



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Doctorado en Biotecnología

**Bases moleculares de la especificidad en el mecanismo de
transducción de señal en los sistemas de dos
componentes bacterianos**

Cristina Mideros Mora

Memoria presentada por Cristina Mideros para optar al grado de
Doctora por la Universidad Politécnica de Valencia.

Dirigida por el Dr. ALBERTO MARINA MORENO y co-dirigida por la
Dra. PATRICIA CASINO FERRANDO

Tesis Doctoral

Noviembre 2020

El camino siempre es más fácil si alguien camina a tu lado
y son tu inspiración, mis hermanos
pero si el camino es duro siempre la ilusión y los juegos
te ayudarán a continuar, mi hijo

Agradecimientos

Este trabajo no habría sido posible sin el apoyo y ayuda de muchas personas a las que me gustaría agradecer. En primer lugar, a mis directores Alberto y Patricia. Alberto me recibió en su laboratorio sin conocerme y sabiendo que estaba haciendo un cambio de area, por esto le agradezco por su confianza y todo lo que me ha enseñado. A Patricia por no solo haber sido una gran maestra, por haber estado a mi lado todo el tiempo sin dejar de exigir y de enseñar, también por haber sido como una madre para mi con la que podía hablar de todo.

A mis compañeros de laboratorio, Paqui, Rafa, Christian, Carla, Anmol y Alonso por todas las conversaciones, música, experimentos, planificaciones, ayudas y sobre todo los magníficos almuerzos compartidos. Con un ambiente como el que se tenía con ustedes era fácil trabajar todos los días. A los muy mejores amigos, Elisa, Laura, Sara y Jordi, porque con ustedes la amistad fue un poco más allá y es un gusto haber conincido con ustedes.

A toda la gente del IBV, porque cruzarse con ustedes por los pacillos de verdad permitían que uno se sintiera en casa. Gracias por todos los favores pedidos y por divertidas cenas y comidas compartidas.

También quiero agradecer a mis compañeros de vida, Diego y Martín, por haber estado todo este tiempo conmigo y haber sido el motor y la inspiración para no rendirse. A “los tíos” por haber sido nuestra pequeña familia a miles de kilómetros de las nuestras.

Por último, pero no menos importe a mi familia, mi padre por ser el empuje que me llevó hasta aquí, mi madre por ser la fuerza que hace falta para cumplir las metar y mis hermanos por siempre ser el ejemplo a seguir que nunca me ha faltado.

Resumen

El contexto de esta Tesis se enmarca en los sistemas de dos componentes (TCS) para comprender el mecanismo de transducción de la señal. Se analizó la especificidad en el reconocimiento de los TCS abarcando estudios a nivel funcional, estructural y evolutivo.

Primero se utilizó el sistema HK853-RR468, que al estar previamente caracterizado nos permitió analizar específicamente las regiones de reconocimiento (HK-RR) correspondientes a los L β 3 α 3 y L β 4 α 4 de RR468 mutando residuos que determinarían la influencia en la transferencia del grupo fosfato. Los mutantes se caracterizaron de manera bioquímica y se hicieron aproximaciones estructurales pudiendo asignar la reacción de fosfotransferencia a una estructura formada por un complejo entre HK853 y RR468 mutante. Esta estructura nos permitió observar el carácter disociativo de dicha reacción que ha sido descrito previamente y la nula participación del dominio CA. Al mismo tiempo, se analizó la influencia del pH en los residuos catalíticos de la HK y el RR (His y Asp), utilizando un rango de pH de 5 a 8. Los ensayos bioquímicos generados en este rango nos mostraron como la His catalítica perdía su carácter nucleofílico cuando el pH se acercaba y disminuía de 6. Esto se relaciona con el pKa del anillo de imidazol presente en el residuo de His, que se encuentra en torno a 6 y la pérdida de protonación. También se cristalizó el complejo HK-RR a diferentes pHs donde observamos que la His adquiría un rotámero *gauche*- que se asignaba a un estado inactivo o de reposo.

Por otra parte, se analizó la influencia de la mutación G63V en el RR OmpR, que fue descrita como una mutación relacionada con la resistencia al antibiótico ertapenem. Para esto se generaron mutantes en OmpR en la posición G63, tanto en el dominio REC aislado como en la proteína completa. Los estudios bioquímicos de estas mutaciones demostraron como la mutación en esta posición disminuía la capacidad del RR para fosforilarse e incluso a dimerizar. Esto afectaba a la afinidad de este RR para interactuar con su ADN correspondiente, las cajas *ompF* y *ompC*. Estos efectos se lograron evidenciar con la estructura de OmpR_{REC}^{G63V}, donde se observó como la mutación generaba un cambio conformacional al reducir el tamaño

del L β α 3 y generaba un bolsillo hidrofóbico donde quedaba atrapada la cadena lateral de la Val.

Finalmente se analizó el aspecto evolutivo de la señalización, para lo que se buscaron organismos endosimbiontes que presentaran una HK y uno o varios RRs. Estas características nos sugerían que la menor presión selectiva nos iba a permitir encontrar organismos con TCSs menos evolucionados cuya especificidad se haya visto reducida. Se analizaron los sistemas de *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Simkania negevensis* y *Methanobrevibacter* sp. Abm4. Solo pudo evidenciarse reacción de fosfotransferencia en el sistema perteneciente a *Methanobrevibacter*, el cual presenta una HK y 4 RRs. Sin embargo, esta fosfotransferencia presentaba una eficiencia diferenciada, siendo más rápida en RR_{Met572} y RR_{Met589-1} mientras que era nula en RR_{Met589-2}. Por su parte las HKs de *C. trachomatis* y *S. negevensis*, fueron capaces de fosfotransferir, de manera no selectiva, a RR468, probablemente debido a la alta similitud que presenta la hélice α 1 de las HKs con HK853. La aproximación estructural de estos sistemas permitió obtener las estructuras de los RRs_{Met589-1} y RR_{Met572}, ambos en estado no fosforilado. Las dos estructuras presentaron grandes diferencias conformacionales a partir del L β α 4. Esto sugiere que sus mecanismos de reconocimiento con HK_{Met} y de regulación son diferentes lo que apoya la selectividad diferenciada entre los RRs de este sistema.

Resum

El context d'aquesta Tesi s'emmarca en l'estudi dels sistemes de dos components (TCS) amb la finalitat d'entendre el seu mecanisme de transducció de senyal. En aquesta Tesi s'aprofundí en l'especificitat de reconeixement mostrat pels TCS realitzant estudis a nivell funcional, estructural i evolutiu.

Utilitzant com a model el TCS HK853-RR468, analitzarem les regions L β 3 α 3 y L β 4 α 4 del regulador de la resposta (RR) RR468, que prèviament en altres treballs s'havien mostrat importants en el reconeixement de la histidina quinasa (HK), generant mutants i determinant la influència en la transferència del grup fosforil. Els mutants foren caracteritzats bioquímicament, observant que afectaven a una reacció específica de les catalitzades pel sistema y permetent-nos utilitzar aproximacions estructurals que captaren la reacció de fosfotransferència en una estructura formada per un complex entre HK853 i RR468 mutants. Aquesta estructura en va permetre observar el caràcter dissociatiu d'aquesta reacció, el qual havia estat descrit prèviament, i la nul·la participació del domini CA de la HK en la reacció. Al mateix tems, s'analitzà l'efecte del pH sobre la reacció catalitzada durant la transducció del senyal utilitzant els TCS models HK853-RR468 i EnvZ-OmpR. Els assajos bioquímics generats dins del rang de pH entre 5 i 8 ens mostraren com la His de la HK catalítica perdía el seu caràcter nucleofílic quan el pH s'aproximava i disminuïa de 6, valor del pKa de l'anell d'imidazole de la cadena lateral del residu d'His, indicant que aquesta disminució en l'activitat es correlacionava amb el canvi en la protonació de l'anell. Un exhaustiu estudi estructural del complex HK853-RR468 a diferents pHs mostrà que la His catalítica sempre adquiria un rotàmer *gauche*-independentment del valor del pH, invalidant el model que proposava que el pH regulava l'activitat de les HKs de la família HisKA induint un canvi en l'estat rotamèric de la His catalítica.

D'altra banda, s'analitzà la influència de l'efecte de la mutació G63V en el RR OmpR, que fou descrita com una mutació relacionada amb la resistència a l'antibiòtic *ertapenem*. Amb aquesta finalitat, es generaren mutants a OmpR a la posició G63 tant al domini REC aïllat com a la proteïna completa.

Els estudis bioquímics d'aquestes mutacions demostraren com la mutació en aquesta posició disminuïa la capacitat del RR per fosforilar-se i per dimeritzar, afectant a la capacitat d'OmpR per interaccionar amb les seqüències d'ADN palindròmiques diana, corresponents a les caixes *ompF* i *ompC*. Aquests efectes es visualitzaren a nivell molecular al resoldre l'estructura del mutant G63V d'OmpR_{REC}, on s'observava com la mutació induïa un canvi conformacional al reduir la mida del Lβα3 i generant una butxaca hidrofòbica degut a la presència de la nova Val en posició 63. Aquests canvis es transmeten a la resta de l'estructura d'OmpR produint canvis en Lβα4 i α4 que impedeixen la formació d'una superfície de dimerització competent, mantenint a OmpR en forma monomèrica i impedit la seua interacció amb l'ADN.

Finalment, s'analitzà l'aspecte evolutiu de l'especificitat HK-RR i amb aquesta finalitat es buscaren organismes endosimbionts que presentaren TCS aïllats consistent en una HK i un o diversos RRs. Aquestes característiques ens suggerien que la menor pressió selectiva ens anava a permetre trobar organismes amb TCS menys evolucionats, on l'especificitat dels quals s'haguera vist reduïda. S'analitzaren HKs i RRs presents en *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Simkania negevensis* i *Methanobrevibacter* sp. Abm4. La reacció de fosfotransferència sols es va poder detectar en *Methanobrevibacter*, que presenta una sola HK i 4 RRs. Aquesta HK mostrà eficiència diferenciada per a la reacció de fosfotransferència, presentant major velocitat per als RRs RR_{Met572}, RR_{Met589-1} i nul·la per a RR_{Met589-2}. Per la seua banda, les HKs de *C. trachomatis* i *S. negevensis*, foren capaces de transferir, de manera no selectiva, a RR468 de *Thermotoga maritima*, probablement degut a l'alta similitud que presenta l'hèlix α1 de les HKs amb HK853. L'aproximació estructural d'aquests sistemes ens va permetre resoldre les estructures dels RRs_{Met589-1} i RR_{Met572}, ambdós en estat no fosforilat. Les dues estructures presentaren grans diferències conformacionals a partir del Lβα4, els que ens suggereix que els seus mecanismes de reconeixement amb HK_{Met} i de regulació són diferents, cosa que suporta la selectivitat diferenciada entre els RRs d'aquest sistema.

Abstract

The context of the Thesis is framed in the two component systems (TCS) to understand the signal transduction mechanism. The specificity in the recognition of TCS was analyzed covering studies at the functional, structural, and evolutionary level.

First, the previously characterized HK853-RR468 was used, this allowed us to analyze specific recognition regions corresponding to $L\beta 3\alpha 3$ and $L\beta 4\alpha 4$ of RR468 and induce mutations in these regions and understand the recognition between HK and RR and determine the phosphate group transfer's influence. The mutants were characterized biochemically, and structural approximations were prepared, thus assigning the phosphotransfer reaction in a formed structure by an HK8536 and a mutant RR468 complex. This structure allowed us to observe the dissociative character of this reaction that has been previously described and the null participation of the CA domain. Simultaneously, the influence of pH on the catalytic residues of HK and RR (His and Asp) was analyzed, using a pH range of 5 to 8. The biochemical assays generated in this range showed how HK's catalytic His lost the nucleophilic characteristic when pH reached six or below. This is related to the pK_a of the imidazole ring present in the His residue that is found around 6 and the loss of protonation. The HK853-RR468 complex was also crystallized at different pHs where we observed that His acquired a *gauche*-rotamer that was assigned an inactive or resting state.

In addition, the influence of mutation G63V in the RR OmpR was analyzed. This mutation was associated with resistance to the antibiotic ertapenem in *E. coli*. For this, mutants in OmpR were generated in position G63 in both the isolated REC domain and in the whole protein. Biochemical studies of these mutations showed how the mutation in this position reduced the capacity of RR to phosphorylate and even to form a dimer. This affected the affinity of the RR to interact with its corresponding DNA, the boxes *ompF* and *ompR*. These effects were shown with the structure of the REC domain of the OmpR protein mutant G63V. This mutation generated a conformational change by reducing the $L\beta 3\alpha 3$ and generating a hydrophobic pocket that trapped Val's lateral chain.

Finally, the evolutive aspect of signaling was analyzed. For this, endosymbiotic organisms that had one HK or many RRs were identified. These characteristics suggested that lower selective pressure would allow us to find organisms with TCSs that showed lower KH-RR specificity. The systems of *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Simkania negevensis*, and *Methanobrevibacter* sp. Abm4 were analyzed. The phosphotransference reaction was only evident in the the *Methanobrevibacter* system. This system presents only one KH and four RRs. This HK shows differentiated efficiency in the phosphotranference. It has a higher speed in RRMet572, RRMet589-1 and it is null in RRMet589-2. On the other hand, the HKs of *C. trachomatis* y *S. negevensis* were able to transfer in a nonselective manner the RR468 of *T. maritima*. This is due to the similarity between the α 1 helix of the HKs with HK853. The structural approach of there systems allowed us to obtain the structure of RRMet589-1 y RRMet572, both in a non-phosphorylated state. The two structures presented large conformational differences from $L\beta\alpha$ 4. This suggests that the recognition mechanisms with KHMt and regulation are different. This supports differentiated selectivity between the RRs in this system.

Índice

1.	Introducción	1
1.1.	Sistemas de Dos Componentes	3
1.2.	Arquitectura y clasificación de los TCS.....	4
1.2.1.	Histidinas Quinasas.....	5
1.2.2.	Reguladores de la Respuesta.....	16
1.3.	Mecanismos enzimáticos de la transducción de la señal en TCS.....	21
1.3.1.	Detección y transmisión del estímulo	22
1.3.2.	Autofosforilación	23
1.3.3.	Reacción de Fosfotransferencia	26
1.3.4.	Reacción Fosfatasa	28
1.4.	Distribución y evolución de los TCS	29
1.5.	Reconocimiento y especificidad.....	31
1.6.	Importancia en la biomedicina	34
2.	Objetivos	37
3.	Materiales y Métodos	41
3.1.	Técnicas de biología molecular.....	43
3.1.1.	Clonación de genes	43
3.1.2.	Mutagénesis dirigida.....	46
3.2.	Producción de proteínas	49
3.2.1.	Expresión de proteínas	49
3.2.2.	Purificación de proteínas	50
3.3.	Métodos de caracterización de proteínas.....	53
3.3.1.	Separación de proteínas en función de su estado nativo o desnaturalizado	53
3.3.2.	Cuantificación de proteínas.....	55
3.4.	Caracterización de proteínas fosforilables	55
3.4.1.	Ensayos de fosforilación con [γ - ³² P] ATP	55
3.4.2.	Ensayos de fosforilación y desfosforilación de los RR utilizando AcP ³²	58

3.4.3.	Visualización de la fosforilación de OmpR mediante cromatografía de exclusión molecular	60
3.5.	Cálculo de la afinidad por interferometría en bicapa (BLI)	60
3.5.1.	Sistema HK853-RR468	61
3.5.2.	Sistema EnvZ-OmpR.....	61
3.5.3.	Sistema <i>Methanobrevibacter</i> sp.	61
3.6.	Ensayos de movilidad electroforética (EMSAs)	62
3.7.	Ensayos en geles de Phos-tag.....	63
3.8.	Ensayos de Cristalización	63
3.8.1.	Cristalización del complejo HK853-RR468 en sus variantes silvestres y mutantes	64
3.8.2.	Cristalización de OmpR _{REC} ^{G63V}	66
3.8.3.	Cristalización de la HK ancestral HK _{Met}	66
3.8.4.	Cristalización de RRs RR _{MET589-1} y RR _{MET572} de <i>Methanobrevibacter</i> sp.	66
3.9.	Recogida de datos y procesado	66
4.	Resultados	69
4.1.	Estudio funcional y estructural de la reacción de fosfotransferencia 71	
4.1.1.	Reacción de fosfotransferencia en HisKA HKs.....	72
4.1.2.	Efecto de mutaciones en RR468 sobre las actividades de fosfotransferencia y fosfatasa	73
4.1.3.	Estructuras del complejo HK853 con los mutantes de RR468 .80	
4.2.	Estudio funcional y estructural de la influencia del pH en las reacciones enzimáticas.....	99
4.2.1.	Disposición de la His fosforilable en HKs de la familia HisKA.....	100
4.2.2.	Estructuras del complejo HK853-RR468 a distintos pHs.....	103
4.2.3.	Efectos del pH en la actividad fosfatasa de HK853 – RR468.116	
4.2.4.	Influencia del pH en las actividades de autofosforilación y fosfotransferencia de HK853	120
4.2.5.	Influencia del pH en las actividades del sistema EnvZ-OmpR.....	124
4.3.	Caracterización de una mutación clínica en el TCS EnvZ-OmpR ..127	

4.3.1.	Efecto de la fosforilación de OmpR en el residuo Gly63	129
4.3.2.	Interacción de los mutantes de OmpR en Gly63 con EnvZ	133
4.3.3.	Interacción de los mutantes de OmpR en Gly63 con los promotores ompF y ompC	137
4.3.4.	Estructura cristalina de OmpR _{REC} ^{G63V}	139
4.4.	Estudio evolutivo de la especificidad en el reconocimiento HK – RR	146
4.4.1.	Búsqueda de TCS que presenten “cross-talk”	147
4.4.2.	Autofosforilación de las HKs	155
4.4.3.	Fosfotransferencia a los RRs	157
4.4.4.	Reconocimiento de HK _{Met} por RRs de Methanobrevibacter sp. Amb4	161
5.	Discusión General	169
5.1.	Estudio funcional y estructural de la reacción de fosfotransferencia	171
5.2.	Estudio funcional y estructural de la influencia del pH en las reacciones enzimáticas	174
5.3.	Caracterización de una mutación clínica en el TCS EnvZ-OmpR ..	176
5.4.	Estudio evolutivo de la especificidad en el reconocimiento entre HK y RR	178
6.	Conclusiones	181
7.	Referencias	185

1. Introducción





1.1. Sistemas de Dos Componentes

La capacidad que tienen los organismos para adaptarse al medio que los rodea garantiza su supervivencia. Para ello, tienen que ser capaces de evaluar los cambios ambientales y generar una respuesta adaptativa rápida. Los sistemas de transducción de señales son los encargados de detectar el estímulo externo y transmitir la información al medio intracelular para generar respuestas específicas. Las respuestas generadas pueden estar involucradas en la fisiología celular, la regulación génica o en actividades catalíticas. Sin embargo, a pesar del gran número de señales recibidas por las células, tanto en organismos procariontas como eucariotas, el mecanismo molecular más común para su transducción está basado en cascadas de fosforilación de proteínas en residuos específicos (West & Stock, 2001).

En 1986 se describió bioquímicamente un sistema de transducción de señal involucrado en regulación génica frente a la disponibilidad de nitrógeno en *Escherichia coli*. Ninfa y Magasanik descubrieron que en dicho sistema regulador la proteína NR_{II} regulaba la fosforilación de la proteína NR_I actuando como quinasa/fosfatasa. Siendo NR_I fosforilada la encargada de activar la expresión de los genes involucrados en la regulación celular del ciclo del nitrógeno (Ninfa & Magasanik, 1986). Fue en el mismo año cuando Nixon y colaboradores determinaron la similitud entre proteínas de distintos organismos con NR_{II} y NR_I , ya que eran capaces de sentir estímulos ambientales y desencadenar respuestas a través de la regulación de genes (Nixon *et al.*, 1986). Estas similitudes condujeron a la descripción de un nuevo sistema de transducción de señales en bacterias basados en la actividad de dos proteínas, donde una de ellas actúa como sensora y quinasa, y la otra que actúa como efectora tras su fosforilación; por esta característica fueron denominados Sistemas de Dos Componentes (TCS).

Años después y gracias a la continua investigación en estos sistemas, Weiss y Magasanik determinaron que la proteína sensora se fosforilaba en un residuo de histidina (His) y la efectora en un residuo de ácido aspártico (Asp) (Weiss & Magasanik, 1988). Al mismo tiempo, se describió por primera vez un sistema de *Escherichia coli* que cumplía las mismas características, CheA-CheY, siendo un residuo de His conservado en la proteína sensora CheA el primero en fosforilarse después de la detección de la señal extracelular, y

después un residuo de Asp era el residuo fosfoceptor ubicado en la proteína efectora CheY (Hess et al., 1988; Sanders et al., 1989). Estos hallazgos evidenciaron que los TCS constituían un sistema de transducción de señales totalmente diferente a los previamente conocidos y descritos en células eucariotas y que se basaba en la fosforilación en residuos de Ser, Thr ó Tyr (West & Stock, 2001).

Los TCS son sistemas de señalización sofisticados donde existen dos moléculas claramente separadas, las cuales se han adaptado e integrado en una gran variedad de señalizaciones celulares (Stock *et al.*, 2000; Buschiazzo & Trajtenber, 2019). El sistema prototipo está compuesto por una proteína sensora/quinasa, generalmente transmembrana, llamada histidina quinasa (HK del inglés Histidine Kinase) y una proteína efectora llamada regulador de la respuesta (RR del inglés Response Regulator). La activación del RR se da por el proceso de fosfotransferencia llevado a cabo desde la HK, donde un grupo fosforilo se transfiere desde un residuo conservado de His en la HK hasta un residuo conservado fosforilable de Asp en el RR. El RR activado es capaz de controlar una gran cantidad de procesos esenciales dentro de la célula: como la resistencia a antibióticos (Parkinson & Kofoid, 1992; Grebe & Stock, 1999; Hoch, 2000), virulencia (Beier et al., 1995), la adquisición de nutrientes y su metabolismo (Makino et al., 1986; Bott, 1997), adaptación física y química al medio (Fuhrer & Ordal, 1991), regulación aeróbica/anaerobia en *E. coli* (Iuchi & Weiner, 1996; Uden & Bongaerts, 1997) o esporulación en *Bacillus subtilis* (Hoch, 1993; Perego, 1998) entre otros. La importancia de estos procesos para la supervivencia celular hace que su correcto funcionamiento sea imprescindible para la adaptación, lo que conlleva al éxito evolutivo.

1.2. Arquitectura y clasificación de los TCS

Como la mayoría de los sistemas de transducción de señales, los TCS son sistemas modulares basados en dominios variables que permite la captación de diferentes señales junto a dominios catalíticos conservados esenciales para su función de transducción. Las HKs son generalmente proteínas transmembrana que contienen un dominio sensor en la parte extracelular

que presenta gran variabilidad para poder detectar diferentes señales. El dominio transmembrana es variable; aunque en la mayoría de las HKs está formado por dos hélices transmembrana (TM) como en el caso de EnvZ, una HK prototípica que está involucrada en la osmorregulación. Sin embargo, otras HK como UhpB que participa en la regulación del transporte de azúcares presenta ocho segmentos transmembrana. Por otra parte, algunas HKs como CheA, implicada en la quimiotaxis, no contienen dominio transmembrana y se encuentran solubles en el citoplasma detectando estímulos intracelulares mediante la interacción con otras proteínas de membrana o reconociendo señales del citoplasma (Lois et al., 1993; Stock et al., 2000). En la parte citoplasmática, se encuentran los dominios conservados catalíticos de la HK que permiten la autofosforilación en un residuo conservado fosforilable de His.

Por su parte el RR prototípico presenta dos dominios funcionales, un dominio receptor de la señal y un dominio efector. El dominio receptor (REC domain) está altamente conservado e incluye un residuo conservado fosforilable de Asp que recibe el grupo fosforilo desde la fosfo-His de la HK creando un grupo acíl fosfato de gran energía que activa al RR. Por su parte el dominio efector suele ser más variable en su naturaleza. En la mayoría de los casos tiene capacidad de unir ADN actuando como regulador transcripcional, sin embargo, también se han descrito RRs con actividad enzimática, capaces de unir al ARN o a otras proteínas. Se ha observado que alrededor del 15% de los RRs bacterianos carecen de un dominio efector presentando únicamente el dominio aceptor (Gao et al., 2007).

1.2.1. Histidinas Quinasas

Las HKs son el vínculo principal entre la señal y la respuesta, ya que presentan una región sensora en la parte N-terminal correspondiente a dominios sensores y una región catalítica en la parte C-terminal correspondiente a la porción catalítica. Esta porción catalítica se divide en dos dominios bien diferenciados, uno de dimerización que contiene la His conservada fosforilable y otro encargado de unir el sustrato ATP. Los dominios catalíticos son citoplasmáticos, sin embargo, los dominios sensores pueden encontrarse tanto en la región extracelular como en el citoplasma (Casino et al., 2010) (Gao & Stock, 2009) (Figura 1.1).

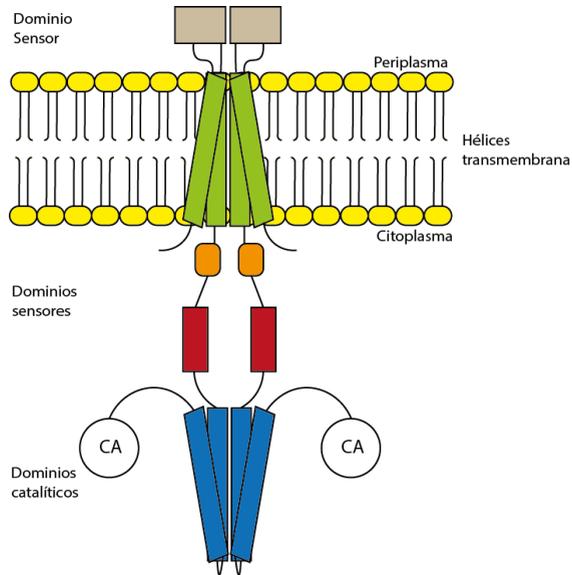


Figura 1.1. Esquema de la HK. Esquema de los dominios canónicos de una HK. En gris, los dominios sensores extracelulares; en verde, hélices transmembrana; en naranja y rojo los dominios sensores citoplasmáticos; en azul, el dominio DHP; en blanco, el dominio CA.

1.2.1.1. *Región sensora*

EL 73% de las HKs cuya secuencia se encuentra actualmente en bases de datos muestran la presencia de hélices transmembrana y por lo tanto se considera que están asociadas a membrana. En general, el extremo N-terminal de estas HKs comienza en el citoplasma y se inserta en la membrana a través de una hélice α transmembrana (TM1) que conecta con un dominio extracelular que actuaría como sensor. El final de este dominio sensor conecta con una segunda hélice transmembrana (TM2) que acaba en el citoplasma donde se encuentra la porción catalítica y en ocasiones dominios sensores adicionales citoplasmáticos (Jacob-Dubuisson et al., 2018).

Dominios sensores extracelulares

Dependiendo de si la bacteria es Gram positiva o negativa el dominio sensor extracelular se encontraría en la región extracelular o el espacio periplasmático, respectivamente (Wolanin et al., 2002). Los dominios sensores extracelulares encontrados en las HKs son extremadamente diversos, sin embargo, el más abundante es el dominio PDC, el cual toma su nombre por las HKs PhoQ, DcuS y CitA, para las cuales se obtuvo la estructura de este dominio en primer lugar (Shah et al., 2013). Este dominio es muy similar al dominio sensor citoplasmático PAS (PER-ARNT-SIM) que presenta un plegamiento α/β , y contiene un centro catalítico donde el ligando señalizador es unido y reconocido. La región sensora puede incluir diversos dominios sensores en tándem, como en el caso de KinD de *Bacillus subtilis* que presenta varios dominios PDC en tándem para detectar pequeñas moléculas (Wu et al., 2013). También se pueden encontrar dominios sensores formados solo por hélices α , como en el caso de NarX de *E. coli*, que permite detectar nitritos y nitratos (Cheung et al., 2009) (Figura 1.2).

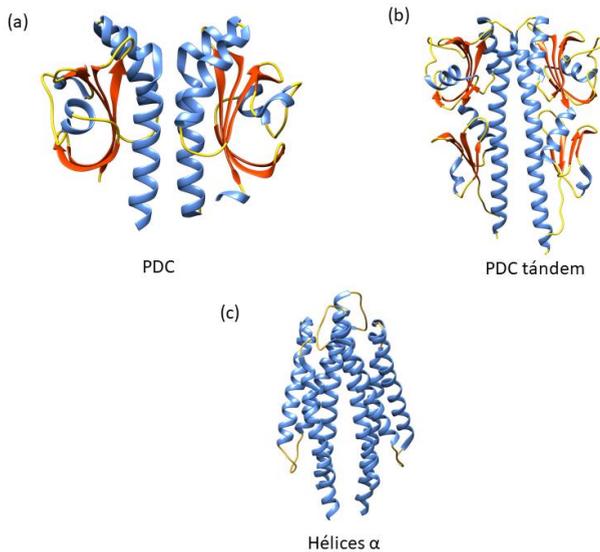


Figura 1.2. Estructura tridimensional de los dominios sensores extracelulares.

Ejemplos de los dominios sensores, donde encontramos en azul las hélices α ; en rojo las hebras β ; y en amarillos los loops de conexión. (a) dominio PDC de CitA (PDB: 2J80), (b) dominio PDC en tándem de KinD (PDB: 4JGO), (c) hélices α de TorS (PDB: 3ATP) similar al encontrado en NarX.

Los dominios sensores están conectados con las hélices α transmembrana (TMs). Éstas tienen una longitud de alrededor de 20 residuos y son las encargadas de la transducción de la señal desde el dominio sensor a la región citoplasmática través de rotaciones y/o translaciones que conllevan movimientos estructurales para activar o desactivar el sistema.

Los estudios estructurales de los dominios sensores han ayudado a determinar que existe una plasticidad en la región de dimerización, donde la afinidad depende del estado de señalización. Esta plasticidad tiene una gran importancia funcional ya que permite los movimientos necesarios para realizar la transducción de la señal. Esto se ha visto en varias HKs como es el caso de CitA donde la unión del ligando produce una distorsión en las hebras β de los dominios sensores, lo cual desencadena un movimiento tipo pistón que se propaga a los dominios catalíticos (Cheung & Hendrickson, 2009).

Dominio sensor citoplasmático

Además de los dominios sensores extracelulares que permiten a la bacteria percibir su entorno, muchas HKs presentan dominios sensores citoplasmáticos que permiten percibir señales intracelulares y/o que modulan la señal extracelular. En estos se encuentran:

- Dominio HAMP

Es uno de los dominios sensores más abundantes, recibe su nombre porque se encuentra en HKs, Adenilato ciclase, proteínas de quimiotaxisceptoras de Metilo y Fosfatasas (Phosphatases en inglés). Está formado por dos hélices α paralelas que constan de unos 50 residuos y que por la naturaleza dimérica de las HKs forman un haz de 4 hélices. Este dominio está presente en el 30% de las HKs y suele unir la última hélice transmembrana o TM2 con los dominios catalíticos (Hulko et al., 2006; Bhate et al., 2015).

Recientemente se ha descrito un nuevo dominio que tiene una estructura similar al dominio HAMP, denominado STAC “Signal Transduction Associated Component” y que está formado por una hélice α . Aunque todavía no se tiene clara su función, se cree que está involucrado en la transducción de la señal al conectar los dominios catalíticos y la hélice transmembrana (Korycinski et al, 2015) (Figura 1.3).

En el año 2017, se publicó la estructura cristalina de una región sensora completa correspondiente a la HK NarQ de *E. coli* que detecta Nitrito/Nitrato. Esta estructura contenía la TM1, el dominio sensor extracelular formado por hélices α , la TM2 y un dominio sensor citoplasmático helicoidal denominado HAMP. El dominio sensor extracelular se cristalizó tanto en ausencia como en presencia de ión nitrato. De esta forma, se logró determinar que la unión de ligando producía un movimiento tipo pistón en las TMs el cual se amplificaba o transducía al dominio HAMP provocando una rotación helicoidal (Gushchin et al., 2017). Un estudio reciente en la HK NsaS de *S. aureus* corroboró que la rotación helicoidal es el método a través del cual se transduce la señal a los dominios catalíticos, (Bhate et al., 2018).

- Dominio PAS y dominio GAF

El dominio PAS, nombrado anteriormente, recibe su nombre de tres proteínas que lo contienen Per: proteína del periodo circadiano, Arnt: proteína translocadora del receptor nuclear Ah y Sim: proteína “single-minded” que regula el desarrollo del sistema nervioso central de *Drosophila*. Este dominio es capaz de detectar pequeños nutrientes y está formado por una hoja β antiparalela de cinco hebras cubiertas por hélices α . Generalmente, se encuentra conectado con los dominios catalíticos (Henry & Crosson, 2011).

Por su parte el dominio GAF, recibe su nombre de las enzimas donde se encontraba de forma recurrente como “cGMP-specific phosphodiesterases”, “Adenylyl cyclases” y “Formate hydrogenases” y es capaz de detectar gases del tipo O_2/NO , como se ha demostrado en el TCS DevS-DevL (Cheung & Hendrickson, 2010). Este dominio está formado por una hoja β antiparalela central formada por seis hebras que está flanqueada en una de sus caras por cuatro hélices α (Ho et al., 2000) (Figura 1.3).

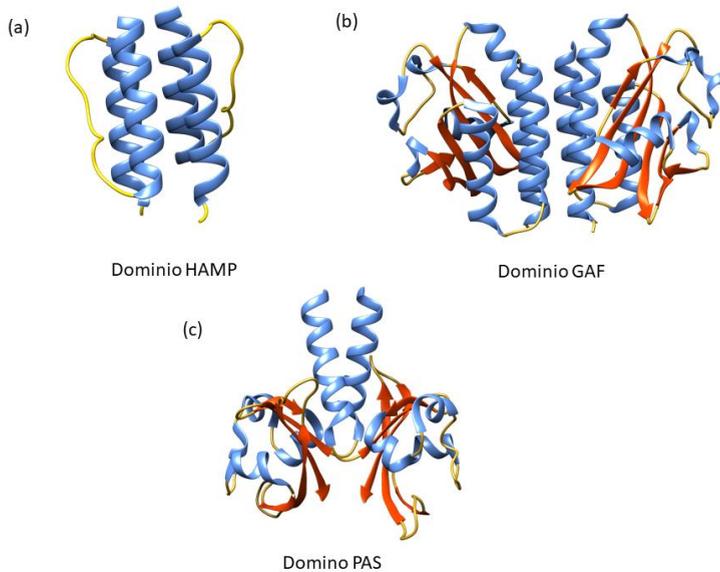


Figura 1.3. Estructura tridimensional de los dominios sensores citoplasmáticos.

Ejemplos de los dominios sensores, donde encontramos en azul las hélices α ; en rojo las hebras β ; y en amarillo los loops de conexión. (a) dominio HAMP de Af1503 (PBD: 3ZRX), (b) dominio GAF de NtrC2 (4G3V), (c) dominio PAS de CovS (4I5S).

1.2.1.2. *Región catalítica*

La región catalítica se encuentra en el citoplasma y está formada por dos dominios. Uno se denomina DHp del inglés “Dimerization Histidine phosphotransfer” que como su nombre indica media la homodimerización de la HK y contiene el residuo de His fosforilable. Mientras, el otro dominio denominado CA del inglés “Catalytic ATP-binding” es capaz de unir el substrato ATP.

- Dominio DHp

Este dominio está formado por dos largas hélices α antiparalelas ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), conectadas por un loop de longitud variable, las cuales en el homodímero se asocian formando un haz de cuatro hélices con simetría binaria a lo largo del eje helicoidal. En la hélice $\alpha 1$ se encuentra la caja H que contiene el residuo

de His fosforilable conservado y encargado de iniciar la cascada de fosforilación durante la transducción de la señal (Wu et al., 1999).

Según la conservación de los residuos en el dominio, la HKs se pueden subdividir en cuatro subfamilias diferentes: HisKA, HisKA_2, HisKA_3, y HWE_HK, que muestran una abundancia aproximada del 80%, 14%, 3% y 3% respectivamente. La familia HisKA se caracteriza por tener el motivo conservado HE/DxxT/NP tras la His fosforilable, donde los residuos variables E/D y T/N son importantes para la actividad catalítica de la HK. Este motivo varía en cada una de las subfamilias, siendo DxxxQ (Hyunh et al, 2010) en HisKA_3 y RxxN para HisKA_2 y HWE_HK (Willet & Kirby, 2012; Jacob-Dubuisson et al., 2018) (Figura 1.4).

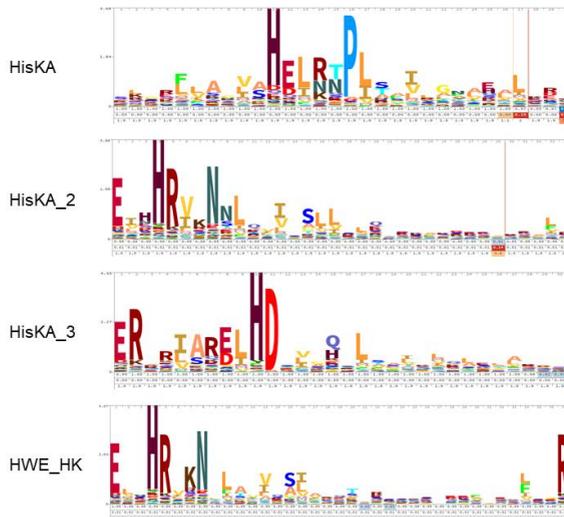


Figura 1.4. Comparación de la secuencia conservada en la hélice $\alpha 1$ de las 4 familias de HK. HMM logo de las familias de HKs, tomado de Pfam.

El análisis comparativo de las estructuras tridimensionales del dominio DHP ha permitido diferenciar tres zonas a lo largo de la hélice $\alpha 1$ (Figura 1.5). La primera zona se encuentra antes de la His fosforilable, la segunda incluye la His y seis residuos consecutivos por lo que esta zona está muy conservada y es importante pues participa en los procesos catalíticos. A continuación, se encuentra la tercera zona, mucho más variable y que comprende el final de

la hélice $\alpha 1$ y el inicio de la hélice $\alpha 2$ incluyendo el loop de conexión entre ambas (Bhate et al., 2015). Se ha visto que modificaciones en esta tercera zona, sobre todo en el loop de conexión, genera diferencias en la disposición relativa de los dominios DHp y CA de las HKs. Esto se observa claramente al comparar el DHp de las HKs EnvZ de *E. coli* y HK853 de *Thermotoga maritima*, donde el loop de conexión se proyecta en direcciones diferentes. Este hecho hace que las disposiciones topológicas relativas de las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ sean diferentes entre HKs (Figura 1.5). Dado que la hélice $\alpha 2$ conecta con el dominio CA, la direccionalidad tiene importancia en la reacción de autofosforilación. Por ello, en unas HKs la autofosforilación se realiza dentro de la misma subunidad del dímero (cis-autofosforilación) mientras que en otras la fosforilación se realiza entre las dos subunidades del dímero (trans-autofosforilación). Sin embargo, a pesar de la diferente direccionalidad, en ambos casos la reacción se cataliza del mismo modo (Casino et al., 2014) (Figura 1.5).

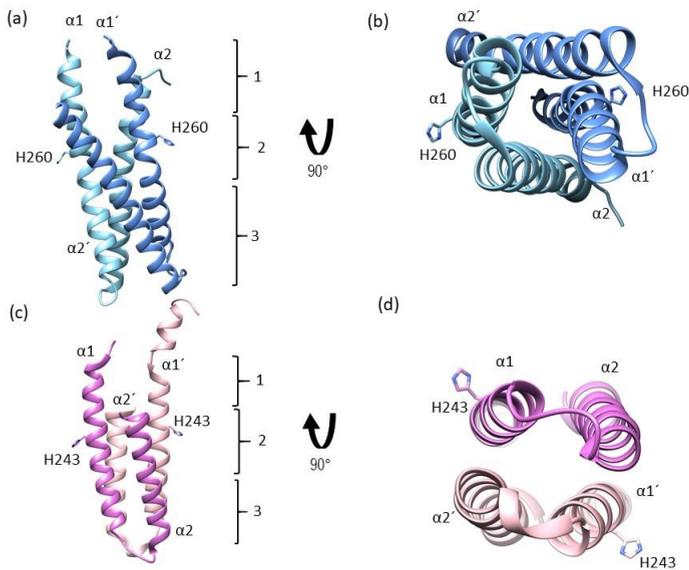


Figura 1.5. Estructura tridimensional del dominio DHp de HK853 (PDB: 3DGE) y de EnvZ (PDB: 5B1O). Haz de cuatro hélices del dominio DHp donde se ven con distintos tonos de color cada monómero. Se observa la cadena lateral de la His fosforilable. **(a)** En HK853 se marcan las 3 zonas identificadas por el análisis estructural. **(b)** En HK853 se observa el haz de cuatro hélices desde la parte inferior, identificando cada una de las hélices. **(c)** En EnvZ se marcan las 3 zonas identificadas por el análisis estructural. **(d)** En EnvZ se observa el haz de cuatro hélices desde la parte inferior, identificando cada una de las hélices.

- Dominio CA

El dominio CA o dominio de unión a ATP tiene homología estructural con los dominios de unión a nucleótido de las ATPasas de la familia GHL (DNA girasaB, Hsp90 y MutL). Esta familia se caracteriza por presentar un plegamiento tipo Bergerat que consiste en un sándwich α/β , con una hoja β antiparalela de 5 hebras cubierta por 3 hélices α (Mizuno, 1997). Entre dos de las tres hélices α y la hoja β se localiza el centro activo que acomoda el ATP y que está cubierto por un loop que hace de tapadera denominado "ATP-lid". El ATP-lid es altamente variable en secuencia y longitud, y presenta gran flexibilidad para permitir la entrada del sustrato ATP y la salida del producto ADP. Datos estructurales del dominio CA obtenidos mediante cristalografía de rayos X han demostrado que la presencia del nucleótido unido al ATP-lid estabiliza su conformación (Bhate et al., 2015) (Figura 1.6).

En el dominio CA se encuentran cinco regiones de secuencia que están altamente conservadas entre HKs y que han ayudado a la identificación de las HKs. Estas secuencias se han denominado cajas N, D, G1, G2 y F (Stock et al., 1989) y tienen una función primordial para la unión del nucleótido y/o la catálisis. La caja N es la que coordina el ion magnesio quelado por los fosfatos del ATP. La caja D ayuda en la especificidad por la adenina del nucleótido de ATP. Por su parte las cajas G son dos regiones ricas en Gly que brindan flexibilidad al bucle que forma el ATP-lid. Finalmente, la caja F se localiza al inicio del ATP-lid anclando este extremo al dominio (Bhate et al., 2015).

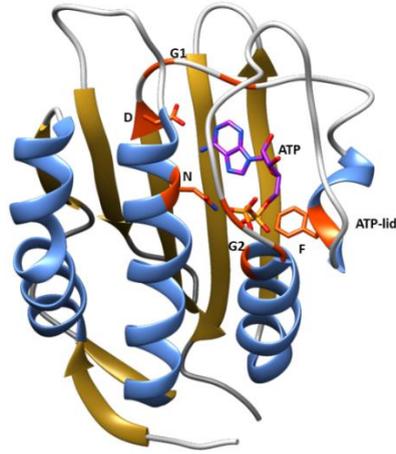


Figura 1.6. Estructura tridimensional del dominio CA.

Dominio CA de HK853 (PDB: 3DGE) presentando las hebras β en color amarillo, las hélices α en azul y los loops en gris. Se resaltan en rojo los residuos correspondientes a las cajas N, D, F, G1 y G2. También se ve la localización del ATP y del ATP-lid.

1.2.1.3. *Clasificación de las HKs*

Durante muchos años la comparación de secuencias se ha utilizado para clasificar a las proteínas de los TCS en varias subfamilias. Para la clasificación de las HKs, en la mayoría de las ocasiones, se han utilizado los dominios catalíticos citoplasmáticos ya que son altamente conservados. Una primera clasificación se basó en la caja H y fue propuesta por Fabret y colaboradores en 1999 (Fabret et al., 1999). En el mismo año Grebe y Stock utilizaron las seis cajas de los dominios catalíticos de las HKs para hacer una clasificación mucho más precisa donde se clasificaron las HKs dentro de 11 subfamilias (Grebe & Stock 1999). Posteriormente se utilizó la organización de la secuencia y la predicción de estructura secundaria de la caja H, esto permitió la inclusión de las HKs pertenecientes a las arqueas (Kim & Forst, 2001).

Estos sistemas de clasificación están en continua evolución debido al aumento del número de secuencias de HKs y al desarrollo de nuevos programas de análisis de estas secuencias que permiten relacionar determinadas subfamilias de HKs con subfamilias de RRs pareja. Sin

embargo, al tomar en cuenta únicamente los dominios catalíticos se olvidan de los aspectos funcionales como los mecanismos para detectar el estímulo y la transducción de la señal por parte de la HK. Comparar directamente los dominios sensores es muy complicado por la gran variedad que presentan, pero si se toma en cuenta la organización de su secuencia junto con las hélices transmembrana y la topología de la membrana se puede hacer una clasificación funcional de las HKs que no necesariamente nos dé información filogenética (Mascher et al., 2006) como se describe a continuación:

Grupo I; Encontramos las HKs con dominios sensores periplasmáticos o extracelulares que en su mayoría detectan solutos y nutrientes. Estas HKs presentan dominios sensores extracelulares y al menos dos TMs, dejando a los dominios catalíticos en otro compartimento celular. Dentro de este grupo encontramos a HKs como: PhoQ de *Salmonella* sp., que regula la modificación del lípido A y otros factores de virulencia incluyendo la resistencia a algunos péptidos antimicrobianos (Fields et al., 1989; Rebeil et al., 2004).

Grupo II; Encontramos HKs que carecen de dominio sensor extracelular y por tanto los estímulos detectados deben ocurrir en la membrana o cerca de ella, asociado a las TMs. Es un grupo altamente diverso ya que el número de TMs puede variar entre 2 y 20, por esta razón se sub-agrupan en base a la función y al número de regiones transmembrana. Dentro del primer subgrupo se encuentran HKs pequeñas con únicamente dos TMs que hasta el momento solo se han encontrado en Gram-positivos; como las HKs VraS de *S. aureus* y LiaS de *Bacillus subtilis*, las cuales están involucradas en la detección de antibióticos que actúan contra la integridad de la pared celular como los β -lactámicos (Kuroda et al., 2003). En el segundo subgrupo se encuentran HKs con 4 y 5 TMs que están involucradas en el control de la fluidez de la membrana como DesK, la cual modula la composición de los ácidos grasos dependiendo de la temperatura (Saita et al., 2015). Con 6 TMs están las HKs tipo RegB y PrrB muy conservadas en organismos fotosintéticos que regulan la generación y utilización de la energía en procesos como fotosíntesis o respiración aeróbica/anaeróbica (Elsen et al., 2004). HKs conteniendo entre 6 y 10 TMs se encuentran principalmente en gram-positivos y están involucradas en el sistema de “quorum sensing” donde sus largas conexiones entre hélices les permite detectar diferentes

péptidos como en el caso de AgrC que está involucrada en la virulencia de *S. aureus* (Lyon & Novick, 2004). Finalmente existen HKs que presentan entre 12 y 20 TMS, como en el caso de CbrA que controla la expresión de varias rutas catabólicas en respuesta a la relación carbono/nitrógeno intracelular (Nishijyo et al., 2001).

Grupo III; Está formado por las HKs con dominio sensor citoplasmático. Este tipo de HKs detectan solutos citoplasmáticos o proteínas señalizadoras del ciclo celular o del estadio de la pared. Pueden presentar dominios anclados en la membrana como es el caso de FixL (Gilles-Gonzalez et al., 1991). También pueden presentar dominios citoplasmáticos asociados a proteínas integrales de la membrana como es el caso de la HK CheA que regula la quimiotaxis en proteobacterias (Bilwes et al., 2003). O pueden presentar dominios con localización permanente citoplasmática como en el caso de NtrB (Krell et al., 2010).

Generalmente, una clasificación de HKs puede correlacionar la arquitectura de dominios, la conservación de secuencia y distribución filogenética, pero existen algunas excepciones que dificultan una única clasificación que pueda tener en cuenta las características funcionales y filogenéticas al mismo tiempo.

1.2.2. Reguladores de la Respuesta

El RR es el componente final de la ruta de señalización y genera la respuesta adaptativa. El RR es una proteína fosforilable citosólica que acepta el grupo fosforilo desde el residuo de His en la HK a un residuo Asp conservado presente en un dominio aceptor denominado REC. Pero el RR también puede aceptar el grupo fosforilo desde pequeñas moléculas fosfodonadoras como acetil fosfato, imidazol fosfato y fosforamidato (Lukat et al., 1992). Además, en muchos casos, los RR son capaces de regular su propia desfosforilación, mediante autohidrólisis, por lo que la vida media de los RR activados varía entre unos pocos segundos hasta varias horas, lo que se suele correlacionar con las características propias de la ruta regulada por el RR (Robinson et al., 2000).

Los primeros genes secuenciados correspondientes a RRs fueron Spo0A de *B. subtilis* y CheY de *E. coli* en los años 1984-1985 (Ferrari et al., 1985;

Matsumura et al., 1984). A nivel estructural, las primeras estructuras cristalinas de un RR fueron obtenidas para CheY de *S. typhimurium* y *E. coli*, presentando estado inactivo y activo/fosforilado respectivamente (Stock et al., 1989; Lee et al., 2001). En la actualidad, existen más de 200 estructuras de RRs en la base de datos “Protein Data Bank” (PDB).

Como se ha comentado anteriormente, la mayoría de los RRs están compuestos de dos dominios. La porción N-terminal de la proteína contiene el dominio aceptor REC que está altamente conservado y es el dominio catalítico de la proteína pues contiene el residuo Asp fosforilable así como otros residuos catalíticos que están involucrados en el proceso de fosforilación. La región C-terminal se denomina efectora pues produce la respuesta final del sistema y presenta una mayor variabilidad. El 20% de los RRs bacterianos no presentan dominio efector y en las arqueas hasta el 50% de los RR carecen de este dominio (Jenal & Galperin, 2009) (Figura 1.7).

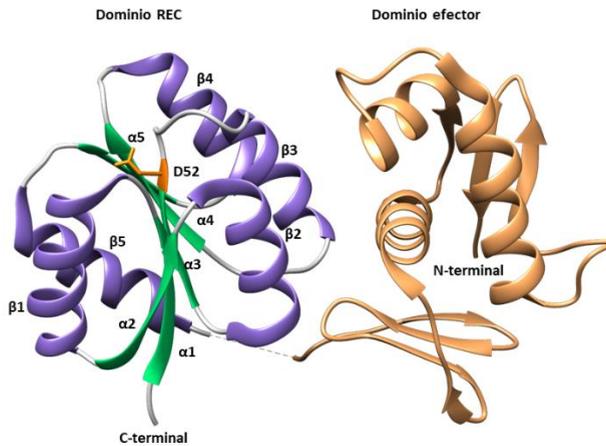


Figura 1.7. Estructura tridimensional de KdpE, RR tipo OmpR/PhoB.

Estructura del RR KdpE (PDB: 4KNY) donde se representan los dos dominios del RR. En morado se observan las 5 hebras β del dominio REC y en verde las 5 hélices α y se resalta en rojo el residuo Asp fosforilable. El dominio efector de unión al DNA (wHTH) aparece coloreado en naranja.

1.2.2.1. *Dominio REC*

Este dominio está compuesto por unos 120 residuos y presenta una estructura secundaria α/β muy conservada formada por un núcleo central con una hoja β paralela de 5 hebras rodeadas por 5 hélices α , colocándose 3 α hélices en una cara de la hoja β y las dos α hélices restantes en la otra. En la estructura, las hojas β y las hélices α se van alternando, de forma que los loops que conectan estos elementos juegan papeles esenciales en la catálisis y oligomerización de la proteína. El centro catalítico está formado por tres residuos ácidos de Asp, y un residuo de Lys. Uno de los Asp se encuentra en el loop que conecta hoja β_3 con la hélice α_3 ($L\beta_3\alpha_3$) siendo este el aceptor del fosfato. Los otros dos Asp se encuentran en el loop de conexión entre β_1 con α_1 ($L\beta_1\alpha_1$) los cuales están implicados en la coordinación del ion de Mg^{2+} que se requiere para estabilizar la fosforilación del RR (Stock et al., 2000). Por su parte, el residuo de Lys en la hebra β_5 interactúa directamente con el grupo fosforilo (Robinson et al., 2000) (Figura 1.7). Cerca del centro catalítico también están presentes otros residuos altamente conservados, como un residuo de Thr o Ser que se encuentra en la conexión de las cadenas β_4 con α_4 y un residuo de Phe/Tyr perteneciente a la β_5 . Una vez fosforilado el RR, el residuo de Thr/Ser sufre un cambio conformacional para interactuar con el grupo fosforilo, generando este cambio un hueco que es ocupado por Phe/Tyr que previamente estaba expuesta al solvente. Estos cambios son cruciales para la activación del RR y se conocen como mecanismo “Y-T coupling” (Djordjevic & Stock, 1998; Robinson et al., 2000).

1.2.2.2. *Dominio Efector*

El dominio efector de los RRs es mucho más variable debido a las funciones que pueden llevar a cabo. En la mayoría de los casos interactúan con el ADN, de forma que los RRs actúan como factores de transcripción, aunque también se ha visto que puede interactuar con el ARN, con otras proteínas o incluso catalizar reacciones enzimáticas. Esta gran variabilidad en los

dominios efectores es lo que ha permitido realizar una clasificación de estas proteínas en base a la arquitectura y estructura de estos dominios. Así pues, podemos distinguir 4 grupos:

Grupo I: RRs que presentan un dominio de unión al ADN. Representan más del 69%, y se divide en varias subfamilias dependiendo de su arquitectura. Los más habituales son dominios prototípicos de unión a DNA del tipo hélice-vuelta-hélice (“helix-turn-helix” HTH) característico de la subfamilia NarL/FixJ (Milani et al., 2005) y el HTH con forma alada “winged” (wHTH) característico de la subfamilia OmpR/PhoB (Martinez-Hackert & Stock, 1997) (Figura 1.7). Ambas subfamilias están muy estudiadas y se sabe que se unen al surco mayor del ADN. Por otra parte, la subfamilia NtrC/DctD posee un dominio AAA+ATPasa fusionado a un dominio HTH tipo Fis (Batchelor et al., 2008). Hace algunos años se describió la subfamilia LytTR cuyos RRs poseen un dominio muy inusual con plegamiento de hebras β (Sidote et al., 2008).

Grupo II: RRs cuyo dominio efector tiene una función enzimática. Representan el 8% de los RRs secuenciados. Dentro de este grupo hay una gran diversificación en su función pudiendo encontrar del tipo GGDEF con actividad diguanilato ciclasa (Chan et al., 2004), otros con actividad metiltransferasa (Djordjevic et al., 1998) o con actividad c-di-GMP fosfodiesterasa (Tamayo et al., 2005).

Grupo III: RRs cuyos dominios efectores son capaces de interactuar con el ARN, estos representan únicamente el 1% y hasta el momento se han descrito únicamente dos: el tipo ANTAR “AmirR and NasR Transcription Antitermination Regulators” que como su nombre indica previenen la terminación de la transcripción mediada por terminadores rho-independientes (Shu & Zhulin, 2002) y el tipo CsrA con capacidad para interactuar con pequeños RNAs (Romero, 1998).

Grupo IV: RRs que no presentan dominio efector. Representan un 14 % y en estos casos es el mismo dominio REC el que interactúa con otras proteínas ejerciendo así su función reguladora. El RR CheY, involucrado en la quimiotaxis de muchos organismos, es el mayor ejemplo de este grupo y realiza su función interactuando con la proteína FliN del flagelo controlando de este modo el movimiento de la bacteria (Szurmant & Ordal, 2004).

Como se ha comentado anteriormente, los dominios presentes en la HK y el RR pueden fusionarse generando HKs más complejas denominadas híbridas que permiten incorporar más de un paso de transferencia de grupo fosforilo. En estos casos, las HKs híbridas han fusionado el dominio receptor REC del RR a sus dominios catalíticos por lo que presentan residuos de Asp fosforilable en su propia cadena polipeptídica (West & Stock, 2001). Así pues, el grupo fosforilo transferido en un primer paso His-Asp se transfiere de nuevo a un dominio fosfotransferasa, denominado HPt (“Histidine-containing-Phosphotransfer”), que puede encontrarse aislado o fusionado también a la HK híbrida y que contiene una His conservada fosforilable. Este dominio es el encargado de hacer llegar el grupo fosforilo al residuo de Asp fosforilable conservado del RR final (Robinson et al., 2000). Estas cascadas de fosforilación, presentes en los TCS complejos, que involucran más de un paso de transferencia de fosforilo son denominadas “phosphorelays” y permiten a las células introducir más de un punto de control en la traducción de la señal (Figura 1.8).

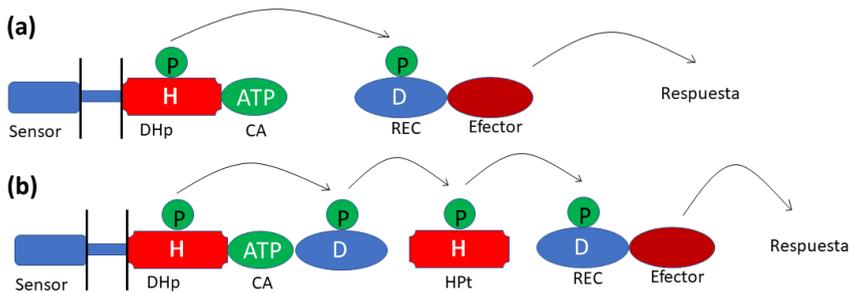


Figura 1.8. Representación de los TCS básicos y los sistemas de fosfotransferencia.

Comparación entre **(a)** un TCS básico formado por una HK y un RR y **(b)** sistema de fosfotransferencia formado por una HK híbrida, la fosfotransferasa Hpt y el RR. Imagen basada en Robinson et al., 2000.

1.3. Mecanismos enzimáticos de la transducción de la señal en TCS

La transducción de señal en TCS presenta diferentes etapas que involucran tres reacciones: i) La detección de un estímulo por la HK que provoca la reacción de *autofosforilación* en el residuo de His conservado del dominio DHp, ii) Posteriormente, la HK fosforilada es capaz de reconocer a su RR correspondiente para realizar la reacción de *fosfotransferencia* al Asp conservado del dominio REC. Una vez fosforilado, el RR sufre cambios conformacionales para adquirir el estado activo que le permite actuar sobre su diana y proporcionar una respuesta celular. Finalmente, iii) la transducción termina con la reacción de *desfosforilación* del RR que puede estar catalizada por la actividad fosfatasa propia del RR o mediada por su HK pareja o por fosfatasas externas (Figura 1.9).

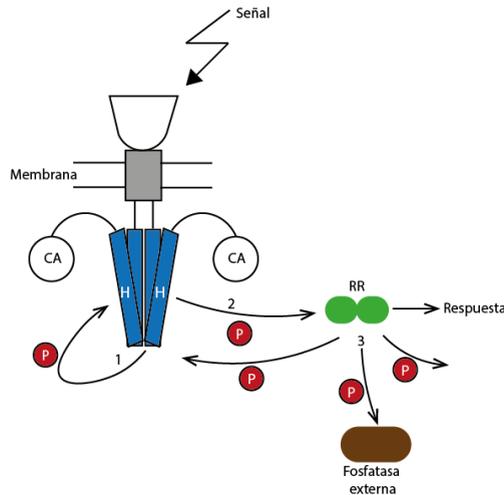


Figura 1.9. Representación de las reacciones llevadas a cabo por los TCS.

Representación de la cascada de fosforilación por las distintas reacciones. La reacción 1 es la autofosforilación de la HK. La reacción 2 corresponde con la fosfotransferencia de la HK al RR. La reacción 3 comprende la desfosforilación del RR que puede ser llevada a cabo por la HK, una fosfatasa interna o la autodesfosforilación por parte del RR.

1.3.1. Detección y transmisión del estímulo

El dominio sensor se encarga de detectar el estímulo y propagar dicha señal a lo largo de las hélices transmembrana hasta los dominios catalíticos para así activar la cascada de fosforilación. La propagación genera cambios conformacionales en el dominio sensor que llegan hasta la última hélice transmembrana o TM2 que conecta con los dominios citoplasmáticos. Como se ha nombrado previamente, la reciente estructura de NarQ y los estudios con NsaS ayudaron a determinar que la recepción de la señal produce un movimiento tipo pistón en las TMs el cual se amplifica o transduce a los dominios sensores intracelulares (Gushchin et al., 2017).

Cuando la señal llega a la región citoplasmática se propaga por los dominios sensores tipo HAMP y PAS hasta llegar a la hélice $\alpha 1$ del dominio DHp donde se encuentra la His fosfoaceptora. Aunque se desconoce cómo se produce el proceso de propagación desde los dominios sensores citoplasmáticos al DHp, el análisis de diferentes estructuras que incluyen el dominio HAMP ha servido para postular un modelo en el que la rotación de las hélices transmembrana, producida al detectar un estímulo, genera una rotación de las hélices del HAMP alterando su empaquetamiento y el de las hélices adyacentes en el DHp (Hulko et al., 2006; Moukhametzianov et al., 2006).

En la transducción de señal se debe tener en cuenta el papel de los fragmentos que conectan los dominios citoplasmáticos sensores HAMP y/o PAS (siendo estos los más comunes) con la hélice $\alpha 1$ del dominio DHp. Estos fragmentos conectores mantienen una longitud constante con un número de residuos múltiplo de siete. Se cree que están involucrados en producir un cambio en la simetría de la señal, es decir, los dominios sensores pueden sufrir modificaciones estructurales de manera simétrica mientras que los dominios catalíticos sufren movimientos asimétricos, como se han observado en las diferentes HKs (Bhate et al., 2015).

Finalmente, los movimientos descritos desde los dominios sensores hasta la hélice $\alpha 1$ del dominio DHp parecen generar movimientos en el haz de cuatro hélices que mantiene el homodímero. Estos movimientos deben generar una modificación en la posición relativa del dominio CA con el DHp, acercando la molécula de ATP a la His fosforilable para producir la autofosforilación o permitir la exposición de la His fosfoaceptora para el

reconocimiento y unión del RR, para que puedan darse los procesos de fosfotransferencia o fosfatasa. Estos movimientos se deben producir gracias a la presencia de loops que conectan estos dominios aportando flexibilidad (Bhate et al., 2015). Precisamente el análisis estructural de algunas HKs, como DesK, permite observar la plasticidad que existe en la disposición relativa entre los dominios DHp y CA. El loop de conexión que existe entre ambos dominios actúa como bisagra permitiendo el movimiento del dominio CA en diferentes orientaciones al DHp, lo que permite a la HK catalizar las diferentes reacciones enzimáticas (Albanesi et al., 2009). De hecho, mutaciones en este loop disminuyen la capacidad de autofosforilación de la HK (Marina et al., 2001; Depardieu et al., 2003).

1.3.2. Autofosforilación

La autofosforilación de la HK es el primer paso del mecanismo enzimático de la transducción de la señal. La estabilidad química del enlace fosforamidato es un elemento clave en la función biológica ya que por su naturaleza lábil es adecuado para la transferencia del grupo fosforilo a otras moléculas (Attwood et al., 2007). En este proceso participan los dominios DHp y CA de las HKs; en el dominio CA se une una molécula de ATP que se atrapa gracias al "ATP-lid" y la hélice $\alpha 5$ dejando el fosfato- γ expuesto y permitiendo que sea atacado por la His fosforilable del dominio DHp (Casino et al., 2010). Las HKs en estado nativo actúan como homodímeros por lo que, para realizar la autofosforilación, el ATP unido al dominio CA debe acercarse a la His para donar el grupo fosforilo. Para esto se deben generar cambios conformacionales que acerquen el dominio CA al dominio DHp. Cuando la interacción de estos dos dominios se realiza dentro de la misma molécula del homodímero se produce una reacción intramolecular denominada *cis-autofosforilación* (Figura 1.10). Por el contrario, si el dominio CA se acerca al DHp de la molécula contraria se producirá una reacción intermolecular denominada *trans-autofosforilación* (Casino et al., 2009). Se ha mostrado que la longitud, y probablemente la composición aminoacídica del loop de conexión entre las dos hélices del dominio DHp, está directamente relacionado con la direccionalidad de la reacción de autofosforilación (Ashenberg et al., 2013; Casino et al., 2014).

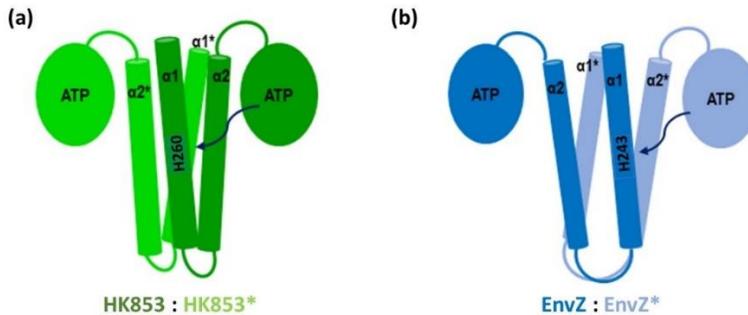


Figura 1.10. Representación de HKs con autofosforilación en *cis* y *trans*

A) Representación de HK853 con autofosforilación en *cis*, donde la hélice α1 con el residuo His fosforilable queda cerca del dominio CA de la misma molécula, dándose una autofosforilación intramolecular. **B)** Representación de EnvZ con autofosforilación en *trans*, donde la hélice α1 con el residuo de His fosforilable, queda cerca del dominio CA de la molécula contraria, dándose una autofosforilación intermolecular.

En la actualidad se han descrito HKs con autofosforilación en *cis* como HK853, Walk, PhoR, y otras en *trans* como EnvZ, CpxA, AgrC, por lo que no puede determinarse que estas enzimas tengan una direccionalidad prioritaria. Aunque para las HKs de la familia HisKA parece haber una correlación entre la direccionalidad del loop de conexión de las hélices α1 y α2 del DHP y la autofosforilación, esta relación parece no mantenerse en otras subfamilias. Este es el caso de DesK que presenta una direccionalidad de loop similar a HisKA con *cis*-autofosforilación pero que se autofosforila en *trans* (Trajtenberg et al., 2010). En cualquier caso, se desconoce la razón del porqué las HKs utilizan dos direccionalidades diferentes para catalizar la misma reacción, aunque se ha propuesto que podría estar relacionado con la alta especificidad HK-RR mostrada por los TCSs (Casino et al., 2014).

A pesar de las direccionalidades *cis* o *trans*, el mecanismo catalítico de la reacción de autofosforilación está conservado en todas las HKs. Gracias a las estructuras tridimensionales de CpxA (PDB:4BIW) y EnvZ^{Chim} (PDB:4KP4) atrapadas en la conformación de autofosforilación se ha podido descifrar las bases moleculares de esta reacción donde la His fosforilable actúa como un nucleófilo promoviendo el ataque al fosfato-γ del ATP. El residuo ácido

adyacente a la His fosforilable, altamente conservado, juega un papel importante actuando como una base general para incrementar la capacidad nucleofílica de la His, abstrayendo un protón del anillo de imidazol. Además, la His y el residuo ácido interactúan con un residuo de Asn que se encuentra en la hélice $\alpha 4$ del dominio CA ayudando a mantener la correcta disposición de los residuos catalíticos. Por su parte, el fosfato- γ del ATP se encuentra estabilizado en la posición correcta gracias al dipolo que forma la hélice $\alpha 5$ y los nitrógenos del enlace peptídico de los residuos conservados en la caja G2 con los oxígenos de este grupo fosfato. Los residuos de las cajas N, F y la caja G2 ayudan a estabilizar la molécula de ATP durante la autofosforilación lo que demuestra la importancia de la hélice $\alpha 5$ del dominio CA (Figura 1.11) (Casino et al., 2014; Mechaly et al., 2014).

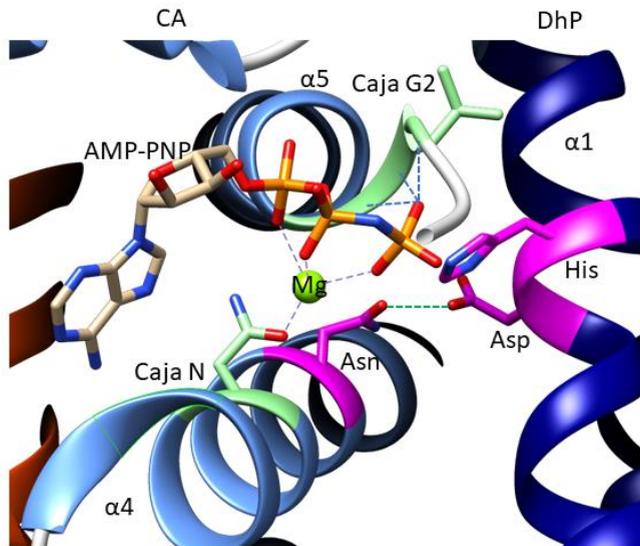


Figura 1.11. Centro activo de EnvZ^{Chim} (PBD: 4KP4)

Centro activo de EnvZ^{Chim} en el estado de autofosforilación donde se ve la hélice $\alpha 1$ del dominio DHp en azul oscuro, y las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ del dominio CA en azul claro. Resaltado en magenta se ve la His catalítica, el residuo ácido adyacente y el residuo de Asn con el que interactúan. En verde se ven las cajas G2 y N, con sus correspondientes interacciones marcadas en líneas discontinuas.

1.3.3. Reacción de Fosfotransferencia

En la reacción de fosfotransferencia, el enlace fosforamidato P-N entre la His fosforilable de la HK y el grupo fosforilo debe ser hidrolizado para transferir dicho grupo fosforilo al Asp fosforilable en el RR y producir un nuevo enlace fosfomonoéster P-O. La transferencia del grupo fosforilo se puede realizar a través de la formación de un metafosfato o de un intermedio covalente pentavalente de fósforo (fosforano) en un mecanismo por etapas de carácter disociativo o asociativo, respectivamente. Sin embargo, estos mecanismos por etapas son extremos pudiendo darse un mecanismo concertado con diferentes estadios de transición durante la rotura y formación de nuevos enlaces (Lassila et al., 2011). Hoy en día, se desconoce cuál es el mecanismo catalítico de esta reacción y si la reactividad nucleofílica del Asp fosforilable se incrementa por la acción de una base general o la coordinación del ión magnesio. En estos momentos, no existen datos estructurales para esta reacción que hayan atrapado estados de transición. Una estructura reciente del complejo DesK-DesR (PDB: 5IUJ), donde DesK pertenece a la subfamilia HisKA_3, parece representar la conformación de fosfotransferencia, sin embargo, la His fosforilable está mutada a Glu y alejada del Asp fosforilable ~ 10 Å impidiendo dilucidar el posible mecanismo (Trajtenberg et al., 2016).

La formación del enlace fosfomonoéster provoca cambios conformacionales en el RR para estabilizar la forma fosforilada e inducir la forma activada del RR. Las estructuras cristalinas del RR en ausencia y presencia del fosfomimético BeF_3^- han permitido conocer dichos cambios conformacionales producto de la fosforilación que implican movimientos en los loops de conexión $\text{L}\beta 3\alpha 3$, $\beta 4\text{L}\alpha 4$ y $\text{L}\beta 5\alpha 5$ así como en la hélice $\alpha 4$ permitiendo que diversos residuos catalíticos conservados estabilicen el grupo fosforilo. Estos residuos corresponden a dos residuos conservados de Asp en la hélice $\alpha 1$, uno encargado de quelar el ión magnesio y el otro de estabilizar una Lys conservada catalítica que interacciona con el grupo fosforilo y que se encuentra en el loop de conexión $\text{L}\beta 5\alpha 5$. Otros tres residuos, uno conservado de Thr/Ser en $\beta 4$, la Lys conservada en el $\text{L}\beta 5\alpha 5$ y el Asp fosforilable junto con el ión magnesio interaccionan con el fosforilo para estabilizarlo en el sitio activo (Figura 1.12).

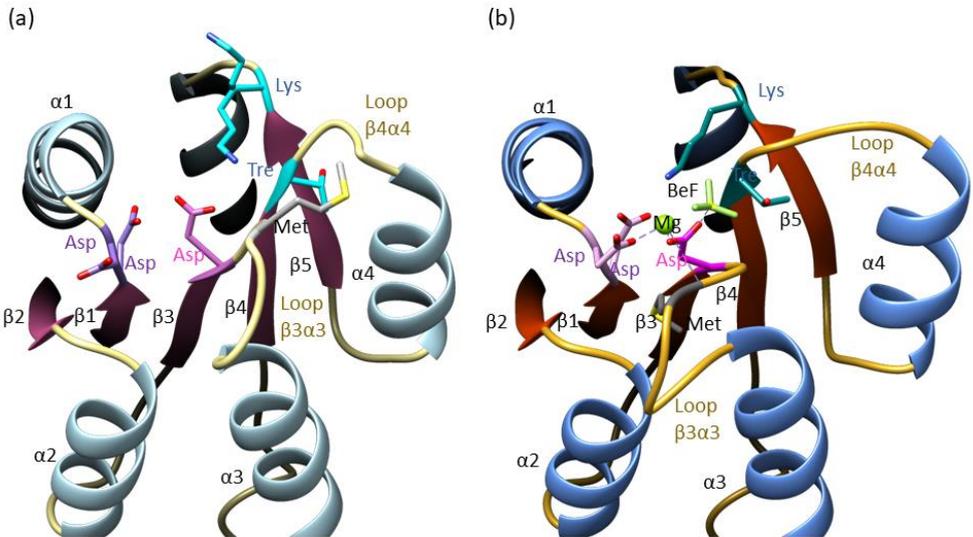


Figura 1.12. Comparación del centro activo de RR468 sin fosforilar (PDB: 3DGF) y fosforilado (PDB: 3GL9) representado por la ausencia o presencia de fosfomimético Be_3F^- .

Centro activo de RR468, las hélices α se encuentran en azul; las hebras β en rojo; y los loops de conexión en amarillo. **(a)** RR468 con el centro activo en ausencia de fosfomimético Be_3F^- (BeF), es decir, estado sin fosforilar, donde se resalta en magenta el residuo de Asp catalítico; en morado los residuos ácidos que quelan el ión magnesio; en cian se marcan los residuos de Thr y Lys que también participan en la estabilización del centro activo. **(b)** Centro activo de RR468 en presencia de BeF, es decir, estado fosforilado manteniendo los mismos colores de los residuos involucrados en la estabilización del centro activo.

Así pues, el estudio de esta reacción requiere de una aproximación mecanística y estructural que permita conocer la configuración del centro activo. Sin embargo, se tiene información del reconocimiento entre la HK y el RR, que es el primer paso para que se pueda llevar a cabo la fosfotransferencia. Teniendo en cuenta que algunas bacterias cuentan con más de un centenar de TCS, el reconocimiento y su especificidad son trascendentales para la eficiencia del sistema. Los primeros datos del reconocimiento HK:RR se obtuvieron por ensayos de mutagénesis dirigida en las dos moléculas que comprometían la capacidad de llevar a cabo las reacciones. Con estos estudios se logró delimitar las zonas importantes de reconocimiento tanto en la HK como en el RR pero no se pudo determinar los residuos exactos (Hsing et al., 1998; Brandon et al., 2000; Janiak-Spens &

West 2000; Qin et al., 2003). En la actualidad se tiene mayor conocimiento sobre el reconocimiento que se discutirá en los siguientes apartados.

1.3.4. Reacción Fosfatasa

El RR fosforilado en el residuo de Asp produce un enlace de alta energía acilfosfato al igual que el enlace fosfoanhídrido en la molécula de ATP (Stock et al., 1990). Los acilfosfatos son rápidamente hidrolizables tanto en condiciones ácidas como básicas, aunque se ha observado que la vida media de los RRs fosforilados es altamente variable. Por ejemplo, CheY-P de *E. coli* tiene una vida media de 10s, mientras que para OmpR-P de *E. coli* y Spo0F-P de *B. subtilis* es varias horas (Zapf et al., 1998). Estas observaciones indican que es el mismo RR el encargado de estabilizar o acelerar la hidrólisis del enlace acilfosfato. El RR utiliza el oxígeno de una molécula de agua como nucleófilo que ataca al fosfato, por lo tanto, si la molécula de agua accede más fácilmente al centro catalítico del RR, éste se defosforila más rápido (Zhu et al., 2000).

En muchos casos, la reacción fosfatasa está mediada por la HK. Sin embargo, la reacción fosfatasa no es la reversa de la fosfotransferencia, ya que la mutación en la His fosforilable inhibe la actividad de fosfotransferencia, pero no la actividad fosfatasa aunque sí puede comprometerla para algunas HKs (Lukat et al., 1991; Hsing & Silhavy, 1997; Huynh & Stewart, 2011). Además, la catálisis de ambas reacciones es diferente e incluso algunas HKs carecen de actividad fosfatasa. Sin embargo, el mecanismo catalítico básico aceptado para esta reacción implica la activación de una molécula de agua por parte de un residuo polar en la HK para que se produzca el ataque nucleofílico al fosforilo. Sin embargo, hay discrepancias en el mecanismo molecular entre diferentes subfamilias de HKs. En las de tipo HisKA el residuo polar que activa la molécula de agua es un residuo de Thr/Asn que se encuentra en el motivo HD/E-X-X-T/N donde la His fosforilable también parece jugar un papel importante en la localización y/o activación de dicha molécula de agua. Precisamente, la estructura de un complejo entre la HK HK853 y el RR RR468 (PDB: 3DGE) parece haber capturado dicha reacción donde la presencia de un ión sulfato entre la His y el Asp fosforilables podría representar al fosfo-Asp siendo atacado por la molécula de agua, jugando uno de los oxígenos del sulfato el papel de la molécula de agua que ataca al

fosforilo. En la subfamilia HisKA_3, es una Gln que se localiza en el motivo HD-X-X-X-Q/H el residuo polar catalítico en esta reacción y la His fosforilable no juega ningún papel. Una estructura del complejo DesK-DesR (PDB: 5IUN) parece capturar dicha reacción donde la Gln interacciona con una molécula de agua para el ataque nucleofílico y la His fosforilable se encuentra alejada de dicho centro activo.

En algunos casos, otras proteínas fosfatasa pueden realizar este mismo proceso si la HK no presenta actividad fosfatasa (Casino et al., 2010).

1.4. Distribución y evolución de los TCS

El desarrollo de los avances técnicos en el campo de la genómica, así como la secuenciación de múltiples genomas ha permitido localizar y evaluar la presencia de genes correspondientes a TCS. Estos genes se pueden encontrar en casi todas las especies de bacterias secuenciadas con unas pocas excepciones. Además, se ha observado que aquellos microorganismos que presentan la capacidad de adaptarse a un mayor número de ambientes suelen presentar genomas más ricos en TCS, como en el caso de *Myxococcus xanthus* (longitud del genoma 9,14Mb) donde existen alrededor de 136 HKs y 127 RRs (Capra & Laub, 2012). Por el contrario, organismos que viven en ambientes más constantes donde no es necesario adaptarse a cambios constantemente presentan genomas más reducidos como en el caso de los patógenos del género *Mycoplasma* (longitud del genoma 580Kb) y algunos endosimbiontes que no presentan TCSs (Wolanin et al., 2002; Ashby, 2006; Wuichet et al., 2010).

Un caso particular es el observado en arqueas, donde tan solo el 50% de los genomas secuenciados han mostrado la presencia de TCS (Wuichet et al., 2010). Esto puede deberse a la poca variabilidad de los ambientes en los que viven algunas arqueas, no siendo necesaria la presencia de sistemas de señalización, así como a las condiciones extremas (temperatura, concentración de sal, pH) en las que viven, lo que reduce la estabilidad y la capacidad de mantener la fosforilación de las proteínas que forman parte de los TCS. Hay que indicar que a diferencia de la fosforilación en Thr, Ser y Tyr, la Fosfo-His y el Fosfo-Asp son lábiles a pH ácidos y básicos, siendo esta una

de las causas que contribuyó a que se descubrieran mucho más tarde. En arqueas hasta el momento, solo se tiene claro el papel de estos TCS en quimiotaxis de arqueas halófilas (Albers & Jarrell, 2015) y la regulación de metalogénesis en arqueas metalogénicas (Li et al., 2014).

Alrededor del 30% de los genomas eucariotas correspondientes a hongos unicelulares, hongos filamentosos, protozoos y algunas plantas (Wuichet et al., 2010) presentan TCS. Aunque estos son más complejos pues implican HK híbridas y fosfotransferasas adicionales para realizar múltiples pasos de fosfotransferencia y activar el RR (descrito en el apartado 2). En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito un TCS involucrado en la osmorregulación (Maeda et al., 1994; Ota & Varshavsky, 1993), también en *Candida albicans* se han encontrado al menos dos HKs híbridas involucradas en el mismo proceso de osmorregulación y una para el desarrollo de las hifas (Nagahashi et al., 1998). En protozoos como la ameba *Dictyostelium* sp. al menos 11 HKs híbridas regulan el crecimiento y diferenciación celular (West & Stock, 2001). Estos TCS complejos también se han encontrado en *Arabidopsis thaliana* (Chang et al., 1993) y en el tomate (Wilkinson et al., 1995) involucrados en la regulación hormonal por etileno. Por el contrario, no se han encontrados genes de proteínas pertenecientes a los TCS en los genomas completos de *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y *Homo sapiens*, por lo que se considera que estos sistemas de señalización están ausentes en el reino animal (Wolanin et al., 2002; Zschiedrich et al., 2016).

Probablemente, los TCS han llegado desde las bacterias a las arqueas y a las células eucariotas a través de la transferencia lateral de genes; se cree que las HKs híbridas eucarióticas evolucionaron de un cluster de HKs híbridas bacterianas (BarA, RcsC, ArcB) (Pao & Saier, 1997). Las HK híbridas son poco frecuentes en los procariotas mientras que en eucariotas (hongos y plantas) son las únicas presentes (Grebe & Stock, 1999; Bahn, 2008). En el caso de las plantas, la integración de genes HK y RR provenientes de los cloroplastos al genoma nuclear junto a posteriores procesos de duplicación y diversificación han permitido que estos genes se fijen y cumplan nuevos roles (Kim & Forst, 2001; Koretke et al., 2000).

La razón por la que probablemente los TCS no se encuentran en el reino animal se debe a la necesidad de transmitir señales desde la membrana

celular hasta el núcleo sin perder la fosforilación en el camino. Los residuos de His y Asp presentan una fosforilación muy lábil, por lo cual no son los mejores transmisores de señal en estos casos, mientras que los residuos de Ser, Thr y Tyr presentan una fosforilación mucho más estable que garantiza la transmisión de la señal (Capra & Laub, 2012). De hecho, en hongos, los RRs cumplen funciones a nivel citoplasmático interaccionando con otras proteínas, como las MAP quinasas (Posas et al., 1996). En las plantas, algunos RRs se encuentran en el núcleo, activándose al recibir el grupo fosforilo desde una fosfotransferasa que se traslada desde el citoplasma al núcleo una vez fosforilada por la HK híbrida. (Imamura et al., 2001; Grefen & Harter, 2004).

La accesibilidad a la secuenciación masiva ha hecho que en la actualidad se hayan anotado una gran cantidad de TCS. En concreto, las bases de datos P2CS y MiST2 recogen datos de TCSs de diferentes microorganismos (Ortet et al., 2015). En P2CS <http://www.p2cs.org/> actualmente están anotadas 164277 proteínas de las cuales 74029 son HKs, de éstas 11291 son híbridas; 81546 son RRs y las demás son proteínas incompletas, fosfotransferasas y predichas como miembros de los TCS por su homología de secuencia. Dentro de estas bases de datos también se pueden encontrar las clasificaciones de estas proteínas por familia, género, especie e incluso realizar árboles filogenéticos para determinar la relación o evolución de estas proteínas dentro de un linaje. Generalmente, los TCS son fácilmente identificables porque los genes correspondientes a la HK y el RR que lo componen se suelen encontrar codificados en un mismo operón, sin embargo, en ocasiones, estos genes se pueden encontrar aislados en distintas partes del genoma denominándose como HK or RR huérfanos, dificultando la identificación de los componentes que interactúan para formar el TCS (Ortet et al., 2015).

1.5. Reconocimiento y especificidad

El reconocimiento e interacción entre una HK y su correspondiente RR son indispensables para que el sistema pueda funcionar de manera correcta. El análisis de datos estructurales (Casino et al., 2009) y funcionales (Podgornaia

et al., 2013) nos demuestran que la especificidad para el reconocimiento y correcto posicionamiento se da en base a la secuencia de pocos residuos.

La reacción de fosfotransferencia y fosfatasa son dos reacciones que catalizan procesos diferentes pero que requieren de un reconocimiento o interacción entre HK con el RR. Los datos estructurales provenientes del complejo DesK-DesR (PDB: 5IUN) y HK853-RR468 (PDB: 3DGE) han permitido determinar el reconocimiento primario en ambas reacciones. En el caso del complejo DesK-DesR, las estructuras muestran conformaciones para la actividad de fosfotransferencia y fosfatasa mientras que el complejo HK853-RR468 ha mostrado la conformación para la actividad fosfatasa. Estas tres conformaciones demuestran que la interacción HK-RR es similar en ambas reacciones donde el reconocimiento primario se realiza por la hélice $\alpha 1$ del dominio DHP de la HK y la hélice $\alpha 1$ del RR así como con el loop de conexión $\beta 5$ - $\alpha 5$, del RR. Sin embargo, los complejos HK-RR catalizando ambas reacciones muestran importantes diferencias, siendo las más importantes las disposición asimétrica o simétrica que adquieren los componentes durante la reacción. La conformación del complejo durante la reacción de fosfotransferencia observada para el sistema DesK-DesR muestra un estado asimétrico, donde solo 1 RR DesR se une al homodímero de DesK y la disposición de los dominios CA en el dímero de DesK es diferente. Por el contrario, la conformación para la reacción fosfatasa observada en DesK-DesR y HK853-RR468 muestra una disposición simétrica donde un homodímero de la HK con un eje de simetría dos une dos moléculas de RR que siguen la misma simetría. Estas diferencias pueden deberse a que tanto la HK como el RR deben presentar conformaciones diferentes en cada reacción. En la reacción de fosfotransferencia la HK fosforilada debe reconocer a un RR defosforilado, mientras que en la de fosfatasa la HK defosforilada debe reconocer un RR fosforilado. Dado que el RR presenta cambios conformacionales importantes en función de su estado de fosforilación en regiones involucradas en el reconocimiento de la HK, es comprensible que los complejos que catalizan ambas reacciones difieran. Pero además de la hélice $\alpha 1$ en la HK, deben estar implicadas otras regiones que discriminen el estado de fosforilación del RR (Casino et al., 2009; Trajtenberg et al., 2016; Buschiazzo & Trajtenber, 2019). Analizando el complejo Spo0B-Spo0F (PDB: 2FTK) se determinó que la afinidad del RR por

su HK varía dependiendo de su estado de fosforilación (Varughese et al., 2006).

No sólo la HK debe reconocer el estado de fosforilación del RR sino que para que la señal se transfiera de forma rápida y efectiva se debe evitar que otros RRs puedan interaccionar de forma cruzada o “cross-talk” interfiriendo en la respuesta. De forma general, los TCS son fieles y una HK interacciona con un solo RR (Skerker et al., 2008). Sin embargo, la alta conservación de secuencia y estructura que existe entre HKs o entre RRs permite que existan fosfotransferencias cruzadas entre pares no correspondientes. Esto podría ser ventajoso para la célula ya que podría integrar múltiples señales o diversificar la respuesta de un estímulo, sin embargo, tiene que estar muy regulado (Laub & Goulian, 2007). Se ha descrito *in vivo* que la doble función (fosfotransferasa – fosfatasa) de las HKs sobre su correspondiente RR ayuda a prevenir la fosforilación por una HK ajena. Un ejemplo de esto se encuentra en el sistema PhoR-PhoB de *E. coli* donde el RR PhoB, puede ser fosforilado por la HK VanS solo si la HK PhoR está ausente. Lo mismo ocurre en el sistema VanS-VanR, donde el RR VanR es fosforilado por PhoR solo si su propia HK no está presente en la célula. Esto no puede ser detectado en la presencia de los dos sistemas completos ya que la actividad fosfatasa de la HK impediría que su RR sea fosforilado por otra HK. También se puede dar una competencia entre RRs, lo cual ayuda a disminuir el “cross-talk” como ocurre en los mismos sistemas nombrados previamente, si VanR está presente no permite que VanS fosforile a PhoB (Fisher et al., 1995; Haldimann et al., 1997). Tomando en cuenta la cantidad *in vivo* de HK:RR (100:3500 en el caso de EnvZ:OmpR) se puede sugerir que la competencia de los RR por las HKs y la gran cantidad que hay de ellos ayudan a prevenir “cross-talk” (Laub & Goulian, 2007).

Finalmente, se ha determinado que los residuos involucrados en el reconocimiento HK-RR están sujetos a efectos epistáticos, de forma que la duplicación génica junto a la presión mutacional positiva sobre estos residuos de origen a nuevos TCS, que presentan especificidad en su aparición y evitan el “crosstalk” (Podgornaia et al., 2013 y 2015). Además, se ha determinado que la presión mutacional se debe dar de forma gradual en al menos 3 residuos de la HK y el RR produciendo al principio proteínas

promiscuas que pueden ser reconocidas por más de una proteína de la misma familia (Aakre et al., 2015).

1.6. Importancia en la biomedicina

La multiresistencia a los antibióticos es un problema que va en aumento a nivel mundial, de hecho, la “World Health Organisation” (WHO) lo ha identificado como más grave e importante que el SIDA. Los microorganismos causantes de enfermedades nosocomiales (adquiridas en los hospitales) son resistentes a casi todos los antibióticos que se encuentran actualmente en el mercado (Boucher et al, 2009). Las infecciones causadas por estos microorganismos producen mayor tasa de mortalidad e incrementan el coste de los tratamientos. Además, la creciente población inmunocomprometida (pacientes en tratamiento contra el cáncer, trasplantes, mayores de edad, etc.) hace más necesario el desarrollo de nuevos antibacterianos (Cosgrove & Carmeli, 2003). Por todo ello, la WHO prevee que en el año 2050 la primera causa de muerte a nivel mundial será debida a infecciones por bacterias multirresistentes a antibióticos.

La presencia, en gran proporción, de TCS en bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas y su ausencia en los animales, sobre todo en humanos, despierta un gran interés médico, ya que juegan papeles elementales para la supervivencia de los microorganismos. Hace varios años que se ha comenzado a investigar el desarrollo de compuestos que puedan inhibir las HKs de los TCS, ya que son un blanco muy interesante para el desarrollo de antibacterianos, para atenuar la virulencia de los patógenos y comprometer el crecimiento bajo condiciones de estrés (Barrett et al., 1998). Además, el alto grado de homología que existe en los centros activos de diferentes HKs y la diferencia estructural que presenta con los Ser/Thr/Tyr quinasas, propias de los mamíferos, permite que dichos compuestos presenten un amplio espectro de acción en microorganismos y una reducida toxicidad en animales (Dutta & Inouye, 2000; Velikova et al., 2016).

Las bacterias adquieren resistencia a los antibióticos por diferentes mecanismos. Destaca la mutación en genes que alteran diferentes procesos de permeabilidad en la membrana e impiden el acceso del antibiótico a la

célula, o el incremento en la función de las bombas de eflujo que expulsan los compuestos antimicrobianos (Li et al., 2018). Otro mecanismo es la adquisición de genes de resistencia, bien por la transferencia horizontal o a través de elementos genéticos móviles, como los que codifican para betalactamasas que son capaces de inactivar al antimicrobiano (Li et al., 2018; Bhagirath et al., 2019). También hay sistemas que protegen a la bacteriadegradando directamente el antibiótico. Este sería el caso del TCS VanS-VanR que juega un papel esencial para la resistencia a vancomicina, ya que activa genes que remodelan la pared celular lo que impide el reconocimiento del antibiótico.

Además del papel que algunos TCS juegan directamente en la resistencia a antibióticos, otros tienen funciones esenciales para la supervivencia o para la virulencia. Este es el caso del TCS WalK-WalR, presente en bacterias gram-positivas, que está involucrado en el metabolismo y la homeostasis de la pared celular y es esencial para la supervivencia de patógenos como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* (Zheng et al., 2015); mientras que el TCS PhoQ-PhoP está involucrado en la virulencia de bacterias gram-negativas como *Salmonella enterica*, por lo que ambos TCS son los blancos ideales para la búsqueda de compuestos que pueden inhibirlos (Dubrac & Msadek, 2008). La interrupción de la cascada de fosforilación en los TCS permitiría que las bacterias no fueran capaces de adaptarse y por tanto morirían, por esto, se investiga en la búsqueda de compuestos inhibidores basados en detener el proceso de autofosforilación de las HK (Bem et al., 2015; Wilke et al., 2015). La alta conservación de los dominios catalíticos implicados en la autofosforilación de las HK permite que sean una diana de antibióticos con menor probabilidad de desarrollar resistencia en comparación con los antibióticos convencionales (Velikova et al., 2013; Bem et al., 2015).

La importancia en la regulación transcripcional que juegan los TCS hace que su papel en la resistencia a antibióticos sea tanto directa como indirecta. Por ejemplo, se ha descrito que enterobacterias como *E. coli*, *Klebsiella* sp. *Salmonella* sp, etc. presentan, en ocasiones, carbapenemasas capaces de hidrolizar a los carbapenemas que junto con la deficiencia de porinas hace que estos microorganismos sean multirresistentes y muy difíciles de controlar (Hawser et al., 2012). Recientemente, se ha encontrado un aislado



clínico de *E. coli* resistente a los carbapenemas que presenta una mutación en el RR OmpR que forma parte del TCS EnvZ-OmpR. OmpR está involucrado en la regulación transcripcional de los genes que codifican para las porinas OmpC y OmpF (Dupont et al., 2017), de forma que la variante mutante disminuye la producción de porina confiriendo resistencia. De esta forma, inhibidores generales de la señalización por TCS podrían jugar un papel relevante ya no directamente como antibióticos, sino como adyuvantes de antibióticos ya utilizados y para los cuales se han desarrollado resistencias.

2. Objetivos





El objetivo general de este trabajo es aportar información sobre la especificidad del reconocimiento dentro de los TCS bacterianos para comprender mejor el mecanismo de transducción de la señal por estos sistemas mediante un estudio a nivel funcional, estructural y evolutivo. Para ello, se han propuesto tres objetivos principales.

1. **Caracterizar el reconocimiento del TCS modelo HK853-RR468 de *Thermotoga maritima* en las reacciones enzimáticas del mecanismo de transducción de señal.**
 - a. **Estudio estructural y funcional de la reacción de fosfotransferencia.** Determinación de la estructura correspondiente a la reacción de fosfotransferencia y realización de mutantes que permitan definir los residuos o regiones determinantes para la reacción de fosfotransferencia/fosfatasa.
 - b. **Estudio estructural y funcional de la influencia del pH en las reacciones enzimáticas del mecanismo de transducción de la señal.** Analizar el efecto del pH sobre la reacción de autofosforilación, fosfotransferencia y fosfatasa así como el efecto sobre los residuos fosforilables.
2. **Caracterizar el impacto de mutación clínica en el TCS EnvZ-OmpR de *Escherichia coli*.**
 - a. Estudio funcional y estructural de mutaciones en el RR OmpR sobre el estado de fosforilación y el reconocimiento con EnvZ.
 - b. Efecto de las mutaciones en OmpR para interactuar con regiones específicas de DNA.
3. **Estudio evolutivo de la especificidad en el reconocimiento entre HK y RR en bacterias intracelulares estrictas.**
 - a. Estudio funcional de los TCS presentes en las bacterias del género *Chlamydia*, *Methanobrevibacter* y *Simkania*, microorganismos poco evolucionados donde solo encontramos una HK en su genoma, pero uno ó varios RR.

- 
- b. Caracterización estructural y funcional del reconocimiento entre la HK y los RRs del género *Methanobrevibacter*.



3. Materiales y Métodos





3.1. Técnicas de biología molecular

3.1.1. Clonación de genes

-Sistemas de dos componentes modelo HK853-RR468 de *T. maritima* y EnvZ-OmpR de *E. coli*

La clonación de los dominios catalíticos de las HKs silvestres HK853 y EnvZ así como de los dominios REC de los RR silvestres RR468 y OmpR, se realizó previamente por el laboratorio del Dr. Alberto Marina como se ha descrito anteriormente (Casino et al., 2014). La proteína completa del RR OmpR (OmpR_{FL}) fue clonada también por el laboratorio del Dr. Alberto Marina utilizando la tecnología de clonación independiente de ligasa (LIC, *Ligase-Independent-Cloning*) en el vector pNIC28-Bsa4. Todas las construcciones correspondientes a estas proteínas de estudio se clonaron en vectores que permitieron introducir una cola o etiqueta de afinidad 6x-His en el extremo N-terminal de las proteínas (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Resumen de las proteínas silvestres utilizadas pertenecientes a los dos TCS utilizados como modelo

Variantes	Vector clonación	Cola afinidad	Fuente
HK853 ^{WT}	pLIC-SGC1	cola de 6xHis	Casino P et al., 2014
RR468 ^{WT}	pNIC28-Bsa4	cola de 6xHis	Casino P. et al, 2014
EnvZ ^{WT}	pLIC-SGC1	cola de 6xHis	Casino et al. Cell 2009
OmpR _{REC} ^{WT}	pNIC28-Bsa4	cola de 6xHis	Casino P. et al, 2014
OmpR _{FL} ^{WT}	pNIC28-Bsa4	cola de 6xHis	Este trabajo

- Sistemas de dos componentes ancestrales

Para los sistemas ancestrales se hizo un análisis comparativo de secuencias proteicas de las HKs modelo HK853 y EnvZ en microorganismos poco evolucionados del género *Chlamydia*, *Methanobrevibacter* y *Simkania*. Para predecir los dominios sensores y catalíticos de las HKs encontradas se utilizaron servidores como Pfam y SMART. Una vez obtenida la organización de dominios de dichas HKs, se delimitaron los fragmentos de interés a producir y se adquirió un gen sintético correspondiente a los dominios Dhp y CA para cada una de ellas. Estos genes fueron solicitados con optimización de codones para la purificación y expresión en *E. coli* a la compañía Life

Technologies (ThermoFisher, España), la cual nos envió los genes clonados dentro del plásmido pMA-T. Una vez recibidos los genes sintéticos se amplificaron, utilizando los cebadores indicados en la Tabla 3.2, para su posterior clonación en el vector de expresión pNIC28-Bsa4 (contiene cola de 6xHis) mediante la tecnología de clonación independiente de ligasa (LIC, *Ligase-Independent-Cloning*) (Savitsky et al., 2010).

Tabla 3.2. Cebadores utilizados para la amplificación de las HKs pertenecientes a microorganismos poco evolucionados y su clonaje en vector de expresión.

Microorganismo	Cebadores
<i>Chlamydia trachomatis</i> (residuos 124-352) HK_{Chtra}	5'- TACTTCCAATCCATGGATTTTCTGTTTCTGC TGATTTCGT-3'
	5'- TATCCACCTTTACTGTTATGCCGGTGCCAC AGAATG-3'
<i>Chlamydia psittaci</i> (residuos 131-350) HK_{Chpsi}	5'- TACTTCCAATCCATGGATCGCAGCGAGTAT AAACAGC-3'
	5'- TATCCACCTTTACTGTTACGGCAGTTTCAGG GTAAAGG-3'
<i>Methanobrevibacter sp.</i> (residuos 131-355) HK_{Met}	5'- TACTTCCAATCCATGGATAAAGGCATTATC AAAGATAAAC-3'
	5'- TATCCACCTTTACTGTTAAATGTTATCATACG GAAAACG-3'
<i>Simkania negevensis</i> (residuos 159-417) HK_{Sneg}	5'- TACTTCCAATCCATGCTGAGCGAAATTGGTC GTTTTCT-3'
	5'- TATCCACCTTTACTGTTAGGTGGTGCTGCTA TCCAGA-3'

Una vez amplificados los genes de interés se trataron con la polimerasa T4 para generar extremos complementarios con el vector pLIC-SGC1, que previamente había sido linearizado mediante digestión con la enzima de restricción BsaI y tratado con la T4 polimerasa también. A continuación, se

mezclaron 2 µl del gen-T4 tratado con 1µl del vector-T4 tratado, se incubaron 10 min a temperatura ambiente y la mezcla se transformó mediante electroporación en células de *E. coli* DH5α electrocompetentes. La transformación se adicionó al medio LB-agar en placas petri conteniendo Ampicilina (resistencia del vector) y se incubaron a 37°C toda la noche. Al día siguiente se seleccionaron colonias y se amplificaron mediante PCR con cebadores universales del vector pNIC28-Bsa4/pLIC-SGC1 para verificar la inserción del gen correspondiente (Tabla 3.3). Para las colonias positivas, se verificó mediante secuenciación la correcta inserción y orientación del gen.

Tabla 3.3. Cebadores universales para confirmación de la correcta clonación.

pNIC28-Bsa4/pLIC-SGC1	5'-TGTGAGCGGATAACAATTCC-3'
	5'-AGCAGCCAACCTCAGCTTCC-3'
Promotor y terminador T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

Para la clonación de los RRs de los sistemas ancestrales se realizó también un análisis de secuencia que permitiera detectar dichas proteínas en los mismos microorganismos poco evolucionados *Chlamydia*, *Methanobrevibacter* y *Simkania*. Para *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia psittaci* solo se encontró únicamente 1 RR en su genoma. En el caso de *Simkania negevensis* se encontraron 6 RRs pero solo 3 presentaban todos los residuos conservados necesarios para su fosforilación. Para *Methanobrevibacter* sp. se encontraron 5 RRs pero al igual que en *S. negevensis* se descartó uno de ellos. Para los 9 RRs escogidos (Tabla 3.4), se solicitaron los genes sintéticos correspondientes solo al dominio REC. En esta ocasión el gen sintético se solicitó a la empresa BIOMATIK (Ontario, Canadá) y sus secuencias estaban optimizadas con codones para su expresión en *E. coli*. Además, los genes solicitados se recibieron clonados en el vector pET-3a(+) que contiene una cola de 6xHis en el extremo N-terminal de la secuencia. De esta forma, tras recibir los vectores conteniendo los genes de interés, estos fueron directamente transformados en células *E. coli* DH5α electrocompetentes para su uso.

Tabla 3.4. HKs y RRs de los TCSs ancestrales utilizados en este estudio

Histidina Kinasa	Regulador de la Respuesta
HK_{MET}	RR _{MET571}
	RR _{MET572}
	RR _{MET589-1}
	RR _{MET589-2}
HK_{neg}	RR _{S1220}
	RR _{S17390}
	RR _{S17400}
HK_{Chtra}	RR _{Chtra}
HK_{Chpsi}	RR _{Chpsi}

3.1.2. Mutagénesis dirigida

Las mutaciones fueron realizadas utilizando el sistema Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit de New England BioLabs (NEB, MA, EEUU). Este kit contiene un cocktail optimizado con polimerasa y nucleótidos que permite amplificar todo el vector utilizando cebadores que introducen la mutación deseada. Estos cebadores se diseñaron a través de la plataforma que proporciona NEB (<http://nebasechanger.neb.com/>) para obtener así mayor rendimiento. Posteriormente a la amplificación y de acuerdo con el Kit, se realiza la reacción KLD con la muestra de PCR que permite eliminar el vector parental metilado. Finalmente, la muestra digerida se transforma en células *E. coli* competentes bien suministradas por el Kit o producidas por el laboratorio. Para comprobar si las colonias obtenidas producto de la transformación contienen el vector con la mutación deseada, se realizó una PCR para amplificar el gen correspondiente utilizando los cebadores universales T7

promotor y T7 terminador (Tabla 3.3). Para las secuencias amplificadas se comprobó la presencia de mutación mediante secuenciación.

-Sistemas de dos componentes modelo HK853-RR468 y EnvZ-OmpR

Las mutaciones realizadas sobre HK853, RR468, y OmpR que implican la utilización del Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit se muestran en la Tabla 3.5, así como los cebadores utilizados en cada caso. Como molde para la mutagénesis se utilizaron la proteína silvestre HK853, previamente clonada en el vector pLIC-SGC1, el RR RR468 y el RR OmpR, tanto el dominio REC como la proteína completa, que estaban previamente clonados en el vector pNIC28-Bsa4 (Casino P et al., 2014). En el caso de OmpR se utilizaron los mismos cebadores para introducir mutaciones tanto en la proteína completa como en el dominio REC en solitario.

Tabla 3.5. Cebadores utilizados para mutagénesis en los TCS modelos

Proteína	Mutación	Cebadores
RR468	M55A	5'-TCTCGACATAGCGATGCCCGTGATG-3'
		5'-ACTATCAGGTCTGGTGAAAC-3'
	M56A	5'-CGACATAATGGCGCCCGTGATGG-3'
		5'-AGAACTATCAGGTCTGGTG-3'
	M55A/M56A	5'-CGACATAGCGGCCCGTGATGG-3'
		5'-AGAACTATCAGGTCTGGTG-3'
HK853	T264A	5'-CGAGCTCAGAGCGCCTTTAACGG-3'
		5'-TGCGAGATGTTTCGCTATGAAC-3'
	H260N	5'-GAACATCTCGAACGAGCTCAGAA-3'
		5'-GCTATGAACTCCGTCTTC-3'
	R314A	5'-GGACTTTTCCGCGCTTGAAAGGAAATC-3'
		5'-AGTAACTATTCCAGGAGATTTTC-3'
	I258A	5'-CGTTCTGAGCTCGTGCGACGCTTCGCTATGAACTCCGT-3'
		5'-ACGGAGTTCATAGCGAACGCGTCGCACGAGCTCAGAACG-3'
	L262A	5'-GTTAAAGGCGTTCTCGCCTCGTGCGAGATGTTCCG-3'
		5'-CTCGCACGAGGCGAGAACGCCTTTAAC-3'
	L266A	5'-ACATCTCGCACGAGCTCAGAACGCTGCGACGGCCATAAAAAGC-3'
		5'-GCTTTTATGGCCGTCGCAGGCGTTCTGAGCTCGTGAGATGT-3'
OmpR	G63V	5'-GGTGAAGATGTGTTGTCGATTTGCCGACG-3'
		5'-CGGCAAATCGACAACACATCTTCACCAGG-3'
	G63A	5'-GGTGAAGATGCGTTGTCGATTTGCCGACG-3'
		5'-CGGCAAATCGACAACGCATCTTCACCAGG-3'

En la Tabla 3.6 se esquematizan las proteínas utilizadas pertenecientes a los TCS modelo con sus correspondientes características, tanto las realizadas durante este trabajo como las preparadas previamente dentro del laboratorio.

Tabla 3.6. Resumen de las proteínas mutantes utilizadas pertenecientes a los dos TCS modelo utilizados.

Variantes	Vector clonación	Cola afinidad	Fuente
HK853 ^{T264A}	pLIC-SGC1	cola de 6xHis	En este trabajo
HK853 ^{H260N}	pLIC-SGC1	cola de 6xHis	En este trabajo
HK853 ^{R314A}	pLIC-SGC1	cola de 6xHis	En este trabajo
HK853 ^{I258A}	pLIC-SGC1	cola de 6xHis	En este trabajo
HK853 ^{L262A}	pLIC-SGC1	cola de 6xHis	En este trabajo
HK853 ^{L266A}	pLIC-SGC1	cola de 6xHis	En este trabajo
HK853 ^{I448W}	pET24b	-	Marina A. et al., 2005
HK853 ^{F321C/L444C}	pET24b	-	Marina A. et al., 2005
HK853 ^{Q321P}	pET24b	-	Marina A. et al., 2005
HK853 ^{N257C}	pET24b	-	Marina A. et al., 2005
HK853 ^{R263A}	pET24b	-	Casino et al, 2009
HK853 ^{E438A/Y437A}	pET24b	-	Casino et al, 2009
HK853 ^{H260A}	pLIC-SGC1	cola de 6xHis	Casino P et al., 2014
RR468 ^{M55A}	pNIC28-Bsa4	cola de 6xHis	Este trabajo
RR468 ^{M56A}	pNIC28-Bsa4	cola de 6xHis	Este trabajo
RR468 ^{M55A/M56A}	pNIC28-Bsa4	cola de 6xHis	Este trabajo
RR468 ^{E88A/E89A}	pET22b	-	Casino P. et al., 2009
RR468 ^{D53A}	pET22b	-	Casino P. et al., 2009
OmpR _{REC} ^{G63A}	pNIC28-Bsa4	cola de 6xHis	Este trabajo
OmpR _{REC} ^{G63V}	pNIC28-Bsa4	cola de 6xHis	Este trabajo
OmpR _{FL} ^{G63A}	pNIC28-Bsa4	cola de 6xHis	Este trabajo
OmpR _{FL} ^{G63V}	pNIC28-Bsa4	cola de 6xHis	Este trabajo

-Estudio TCSs ancestrales

Con el fin de abordar estudios cristalográficos sobre la HK de *S. negevensis*, se insertó un codón “STOP” después del residuo 398, que permitiera acortar parte de la secuencia en el C-terminal ya que parecía presentar una estructura secundaria desordenada aportando inestabilidad, de acuerdo al programa de predicción estructural XtalPred (<http://xtalpred.godziklab.org/XtalPred-cgi/xtal.pl>). En la Tabla 3.7 se muestran los cebadores utilizados para introducir la mutación puntual.

Tabla 3.7. Cebadores utilizados para mutación puntual en la HK de *Simkania negevensis*

Proteína	Mutación	Cebadores
Simkania negevensis	Inserción stop	5'-TAACTGCAGACCGTTATGGATTATAG-3'
		5'-TGCTTTACGAAAGGTCATC-3'

3.2. Producción de proteínas

3.2.1. Expresión de proteínas

Para realizar la expresión de las variantes silvestres y mutantes de HK853, RR468 y EnvZ, los vectores que contenían dichas variantes fueron transformados en células de expresión competentes BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (RIL). Para la expresión de las variantes de OmpR se utilizaron las células de expresión competentes C43(DE3) mientras que para la expresión de las HKs y RRs ancestrales se utilizaron las células de expresión competentes BL21(DE3).

De forma general, la transformación de los vectores en células de expresión se realizó mediante electroporación obteniendo colonias aisladas en placas de cultivo crecidas en medio selectivo LB-agar con antibiótico según el vector utilizado (pET22b y pLIC-SGC1 contienen resistencia a Ampicilina mientras que pET24b y pNIC28-Bsa4 contienen resistencia a Kanamicina). En el caso de las células RIL, las placas contenían también Cloranfenicol ya que poseen un plásmido que provee codones raros y dicha resistencia. Posteriormente, se sembraron colonias de la placa de cultivo en medio líquido LB y se dejó incubando toda la noche a 37 °C hasta conseguir un cultivo saturado. Al día siguiente, se inoculó el cultivo saturado a una dilución 1/50 en nuevo medio LB con las concentraciones de antibióticos correspondientes a 100µg/ml en el caso de Ampicilina y 33µg/ml para Kanamicina y Cloranfenicol. El cultivo se mantuvo en agitación a 37°C hasta llegar a fase exponencial de crecimiento (densidad óptica de 0,6-0,8) y se adicionó 1mM de isopropil-β-tiogalactopiranósido (IPTG) o 0,5 mM, incubándose posteriormente a 20°C durante toda la noche o a 37°C durante

3h según cada proteína. En la Tabla 3.8 se muestran las condiciones de expresión utilizadas para cada proteína.

Tabla 3.8. Condiciones de expresión para las proteínas utilizadas

Proteína	IPTG / T° incubación
HK853 silvestre y mutantes	0,5mM / 37°C
RR468 silvestre y mutantes	1mM / 37°C
OmpR silvestre y mutantes	1mM / 37°C
EnvZ	1mM / 37°C
HKs ancestrales	1mM / 20°C
RRs ancestrales	1mM / 20°C

En todos los casos, al finalizar la incubación de los cultivos inducidos, las células se recogieron mediante centrifugación a 4500rcf y se mantuvieron congeladas a -20°C hasta su utilización.

3.2.2. Purificación de proteínas

El procedimiento inicial seguido para purificar todas las proteínas de estudio consta principalmente de dos etapas, el lisado de células congeladas y la realización de cromatografía.

El lisado de las células congeladas se realizó en el tampón correspondiente para cada proteína adicionando 1mM de PMSF y 1mM de β -mercaptoetanol. Para el sistema HK853-RR468 se utilizó el Tampón A, para el sistema EnvZ-OmpR el tampón B y para los sistemas ancestrales el tampón C. El proceso de lisis se realizó mediante sonicación con pulsos de 1 seg ON y 1 seg OFF durante 12 min, haciendo pausas cada 4 min. Posteriormente el lisado se centrifugó a 14000g durante 30 min y el sobrenadante clarificado fue purificado por cromatografía. En el caso del TCS HK853-RR468, ambas proteínas son termoestables pues proceden del organismo termófilo *T. maritima*, por lo que se incluyó un paso adicional de purificación incubando el sobrenadante clarificado al baño maría a 70°C durante 15 min. Al final de la incubación se repitió la centrifugación a 14000g durante 30 min. Para la purificación de las HKs de *C. trachomatis* y *C. psittaci* fue necesario

resuspender el pellet de la centrifugación en tampón C suplementado con 2M de urea e incubándose toda la noche a 4°C ya que formaban cuerpos de inclusión. Al día siguiente se repitió la centrifugación a 14000g durante 30 min y este sobrenadante fue el que se utilizó para la purificación. Los tampones utilizados en cada caso se describen en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Tampones utilizados

Tampón	Composición
<i>Purificación de proteínas</i>	
Tampón A	50mM Tris-HCl pH 8,0, 150mM NaCl
Tampón B	50mM Tris-HCl pH 8,0, 500mM NaCl
Tampón C	100mM Hepes 7,5, 500mM NaCl
Tampón D	50mM Hepes 7,5, 150mM NaCl
Tampón E	50mM Tris-HCl pH 8,0, 1M NaCl

Una vez obtenidos los sobrenadantes clarificados, cada una de las proteínas fue sometida a cromatografía de afinidad, utilizando columnas Histrap para aquellas variantes expresadas con cola de 6xHis, o intercambio iónico utilizando columnas MonoQ para aquellas que no poseían cola de afinidad. Al finalizar este primer paso de cromatografía se procedía a realizar una segunda cromatografía de exclusión molecular para eliminar agregación. A continuación, se detallan las cromatografías realizadas utilizando los tampones descritos en la Tabla 3.9. Las cromatografías se realizaron en un sistema de cromatografía líquida de media presión FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography).

- **Cromatografía de afinidad para proteínas con cola de afinidad 6xHis**

Para realizar este tipo de cromatografía se utilizaron columnas de afinidad Histrap (GE, Healthcare) de 1ml o 5ml, según el volumen de sobrenadante clarificado a purificar, equilibradas en tampón de lisis. El sobrenadante clarificado obtenido después de la lisis celular se inyectó en la columna y se realizaron diferentes etapas de elución utilizando concentraciones variables de imidazol obtenidas al mezclar el tampón de lisis con el mismo tampón

conteniendo 500 mM de imidazol. En una primera etapa, se realizó una elución con 50mM de imidazol que permitió eluir proteínas unidas inespecíficamente a la columna, posteriormente se realizó otra elución con 350mM de imidazol que permitió eluir las proteínas de interés en alta concentración.

Para aquellas proteínas cuya cola de 6xHis contenía sitio de corte para la proteasa del virus del tabaco (Tobacco Etch Virus; TEV) se procedió a eliminar la cola de forma que no interfiriera en futuros experimentos de cristalización. Para ello, la proteína eluída en 350mM imidazol se incubó con una dilución 1/25 de TEV purificada y conteniendo cola de 10xHis, en relación molar. La digestión se realizó durante una diálisis para eliminar el imidazol utilizando el tampón de lisis suplementado con 5mM de β -mercaptoetanol y 0,5mM de EDTA para aumentar la eficiencia de la digestión. Posteriormente, se realizó una segunda cromatografía de afinidad para separar la proteína digerida de la proteasa y de posible proteína no digerida conteniendo 6xHis. Durante esta cromatografía, al inyectar en la columna la mezcla de proteína purificada incubada con TEV se recogió la fracción no retenida que contenía la muestra digerida. Posteriores etapas de elución con imidazol permitieron eluir de la columna la proteasa TEV y posible proteína no digerida.

- **Cromatografía de intercambio iónico para proteínas sin cola de afinidad**

Para las proteínas HK853 y RR468 provenientes del vector pET24b y pET22b, respectivamente, carentes de cola de afinidad se realizó una cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna Mono Q 5/50 GL (GEhealthcare) de 1ml o 5ml, según el volumen de sobrenadante clarificado a purificar. Para realizar este tipo de cromatografía fue necesario retirar el NaCl del sobrenadante procedente del tampón de lisis mediante una diálisis. Posteriormente, se inyectó el sobrenadante dializado en la columna y la elución se realizó sobre un gradiente de NaCl desde 0 hasta 200 mM para RR468 y de 150mM a 500mM para HK853 mezclando el tampón sin NaCl con Tampón E (Tabla 3.9) en un gradiente de 20 volúmenes de columna.

- **Cromatografía de exclusión molecular**

Para comprobar el estado de agregación y oligomerización de las proteínas de estudio se realizó una cromatografía de exclusión molecular utilizando la columna Superdex prep grade HiLoad 200 16/60 para las HKs y Superdex 75 prep grade HiLoad 16/60 para los RRs. Para esta cromatografía se utilizó el tampón de lisis en cada caso, excepto en las HKs ancestrales que se utilizó el Tampón D (Tabla 3.9). Finalmente, el pico correspondiente para cada proteína de interés en el estado oligomérico más abundante se concentró usando los concentradores Amicon Ultra (Millipore) hasta ~8-30 mg/ml. La concentración fue determinada mediante Bradford (Bio-Rad) y las proteínas se alicuotaron y congelaron en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80°C.

3.3. Métodos de caracterización de proteínas

3.3.1. Separación de proteínas en función de su estado nativo o desnaturalizado

La electroforesis en geles de poliacrilamida bien nativa (Nativa-PAGE) o desnaturalizante (SDS-PAGE) se realizó en un sistema discontinuo formado por un gel con dos composiciones diferentes. En la parte inferior, la composición del gel permite separar las proteínas según su tamaño, denominándose por ello parte separadora y conteniendo % variables de acrilamida. Mientras, en la parte superior la composición del gel permite concentrar las muestras (en una banda) antes de que penetren en la parte separadora. La composición del gel en la parte separadora y la parte superior se muestran en la Tabla 3.10. Para los geles en estado nativo no se añade SDS.

Tabla 3.10. Soluciones utilizadas para los geles de acrilamida

Solución	Composición
Parte superior gel acrilamida SDS-PAGE	1,59ml de H ₂ O, 0,245ml de Acrilamida al 40%, 0,625ml Tris-HCl 0,5M pH 6,8, 25µl SDS 10%, 12,5µl APS 10%, 5µl TEMED
Parte separadora gel 15% acrilamida SDS-PAGE	1,795ml de H ₂ O, 1,875ml de Acrilamida al 40%, 1,25ml Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 50µl SDS 10%, 25µl APS 10%, 5µl TEMED
Tampón carga SDS-PAGE	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 30% glycerol, 1% SDS, 0,01 % de azul de bromofenol, 0,74 M β-mercaptoetanol, 5mM EDTA
Tampón carga Native-PAGE	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 30% glycerol, 0,01 % de azul de bromofenol, 0,74 M β-mercaptoetanol, 5mM EDTA
Tampón de la fuente	25mM Tris Base, 192mM Glicina, 0,1% SDS

-Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) permitió evaluar la pureza de las proteínas durante el proceso de purificación. Para ello, las proteínas debían ser desnaturalizadas en presencia del detergente aniónico dodecil sulfato sódico (SDS), beta-mercaptoetanol y sometidas a 95°C por 5 minutos. De esta forma, el SDS cargado negativamente se une proporcionalmente al tamaño de la proteína y la migración es dependiente del tamaño, pero no su carga. La electroforesis SDS-PAGE se llevó a cabo a temperatura ambiente en un campo eléctrico de 200V. Los tampones utilizados tanto para la preparación del gel, como para la muestra se encuentran en la Tabla 3.10.

-Electroforesis Nativa-PAGE

La electroforesis nativa (Native-PAGE) se utilizó para visualizar cambios de movilidad electroforética entre proteínas no fosforiladas y fosforiladas, o la formación de complejos entre proteínas. Esta técnica permite la migración de proteínas en geles de poliacrilamida de acuerdo con su forma, tamaño y pl por lo que cada proteína o complejo migra de forma diferencial permitiendo su identificación. La electroforesis Native-PAGE se llevó a cabo en un campo eléctrico a 100V durante 2-3 horas a 4°C. Los tampones utilizados contenían lo mismos reactivos que los utilizados para SDS-PAGE a excepción de SDS (Tabla 3.10).

- Tinción con Coomassie Blue

Para teñir los geles Nativa-PAGE y SDS-PAGE se utilizó una solución de Coomassie Blue que se preparó disolviendo 80mg de Coomassie Blue G-250 en 1L de agua destilada. Esta disolución se mantuvo en agitación durante 3h y después se añadieron 6ml de HCl al 37%. Para la tinción del gel, a éste se añadía ~20ml de la disolución de Coomassie, se calentaba 1 min en el microondas y se dejaba en agitación. Para visualizar con mayor contraste las bandas de proteínas en el gel, éste se desteñía incubando con agua destilada y calentando 1 min en el microondas si se consideraba necesario.

3.3.2. Cuantificación de proteínas

Para calcular la concentración de las proteínas purificadas se utilizó el método de Bradford (Bradford M. 1976). Para ello, se realizaba una dilución 1/5 del reactivo de Bradford comercializado como Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratorios, Hercules, CA) y se realizaba una recta patrón mezclando el reactivo diluido con diferentes cantidades de albúmina de suero bovino (BSA) (2.5 µg, 5 µg, 7.5 µg y 10 µg). Esto producía una graduación de coloración desde marrón (sin proteína) hasta azul (con proteína) que se medía a 600nm. Para medir la concentración de nuestras proteínas de interés, se mezclaba el reactivo diluido con cantidades variables de la proteína de estudio y se medía la coloración a 600nm, interpolando el valor de la densidad óptica sobre la recta patrón. Cada medida se realizaba un mínimo de tres veces.

3.4. Caracterización de proteínas fosforilables

3.4.1. Ensayos de fosforilación con [γ -³²P] ATP

De forma general, los ensayos de fosforilación se realizaron en tampón quinasa a diferentes pHs, como se observa en la Tabla 3.11, conteniendo una mezcla de ATP y [γ -³²P]ATP (3000Ci/mmol Perkin Elmer, Wellsley, MA) según el experimento llevado a cabo. Durante el transcurso de la reacción las muestras se incubaron a temperatura ambiente o 37°C según las condiciones de estudio. La reacción de fosforilación se detuvo a diferentes

tiempos mezclando la muestra con un tampón de carga conteniendo 2% de SDS y 5mM EDTA que denominaremos tampón de parada (Tabla 3.11), en un ratio 2:1 (muestra:tampón). Este tampón de parada llevaba el doble de SDS que el tampón de carga habitual para favorecer la desnaturalización de las proteínas, ya que estas muestras no se calentaron a 95°C para evitar la pérdida de fosforilación. Las muestras sometidas a fosforilación se cargaron en geles SDS-PAGE al 15%. Al finalizar la electroforesis, los geles se secaron en vacío y se revelaron mediante autorradiografía utilizando un equipo Fluoro Image Analyzer FLA-5000 (Fuji, FUJIFILM Europe GMBH, Düsseldorf, Alemania). La intensidad de las bandas se cuantificó con el programa MultiGauge Fujifilm (Fuji). A continuación, se describen las condiciones específicas de cada ensayo realizado.

Tabla 3.11. Tampones utilizados para ensayos de radioactividad

Tampón	Composición
Fosforilación	
Tampón quinasa A	100mM Tris-HCl pH8,0, 100 mM KCl, 10mM mM MgCl ₂
Tampón quinasa B	100mM Bis-Tris pH7,0, 100 mM KCl, 10mM mM MgCl ₂
Tampón quinasa C	100mM Bis-Tris pH6,0, 100 mM KCl, 10mM mM MgCl ₂
Tampón quinasa D	100mM Bis-Tris pH5,0, 100 mM KCl, 10mM mM MgCl ₂
Tampón quinasa E	20mM Tris-HCl pH8,0, 100 mM KCl, 10mM mM MgCl ₂
Tampón quinasa F	50mM Hepes pH7,5, 50mM KCl, 100mM NaCl, 25mM MgCl ₂
Tampon parada SDS-PAGE	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 30% glicerol, 2% SDS, 0,01 % de azul de bromofenol, 0,74 M β-mercaptoetanol, 5mM EDTA
Tampón TKM	2,5mM Tris-HCl pH 7,6, 6mM Acetato potásico, 1mM EDTA

3.4.1.1. **Autofosforilación de HK853 silvestre o mutantes y EnvZ**

Estos ensayos se realizaron mezclando 4μM de la HK con concentraciones de 0,1mM ATP y 0,1μCi [γ -³²P]ATP en el tampón quinasa correspondiente para el pH a analizar, Tampones A, B, C y D (Tabla 3.10). La fosforilación se llevó a cabo a temperatura ambiente y se tomaron muestras a diferentes tiempos parando la reacción al añadir tampón de parada.

3.4.1.2. **Estabilidad de la fosforilación de HK853 y EnvZ**

La estabilidad de la autofosforilación para HK853 y EnvZ se determinó mezclando 10 μ M de la HK con 0,1mM ATP y 0,1 μ Ci [γ -³²P]ATP en tampón E (Tabla 3.10) durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla se cargó en columnas conteniendo 0.5ml de resina Sephadex G-25 Fine (GE, Healthcare) para eliminar todo el ATP libre, repitiendo este paso por duplicado. La mezcla con HK fosforilada fue diluida 2,5 veces en el tampón quinasa A y D (Tabla 3.11) para que la dilución quedara en el pH deseado y se incubó la muestra a temperatura ambiente tomando muestras a diferentes tiempos y parando la reacción al adicionar el tampón de parada.

3.4.1.3. **Ensayos de fosfotransferencia HK853-RR468 silvestre y mutantes**

Para estos ensayos se mezcló 4 μ M de HK853 con 0,1mM ATP y 0,1 μ Ci [γ -³²P]ATP en el tampón quinasa A (Tabla 3.11) durante 15 min a 4°C. Transcurrido ese tiempo se cargó la proteína en una columna con 0,5ml de la resina Sephadex G-25 Fine (GE Healthcare) para eliminar el ATP libre de la mezcla. Este paso se realizó por duplicado. La HK fosforilada se añadió al RR correspondiente en una relación molar 1:1 y se incubó a temperatura ambiente parando las muestras a tiempos variables con el tampón de parada.

3.4.1.4. **Ensayos de fosfotransferencia HK-RR con variación de pHs**

Para realizar estos ensayos, 10 μ M de HK (HK853 ó EnvZ) se fosforiló como se indica en 3.4.1.2 utilizando el tampón E (Tabla 3.11) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el ATP libre utilizando la resina Sephadex G-25 Fine equilibrada en el mismo tampón. Posteriormente se diluyó la muestra 2.5 veces en el tampón A y D (Tabla 3.11), al que previamente ya se

le había añadido una cantidad equimolecular del RR correspondiente RR468 u OmpR.

3.4.1.5. Fosfotransferencia de EnvZ a OmpR y sus mutantes

En este experimento se autofosforiló 5 μ M de EnvZ en el tampón quinasa A (Tabla 3.11) durante 10 minutos a temperatura ambiente con las mismas concentraciones de ATP que en los apartados anteriores. Se cargó en la resina Sephadex G-25 Fine y la HK fosforilada se mezcló con una concentración molar del correspondiente RR (OmpR, OmpR^{G63V}, OmpR^{G63A}). Posteriormente, la mezcla se incubó diferentes tiempos.

3.4.1.6. Autofosforilación y fosfotransferencia HKs ancestrales

La autofosforilación de las HKs ancestrales se llevó a cabo utilizando una concentración de 5 μ M, siendo necesario utilizar 7 μ M para *C. trachomatis* debido a su débil fosforilación. Las HKs se incubaron a 37°C con las mismas concentraciones de ATP que en los experimentos anteriores, pero utilizando el tampón quinasa F (Tabla 3.11). Se tomaron muestras a distintos tiempos deteniendo la autofosforilación al añadir el tampón de parada.

Para los ensayos de fosfotransferencia, la autofosforilación se mantuvo hasta 1h a 37°C y luego se añadió una cantidad equimolecular de diferentes RRs.

3.4.2. Ensayos de fosforilación y desfosforilación de los RR utilizando AcP³²

El primer paso para realizar estos ensayos es la síntesis de AcP³². Para ello, se incubó a temperatura ambiente 10 μ Ci de [γ -³²P]ATP con 1U de acetato quinasa (9027-42-3, Sigma-Aldrich) en el tampón TKM (Tabla 3.11), durante 2 horas. Tras la incubación, se utilizó un concentrador Amicon-Ultra de 10K

para separar el AcP³² de la enzima acetato quinasa. Con una eficiencia del 100% en la que todo el acetato se transforma en AcP³², obtenemos una solución de AcP³² a 100mM.

3.4.2.1. **Fosforilación de RR468 y cálculo de vida media**

La fosforilación de RR468 se llevó a cabo mezclando 5 μ M del RR en presencia de 20mM de AcP³², utilizando el tampón quinasa A (Tabla 3.11) durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se cargó la proteína en una columna con 0,5ml de la resina Sephadex G-25 Fine (GE Healthcare), para eliminar el AcP³² libre de las muestras. Este paso se realizó dos veces. Posteriormente, RR468 se incubó a temperatura ambiente tomando muestras a distintos tiempos hasta un máximo de 6 horas. Cada muestra fue parada con el tampón de parada y se corrieron geles SDS-PAGE al 17%. Las bandas fosforiladas obtenidas mediante autorradiografía fueron cuantificadas y utilizadas para hacer el cálculo de la vida media que se obtiene mediante la representación del Logaritmo natural correspondiente al porcentaje de fosforilación en relación con el tiempo.

Este ensayo también se realizó variando el tampón quinasa a diferentes pHs, es decir, utilizando tampón A, B, C o D dependiendo del pH (Tabla 3.11). RR468 se incubó a temperatura ambiente y se fueron tomando muestras a diferentes tiempos.

3.4.2.2. **Defosforilación de RR468 silvestre y mutantes mediada por HK853**

Para comprobar cómo afecta la presencia de HK853 para la defosforilación de RR468 fue necesario fosforilar 5 μ M del RR468 durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente se retiró el exceso de AcP³² utilizando columnas con 0.5ml de la resina Sephadex G-25 Fine (GE Healthcare). Al eluido de la columna se añadió una cantidad equivalente de la HK y se fueron tomando muestras a diferentes tiempos.

La desfosforilación de RR468 mediada por HK853 a diferentes pHs, es decir, en los diferentes tampones A, B, C o D, se realizó de la misma manera, manteniendo el pH del tampón en todos los pasos. Por otra parte, también se incubó RR468 en presencia de HK853 y 2mM ADP. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se cuantificaron como se describió previamente.

3.4.3. Visualización de la fosforilación de OmpR mediante cromatografía de exclusión molecular

La fosforilación de OmpR induce la dimerización de este RR por lo que esta oligomerización puede detectarse mediante exclusión molecular. Para ello, 200 μ g de OmpR_{FL} o del dominio aislado REC (OmpR_{REC}) se incubaron con 50mM de AcP ó 50mM de fosforamidato amónico durante 1h a 37°C en presencia de 50mM de MgCl₂. Como control, OmpR_{FL} y OmpR_{REC} sin fosfodoador se incubaron al mismo tiempo en presencia de 50mM de MgCl₂. Las muestras se inyectaron en una columna Tricorn Superdex 75 Increase 10/300GL de 25 ml a un flujo de 0.75ml/ml conectada a un equipo ÄKTA Pure (GE, 29018224). La columna estaba previamente equilibrada en tampón B (Tabla 3.11).

3.5. Cálculo de la afinidad por interferometría en bicapa (BLI)

Los parámetros cinéticos de la interacción, afinidad de la unión (K_D) y constantes de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}), entre HK y el RR fueron medidos mediante interferometría en bicapa (Biolayer Interferometry, BLI) utilizando el sistema BLITz (FortéBio, CA, EEUU). Se utilizaron biosensores Ni-NTA (FortéBio, CA, EEUU) donde inmovilizamos el RR a través de su cola de 6xHis, posteriormente se añadieron diferentes concentraciones de HK sin cola afinidad para seguir la interacción durante la asociación y la disociación. De acuerdo con las proteínas utilizadas en este estudio se utilizaron diferentes tampones que se describen en la Tabla 3.12. El cálculo de los valores cinéticos y el análisis de los datos se realizó con el programa informático BLITZ Pro 1.2.

Tabla 3.12. Tampones utilizados para cálculo de afinidad

Tampón	Composición	Muestras
BLITZ 1	50mM Tris-HCl pH 8 150mM NaCl 0,5% BSA 0,02% Tween 20	RR468-6xHis 8 μ M y HK853 (0.15–0.0047 μ M)
BLITZ 2	50mM Tris-HCl pH 8 500mM NaCl 0.5% BSA 0.02% Tween 20	*OmpR FL-6xHis 16 μ M y EnvZ (0.28-4.5 μ M) *OmpR REC-6xHis 16 μ M y EnvZ (0.14-2.25 μ M)
BLITZ 3	50mMHepes pH 7,5 150mM NaCl 0,5% BSA 0,02% Tween 20	RR _{Met572} -6xHis 16 μ M y HK _{MET} (0.28-4.5 μ M) RR _{Met589-1} -6xHis 16 μ M y HK _{MET} (0.28-4.5 μ M) RR _{Met571} -6xHis 60 μ M y HK _{MET} (40-1.25 μ M) RR _{Met589-2} -6xHis 60 μ M y HK _{MET} (40-1.25 μ M)

* Hace referencia OmpR silvestre y mutantes G63V y G63A.

3.5.1. Sistema HK853-RR468

Para medir la interacción en este TCS, se preparó una disolución en tampón BLITZ 1 (Tabla 3.12) de 8 μ M RR468 que contenía cola de afinidad 6xHis para su inmovilización en el sensor hidratado en el mismo tampón. La asociación de la HK se realizó utilizando con una dilución a 0.15–0.0047 μ M, hasta tener entre 4-5 medidas que nos permitieran el cálculo de la K_D .

3.5.2. Sistema EnvZ-OmpR

En este caso, fue necesario utilizar 16 μ M de OmpR conteniendo cola de afinidad 6xHis en tampón BLITZ 2 (Tabla 3.12) para su inmovilización en el sensor. Posteriormente se utilizaron diluciones seriadas de EnvZ (0.28-4.5 μ M con OmpR FL y 0.14-2.25 μ M con OmpR REC) para obtener las medidas necesarias para el cálculo de constantes. Este mismo experimento se repitió con las variantes mutantes G63A y G63V de de OmpR-FL y de OmpR REC.

3.5.3. Sistema Methanobrevibacter sp.

En este caso, para conocer la afinidad de interacción entre la HK de *Methanobrevibacter* sp. y los cuatro RR que contiene la bacteria

Methanobrevibacter RRs (RR_{Met571}, RR_{Met572}, RR_{Met589-1}, RR_{Met589-2}) fue necesario inmovilizar por separado cada uno de los RRs conteniendo cola de afinidad 6xHis diluidos en el tampón BLITZ 3 (Tabla 3.12) a 16µM para RR_{Met572}, RR_{Met589-1}, y a 60µM para RR_{Met571}, RR_{Met589-2}. Las concentraciones utilizadas para la HK fueron variando, dependiendo de cada RR ya que para las que presentaban menor interacción fue necesario añadir una concentración hasta de 40µM.

3.6. Ensayos de movilidad electroforética (EMSAs)

Los ensayos de movilidad electroforética se realizaron en geles de acrilamida utilizando un sistema continuo formado solamente por un gel con parte separadora al 8% preparado en tampón TBE (Tabla 3.13) al 0,5x suplementado con 40mM MgCl₂. Los geles se corrieron en tampón TBE al 0,5x a 100V en una temperatura de 4°C por aproximadamente 1,5h. Todas las muestras contenían 0.2µM de DNA poly (dl-dC) para evitar interacciones inespecíficas. Se utilizaron dos concentraciones de Omp_{FL}, 2 µM y 20µM que se incubaron en presencia de 1µM de DNA específico derivadas de los promotores ompF y ompC. En la Tabla 3.14, se encuentra la secuencia de los DNAs específicos utilizados en los ensayos EMSA. La mezcla conteniendo Omp_{FL}, DNA poly (dl-dC) y el DNA específico se incubó durante 1h a temperatura ambiente en presencia y ausencia de 50mM AcP ó 50mM de fosforamidoato amónico en tampón EMSA (Tabla 3.13). Los ensayos EMSA se realizaron también con los mutantes Omp_{FL}^{G63A} y Omp_{FL}^{G63V}.

Tabla 3.13. Composición de los tampones utilizados para el EMSA.

Tampón	Composición
Tampón TBE	Tris-HCl, Borato, EDTA
Tampón EMSA	20mM Hepes pH 8,0, 0,1mM EDTA, 50mM NaCl, 1mM DTT, 5% glicerol, 5mM MgCl ₂

Tabla 3.14. Secuencias de DNA pertenecientes a las cajas de reconocimiento de OmpR y las modificaciones de estas

DNA	Secuencia
F1	5'-CCTTTACTTTTGGTTACATATTCC-3' 5'-GGAATATGTAAGGAAAAGTAAAGG-3'
C1	5'-CCTTTACATTTTAAAACATCTACC-3' 5'-GGTAGTGTTTCAAAATGTAAAGG-3'
F1.1	5'-CCTTTACTTTTGGTTACATATTC-3' 5'-GGAATATGTAACCAAAAAGTAAAG-3'
F1.4	5'-CCAATTTTACTTTTGGTTACATATTTTCC-3' 5'-GGAAAAATATGTAACCAAAAAGTAAATTGG-3'

3.7. Ensayos en geles de Phos-tag

Para los ensayos de Phos-tag se utilizó Phos-tagTM Acrylamide (FUJIFILM Wako Chemicals), el cual se diluyó como indica el fabricante y se guardó alicuotado a 4°C. Los geles se prepararon adicionando 50µM de Phostag y 100µM de MnCl₂ en la parte separadora del gel SDS-PAGE al 15%. Los RRs se fosforilaron con 50mM de Fosforamidato amónico parando la reacción a diferentes tiempos con tampón de parada (Tabla 3.10). Los geles se corrieron 100V por 1h y 30 min con una temperatura constante de 4°C. Los geles se tiñeron con Coomasie como se describe en el apartado 3.1.

3.8. Ensayos de Cristalización

Los ensayos de cristalización se realizaron mediante la técnica de difusión de vapor en gota sentada en placas tipo MRC2 y MRC3 de 96 pocillos utilizando diversas matrices de cristalización como los "screenings" JBS HTSI y HTSII (Jena Bioscience, Alemania), MIDAS y PACT premier (Molecular Dimensions, Inglaterra). Para ello, se mezclaron 0.3µL de proteína y 0.3µL de solución madre proveniente del screening con un equipo de nanodispensación (HoneyBee X8, Genomic Solutions). Posteriormente, las placas fueron incubadas a 21°C para permitir la cristalización. La aparición de cristales era variable pudiendo observarse en algunos casos a los 3 días. En aquellos casos



en los que se habían obtenido cristales, éstos se congelaban en nitrógeno líquido utilizando unas condiciones crioprotectoras que contenían la solución madre con precipitante a mayor concentración para mantener los cristales vitrificados (Tabla 3.14).

3.8.1. Cristalización del complejo HK853-RR468 en sus variantes silvestres y mutantes

Para la cristalización del TCS HK853-RR468 combinando variantes silvestres y mutantes se utilizó una disolución que contenía 10mg/ml de HK853 y 7,5mg/ml de RR468 así como 4mM ADP, 5mM de BeSO_4 , 30mM de NaF y 7mM de MgCl_2 para los casos que se requería generar el fosfomimético BeF_3^- y promover la fosforilación del regulador. Esta disolución se incubaba toda la noche previamente a la preparación de placas. En la Tabla 3.15 se detallan las condiciones de cristalización para cada una de las variantes utilizadas, así como el precipitante utilizado en la solución madre para preparar las condiciones crioprotectoras utilizadas.

Tabla 3.15. Detalle de los cristales pertenecientes al complejo HK853-RR468

Variantes HK-RR	Condiciones cristalización (solución madre)	Precipitante utilizado
HK853-RR468 ^{E88A/E89A}	0,1M de citrato pH5,6, 0,015M imidazol pH6,5 y 1,6M (NH ₄) ₂ SO ₄	2M Li ₂ SO ₄
	20% PEG 8000 y 0,1M CHES pH9,5,	35% PEG 8000
HK853-RR468 ^{M55A}	10% PEG 6000 y 0,01M MgCl ₂	22% PEG 6000
HK853-RR468 ^{M56A}	20% PEG 8000 y 0,1M Tris-HCl pH8,5	35% PEG 8000
	0,1M Citrato pH5,6, 0,1M NaCl y 2M (NH ₄) ₂ SO ₄	2M Li ₂ SO ₄
	30% PEG 1500	-
HK853-RR468 ^{M55A/M56A}	1M (NH ₄) ₂ SO ₄ y 0,1M acetato sódico pH4,6	1,6M Li ₂ SO ₄
	20% PEG 8000, 0,1M citrato pH5,6 y 0,2M NaCl	40% PEG 8000
HK853-RR468 ^{pH5}	1,8M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1M Citrato pH7,5	2M Li ₂ SO ₄ ,
	1,8M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1M Citrato pH7	2M Li ₂ SO ₄
	1,8M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1M Citrato pH6,5	2M Li ₂ SO ₄
	1,5M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1M BisTris pH5,5	2M Li ₂ SO ₄
HK853-RR468 ^{D53A}	1,2M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1M Bistris pH5,3	1,6 M Li ₂ SO ₄
	1,8M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1M citrato pH7,5	2M Li ₂ SO ₄
HK853 ^{H260A} -RR468 ^{D53A}	1,2M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1M Bistris pH5,3	1,6 M Li ₂ SO ₄
	1,8M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1M citrato pH7,5	2M Li ₂ SO ₄

3.8.2. Cristalización de OmpR_{REC}^{G63V}

La cristalización de OmpR_{REC}^{G63V} se llevó a cabo con una mezcla de 0,3μl de proteína a 10mg/ml y 0,3μl de la solución de cristalización que consistía en 0,1M de acetato sódico pH 4,6 y 8% de PEG 4000. Para vitrificar los cristales previos a la difracción se incrementó la concentración de PEG 4000 a 20% y se añadió 15% de etilenglicol.

3.8.3. Cristalización de la HK ancestral HK_{MET}

Para abordar la cristalización de la HK ancestral HK_{MET} se preparó una mezcla a 10mg/ml de la HK con 4mM de AMP-PNP, un análogo no hidrolizable del ATP. Se obtuvieron gran cantidad de cristales en diversas condiciones que aparecían en pocos días. Los mejores cristales crecieron en 16% PEG 3500, 0,2M NaF y 0,1M BisTris Propano pH7,5.

3.8.4. Cristalización de RRs RR_{MET589-1} y RR_{MET572} de *Methanobrevibacter sp.*

Para abordar la cristalización de cada uno de los reguladores RR_{MET589-1} y RR_{MET572} se prepararon placas de cristalización conteniendo 10mg/ml de RR en ausencia y presencia de 5mM BeSO₄, 30mM NaF y 7mM MgCl₂ para formar BeF₃⁻. Los cristales obtenidos para RR_{MET589-1} crecieron en 30% PEG 8000 y 0,2M (NH₄)₂SO₄, incrementándose el PEG8000 al 35% para preparar una disolución crioprotectora durante la congelación. En el caso de RR_{MET572} los cristales crecieron en 1,2M (NH₄)₂SO₄, 3% 2-Propanol y 0,05M Citrato Sódico, y la crioprotección se realizó intercambiando el (NH₄)₂SO₄ por Li₂SO₄ e incrementando la concentración a 1,6M.

3.9. Recogida de datos y procesado

Todos los cristales obtenidos en este trabajo fueron difractados en los sincrotrones: ALBA (Cerdanyola del Vallés, España) y Diamond Light Source (DLS; Didcot, Inglaterra). Una vez recogidos los datos de difracción, las imágenes fueron integradas utilizando el programa XDS (Kabsch W. 2010) y

Mosflm (Powell H. R., et al., 2013). La verificación del grupo espacial y la reducción de los datos se llevó a cabo utilizando los programas Pointless y Aimless, pertenecientes a la interfaz CCP4 Suite (Emsley P. et al., 2010; Winn M. et al, 2011). Las fases fueron obtenidas mediante reemplazo molecular mediante el programa Phaser (CCP4). Para trazar estructuras obtenidas a resoluciones iguales o mayores de 2Å se utilizó el trazado automático como fase inicial de reconstrucción del modelo utilizando programa ArpWarp (CCP4). El modelo final se obtuvo mediante ciclos de trazado y refinado utilizando los programas COOT (Emsley P et al., 2010) y Refmac5 (CCP4), respectivamente. Las figuras de las estructuras que aparecen en este trabajo fueron generadas con el programa UCSF CHIMERA (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>).

Todas las estructuras de los complejos pertenecientes al TCS HK853-RR468 fueron resueltas por remplazo molecular utilizando el PDB:3DGE como modelo, bien utilizando dominios aislados e incluso eliminando loops que pudieran sufrir algún cambio conformacional dificultando la obtención de fases. Además, en el modelo se mutaron los residuos catalíticos H260 y D53 a Ala para determinar correctamente el rotámero correspondiente en cada estructura. En la siguiente Tabla 3.16 se muestran los datos de la recogida de cada uno de los cristales difractados.

Tabla 3.16. Datos correspondientes a la difracción de cristales.

Cristales	Beamline	Resolución	λ
HK853-RR468^{E88A/E89A}	BL23-XALOC	2,6Å	0,97926
	I24 del DLS	2,3Å	0,96862
HK853-RR468^{M55A}	BL23-XALOC	2,6Å	0,97926
HK853-RR468^{M56A}	BL23-XALOC	2,8Å	0,97926
	BL23-XALOC	2,3Å	0,97926
	BL23-XALOC	2,0Å	0,97926
HK853-RR468^{M55A/M56A}	BL23-XALOC	2,6Å	0,97929
	BL23-XALOC	2,55Å	0,97929
HK853-RR468^{7,5}	BL23-XALOC	2,2Å	0,97927
HK853-RR468⁷	BL23-XALOC	2,83Å	0,97927
HK853-RR468^{6,5}	BL23-XALOC	2,35Å	0,97927
HK853-RR468^{5,5}	I04 de DLS	2,9Å	0,97917
HK853-RR468^{D53A}pH5,3	BL23-XALOC	2,0Å	0,97926
HK853-RR468^{D53A}pH7	BL23-XALOC	2,0Å	0,97926
HK853^{H260A}-RR468^{D53A}pH5,3	BL23-XALOC	2,0Å	0,979260
HK853^{H260A}-RR468^{D53A}pH7,5	BL23-XALOC	1,9Å	0,97926
OmpR_{FL} – DNA F1.1	BL23-XALOC	10Å	0,979260
OmpR_{FL} – DNA F1.4	BL23-XALOC	8Å	0,979260
OmpR_{REC}^{G63V}	BL23-XALOC	1,6 Å	0,979260
Met_{HK}	BL23-XALOC	4Å	0,979260
RR_{MET589-1}	I04 de DLS	1,5Å	0,9795
RR_{MET572}	I04-1 de DLS	1,5Å	0,91587

4. Resultados





4.1. Estudio funcional y estructural de la reacción de fosfotransferencia

La transducción de la señal en un TCS implica una íntima interacción entre la pareja HK-RR para que se transfiera un grupo fosforilo desde la HK hacia el RR en la reacción de fosfotransferencia, o para que la HK induzca la defosforilación del RR fosforilado en la reacción fosfatasa. Estudios estructurales realizados con el complejo formado por HK853 y RR468 permitieron observar una serie de residuos implicados en este reconocimiento HK-RR (Casino et al., 2009; Podgoraia et al., 2013). Estas estructuras se adscribieron a la reacción fosfatasa, por lo que se desconocía si estos residuos contribuían de la misma manera en el reconocimiento HK-RR en la reacción de fosfotransferencia. Durante la realización de la presente Tesis se publicaron datos estructurales del complejo entre la HK DesK de la familia HisKA_3 y su RR pareja DesR en dos conformaciones, fosfotransferencia y fosfatasa, presentando ambas conformaciones diferencias como se indicó en la introducción. Sin embargo, estas diferencias podrían ser propias de la familia HisKA_3 a la que este TCS pertenece. En la familia HisKA existan diferentes conformaciones para catalizar la reacción de autofosforilación y la fosfatasa. Las HKs CpxA, EnvZ y HK853 (Mechaly et al., 2014; Casino et al., 2014) pertenecientes a esta familia adoptan una conformación asimétrica en la reacción de autofosforilación, mientras que el complejo HK853-RR468, el único complejo HK-RR del que se dispone información estructural para esta familia, adopta una conformación simétrica en la reacción fosfatasa. Estos datos justifican el estudio de las bases moleculares de la reacción de fosfotransferencia en la familia HisKA, la más abundante en TCS.

Para estos estudios se utilizó el TCS modelo HK853-RR468 de *Thermotoga maritima*. Este sistema se ha utilizado con anterioridad para describir las bases moleculares de la reacción de autofosforilación y fosfatasa en la familia HisKA (Casino et al., 2014; Casino et al., 2009), así como el reconocimiento HK-RR (Casino et al., 2010) y es considerado en la actualidad con un sistema modelo para esta familia y ampliamente utilizado en el campo. HK853 es una HK canónica que consta tan solo de un dominio extracelular sensor y los dominios DHP y CA catalíticos citoplasmáticos,

mientras que RR468 es un RR que solo posee dominio REC. A pesar de no conocerse la señal que lo controla ni los procesos que regula se tiene gran información funcional y estructural de este sistema (Marina et al., 2005; Casino et al., 2009; Casino et al., 2010; Casino et al., 2014).

4.1.1. Reacción de fosfotransferencia en HisKA HKs

El análisis estructural de HKs catalizando reacciones específicas ha sido de gran utilidad no solo para conocer los residuos claves que catalizan estas reacciones y el papel que juegan en ellas, sino para observar los cambios conformacionales de los diferentes dominios catalíticos, CA y DHP, requeridos para cada reacción. Estos cambios deben estar gobernados por la señal, y por ello nos informan del mecanismo de transducción de ésta. Aunque, existen datos estructurales para la reacción de autofosforilación y fosfatasa de HisKA HKs (Casino et al., 2009; Casino et al., 2014) carecemos de estos datos para la reacción de fosfotransferencia.

Uno de los objetivos de la presente tesis era obtener datos estructurales de dicha reacción que había sido esquiva en el campo durante mucho tiempo. Nuestra hipótesis de partida fue que esta reacción era altamente efímera, tal vez por la conformación que adquiriría el complejo HK-RR para catalizarla, y por ello había sido difícil atraparla en un cristal, ya que la aproximación usada de forma habitual había sido la cristalografía de macromoléculas. Así pues, se diseñaron diversos mutantes en el TCS HK853-RR468 que permitieran modificar el equilibrio en las reacciones de fosfotransferencia-fosfatasa. De esta forma, se favorecería la fosfotransferencia bien eliminando la reacción fosfatasa o reduciéndola, por lo que dichos mutantes podrán quedar bloqueados catalizando la reacción de fosfotransferencia, lo que se aprovecharía para resolver su estructura tridimensional. Para ello, se seleccionaron residuos del RR468 en regiones correspondientes a $\text{L}\beta\text{3}\alpha\text{3}$ y $\text{L}\beta\text{4}\alpha\text{4}$ que previamente se habían descrito como zonas de reconocimiento del estado de fosforilación HK-RR (Casino et al., 2009). De hecho, los cambios conformacionales en estos loops son los más importantes que ocurren en el RR entre los estados fosforilado y no fosforilado junto con la dupla Y-T indicada en la introducción que suele utilizarse para determinar el estado de activación del RR (Casino et al., 2009).

4.1.2. Efecto de mutaciones en RR468 sobre las actividades de fosfotransferencia y fosfatasa

Para entender el equilibrio entre las reacciones de fosfotransferencia y fosfatasa de HK853-RR468, y poder modificarlo de manera que se favorezca la fosfotransferencia se introdujeron mutaciones en los residuos E88 y E89 del L β 4 α 4 (RR468^{E88AE89A}), mutaciones simples en los residuos M55 y M56 del L β 3 α 3 (RR468^{M55A}, RR468^{M56A}), así como el doble mutante en los residuos anteriores (RR468^{M55AM56A}). Estos residuos fueron escogidos de acuerdo con datos estructurales que apuntaban un papel relevante al comparar las estructuras de RR468 fosforilada (RR468-P) y no fosforilada (RR468-apo) tanto en complejo con HK853 como en solitario. De este modo, se superpuso la estructura de RR468-P sobre la estructura del complejo y se observó que el residuo M55 del RR se interpone entre los residuos catalíticos H260 y D53 (Figura 4.1a). Mientras, el residuo M56 es un residuo conservado en RRs que está implicado en la estabilidad del RR fosforilado permitiendo el cambio conformacional del L β 3 α 3 durante la fosforilación (Banerjee et al., 2014), como muestra la comparación de RR468 en forma fosforilada y apo (Figura 4.1b). En el complejo HK853-RR468, los residuos E88 y E89, localizados en el L β 4 α 4, intervienen en la interacción con el loop que conecta los dominios DHp y CA de HK853. Esta conexión cambia de conformación si la estructura del HK es simétrica o asimétrica, lo que ocurre en las reacciones fosfatasa y quinasa, respectivamente (Figura 4.1c). Además, el L β 4 α 4 del RR presentan también cambios conformacionales entre las formas fosforilada y no fosforilada de RR468 (Figura 4.1b), por lo que estos dos loops han sido denominados elementos de reconocimiento del estado de fosforilación (Casino et al., 2009).

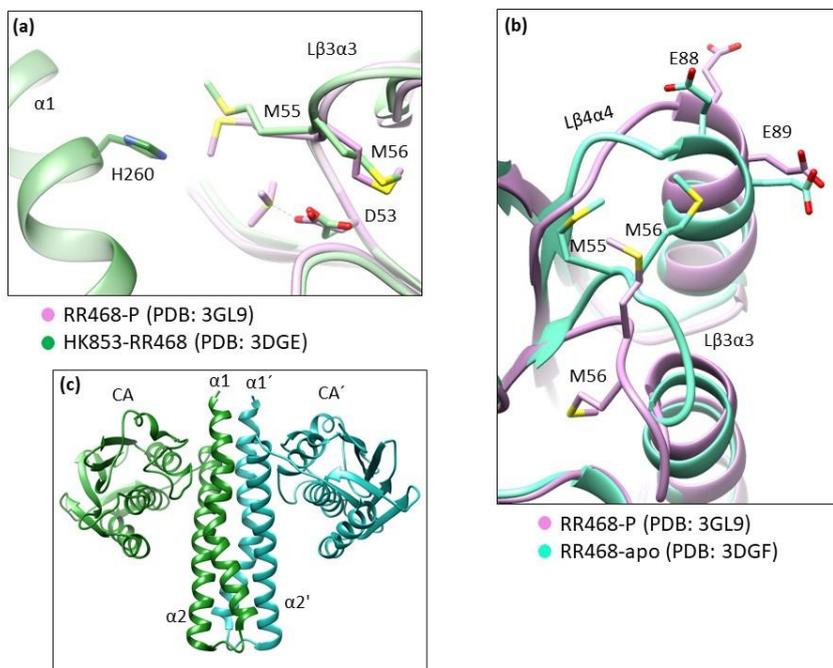


Figura 4.1. Análisis de estructuras para determinar mutantes de RR468. (a) Superposición del complejo HK853-RR468 donde se observan los residuos catalíticos H260 y D53. Además, se resaltan los residuos M55 y M56 donde se puede observar el movimiento que interfiere la interacción de los residuos catalíticos. (b) Superposición de RR468 en sus formas apo y fosforilada. Se observa el movimiento de los $L\beta 3\alpha 3$ y $L\beta 4\alpha 4$, además se resaltan los residuos analizados para las mutaciones. (c) HK853 en su conformación simétrica correspondiente a la reacción fosfatasa (PDB: 3DGE).

En primer lugar, se realizaron estudios de fosfotransferencia con HK853 y los distintos mutantes de RR468 con el fin de analizar si las mutaciones producían cambios en el equilibrio fosfotransferencia-fosfatasa. Para ello, se fosforiló HK853 con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP durante 10 min, posteriormente se eliminó el $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP libre y se añadió cada uno de los RRs mutantes incubando la reacción hasta 30 min. En la Figura 4.2 se observa la diferencia en la velocidad o capacidad de HK853 para fosfotransferir y desfosforilar a los RRs mutantes respecto de RR468 salvaje (RR468^{WT}).

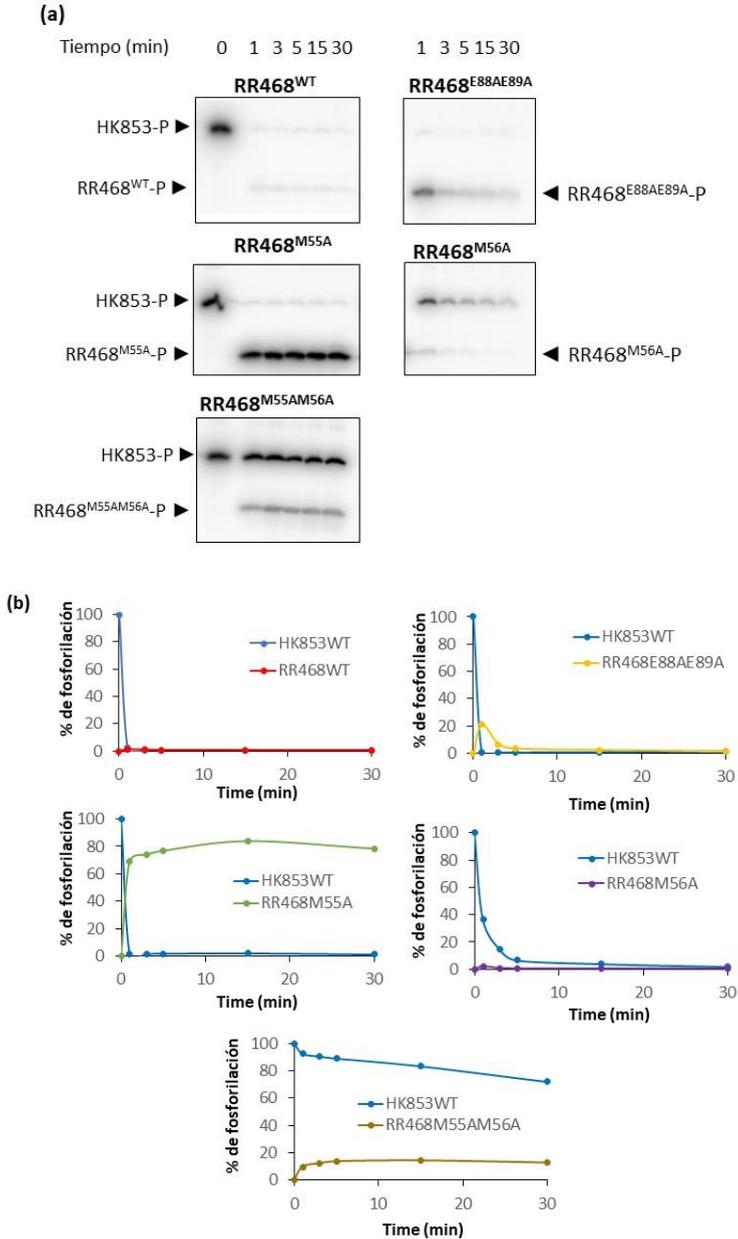


Figura 4.2. Fosfotransferencia de HK853 a las variantes de RR468salvaje y mutantes. (a) Autoradiografía mostrando la fosforilación de HK853 (tiempo 0) y posterior fosfotransferencia a RR468 durante 1, 3, 5, 15 y 30 min de incubación **(b)** Cuantificación de la fosforilación de HK853^{WT} y de las variantes de RR468 para cada autoradiografía.

Como se puede observar, la fosfotransferencia desde HK853 a RR468^{E88AE89A} es igual de rápida que a RR468^{WT}. Para RR468^{WT} la banda correspondiente al RR fosforilado apenas es apreciable, indicando que HK853 rápidamente desfosforila a RR468^{WT}-P. Por el contrario, la banda correspondiente a RR468^{E88AE89A}-P se acumula a corto plazo y va disminuyendo con el tiempo indicativo de que la actividad fosfatasa podría estar afectada (Figura 4.2a y 4.2b). La fosfotransferencia a RR468^{M55A} es igual de eficiente que a RR468^{WT}, pero se puede observar claramente que la banda correspondiente al RR mutante fosforilado no disminuye durante el tiempo, indicativo de una muy reducida o nula actividad fosfatasa. Al contrario que en los mutantes RR468^{E88AE89A} y RR468^{M55A}, la fosfotransferencia a RR468^{M56A} está reducida, un 40% frente a RR468^{WT} durante el primer minuto de incubación, pero no se observa acumulación del RR fosforilado lo que implica que o bien existe actividad fosfatasa o bien la fosforilación del RR mutante es inestable o está impedida. De forma interesante, la fosfotransferencia a RR468^{M55AM56A} tiene un efecto combinado de los mutantes M55A y M56A, donde la fosfotransferencia está reducida y se observa la acumulación del RR mutado fosforilado que se mantiene estable durante el tiempo.

Posteriormente, se analizó si los niveles de RR fosforilado para cada uno de los mutantes estaba relacionada con la actividad fosfatasa propia o mediada por la HK. Para ello, se fosforiló cada uno de los mutantes con el fosfodonor acetil fosfato (AcP) radioactivo y se calculó la vida media del RR-P en presencia y ausencia de HK853. Tras incubar estos RRs con AcP radioactivo durante 60min se observó que tanto RR468^{M55A} como RR468^{E88AE89A} son capaces de fosforilarse de forma similar a RR468^{WT}. En ausencia de HK853 estas dos formas mutantes presentan una alta estabilidad, muy similar a la forma WT, manteniendo estable dicha fosforilación con el tiempo (Figura 4.3 y 4.4). Al añadir HK853, se produce una pérdida de fosforilación, esperable por la actividad fosfatasa, que a los 30s resulta sobre ~40% para RR468^{WT} y sobre ~25% para RR468^{E88AE89A} aunque ambos pierden el 80% de la fosforilación a los 15 min. Mientras, la presencia de HK853 sobre RR468^{M55A} fosforilado produce una pérdida de fosforilación bastante menor a los 30s, sobre el ~20%, que aumenta hasta el 40% a los 15 min. Esto demuestra que el mutante RR468^{M55A} presenta una reducción en desfosforilación inducida por HK853 de alrededor del 50%

respecto de RR468^{WT}. Por otro lado, los mutantes RR468^{M56A} y RR468^{M55AM56A} no se fosforilaron en presencia de AcP, a diferencia de lo observado en la fosfotransferencia donde principalmente con RR468^{M55AM56A} se observaba una acumulación de la forma fosforilada del mutante. Estos datos indicarían que la mutación M56A está inhabilitando la autofosforilación de RR468, ya que, si la falta de la forma fosforilada del mutante se debiera a un aumento en la inestabilidad del mutante o un aumento de su auto desfosforilación, no se observaría el acúmulo de dichas formas tras la fosfotransferencia desde HK853 (Figura 4.2). Este último hecho apoya que la fosforilación de los mutantes RR468^{M56A} y RR468^{M55AM56A} en la fosfotransferencia está favorecida gracias a la interacción con HK853 que promueve los cambios conformacionales necesarios para que se adquiriera la conformación competente para ser fosforilada.

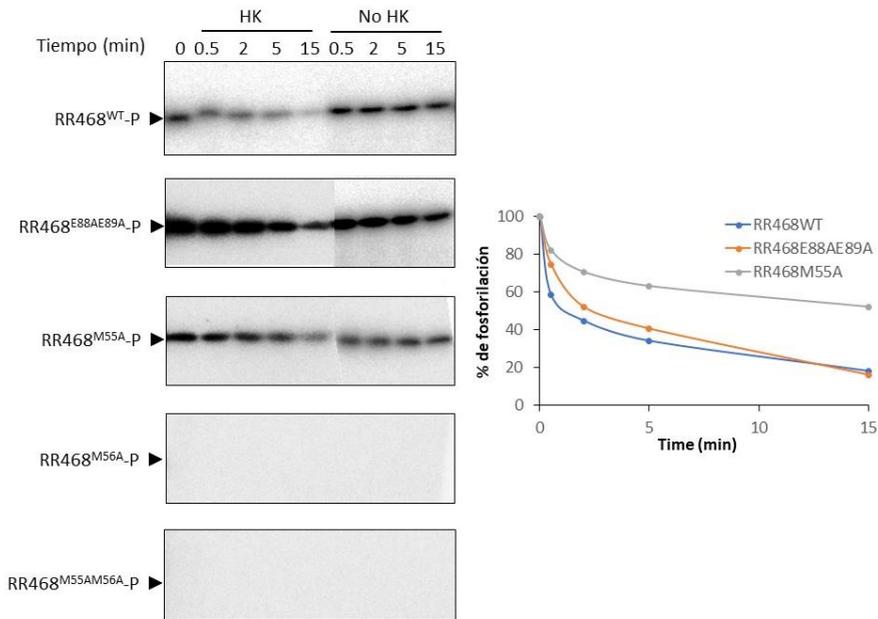


Figura 4.3. Fosforilación de las variantes de RR468 y la actividad fosfatasa en presencia de HK853. Autorradiografía mostrando estabilidad de fosforilación de las variantes de RR468 durante 0.5, 2, 5 y 15 min, una vez fosforiladas en presencia de AcP-radioactivo tanto en ausencia como en presencia de HK853. El panel derecho muestra las curvas de la cuantificación correspondiente al % de fosforilación de RR468 y sus mutantes en la presencia de HK853.



Para analizar qué mutación M55A o E88AE89A inducía mayor estabilidad de RR fosforilado, se calculó la vida media de los mutantes RR468^{E88AE89A} y RR468^{M55A} previamente fosforilados durante 1h en presencia de AcP radioactivo. La incubación de los RRs mutantes fosforilados se siguió durante 6 horas a temperatura ambiente (Figura 4.4). La comparación de la vida media entre los mutantes y RR468^{WT} indica que este último es el más estable fosforilado (11.7 h), seguido de RR468^{E88AE89A}-P (9.6 h) y finalmente RR468^{M55A}-P (4.4 h). Esto sugiere que las mutaciones realizadas han afectado la capacidad de mantener al grupo fosforilo unido en el centro activo del RR pese a no verse disminuida la capacidad de ser fosforilado por HK853 durante la fosfotransferencia o por el fosfodoador. Con estos resultados el mutante RR468^{M55A} resultó ser nuestro mejor candidato para estudiar la reacción de fosfotransferencia por cristalografía, ya que a pesar de ser el más inestable en su forma fosforilable, presenta una reducción de la desfosforilación inducida por la HK de alrededor del 50%.

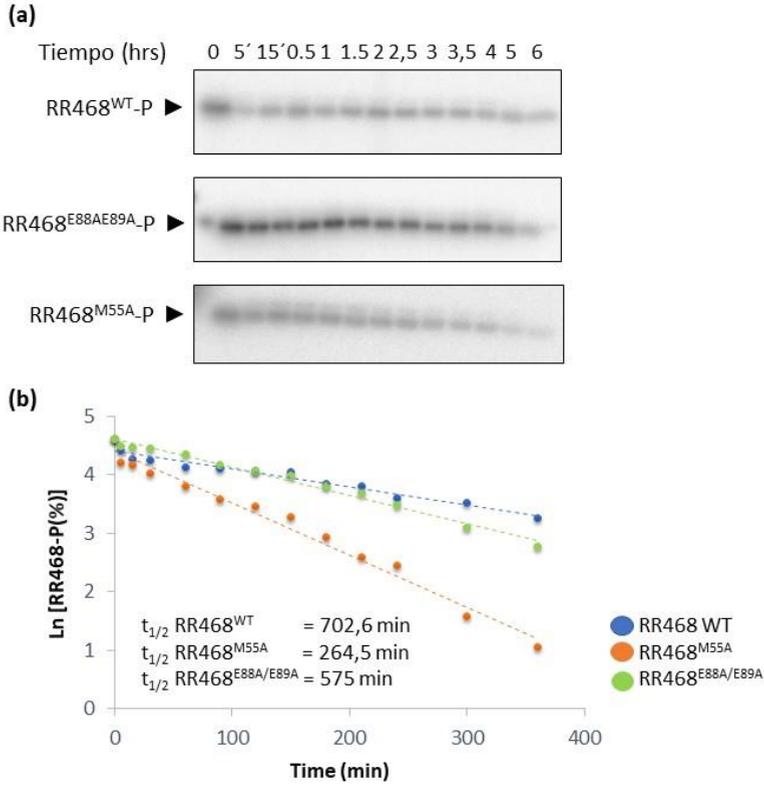


Figura 4.4. Vida media de fosforilación de variantes para RR468. (a) Fosforilación de RR468^{WT}, RR468^{M55A} y RR468^{E88A/E89A} con AcP radioactivo durante 1h (tiempo 0) e incubación posterior hasta 6h a T^a ambiente tomando muestra a diferentes tiempos (5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300 y 360 min). (b) Cuantificación de la fosforilación realizada en a) durante el tiempo de incubación. En el eje de ordenadas se representa el % de RR fosforilado.

4.1.3. Estructuras del complejo HK853 con los mutantes de RR468

Los estudios enzimáticos llevados a cabo entre HK853 y los RRs mutantes evidenció un efecto sobre el equilibrio de las reacciones de fosfotransferencia y fosfatasa, favoreciéndose en algún caso la reacción de fosfotransferencia. Con el fin de comprender el efecto que tenían las mutaciones de RR468 en la interacción con HK853 para desplazar dicho equilibrio se llevó a cabo una aproximación estructural mediante la cristalización del complejo HK853-RR mutante en presencia del fosfomimético BeF_3^- y el nucleótido ADP. Se obtuvieron diferentes formas cristalinas para estos complejos en diferentes condiciones. El análisis de estos cristales evidenció que estos cristales pertenecían a dos grupos espaciales diferentes para los cristales obtenidos, uno monoclinico I2 (celda; $a=69/b=93.2/c=174 \text{ \AA}$ y $\alpha=\gamma=90^\circ$ y $\beta=93.5^\circ$), similar al observado para el complejo HK853-RR468^{WT} (Casino et al 2009), y un grupo espacial trigonal P3₁21 (celda; $a=77.7/b=77.7/c=72.3 \text{ \AA}$ y $\alpha=\gamma=90^\circ$ y $\beta=120^\circ$). Los complejos del mutante RR468^{E88AE89A} cristalizaron en ambos grupos espaciales, mientras que para los complejos HK853-RR468^{M55A} y HK853-RR468^{M56A} solo se obtuvieron cristales que difractaron en el grupo espacial, P3₁21, (Tabla 4.1). Los datos cristalográficos obtenidos para HK853-RR468^{E88AE89A} en el grupo espacial P3₁21, también fueron reprocesados en P1, para confirmar la correcta selección del grupo espacial. Finalmente, todos nuestros intentos de cristalizar el complejo de HK853 con el doble mutante RR468^{M55AM56A} solo rindieron cristales con nula capacidad de difracción o cristales que presentaban solo una de las dos moléculas, sugiriendo un complejo altamente transiente.

Tabla 4.1. Datos de difracción y refinado de los complejos con los RR mutantes. En paréntesis se muestran los datos para la celda de mayor resolución.

	HK853 - RR468 ^{E88AE89A}			HK853 - RR468 ^{M55A}	HK853 - RR468 ^{M56A}
Condiciones de cristalización	0,1M Citrato pH5,6; 0.015M Imidazol pH6,5; 1,6M NH ₄ SO ₄	20% PEG 8000; 0,1M CHES pH9,5		10% PEG 6000; 0,01M MgCl ₂	20% PEG 8000; 0,1M Tris pH8,5
Recogida de datos					
Grupo espacial	I2	P3 ₁ 21	P1	P3 ₁ 21	P3 ₁ 21
a, b, c (Å)	69,0 92,2 174,0	77,7 77,7 72,3	72,31 77,70 77,73	75,0 75,0 70,7	80,0 80,0 73,3
α, β, γ, (°)	90,0 93,5 90,0	90,0 90,0 120,0	60,1 89,87 89,89	90,0 90,0 120,0	90,0 90,0 120,0
Resolución (Å)	86,87-2,6 (2,72-2,6)	67,33- 2,27 (2,34-2,27)	72,31-2,70 (2,77-2,70)	64,99-2,6 (2,72-2,6)	69,31-2,8 (2,95-2,8)
No. Reflexiones totales	31798	12044	35780	6428	6106
Rmerge	0,063 (0,708)	0,164 (0,873)		0,350 (1,344)	0,137 (0,599)
I / σI	11,9 (1,9)	7,0 (2,5)		5,8 (2,2)	8,2 (2,5)
Complejidad (%)	99,2 (99,2)	100 (100)	93,36	100 (100)	100 (100)
Redundancia	3,7 (3,9)	8,8 (7,1)		8,9 (8,8)	8,4 (8,5)
Refinado					
Rwork / Rfree	0,2157 / 0,2702	0,2197 / 0,2626	0,2487 / 0,2899	0,2163 / 0,2570	0,2085 / 0,2580
No. átomos	5727	1448	8297	1403	1406
Proteína	5504	1413		1361	1390
Ligando/ión	117	5		5	5
Agua	103	30		37	11
Promedio factores B (Å²)	68,23	62,9	62,479	55,5	76,1
Desviaciones RMSD					
Distancia de enlace (Å)	0,019	0,016		0,010	0,007
Ángulos de enlace (°)	1,998	1,83		1,28	1,13

Las estructuras tridimensionales a partir de los datos de estos cristales se resolvieron mediante reemplazo molecular utilizando como modelo las estructuras de HK853 y RR468 pertenecientes al PDB: 3DGE.

4.1.2.1 *Análisis estructural del complejo HK853-RR468^{E88AE89A} en el grupo espacial I2*

Como podría anticiparse por la identidad del grupo espacial y celda, el complejo obtenido con HK853-RR468^{E88AE89A} en el grupo espacial I2, mostró un dímero simétrico de HK853 unido a dos moléculas de RR468^{E88AE89A} en la unidad asimétrica, casi idéntico (RMSD 0,64 Å para 709 residuos) al observado para el complejo HK853-RR468^{WT} (PDB: 3DGE) previamente descrito como modelo de la reacción fosfatasa (Casino et al., 2009) (Figura 4.5a). En la estructura, se observa también la presencia del ligando ADP unido en el dominio CA de HK853 y el fosfomimético BeF₃⁻ unido al D53 fosforilable de RR468^{E88AE89A}, confirmando una conformación fosforilada para el RR mutante. Si comparamos los RRs de los complejos HK853-RR468^{E88AE89A} y HK853-RR468^{WT} junto con RR468^{WT} unido a BeF₃⁻ libre (PDB:3GL9) se observa que todos ellos son muy similares (RMSD 0.834) y la única diferencia estructural reside al final del Lβ4α4 donde se encuentran los residuos mutados (Figura 4.5b). En los centros activos de HK853-RR468^{E88AE89A}, el BeF₃⁻ ocupa la posición del ion sulfato en el complejo HK853-RR468^{WT} (PDB: 3DGE) que actuaba como fosfomimético, pero no se observa presencia del átomo de oxígeno que se propuso como molécula de agua catalítica. En el complejo mutante, la cadena lateral del residuo fosforilable H260 de HK853 se encuentra orientada hacia el BeF₃⁻ (Figura 4.5c). De esta forma, la estructura del complejo mutante HK853-RR468^{E88AE89A} emula la reacción fosfatasa observada previamente para el complejo HK853-RR468^{WT}. Este hecho no debería sorprender ya los estudios funcionales han mostrado que HK853 sigue manteniendo actividad fosfatasa sobre RR468^{E88AE89A}.

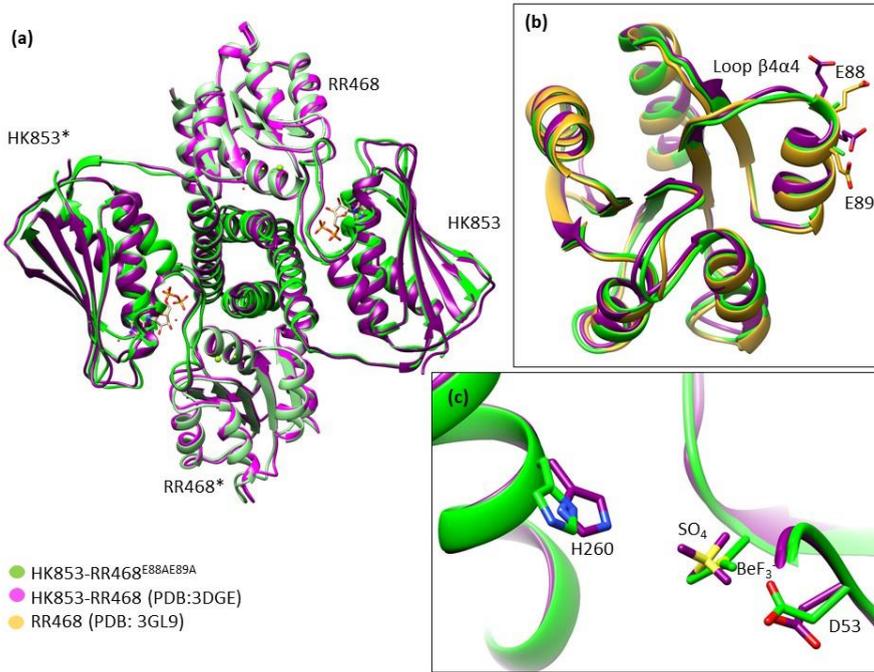


Figura 4.5. Comparación del complejo HK853-RR468^{E88A E89A}-1121 con HK853-RR468^{WT}. (a) Superposición de ambas estructuras donde las HKs están en colores fuertes y el RR en tonos más claros. (b) RRs de los dos complejos mostrando la cadena lateral de los residuos E88 y E89. (c) Centro activo de la HK y el RR con las cadenas laterales de los residuos catalíticos y el SO_4 ó BeF_3^- que se encuentra en el RR.

Como ya se ha descrito para el complejo HK853-RR468^{WT} (Casino et al 2009), la superficie principal de reconocimiento e interacción de HK853 con RR468^{E88A E89A} implica la hélice $\alpha 1$ de una subunidad de la HK y la hélice $\alpha 1$ del RR. En menor medida, también se producen interacciones entre HK853 con regiones periféricas de RR468^{E88A E89A} como la que ocurre entre ATP-lid de una subunidad de HK853 y el $\text{L}\beta 3\alpha 3$ del RR. Sin embargo, la mutación a Ala en los residuos E88 y E89 impide una de estas interacciones periféricas, que se habían propuesto como de reconocimiento del estado de fosforilación (Casino et al., 2009) y que se producía entre el $\text{L}\beta 4\alpha 4$ y el loop DHP-CA de la subunidad contraria de HK853. En el complejo HK853-RR468^{WT} los residuos E88 y E99 de RR468 interactúan con Q321 y R314 de HK853, respectivamente. Por su parte, en el complejo HK853-RR468^{E88A E89A} estas interacciones se pierden, aunque no se observan grandes cambios en los elementos estructurales donde los residuos se encuentran, indicando que el

efecto de la mutación debe provocar tan solo una pérdida de interacciones que provocaría un debilitamiento del reconocimiento HK-RR, justificando los efectos observados en la actividad fosfatasa (Figura 4.6).

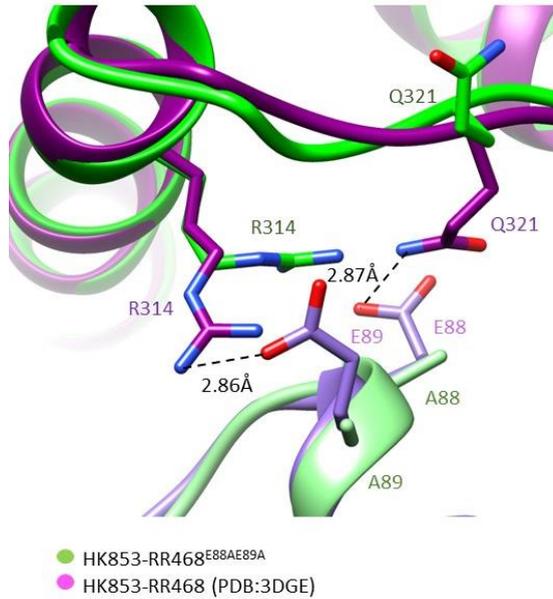


Figura 4.6. Interacciones entre el L β 4 α 4 y el loop DHp-CA. Superposición del complejo HK853-RR468^{E88AE89A} con el complejo HK853-RR468^{WT} (PDB: 3DGE) donde se resaltan las cadenas laterales de los residuos que interaccionan entre el L β 4 α 4 y el loop DHp-CA con las correspondientes distancias. Los residuos se encuentran coloreados de acuerdo con su estructura correspondiente.

4.1.2.2 Estructuras de los complejos mutantes en el grupo espacial P3₁21

Los complejos HK853-RR468^{E88AE89A}, HK853-RR468^{M55A} y HK853-RR468^{M56A} que cristalizaban en el grupo espacial P3₁21 (Tabla 4.1) presentaban un tamaño de celda cuyas dimensiones hacían incompatible albergar una subunidad de HK853 (DHp-CA MW=29098) y una molécula de RR468 mutante (MW=13829). El coeficiente de Matthews para la presencia de ambas moléculas sería de 1.47 correspondiente a una ocupación de la celda por las proteínas del 82% con tan solo un 18% de presencia de solvente. Esto

parecía indicar que probablemente el grupo espacial era erróneo o tan solo contenía 1 de los componentes en el cristal. Así pues, se analizaron los datos de nuevo en el grupo espacial P1 para el complejo HK853-RR468^{E88AE89A} y en paralelo se llevaron a cabo estudios de reemplazo molecular con todos los datos cristalográficos en ambos grupos espaciales, y analizando la presencia de los componentes por separado o la posibilidad de que ambos estuvieran presentes. En el caso de HK853 se utilizó como modelo de reemplazo molecular los dominios DHp y CA por separado ya que como se ha indicado la HK puede adquirir diferentes conformaciones en función de la reacción que cataliza.

Para los complejos en el grupo espacial trigonal, el programa Phaser posicionaba en la unidad asimétrica un dominio DHp formado por las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de HK853 y una molécula de RR mutante. Por simetría cristalográfica, se producía el manojo de 4 hélices del dominio DHp característico de las HK dimericas que interaccionaba con dos moléculas de RR mutante. Los ciclos de trazado y refinado en los complejos mutantes produjeron modelos finales con buenos datos estadísticos. Sin embargo, los modelos finales no presentaban densidad electrónica atribuible para la región N-terminal de la hélice $\alpha 1$, el dominio CA y la región final de la hélice $\alpha 2$ que conecta con este impidiendo su trazado. La ausencia de estos dominios generaría unos valores de coeficiente de Matthews más acorde a lo observados en los cristales proteicos e indicaría que el grupo espacial trigonal es el adecuado.

Por su parte, el reemplazo molecular en el grupo espacial P1 posicionó seis dominios DHp de HK853 y seis moléculas de RR468^{E88AE89A}. Los 6 DHp formaban 3 dímeros canónicos que interaccionaba cada uno de ellos con 2 moléculas de RR468. El trazado y refinado final indicó que los tres dímeros eran similares y se observó ausencia de los dominios CA y de los primeros residuos de la $\alpha 1$ y del final de la $\alpha 2$, exactamente igual que ocurría con el grupo espacial trigonal (Figura 4.7).

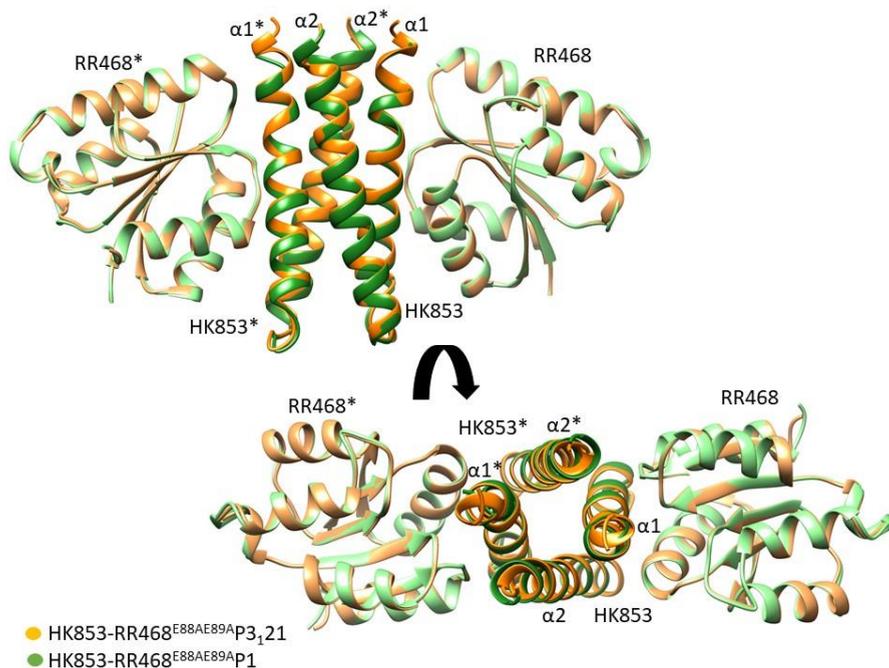


Figura 4.7. Comparación de la estructura de HK853-RR468^{E88AE89A} con los datos en P1 y en P3₁21. En esta comparación se puede apreciar la similitud de la estructura obtenida con cada uno de estos datos, donde se observan claramente un dímero del dominio DHP de la HK y dos moléculas de RR.

El hecho de que no se detectarían problemas como pseudosimetría y twinning en los datos de difracción del grupo espacial trigonal y que el análisis en el grupo espacial P1 rindiese un modelo idéntico con similares datos estadísticos indicaba que la simetría de los cristales era P3₁21. La falta de densidad electrónica atribuible al dominio CA y partes del DHP de HK853 podría ser debida a la proteólisis de estas partes de la proteína o a disposiciones alternativas en el cristal. La mezcla proteica utilizada para los estudios de cristalización fue idéntica para el complejo HK853-RR468^{E88AE89A} obtenido con el grupo espacial P3₁21 e I2, presentando el dominio CA este último, por lo que era poco probable la existencia de actividad proteolítica en la mezcla. También era posible que la actividad proteolítica estuviera inhibida en la mezcla de cristalización para los cristales I2 o que proviniera de los reactivos de cristalización utilizados para los cristales P3₁21. Sin embargo, este hecho parecía poco probable ya que las condiciones de

cristalización donde se obtuvieron cristales eran muy variadas y en muchos casos contenían reactivos similares (Tabla 4.1). Para analizar esta posibilidad se disolvieron unos pocos cristales del complejo para realizar un gel SDS-PAGE, sin embargo, las bandas proteicas teñidas eran tenues y no permitieron obtener datos concluyentes que determinaran un tamaño de HK853 conteniendo el DHp y CA. Alternativamente, la falta de densidad para estas porciones de HK853 podría ser debida a disposiciones alternativas de este dominio dentro del cristal, aunque la falta de espacio debería reducir el número posible de éstas. Aunque era posible que pudiera existir algún otro problema no identificado en los datos de difracción se decidió proseguir con el análisis estructural de los datos en el grupo espacial trigonal.

Como se ha mencionado anteriormente, los complejos HK853-RR468^{E88AE89A}, HK853-RR468^{M55A} y HK853-RR468^{M56A} eran indexables con el mismo grupo espacial y celda. El posicionamiento por reemplazo molecular de HK853 y RR468 y el posterior refinamiento de los modelos rindió la misma composición oligomérica en la celda y la superposición de los complejos finales indicaba que eran muy similares (RMSD ~0.5Å para la superposición de los C α de unos 345 residuos) entre sí (Figura 4.8). El dominio DHp trazado en las 3 estructuras comprendía desde el residuo 257 al 311, pero para el complejo HK853-RR468^{E88AE89A} se observaron 3 residuos extras al inicio de la cadena α 1. En el caso de RR468 se observó la molécula completa en los tres complejos, comprendiendo desde el residuo 1 al 121.

Las diferencias estructurales más importantes entre los tres complejos se observaron en el complejo HK853-RR468^{M56A} y se localizaban en L β 3 α 3 y L β 4 α 4 del RR468 y los primeros residuos de la hélice α 1 de HK853. Además, una observación detallada de los centros activos de cada complejo indicaba dos diferencias importantes, (i) la His fosforilable H260 presentaba rotámeros diferentes y (ii) el Asp fosforilable D53 estaba unido al BeF $_3^-$ solo en RR468^{E88AE89A} y RR468^{M55A}, un dato esperable ya que el mutante RR468^{M56A} presentaba muy baja o nula fosforilación tanto con HK853 o con AcP (Figura 4.9).

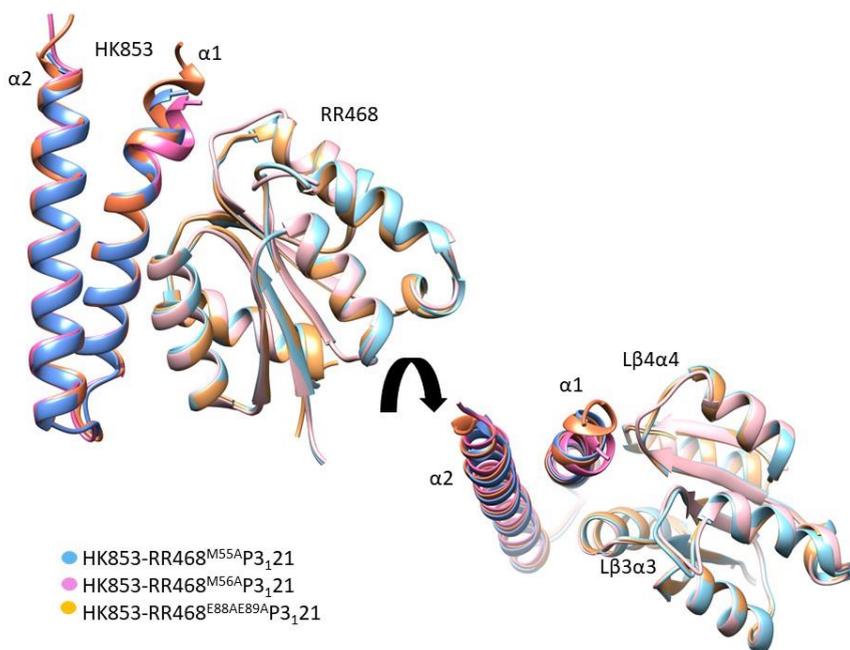


Figura 4.8. Comparación de los complejos HK853-RR468 con los mutantes RR468 en el grupo espacial P_{3,21}. Dos vistas de la superposición de estas estructuras para poder observar las similitudes y diferencias.

En el complejo HK853-RR468^{E88AE89A}, la cadena lateral de H260 de HK853 adquiere una conformación rotámerica *gauche*- que los aleja del D53 de RR468 y del fosfomimético BeF₃⁻. Mientras, en los complejos HK853-RR468^{M55A} y HK853-RR468^{M56A} la cadena lateral de H260 está orientada hacia el BeF₃⁻ o D53 al adquirir una conformación *trans*. En estas diferencias juega un papel clave el residuo M55 del RR468. En el complejo HK853-RR468^{E88AE89A} este residuo se interpone entre la H260 y el fosfo-D53 induciendo al primero a adquirir el rotámero *gauche*-. Obviamente en el mutante RR468^{M55A} este obstáculo desaparece, permitiendo la conformación *trans* que acerca la His y el Asp fosforilable. Por su parte, en el complejo HK853-RR468^{M56A} la M55 está presente pero no impide que la His adquiera el rotámero *trans* porque el extremo N-terminal de la hélice $\alpha 1$ de HK853 se acerca a RR468 e interacciona con L $\beta 4\alpha 4$, desplazando a M55 y haciendo que la H260 se traslade ~ 2 Å hacia el D53 (distancia entre C α) (Figura 4.9).

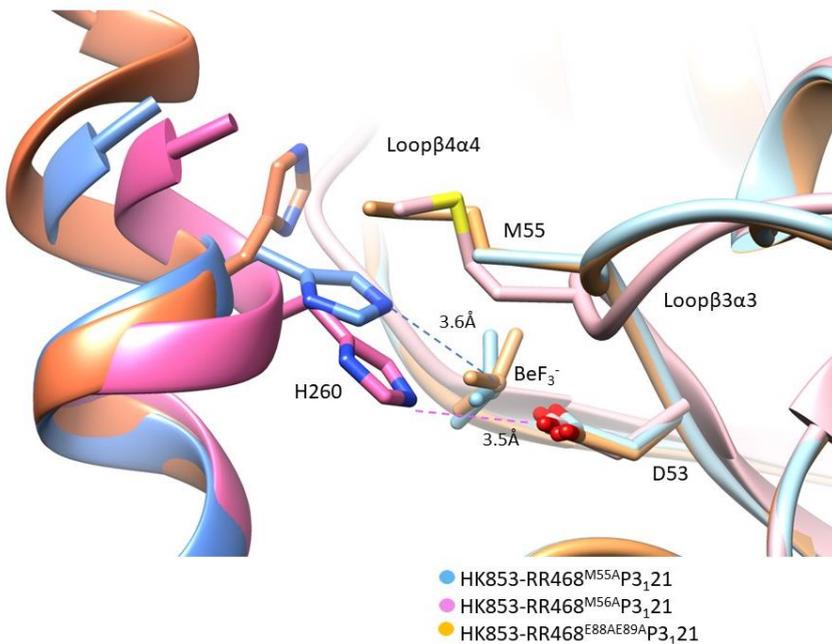


Figura 4.9. Centro activo de los complejos HK853 y RR468 mutantes. Centro activo donde se observan las cadenas laterales de los residuos catalíticos H260 y D53 además de la presencia de BeF_3^- . También se señalan las distancias entre H260, D53 y BeF_3^- en la estructura con el mutante M55A y M56A.

Sorprendentemente, la mutación M55A en el complejo HK853-RR468^{M55A} ha permitido que el Ne de la H260 quede a una distancia de 3.6 Å del Be, un ion que emula al P del fosforilo, mostrando un instante de la reacción de fosfotransferencia. Estos datos estructurales concuerdan con los datos funcionales que demuestran fosfotransferencia desde HK853 a RR468^{M55A} y muy baja actividad fosfatasa confirmando que la mutación M55A ha desplazado el equilibrio de ambas reacciones. Este equilibrio también se ha visto desplazado por la doble mutación E88A - E89A en RR468^{E88AE89A}, pero aunque no ha afectado a la conformación del Lβ4α4 donde dichos residuos residen, ha afectado al reconocimiento con HK853 permitiendo atrapar también la conformación de fosfotransferencia. De hecho, en el complejo HK853-RR468^{E88AE89A}, si H260 adquiriese el rotámero *trans* se obtendría la distancia H260-Be de 3.6 Å observada en el complejo HK853 a RR468^{M55A}. En cambio, la mutación M56A ha tenido un efecto significativo en el centro activo de RR468^{M56A} impidiendo la presencia de fosfomimético y además ha

afectado a la interacción con HK853 de forma que la H260 se aproxima al D53 quedando a una distancia de 3.5 Å. Estos datos indicarían que la H260 puede acercarse todavía más al D53 durante la reacción de fosfotransferencia aumentando el carácter asociativo de esta reacción.

La comparación entre las estructuras de los tres RR mutantes en el complejo, demuestra que RR468^{M56A} ha adquirido una conformación fosforilada en el Lβ3α3 y que el mecanismo Y-T emula a un estado fosforilado pese a no mostrar fosfomimético unido y mostrar inestabilidad de fosforilación en los ensayos funcionales (Ver apartado 4.1.1). Esto es indicativo de que el complejo atrapado en esta forma cristalina corresponde a la HK reconociendo a un RR activado (Figura 4.10).

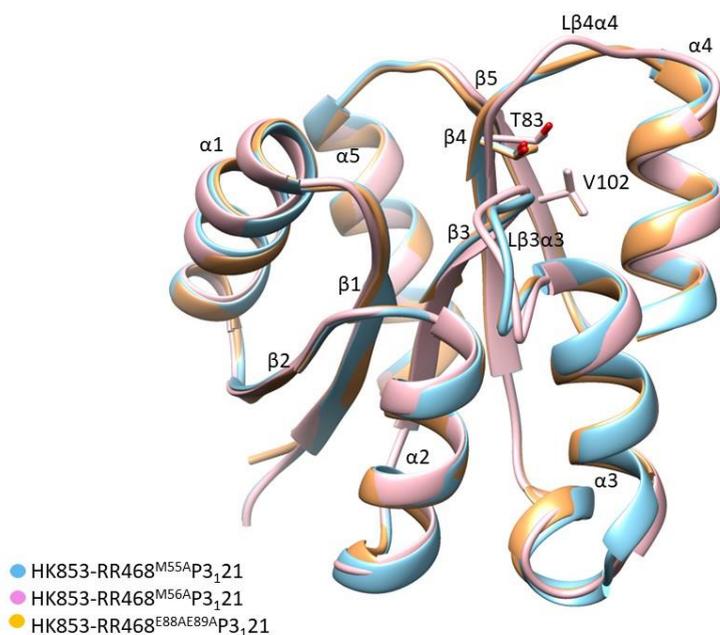


Figura 4.10. Comparación de los RRs en las estructuras pertenecientes al grupo espacial P₃₁₂₁. Se señalan las estructuras secundarias y se observan las cadenas laterales de los residuos T83 y V102, involucrados en el mecanismo Y-T de fosforilación. La posición de estos residuos nos confirma que todos están en una conformación de fosforilación.

4.1.2.3 *Diferencias estructurales entre la reacción fosfatasa y fosfotransferencia*

Para comprender que factores son claves en el reconocimiento HK-RR para realizar la reacción de fosfotransferencia o la de fosfatasa se comparó la estructura HK853-RR468^{WT} previamente publicada que ha sido propuesta como modelo de la reacción fosfatasa (Casino et al., 2009) y las estructuras del complejo de HK853-RR468^{M55A} y HK853-RR468^{M56A}. Ambas estructuras parecen representar la reacción de fosfotransferencia donde la H260 dadora y el D53 aceptor están a una distancia apropiada para catalizar la reacción. En el caso del complejo HK853-RR468^{M55A} se observa como el BeF_3^- actúa de mimético del fosforilo en transición entre la HK y el RR. En la conformación de fosfotransferencia, la parte N-terminal de la hélice $\alpha 1$ de la HK se acerca al RR, llevando consigo en este movimiento a la parte C-terminal de la hélice $\alpha 2$, que se inclina sobre el RR468 también. En esta conformación, si los dominios CA de la HK mantuviesen la misma disposición observada en la conformación fosfatasa se producirían choques que implicarían a residuos de las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del DHp con el ATP-lid del dominio CA en la HK (Figura 4.11). Específicamente, la L309 de $\alpha 2$ chocaría con la T442 del ATP-lid y el E261 de $\alpha 1$ con la P440 del ATP-lid. Por lo tanto, el dominio CA debería adoptar otra disposición en la reacción de fosfotransferencia o el ATP-lid debería desplazarse. Estos movimientos permiten a su vez que la H260 de la hélice $\alpha 1$ se acerque al D53 para la fosfotransferencia. El hecho de que no se observe el dominio CA en la conformación de fosfotransferencia es un indicativo de que se ha producido un cambio en la disposición del CA además de indicar que su papel para estabilizar dicha conformación es menor. De forma que la fosfotransferencia parece ser un paso espontáneo después de la autofosforilación, donde una vez fosforilada la H260, el dominio CA se retira para permitir la transferencia del fosforilo. Por el contrario, en la reacción fosfatasa el dominio CA tiene un papel estabilizador del RR468 al mediar diferentes contactos.

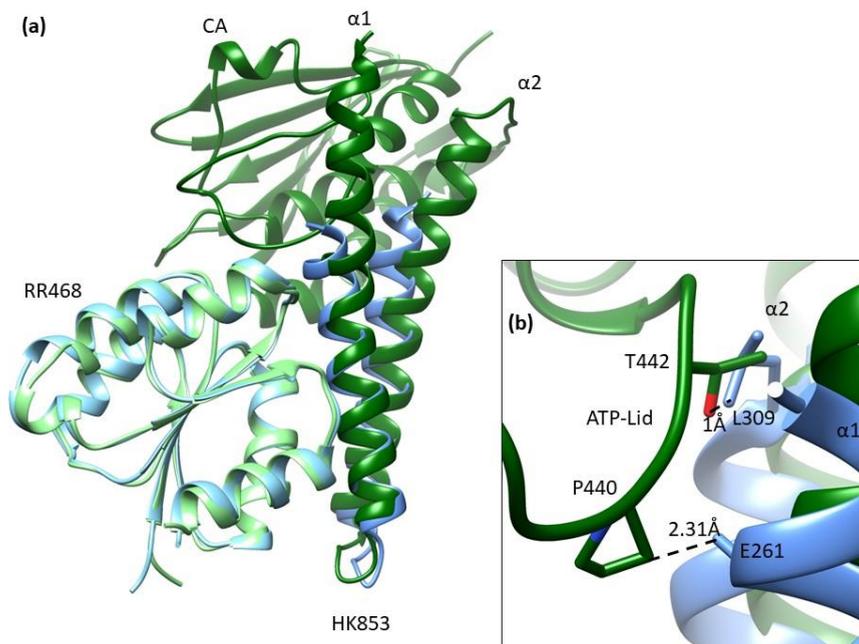


Figura 4.11. Comparación de las estructuras en la reacción fosfatasa y fosfotransferencia. (a) Superposición del complejo HK853-RR468^{WT} y el complejo con la mutación M55. La estructura correspondiente a la reacción fosfatasa (PDB:3DGE) se encuentra en verde y la reacción de fosfotransferencia (HK853-RR468^{M55A}) se encuentra en azul. Las HK están en tono más oscuro que los RR. (b) Acercamiento a los contactos que chocarían entre la ATP-lid y residuos de la $\alpha 1$ y $\alpha 2$.

4.1.2.4 Estructuras de los mutantes RR468^{M56A} y RR468^{M55AM56A}

Los intentos de cristalización de complejos entre HK853 y los mutantes RR468^{M56A} y RR468^{M55AM56A} en presencia de ADP y BeF₃⁻ produjeron cristales en condiciones donde únicamente se encontraba el RR mutante. Se obtuvieron cristales para ambos RR mutantes en dos grupos espaciales diferentes, P6₅22 y P2₁2₁2₁. En el caso del grupo espacial P6₅22 ambas proteínas presentaban idéntico tamaño de celda, pero no era así para los cristales del grupo P2₁2₁2₁, ya que para el mutante RR468^{M55AM56A} uno de los

lados de la celda era casi tres veces mayor que en el mutante RR468^{M56A} (Tabla 4.2). Para todos ellos las estructuras se resolvieron por reemplazo molecular utilizando como modelo RR468^{WT}. Para evitar introducir error en las estructuras, se eliminaron las regiones correspondientes a Lβ3α3 y Lβ4α4 en el modelo ya que su conformación está altamente influenciada por el estado de fosforilación. Además, las mutaciones se encontraban en el Lβ3α3. La resolución de las estructuras de RR468^{M56A} y RR468^{M55AM56A} pertenecientes al grupo espacial P6₅22 mostraron la presencia de una única molécula de RR en la unidad asimétrica. Sin embargo, para el grupo espacial P2₁2₁2₁ el mutante M56A presentaba una molécula de RR y el doble mutante M55AM56A presentaba dos moléculas en la unidad asimétrica, en consonancia con su mayor tamaño de la celda.

Tabla 4.2. Datos de difracción y estadísticas del refinado de las estructuras con RR468^{M56A} y RR468^{M55AM56A}. En paréntesis se muestran los datos para la máxima resolución.

	HK853-RR468 ^{M56A}		HK853-RR468 ^{M55AM56A}	
Condiciones de cristalización	0,1M Citrato pH5,6; 0,1M NaCl; 2M NH ₄ SO ₄	30% PEG 1500	1M NH ₄ SO ₄ ; 0,1M acetato de sodio pH4,6	20% PEG 8000; 0,1M citrato pH5,6; 0,2M NaCl
Recogida de datos				
Grupo espacial	P6 ₅ 22	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P6 ₅ 22	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a, b, c (Å)	89,2 89,2 74,3	34,3 55,3 57,8	89,5 89,5 73,5	53,5 58,7 92,7
α, β, γ, (°)	90,0 90,0 120,0	90,0 90,0 90,0	90,0 90,0 120,0	90,0 90,0 90,0
Resolución (Å)	77,3-2,3 (2,38-2,3)	39,97-2,0 (2,05-2,00)	77,53-2,6 (2,72-2,6)	58,76-2,55 (2,66-2,55)
No. Reflexiones totales	7392	6968	5008	9443
Rmerge	0,111 (1,569)	0,050 (0,204)	0,049 (0,846)	0,041 (0,723)
I / σI	20,8 (2,7)	28,7 (10,8)	26,8 (3,3)	16,5 (2,0)
Compleitud (%)	99,8 (99,8)	99,2 (99,4)	100 (100)	99,2 (100)
Redundancia	20,3 (21,7)	10,9 (11,1)	13,3 (14,0)	4,2 (4,4)
Refinado				
Rwork / Rfree	0,2293 / 0,2870	0,1981 – /0,2630	0,2335 / 0,2803	0,2634 /0,3202
No. átomos	989	972	949	1867
Proteína	950	928	939	1857
Ligando/ión	6	-	-	-
Agua	33	44	10	10
Promedio factores B (Å²)	60,1	36,6	88,9	84,7
Desviaciones RMSD				
Distancia de enlace (Å)	0,011	0,018	0,008	0,007
Ángulos de enlace (°)	1,52	1,99	1,29	1,15

El análisis estructural de los mutantes RR468^{M56A} y RR468^{M55AM56A} en el grupo espacial P6₅22 mostró que ambos RRs presentaban una conformación similar (RMSD: 0,373Å para 122 residuos). Además, no se observó la presencia de fosfomimético en el centro activo (Figura 4.12).

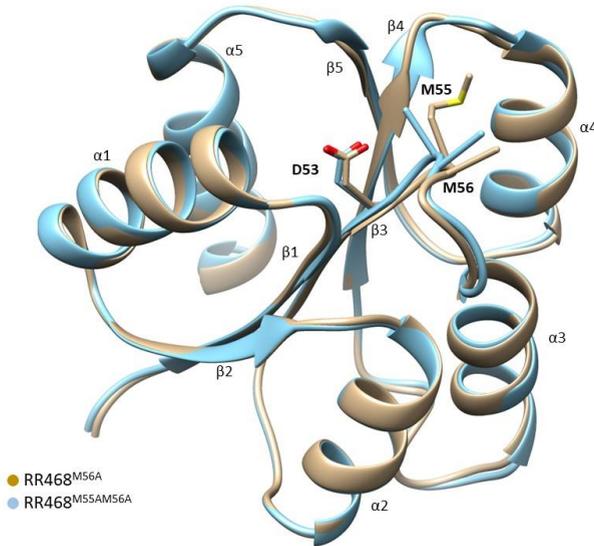


Figura 4.12. Superposición de las estructuras RR468^{M56A} y RR468^{M55AM56A} que corresponden al grupo espacial P6₅22. Se observan las cadenas laterales de los residuos M55, M56 y el Asp catalítico D53.

Por otra parte, las estructuras de RR468^{M56A} y RR468^{M55AM56A} en el grupo espacial P2₁2₁2₁ mostraron que los RRs eran similares (RMSD: 0,737Å para 120 residuos) y que no presentaban fosfomimético en el centro activo (Figura 4.13). En el caso de RR468^{M55AM56A} se encontraron 2 moléculas de RR en la estructura, pero las dos se encuentran en la misma conformación. Finalmente, la comparación de todas las estructuras obtenidas mostró mínimas diferencias independientemente del grupo espacial en el que se cristalizó indicando que esta conformación era la más estable para estos mutantes (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Valores correspondientes al RMSD obtenido al comparar los RRs en las estructuras con los mutantes M56A y M55AM56A en los 2 grupos espaciales obtenidos

	RR468 ^{M56A} P ₆₅ 22	RR468 ^{M55AM56A} P ₆₅ 22	RR468 ^{M55AM56A} P ₂₁₂₁₂₁
RR468 ^{M56A} P ₂₁₂₁₂₁	0,8231	0,7185	0,7511
RR468 ^{M56A} P ₆₅ 22		0,3727	0,8825
RR468 ^{M55AM56A} P ₆₅ 22			0,8331

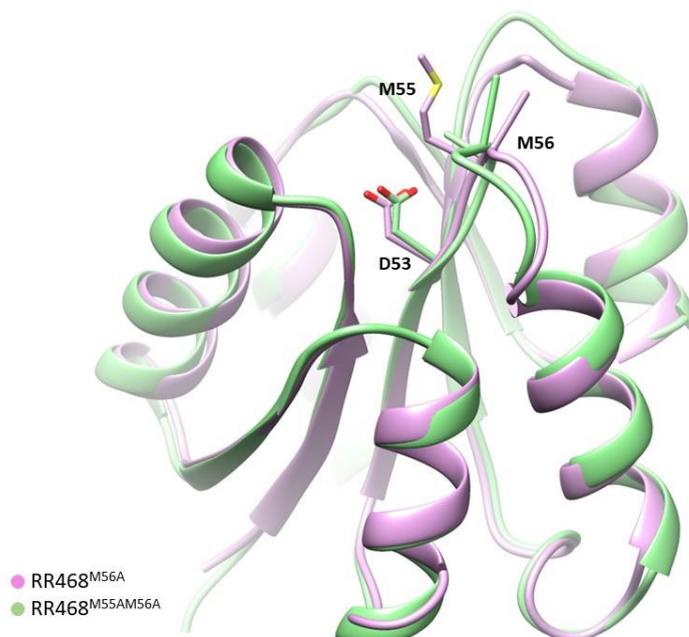


Figura 4.13. Superposición de las estructuras RR468^{M56A} y RR468^{M55AM56A} que corresponden al grupo espacial P₂₁₂₁₂₁. Se resaltan las cadenas laterales de los residuos M55, M56 y D53.

Para analizar qué estado funcional correspondía a esta conformación comparamos dichas estructuras con las de RR468^{M55A} fosforilado en el complejo HK853-RR468^{M55A}, con RR468 sin fosforilar (PDB:3DGF) y RR468 fosforilado (PDB: 3GL9) (Casino et al., 2009). Esta comparación mostró que los mutantes en ambos grupos espaciales presentan una conformación de Lβ3α3 y Lβ4α4 (Figura 4.14) cercana a la observada en la forma no fosforilada de RR468 y que dispone al residuo T83 alejado del centro activo como corresponde a la forma no activa según el mecanismo Y-T. Aunque en la estructura del grupo espacial P₆₅22 hay un movimiento en el Lβ3α3 hacia

la conformación fosforilada, este movimiento no es suficiente para que este adquiriera la conformación correspondiente.

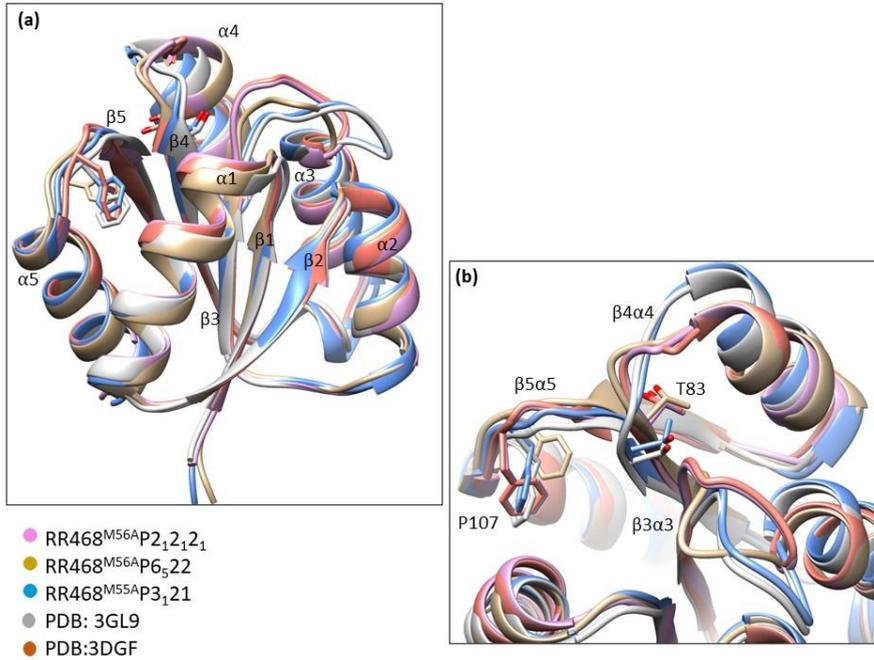
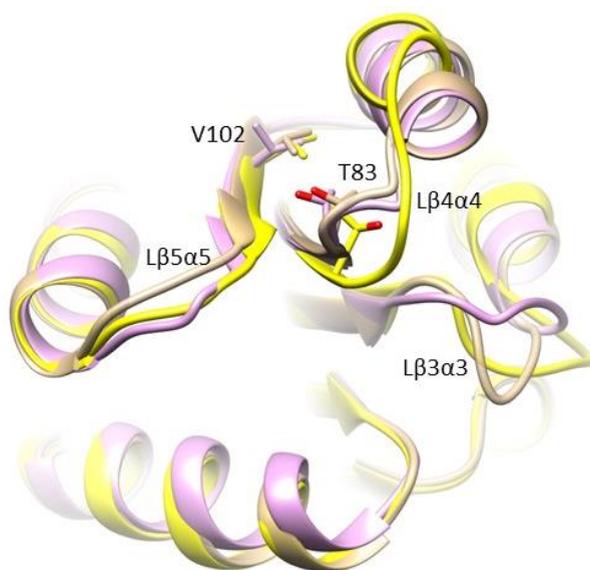


Figura 4.14. Comparación de las estructuras del mutante RR468^{M56A} en los 2 grupos espaciales P₆22 y P₂1₂1, con RR468^{M55A}P₃121 y los PDBs: 3DGF (RR468-P) y 3GL9 (RR468). (a) Comparación general de las estructuras de RR468 donde se aprecian movimientos en varias regiones al comparar los mutantes con los PDBs que corresponden a RR468 fosforilado y no fosforilado. (b) Acercamiento a los loops de conexión Lβ3α3 y Lβ4α4 donde se observan las cadenas laterales de los residuos T83 y V102, involucrados en el mecanismo Y-T de fosforilación.

Además, la comparación de las estructuras no fosforiladas del RR468^{M56A} con la estructura de RR468^{M56A} en complejo con HK853 demuestra que la conformación observada en el complejo presenta un estado intermedio de fosforilación promovida por la interacción con HK853 (Figura 4.15). Esto podría indicar que la presencia de la mutación M56A parece tener un efecto mayor que M55A.



- RR468^{M56A}P212121
- RR468^{M56A}P6522
- RR468^{M56A}P3121

Figura 4.15. Comparación de las 3 estructuras con el mutante RR468^{M56A}. Se observa un acercamiento a los 3 loops donde se observan los movimientos característicos del cambio entre la forma apo y fosforilada. También se observan las cadenas laterales de los residuos T83 y V102 involucrados en el sistema T-Y.

4.2. Estudio funcional y estructural de la influencia del pH en las reacciones enzimáticas

Las características químicas de la fosforilación en los residuos de His y Asp ayudan a que las reacciones en los TCS sean muy versátiles. En el caso de las células eucariotas, residuos de Ser/Thr/Tyr forman un enlace fosfoéster (P-O) altamente estable. Pero en los TCS el enlace que se forma al fosforilar el residuo His es un enlace fosforamidato (P-N) que es más inestable y lábil. El anillo de imidazol que forma la cadena lateral de la His puede protonarse a pH fisiológico debido a su $pK_a \sim 6$ facilitando que la His sea un buen grupo dador, pero que tiene el inconveniente de la inestabilidad a pHs que se alejan de la neutralidad.

Durante el desarrollo de esta tesis, Liu y colaboradores describieron un nuevo mecanismo de regulación para las HKs de la familia HisKA denominado "*pH-gated*" en la que la actividad fosfatasa era controlada por cambios en el pH (Liu et al., 2017). Este modelo se basaba principalmente en datos derivados de la estructura del complejo HK853-RR468 cristalizado a pH 5 (PDB: 5UHT) en comparación con la estructura del mismo complejo cristalizada previamente a pH 5,6 (PDB: 3DGE) que describía la reacción fosfatasa y se apoyaba con datos adicionales de RMN y ensayos de actividad in vitro. En la estructura cristalizada a pH 5 por estos autores, la His fosforilable había adquirido la conformación rotámerica *gauche*-, donde el anillo de imidazol se acerca a la hélice $\alpha 1$ donde se asienta este residuo, alejándose del Asp fosforilable del RR, lo que impediría catalizar la actividad fosfatasa. Por el contrario, en la estructura a pH 5.6 (PDB: 3DGE) publicada anteriormente, aunque se mostraba una idéntica disposición de la HK y el RR, la His fosforilable adquiría el rotámero *trans*, donde el anillo de imidazol se proyecta hacia el solvente quedandocercano al Asp del RR para catalizar la reacción fosfatasa (Casino et al., 2009). En base a estas observaciones, los autores propusieron que cuando el pH desciende de 5.5 se produce un cambio conformacional de la His catalítica que impede catalizar la reacción fosfatasa. Esta propuesta se apoyó con ensayos in vitro con los sistemas HK853-RR468 y EnvZ-OmpR, ambos de la familia HisKA, donde se observó que a pH 5.5 la actividad fosfatasa disminuía o era nula si se comparaba con ensayos a pH 8.0, denominado a este modelo de regulación "*pH-gated*" (Liu



et al., 2017). Así pues y de forma general, el modelo “*pH-gated*” describía un cambio de estado (activo/inactivo) para la actividad fosfatasa, basado en el rango de pH 5.2 – 6.5, lo cual inducía el cambio de rotámero en la His fosforilable. Al presentar dos HKs HisKA modelo de este comportamiento, se propuso que la regulación por “*pH-gated*” podría ser general para esta familia. Esta propuesta era sorprendente, ya que la familia HisKA es la más numerosa dentro de las HKs y parecía poco probable que todas ellas fueran reguladas por pH. Por ello, decidimos revisar este modelo y analizar el efecto de los cambios de pH, no solo en la reacción fosfatasa sino también en las distintas reacciones catalizadas por los TCS para transducir la señal, tanto a nivel estructural como funcional.

4.2.1. Disposición de la His fosforilable en HKs de la familia HisKA

El modelo “*pH-gated*” (Liu et al., 2017) proponía una correlación entre el rotámero de la His fosforilable y el pH. Por ello, y como primer paso, analizamos esta correlación en las estructuras de HKs de la familia HisKA depositadas en el Protein Data Bank. Se encontraron 24 estructuras de HKs correspondientes a HK853 de *T. maritima*, EnvZ y CpxA de *Escherichia coli*, WalK de *Lactobacillus plantarus*, y VicK de *Streptococcus mutans* (Tabla 4.4).

Tabla 4.4: Estructuras depositadas en el PDB de HKs pertenecientes a la familia HisKA. Se nombra la solución de cristalización, el pH y el rotámero de la His fosforilable en cada subunidad.

PDB	Proteína	pH	Rotámero de la His en cada subunidad	Solución de cristalización
3GDE	HK853	5.6	<i>trans/trans</i>	1.7M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2.5% dioxane, 0.1M citrato, pH 5.6
5UHT	HK853	5	<i>gauche-/gauche-</i>	0,1M ácido cítrico (pH 4), 0,8M NH ₄ SO ₄ . Ajuste final a pH 5.0
2C2A	HK853	6.5	<i>gauche-/ gauche-</i>	1.25 M Li ₂ SO ₄ , 0.1M acetate de NH ₄ pH 6.5
4JAU	HK853	8.5	<i>gauche-/trans</i>	8% PEG4000, 0,8M LiCl ₂ , 0.1M Tris-HCl pH 8.5
4JAS	HK853	5.5	<i>gauche-/ gauche-</i>	2,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1M BisTris pH 5.5
4JAV	HK853	5.5	<i>gauche-/gauche-&trans</i>	2,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1M BisTris pH 5.5
4I5S	VicK	7.6-8.6	<i>trans/gauche-</i>	2.3-2.9M Na formato, 3% PEG 4000
4U7N	WalK	5.6	<i>gauche-/trans</i>	1.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1% PEG 4000, 50mM Bis-Tris pH 5.6
5C93	WalK	5.6	<i>gauche-&trans/trans</i>	1.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1% PEG 4000, 50mM Bis-Tris pH 5.6
4U7O	WalK	5.6	<i>trans/trans</i>	1.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1% PEG 4000, 50mM Bis-Tris pH 5.6
4ZKI	WalK	5.6	<i>trans/gauche-</i>	1.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1% PEG 4000, 50mM Bis-Tris pH 5.6
3ZRV	EnvZ ^{HAMP} -DHP	7	<i>trans/trans</i>	20% PEG 4000, 20% Isopropanol, 0.1 M Citrato Tri-sodio pH 5.6
3ZRX	EnvZ ^{HAMP} -DHP	4.6	<i>trans/trans</i>	30% MPD, 0.02M CaCl ₂ , 0.1M Acetato de sodio
3ZRW	EnvZ ^{HAMP} -DHP	7	<i>trans/trans</i>	0.4M Mg Formato, 0.1M BisTris, pH 7
5B1N	EnvZ ^{DHP}	6.9	<i>trans/trans</i>	1.1-1.3 M Na/K Fosfato
5B1O	EnvZ ^{DHP}	6.9	<i>trans/trans</i>	0.1M Formato de Magnesio, 15% PEG 3350
4KP4	EnvZ ^{chim}	7.5	<i>trans/trans</i>	1.5M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2% PEG 1000, 2% PEG 4000, 0.03M Acetato Na, 0.1M Hepes pH 7.5
4BIU	CpxA	8.5	<i>trans/trans</i>	1.75M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 25% glicerol, 0.1M Tris-HCl pH 8.5
4BIW	CpxA	8.5	<i>trans/gauche-</i>	1.75M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 25% glicerol, 0.1M Tris-HCl pH 8.5
5Lfk	CpxA	8,5	<i>trans/trans</i>	1.5M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 12 % glicerol, 0.1M Tris-HCl pH 8.5
4BIV	CpxA	8.5	<i>trans/gauche-</i>	1.75M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 25% glicerol, 0.1M Tris-HCl pH 8.5

PDB	Proteína	pH	Rotámero de la His en cada subunidad	Solución de cristalización
4CBO	CpxA	8.5	<i>trans/gauche-</i>	1.75M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 25% glicerol, 0.1M Tris-HCl pH 8.5
4BIX	CpxA	8.5	<i>gauche-/gauche-</i>	25% PEG3350, 0.2M Li ₂ SO ₄ , 0.1M Tris-HCl pH 8.5
4BIY	CpxA	8.5	<i>gauche-/gauche-</i>	25% PEG3350, 0.2M Li ₂ SO ₄ , 0.1M Tris-HCl pH 8.5

Este análisis mostró que no existe un rotámero preferido, encontrándose un alto número de His con rotámeros *gauche-* (18 His) y *trans* (30 His). Como se observa en la Tabla 4.4, todas las estructuras fueron cristalizadas en un rango de pH 4.6 a 8.5 y la estructura obtenida con el pH más ácido (4.6), correspondiente a EnvZ, presentaba un rotámero *trans*. Un dato opuesto totalmente al modelo "*pH gated*" que propone el rotámero *gauche-* a pHs por debajo de 5.5. Lo mismo ocurría con diferentes estructuras de CpxA cristalizadas a pH 8.5, el más básico de los reportados, que presentaba un rotámero *gauche-* o HK853 cristalizada a pH 6.5 que presentaba este mismo rotámero en contra de lo que proponía el modelo "*pH-gated*". Obviamente este resultado ponía en duda el modelo, pero podría argumentarse la poco probable explicación de un cambio de pH en la solución de la cristalización para estos casos. Dado que las HKs son diméricas y en muchas de las estructuras se encuentran uno o varios dímeros en la unidad asimétrica, nos fijamos en el rotámero de la His en cada una de las subunidades del dímero. Aunque, en la mayoría de los casos se encuentra el mismo rotámero en las dos subunidades, en 9 estructuras (HK853, VicK y CpxA) el rotámero es distinto en cada subunidad. Esto claramente apoya que el pH de la condición no controla la disposición de la His. Además, en los PDBs 4JAV de HK853 y 5C93 de Walk, encontramos una doble conformación para esta His, lo que nos indica que el pH no rige el rotámero de la His fosforilable.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos para las estructuras de las HKs pertenecientes a la familia HisKA se puede sugerir que la adquisición de distintos rotámeros no parece estar relacionada con el pH, sin embargo, podría estar relacionada con el estado catalítico atrapado en el cristal. Esto se deduce a partir de la disposición que presenta la His fosforilable en las estructuras de HKs atrapadas en conformación de autofosforilación o fostatasa. Este es el caso de la subunidad A de CpxA PDB: 4BIW (pH 8.5) y la subunidad A de la versión quimérica de EnvZ PDB: 4KP4 (pH 7.5) que son los

modelos de la reacción de autofosforilación para las HisKA. Ambas presentan un rotámero *trans* donde la His ataca al fosfato gamma del ATP. Este rotámero *trans* de la His también se observa en el complejo HK853-RR468 (PDB: 3DGE) que ha sido propuesto como modelo para la reacción fosfatasa, donde la His está alineada con el sulfato unido al Asp fosforilabe que mimetiza al grupo fosforilo. Finalmente, los datos estructurales presentados en el apartado Resultados 4.1 de la presente tesis muestran que la His adquiere el rotámero *trans* para realizar la reacción de fosfotransferencia. Todos estos datos indicarían que el rotámero *trans* corresponde a la conformación “activa” de la His mientras que el rotámero *gauche*- correspondería a una conformación inactiva o de “reposo”.

4.2.2. Estructuras del complejo HK853-RR468 a distintos pHs

El análisis de las diferentes estructuras de HKs de la familia HisKA no solo no apoya el modelo “*pH gated*”, sino evidencia que podía ser incorrecto. Sin embargo, el modelo podía restringirse a un único TCS, el sistema HK853-RR468 con el que se propuso. Para estudiar esta posibilidad a nivel estructural y analizar la influencia del pH en el complejo HK853-RR468, se procedió a la cristalización de este complejo HK853-RR468 a diferentes pHs 5.5, 6.5, 7.0 y 7.5 en presencia de ADP y el fosfomimético BeF_3^- , substratos utilizados por la propuesta del modelo *pH-gated*. Los cristales del complejo obtenidos a los diferentes pHs difractaron a buena resolución (Tabla 4.5) y presentaban el mismo grupo espacial y una celda similar. Una vez resueltas las estructuras por reemplazo molecular, mostraron en su unidad asimétrica la misma organización consistente con un dímero de HK853 unido a dos moléculas de RR468 (Figura 4.16). Como era de esperar, en los centros activos de HK853 y RR468 se encontraban unidos ADP y BeF_3^- , respectivamente.

Tabla 4.5. Datos de difracción y estadísticas del refinado de los complejos HK853-RR468. En paréntesis se muestran los datos para el intervalo de máxima resolución.

	HK853-RR468 pH 7.5	HK853-RR468 pH 7	HK853-RR468 pH 6.5	HK853-RR468 pH 5.5
Recogida de datos				
Grupo espacial	I 2	I 2	I 2	I 2
a, b, c (Å)	68.47, 92.71, 174.52	68.67, 93.57, 172.70	68.74, 93.61, 173.93	68.62, 92.93, 174.34
α, β, γ (°)	90, 93.39, 90	90., 93.32, 90	90, 93.35, 90	90, 93.49, 90
Resolución (Å)	87.11-2.2 (2.27-2.2)	30.0-2.83 (2.92-2.83)	28.9-2.35 (2.43-2.34)	49.21-2.87 (2.97-2.87)
No. Reflexiones totales	208498 (17468)	71591 (9381)	208226 (16456)	92410 (14022)
Rmerge	0.055 (0.539)	0.119 (0.451)	0.063 (0.528)	0.064 (0.280)
Rmeas	0.074 (0.729)	0.152 (0.567)	0.073 (0.648)	0.079 (0.343)
I / σI	11.6 (2.1)	6.0 (2.3)	13.7 (2.6)	14.1 (5.2)
CC1/2	0.999 (0.837)	0.986 (0.709)	0.999 (0.839)	0.998 (0.943)
Completitud (%)	99.8 (99.8)	95.0 (86.1)	99.2 (96.7)	97.6 (98.5)
Redundancia	3.8 (3.9)	2.9 (2.9)	4.6 (3.8)	3.8 (3.9)
Refinado				
Rwork / Rfree	0.186/0.227	0.243/0.309	0.215/0.265	0.240/0.287
No. átomos	5997	5801	5886	5832
Proteína	5546	5495	5534	5535
Ligando/ión	142	134	135	124
Agua	309	172	217	173
Promedio factores B (Å²)	59.2	67.9	66.1	65.5
Desviaciones RMSD				
Distancia de enlace (Å)	0.02	0.012	0.008	0.012
Ángulos de enlace (°)	1.97	1.61	1.23	1.12
Código PDB	6RGY	6RFV	6RGZ	6RH0

Las cuatro estructuras resueltas a distintos pHs (HK853-RR468^{pH5}) son muy similares entre sí (RMSD \leq 0.39Å) y en todas ellas, la His fosforilable (H260) adquiere la misma disposición de rotámero *gauche-* (Figura 4.16), independientemente del pH. Esta observación invalida el modelo “pH

gated” ya que a pHs superiores a 5.5 se debería haber observado el rotámero *trans*.

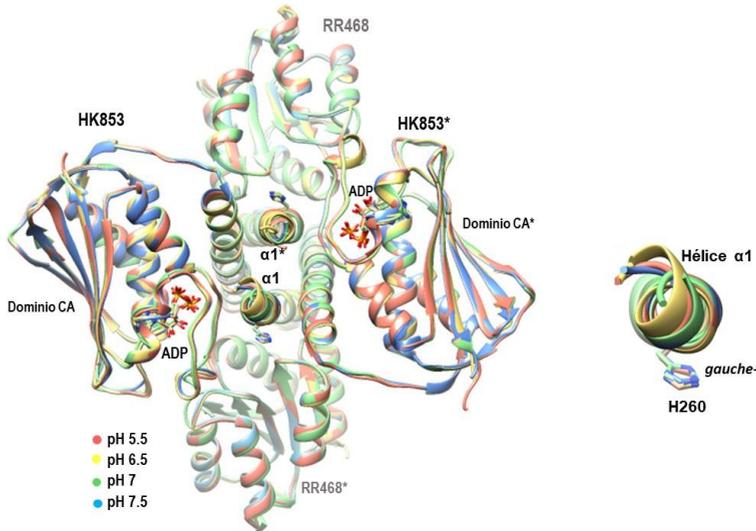


Figura 4.16. Superposición de los complejos HK853-RR468 a diferentes pHs. Las estructuras del complejo cristalizadas a pH 5.5 (tono rosa), pH 6.5 (tono amarillo), pH 7 (tono verde) y pH 7.5 (tono azul) constan de un dímero de HK853 y dos moléculas de RR468 (* señala la segunda molécula). Las HKs se representan en colores oscuros y los RRs en claros del mismo color. En el panel lateral se observa una ampliación de la hélice $\alpha 1$, donde sobresale la cadena lateral de la His fosforilable H260.

Las estructuras HK853-RR468^{pHs} a distintos pHs son similares a las previamente resueltas a pH 5.6 (PDB: 3DGE; HK853-RR468^{5,6}) y a pH 5 (PDB: 5UHT; HK853-RR468^{5,0}), pero la disposición de la His es diferente a la disposición *trans* de HK853-RR468^{5,6} e igual a la disposición *gauche*- de HK853-RR468^{5,0} (Figura 4.17).

El modelo “*pH-gated*” correlacionaba el cambio de rotámero en la His fosforilable con un ligero desplazamiento (2Å aproximadamente) de las hélices $\alpha 1$ de la HK, lo que causaba una pequeña rotación en el dominio CA. Estos movimientos alejaban la His del centro catalítico en la reacción fosfatasa aportando una explicación molecular para la ausencia de actividad fosfatasa debido al efecto del pH ácido. Contrariamente a esta proposición, la superposición de HK853-RR468^{pHs} con HK853-RR468^{5,6} que muestra diferentes rotámeros para la His no muestra ningún movimiento en la hélice $\alpha 1$ y/o el dominio CA. Sin embargo, sí se observan cambios

conformacionales al superponer las estructuras HK853-RR468^{pHs} con HK853-RR468^{5.0} a pesar de que ambas muestran el mismo rotámero *gauche-* de la His (Figura 4.17). Así pues, estas comparaciones determinan que no hay una correlación entre el pH ambiental, los movimientos conformacionales de la hélice $\alpha 1$ y el rotámero adquirido por la His fosforilable, en contra de las bases moleculares del modelo “pH gated”.

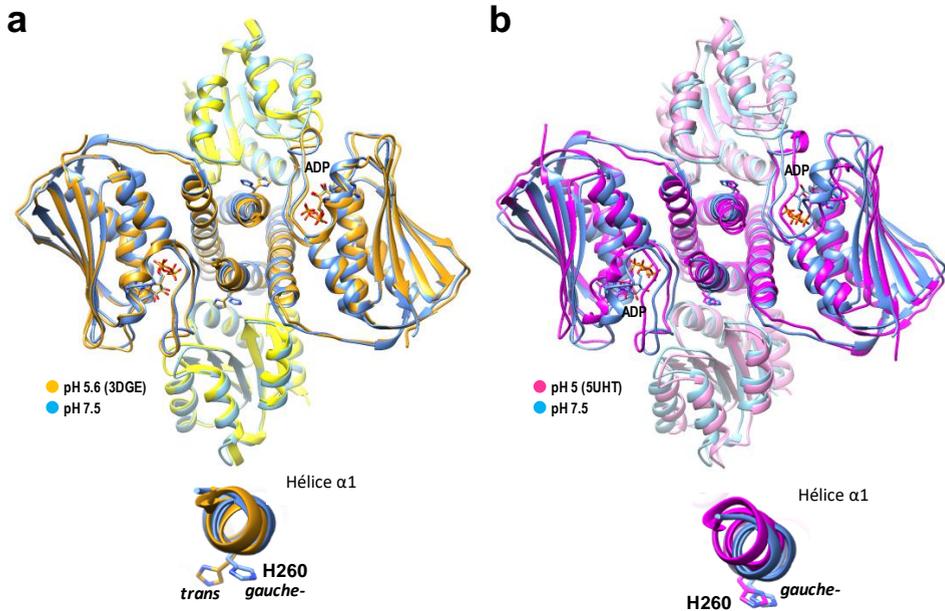


Figura 4.17. Superposición de la estructura HK853-RR468^{pHs} con HK853-RR468^{5.6} y HK853-RR468^{5.0}. Superposición de la estructura HK853-RR468^{pH7.5} (tonos azules), representando las estructuras a diferentes pHs, con **(a)** HK853-RR468^{5.6} PDB: 3DGE (tonos amarillos), en la parte inferior se observa una ampliación de la hélice $\alpha 1$ donde se identifican los rotámeros de la His en cada estructura. **(b)** HK853-RR468^{5.0} PDB: 5UHT (tonos magenta). En la parte inferior se muestra una ampliación de la hélice $\alpha 1$ donde se identifica el rotámero *gauche-* de la His en las dos estructuras.

4.2.2.1 Rotámero *gauche-* de la His fosforilable estabilizado

Una vez descartada la influencia del pH sobre la disposición del rotámero en la His fosforilable, nos preguntamos: ¿Qué determina el rotámero que adquiere la His fosforilable? Para responder a esto se analizaron las interacciones que presentaba el rotámero *gauche-* en las estructuras HK853-RR468^{pHs} a diferentes pHs y de otras estructuras depositadas previamente en el PDB.

De acuerdo con este análisis, se observó que la His fosforilable en su rotámero *gauche-* interactuaba con el oxígeno de la cadena principal perteneciente al residuo en posición -4. Este tipo de interacción se ha visto en otras HKs como: CpxA (PDB: 4BIX), Walk (PDB: 5C93), VicK (PDB: 4I5S), y PhoR (PDB: 5UKV); lo que apoya que esta interacción es la que ayuda a estabilizar el rotámero en la disposición *gauche-* (Figura 4.18).

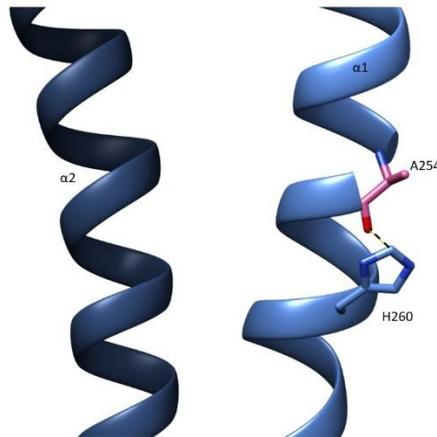


Figura 4.18. Interacciones del rotámero *gauche-* dentro de la misma cadena. En la estructura HK853-RR468^{pH7.5} se observa la interacción con el oxígeno de la cadena principal perteneciente al residuo A254 (en rosa).

Por otra parte, se observó que en las estructuras HK853-RR468^{pHs} a diferentes pHs la His fosforilable presentaba una interacción entre el nitrógeno 3 de su cadena lateral con un ion sulfato (Figura 4.19). Las

soluciones de cristalización presentaban altas concentraciones de sulfato amónico, y se sabe que los iones sulfato tienden a ocupar la posición de los fosfatos en las estructuras cristalinas. De hecho, la presencia del sulfato simula la fosforilación de la proteína como ha sido observado para fosfo-Ser/Thr (Bax et al., 2001; Xu et al., 2014), fosfo-His (Herzberg et al., 1992) y fosfo-Asp (Casino et al., 2009; Miguel-Romero et al., 2017), entre otros. En esta conformación el ion sulfato también interacciona a través de puentes de hidrogeno con otros residuos de RR468 como es el caso de la G86 y la D90, pertenecientes al L β 4 α 4 además de con varias moléculas de agua (Figura 4.19) que lo estabilizarían.

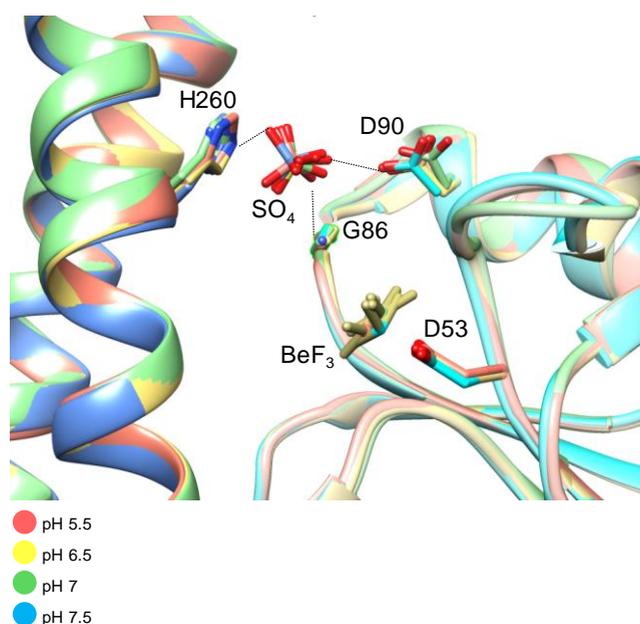


Figura 4.19. Interacciones del ion sulfato con la His fosforilable H260 en HK853. Visión del centro activo de las estructuras HK853-RR468^{pHs} superpuestas a pH 5.5 (tono rosa), pH 6.5 (tono amarillo), pH 7 (tono verde) y pH 7.5 (tono azul). Las líneas negras muestran las interacciones del ion sulfato (SO₄) con residuos de HK853 (H260 en rotámero *gauche*-), y RR468 (G86 y D90) que estabilizan al ion. También se muestra la molécula BeF₃⁻ que interacciona con el Asp catalítico en el centro activo. Los átomos de S, Be y C tienen el mismo color que los complejos que los contienen.

La posición de los iones sulfato en las estructuras HK853-RR468^{pHs} a diferentes pHs es similar a la que se observa en otras estructuras de complejos HK853-RR468 (PDB: 4JAV) con mutaciones en sus componentes o en una estructura de HK853 en solitario (PDB: 2C2A) (Figura 4.20). En el caso del complejo HK853-RR468 (PDB: 4JAV) se observó que la His presentaba dos rotámeros, pero tan solo el rotámero *gauche*- coordinaba un ion sulfato que además se estabilizaba a través de puentes salinos con los residuos R314 y R317 de la HK (Figura 4.20). Estos datos apoyan que la His fosforilada adquiere la conformación *gauche*- de “reposo” via interacciones con la HK y/o el RR.

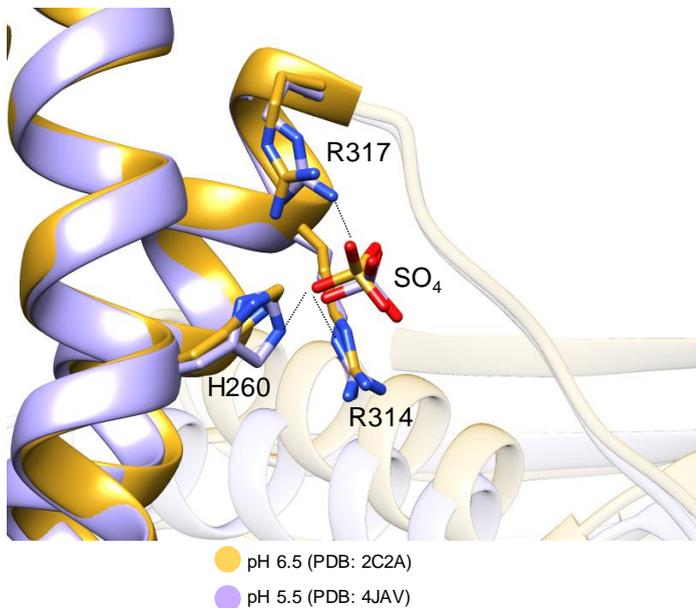


Figura 4.20. Interacciones del ion sulfato en estructuras de HK853. Visión del centro activo de la superposición de los PDBs 2C2A (tono amarillo) y 4JAV (tono violeta), donde se resalta el ion sulfato que interacciona con H260 en rotámero *gauche*-. Además, el ion está estabilizado por puentes salinos con R314 y R317.

De forma interesante, en la estructura HK853-RR468^{5.0} se encontró una molécula de glicerol en la misma posición que el ion sulfato y que también mantiene una interacción con la His fosforilable (Figura 4.21). Esto confirma

que el sitio que ocupa el sulfato presenta un ambiente óptimo para moléculas polares.

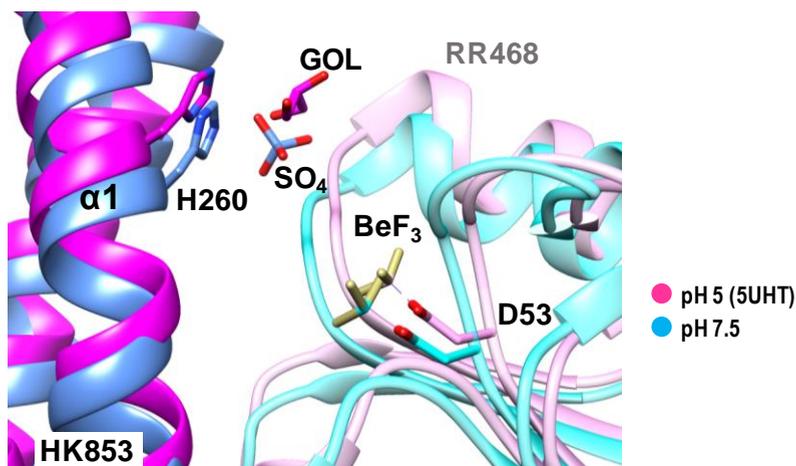


Figura 4.21. Superposición HK853-RR468^{5.0} y del complejo a pH 7.5. Centro activo de los complejos mostrando la molécula polar glicerol (GOL) de la estructura HK853-RR468^{5.0} (tonos magenta) en una posición similar a la del ion sulfato (SO_4) presente en los complejos a diferentes pHs (tonos azulados para pH 7.5). La His y Asp fosforilable también se representan, así como la molécula BeF_3 unida al Asp. Los átomos de C, S y Be se representan del mismo color que los complejos que los contienen.

Para determinar si este ambiente se generaba gracias a la presencia del rotámero *gauche*- en la His, generamos mutantes en los residuos fosforilables H260A y D53A de HK853 (HK853^{H260A}) y RR468 (RR468^{D53A}), respectivamente. A partir de estos mutantes, se obtuvieron estructuras para los complejos formados por ambos mutantes (HK853^{H260A}-RR468^{D53A}) en soluciones de cristalización a pHs 5.3 y 7.5. (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Datos de difracción y estadísticas del refinado de los complejos HK853^{H260A}-RR468^{D53A}. En paréntesis se muestran los datos para la celda de máxima resolución.

	HK853 ^{H260A} -RR468 ^{D53A} pH 7.5	HK853 ^{H260A} -RR468 ^{D53A} pH 5.3
Recogida de datos		
Grupo espacial	I 2	I 2
a, b, c (Å)	68.54, 91.47, 175.37	68.55, 92.19, 175.02
α, β, γ (°)	90, 93.56, 90	90, 93.61, 90
Resolución (Å)	87.51-2.0 (2.04-2.00)	87.33-1.9 (1.93-1.90)
No. Reflexiones totales	407319(25528)	256875(27358)
Rmerge	0.077 (0.771)	0.061 (0.727)
Rmeas	0.089 (0.884)	0.070 (0.815)
I / σ	11.2 (2.4)	14.4 (2.4)
CC1/2	0.997 (0.887)	0.998 (0.822)
Completitud (%)	99.8 (99.9)	98.8 (98.0)
Redundancia	5.6 (5.7)	6.2 (6.2)
Refinado		
Rwork / Rfree	0.182/0.229	0.177/0.2192
No. átomos	6125	6369
Proteína	5626	5719
Ligando/ión	109	149
Agua	390	501
Promedio factores B (Å ²)	49.9	47.1
Desviaciones RMSD		
Distancia de enlace (Å)	0.020	0.019
Ángulos de enlace (°)	1.97	1.92
Código PDB	6RH7	6RH8

El análisis de estcoordinadaos cristales demostró que presentaban el mismo grupo espacial y celda similar a la de los complejos HK853-RR468^{pHs} (Figura 4.22).

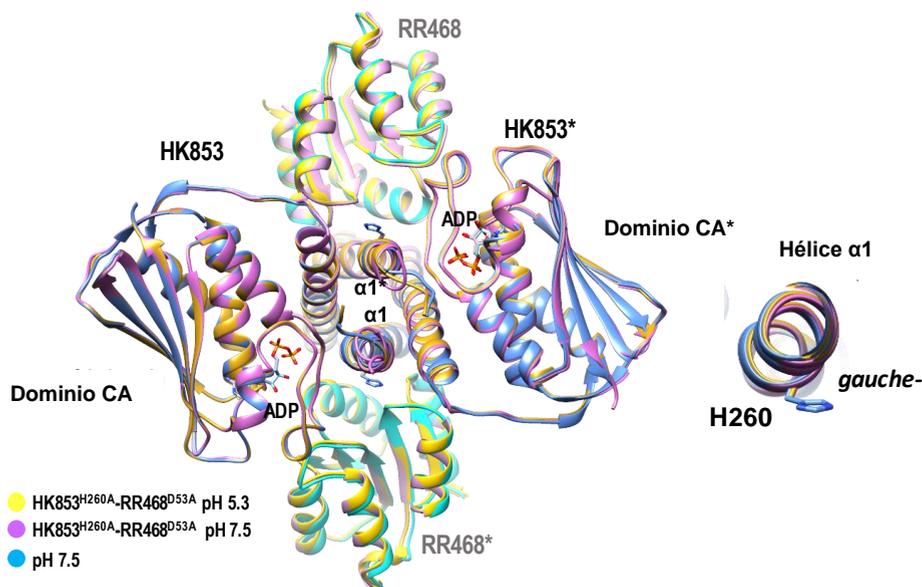


Figura 4.22. Estructuras del complejo HK853^{H260A}-RR468^{D53A} a diferentes pHs. Superposición de los complejos mutantes a pH 5.3 (tono morado), pH 7.5 (tono amarillo) y complejo salvaje a pH 7.5 (tono azul). Las HKs y RRs de la misma estructura tiene tonos más oscuros y tonos más claros, respectivamente, del mismo color.

Una visión detallada de los centros activos y las posiciones que debían ocupar los residuos fosforilables mostró que en ausencia del grupo imidazol, perteneciente a la His en los complejos HK853^{H260A}-RR468^{D53A} tanto a pH 5.3 como a pH 7.5, no se coordinaba ningún sulfato (Figura 4.23). Esto apoyaba la idea de que es el residuo de His es quien principalmente coordinaba este ion sulfato en la posición observada de forma que mimetizara al fosforilo de la fosfo-His (Figuras 4.22 y 4.23). Aunque se incluyó BeF₃⁻ en la mezcla de cristalización, no aparecía este ion en el centro activo del RR468^{D53A}, indicando que es necesaria la presencia del Asp catalítico para coordinarlo. Sin embargo, si se observó la presencia de un ion sulfato en su lugar. La presencia de este ion sulfato en el centro activo cuando el Asp ha sido

mutado a Ala ya se había reportado anteriormente para el RR MaeR (Miguel-Romero et al., 2017), donde la presencia del sulfato actúa como fosfomimético induciendo la conformación fosforilada del RR (Figura 4.23). En este caso, RR468^{D53A} también presenta una conformación activa, apoyando que esta conformación es la adecuada para acomodar el ion sulfato.

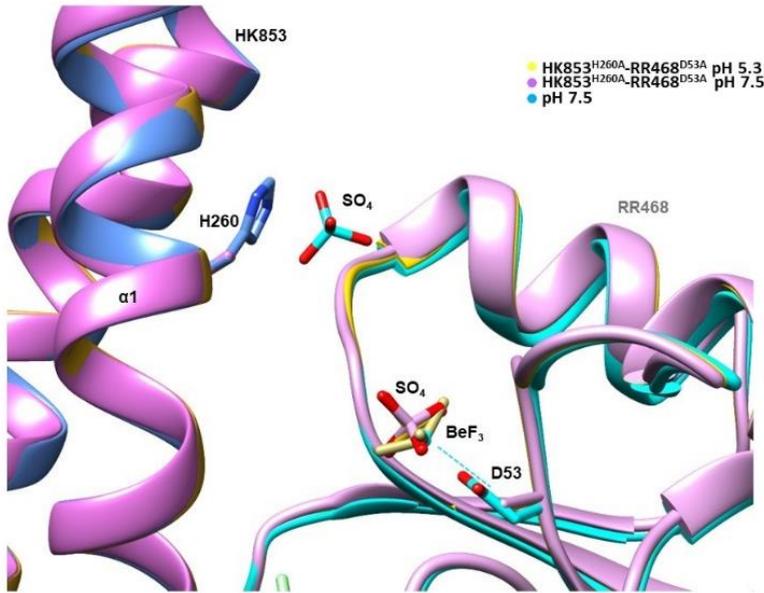


Figura 4.23. Centro activo de los complejos HK853^{H260A}-RR468^{D53A}. Superposición de los complejos mutantes a pH 5.3 (en tono amarillo), pH 7.5 (en tono morado) con la estructura del complejo salvaje a pH 7.5 (tono azul). Visión del centro activo donde se observa la ausencia de los residuos catalíticos en los mutantes comparado con la presencia de la His y Asp fosforilabe del complejo salvaje (tono azul) y ausencia del ion sulfato interaccionando con la His, solo presente en el complejo salvaje (tono azul). En el centro activo de RR468 mutante, se observa un ion sulfato (S en tono morado) que actúa de fosfomimético igual al BeF₃- (Be en tono azul) del complejo salvaje a pH 7.5.

Para confirmar que la presencia del grupo imidazol era necesaria para observar la presencia del ion sulfato, se resolvió la estructura del complejo formado por HK853 silvestre y el mutante D53A de RR468 (HK853-RR468^{D53A}) y, como en el caso anterior, a pHs 5.3 y 7.0 (Tabla 4.7). Los cristales obtenidos también presentaban idéntico grupo espacial y similar celda unida, mostrando unas estructuras casi idénticas (RMSD ≈0,3293 para

716 residuos) a las observadas en los dobles mutantes o en las estructuras HK853-RR468^{pH5} (Figura 4.24). A ambos pHs las His fosforilables presentaba el rotámero *gauche*- e interactuaban con un ion sulfato en una posición similar a la de los complejos anteriores HK853-RR468^{pH5}. Además, este ion sulfato estaba estabilizado a través de contactos adicionales con el residuo R314 de la HK y con los residuos K85 y D90 del RR como se había observado en las estructuras HK853-RR468^{pH5}.

Tabla 4.7. Datos de difracción y estadísticas del refinado de los complejos HK853^{H260A}-RR468. En paréntesis se muestran los datos para la celda de máxima resolución.

	HK853-RR468 ^{D53A} pH 7	HK853-R468 ^{D53A} pH 5.3
Recogida de datos		
Grupo espacial	I 2	I 2
a, b, c (Å)	68.37, 91.15, 176.15	68.53, 92.13, 175.93
α, β, γ, (°)	90, 93.6, 90	90, 93.47 90
Resolución (Å)	87.9-2.00 (2.04-2.00)	87.8-2.00 (2.04-2.00)
No. Reflexiones totales	409524(26968)	272904(17175)
Rmerge	0.085 (1.156)	0.053 (0.460)
Rmeas	0.097 (1.289)	0.066 (0.557)
I / σ	10.4 (1.6)	13.5 (2.9)
CC1/2	0.998 (0.718)	0.998 (0.855)
Completitud (%)	98.0 (97.1)	99.5 (99.8)
Redundancia	5.7 (5.9)	3.7 (3.8)
Refinado		
Rwork / Rfree	0.211/0.255	0.192/0.228
No. Átomos	5976	5996
Proteína	5524	5530
Ligando/ión	104	114
Agua	348	352
Promedio factores B (Å ²)	51.3	42.9
Desviaciones RMSD		
Distancia de enlace (Å)	0.012	0.007
Ángulos de enlace (°)	1.59	1.12
Código PDB	6RH1	6RH2

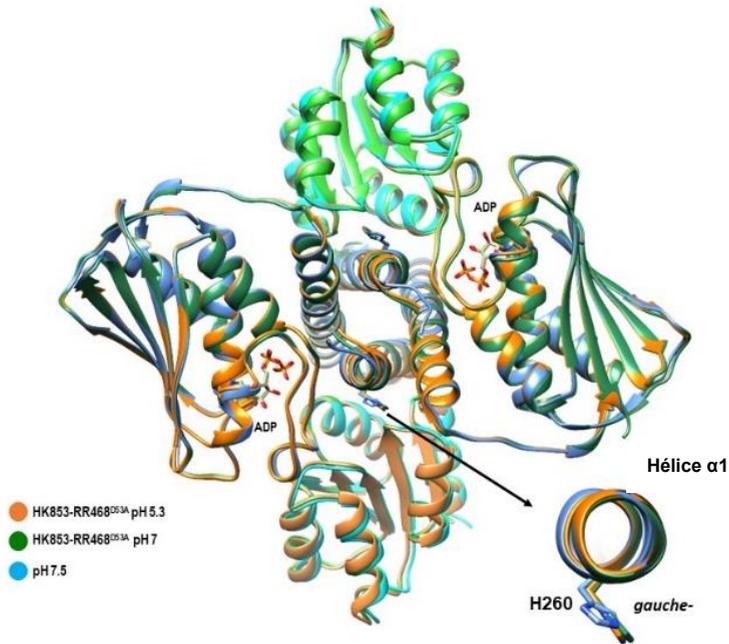


Figura 4.24. Estructuras del complejo HK853-RR468^{D53A}. Superposición de las estructuras mutantes con la estructura de las proteínas salvajes a pH 7.5. Se hace un acercamiento a la hélice $\alpha 1$ donde se observa únicamente la presencia del rotámero *gauche-* en la His fosforilable.

Estos datos apoyan que la His fosforilable de una HK puede estabilizarse tras la autofosforilación adoptando el rotámero *gauche-* emulando un estado inactivo o de reposo hasta que se produzca la fosfotransferencia al RR. Este estado también estaría estabilizado gracias a otros contactos mediados entre el grupo fosforilo y residuos de la HK y el RR. Esta observación no parece estar limitada a la HK HK853 utilizada en nuestros estudios, sino que podría ser común en las HK de la familia HisKA. La estructura de la HK Walk (PDB: 5C93) cristalizada a una alta concentración de sulfato amónico (1M) muestra la presencia del ion sulfato coordinado con la His fosforilable en una posición equivalente a la que se observa en las estructuras HK853-RR468^{pH5}. En esta estructura, la His fosforilable presenta doble conformación, pero tan solo el rotámero en conformación *gauche-* está coordinado un ion sulfato (Figura 4.25).

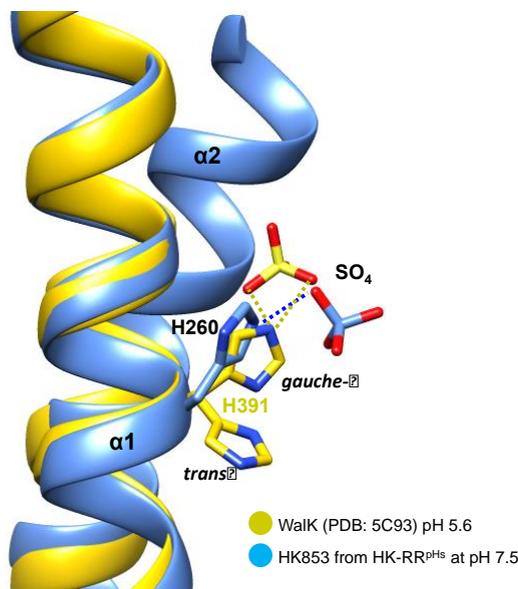


Figura 4.25. Superposición de HKs mostrando rotámero *gauche-* interactuando con el ion sulfato. Superposición de WalK (tono amarillo, PDB: 5C93) con HK853 del complejo HK853-RR468 a pH 7.5 (tono azulado). Acercamiento al centro activo donde se observa la interacción con el ion sulfato que presenta mismo color que la HK.

4.2.3. Efectos del pH en la actividad fosfatasa de HK853 – RR468

De acuerdo con el modelo “*pH-gated*”, un pH entre 5.2 y 6.5 induce el rotámero *gauche-* en la His catalítica evitando que se posicione de forma correcta la molécula de agua catalítica para atacar al fosfo-Asp del RR. Como consecuencia se induce la pérdida de la actividad fosfatasa. Los ensayos bioquímicos realizados para demostrar dicho modelo se realizaron utilizando un fragmento de HK853 que comprendía únicamente el dominio DHp y que mostraban que este fragmento era capaz de defosforilar a RR468 fosforilado a pH 8 pero no así a pH 5. Sin embargo, los datos estructurales presentados anteriormente del complejo HK853-RR468 a diferentes pHs no apoyan este modelo, ya que se ha demostrado que la disposición del

rotamero *gauche*- es independiente del pH, observándose incluso a pHs neutros, como 7.5, donde el modelo pH-gated anticipa un rotámero *trans*.

Para ahondar en este modelo "*pH-gated*", se reexaminaron las actividades catalíticas del complejo HK853-RR468 a diferentes pHs. Para ello, se utilizó un fragmento de HK853 que contenía los dominios catalíticos completos DHp y CA de HK853. Además, se evaluó el efecto del nucleótido en la actividad fosfatasa que ha demostrado estimular dicha actividad (Zhu et al., 2000), probablemente estabilizando el dominio CA.

En primer lugar, se analizó la capacidad de autofosforilación de RR468 por un fosfodonador pequeño como el acetilfosfato (AcP) a diferentes pHs (5-8). Para ello, se sintetizó AcP radioactivo permitiendo seguir la fosforilación mediante autoradiografía. La aparición de una banda correspondiente a RR468-P que se incrementaba con el tiempo llegando a un máximo a los 60 min fue observada para todos los pHs. Esto demostró la estabilidad de RR468 en el rango de pHs probado (Figura 4.26).

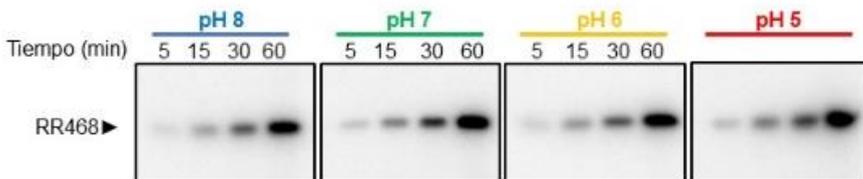


Figura 4.26. Estabilidad de la fosforilación de RR468 a diferentes pHs. Fosforilación de RR468 con el fosfodonador AcP radioactivo a diferentes tiempos y a diferentes pHs.

El hecho de que la fosforilación de RR468 no se viera afectada a pH ácidos se debía, por una parte, a la constante de ionización ácida del residuo fosforilable Asp con un $pK_a \approx 3.9$ que permitía el ataque nucleofílico al AcP incluso a pH 5 y por otra, a la estabilidad del enlace fosfoéster P-O a estos pHs.

Para observar la actividad fosfatasa de RR468 mediada por HK853, se fosforiló previamente RR468 durante 60 min y se eliminó el AcP libre por cromatografía de exclusión molecular. Se analizó la actividad fosfatasa mediada por HK853 sobre este RR468 fosforilado (RR468-P) a diferentes pHs

en presencia y ausencia de ADP (Figura 4.27). En ausencia de ADP, la incubación con HK853 a pH 8 produjo una pérdida muy rápida de la banda correspondiente a RR468-P que desaparecía completamente en tan solo 5 minutos. A pH 7, la pérdida completa de la fosforilación de RR468 requirió más tiempo. Esta pérdida requirió de mayor tiempo de incubación a pH 6 donde la banda del RR468-P aun es observable tras 60 min de incubación con RR468. Finalmente, a pH 5 la disminución de la fosforilación fue mínima incluso a tiempos tan largos de incubación como 60 min.

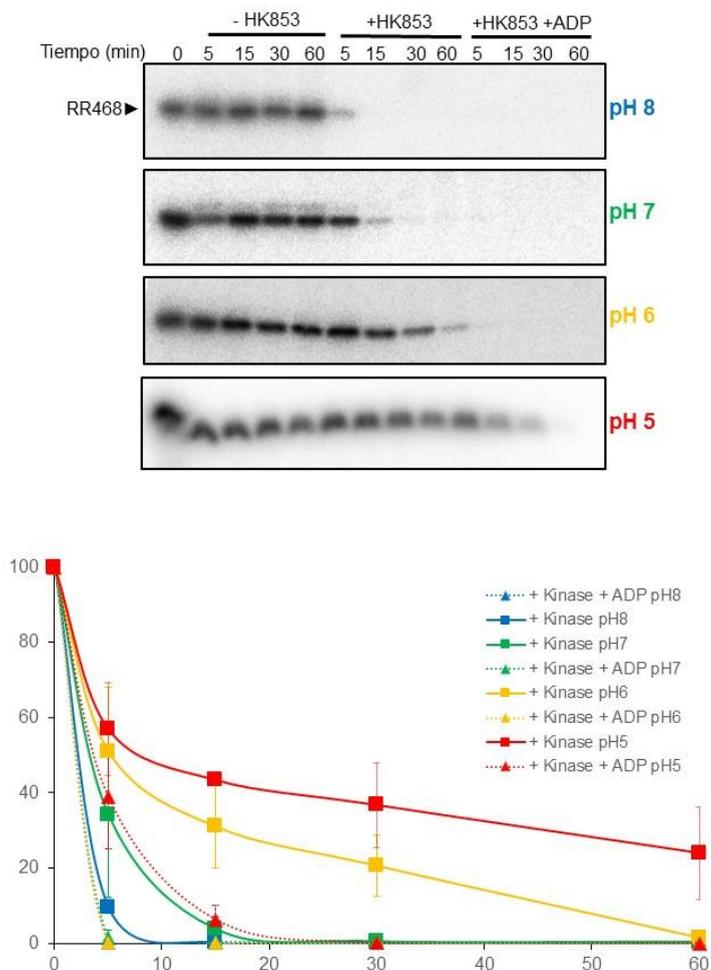


Figura 4.27. Defosforilación de RR468 a diferentes pHs. Actividad fosfatasa de HK853 sobre RR468-P en ausencia y presencia de 2mM ADP.

La adición de 2mM ADP junto con HK853 aceleró considerablemente la actividad fosfatasa a todos los pHs. Después de 5 minutos de incubación, se produjo la pérdida de fosforilación de RR468 a pHs 8, 7 y 6 y unos 15-30 min después se produjo la pérdida a pH 5. La estimulación de la actividad fosfatasa por la presencia del nucleótido ADP, probablemente se deba a la estabilización del dominio CA, y en particular del ATP-lid, en una conformación competente para interactuar con el RR, como se ha observado en las estructuras de los complejos HK853-RR468^{pHs} a diferentes pHs. Estos resultados mostraban por un lado que HK853 sí que presenta actividad fosfatasa a pH 5.0, y por otro que esta actividad se veía influenciada por el pH, aunque los datos estructurales descartaban que fuera por un cambio de conformación de la His fosforilable. En los procesos en que participa un residuo de His se debe prestar gran atención a la ionización del grupo imidazol a diferentes pHs. El grupo imidazol de la His presenta un $pK_a \sim 6.0$, por tanto, un valor de pH inferior a dicho valor incrementaría la protonación de la His fosforilable de las HKs y disminuiría su capacidad para actuar como una base general reduciendo la actividad fosfatasa mediada por la His. Para comprobar si el valor teórico de pK_a en la His se correlacionaba con el que presentaba la His fosforilable en las estructuras HK853-RR468^{pHs} y otras mencionadas en este trabajo, se realizaron cálculos de la constante de ionización pK_a con el programa ROSIE server (Tabla 4.8). Los valores obtenidos de pK_a para la His fosforilable oscilaban entre 5.8 y 6.4, valores cercanos al valor teórico $pK_a \sim 6.0$. Por lo tanto, nuestra propuesta es que la ionización de la His debe tener un papel relevante en la reducción de la actividad fosfatasa a pH 5 y no un cambio conformacional como proponía el modelo pH-gated.

Tabla 4.8. pKa de las His fosforilables de varias estructuras de HKs. Los cálculos se realizaron con el servidor ROSIE <http://rosie.rosettacommons.org/>.

Proteína (código PDB)	Rotámeros	pKa
HK853-RR468 complejo (5UHT)	<i>gauche-/gauche-</i>	5,9/6,0
HK853-RR468 complejo (3DGE)	<i>trans/trans</i>	6,1/6,1
HK853 (2C2A)	<i>gauche-</i>	6,1
EnvZ ^{Chim} (4KP4)	<i>trans/trans</i>	6,0/6,7
EnvZ ^{DHp} (5B1N)	<i>trans</i>	6,5
VicK (4I5S)	<i>trans/gauche-</i>	5,8/6,1
WalK (5C93)	<i>gauche-&trans/trans</i>	6,6/6,6
CpxA (4BIW)	<i>trans/gauche-</i>	4,8/6,1
CpxA (4BIX)	<i>gauche-/gauche-</i>	6,3/6,6
CpxA (4BIU)	<i>trans/trans</i>	5,5/5,6
HK853-RR468 complejo pH 7,5(6RGY)	<i>gauche-/gauche-</i>	6,2/6,3
HK853-RR468 complejo pH 7(6RFV)	<i>gauche-/gauche-</i>	6,0/6,1
HK853-RR468 complejo pH 6,5(6RGZ)	<i>gauche-/gauche-</i>	6,2/6,2
HK853-RR468 complejo pH 5,5(6RH0)	<i>gauche-/gauche-</i>	6,4/6,2
HK853-RR468 ^{D53A} complejo pH 7(6RH1)	<i>gauche-/gauche-</i>	6,0/6,1
HK853-RR468 ^{D53A} complejo pH 5,3(6RH2)	<i>gauche-/gauche-</i>	5,9/5,8

Así pues, los datos in vitro obtenidos también descartaban el modelo “*pH-gated*” que mostraba ausencia de actividad fosfatasa a pH 5 principalmente por cuatro motivos (i) HK853 si muestra actividad fosfatasa, aunque reducida, a pH 5, (ii) ausencia del dominio CA en el fragmento de HK853, (iii) ausencia de ADP en los ensayos fosfatasa e (iv) ignorar el estado de protonación de la His a pH bajo.

4.2.4. Influencia del pH en las actividades de autofosforilación y fosfotransferencia de HK853

En base a los datos estructurales y funcionales anteriores proponemos que el pH influencia el estado de ionización de la His fosforilable y este es el motivo de la disminución de la actividad fosfatasa. Para confirmar nuestra propuesta, decimos comprobar si las otras actividades llevadas a cabo por la HK se veían comprometidas a pHs bajos. En primer lugar, se comprobó el efecto del pH en la capacidad de autofosforilación, una actividad promovida

por el ataque nucleofílico de la His fosforilable al fosfato y de la molécula de ATP. Para que la His actúe como nucleófilo, es necesario que adquiera su forma desprotonada y neutra que es la más abundante en un pH > 6. Por lo tanto, a pH más ácidos de seis esperaríamos una disminución de la actividad.

La autofosforilación de HK853 a diferentes pHs demostró una clara reducción en dicha actividad que correlacionada con el descenso del pH (Figura 4.28a), siendo prácticamente anulada a pH 5. Dado que el enlace fosforamidato de la P-His es inestable a pH ácidos, decidimos comprobar si esta disminución en la autofosforilación estaba relacionada con la pérdida de capacidad nucleofílica de la His o era debido a la inestabilidad que presentaba HK853-P a pH bajo. Para ello, en primer lugar, se fosforiló HK853 a pH 8 durante 10 min y posteriormente se intercambiaba el pH de la disolución bien a pH 8 o pH 5 y se observó la variación de la fosforilación durante 30 min de incubación (Figura 4.28b).

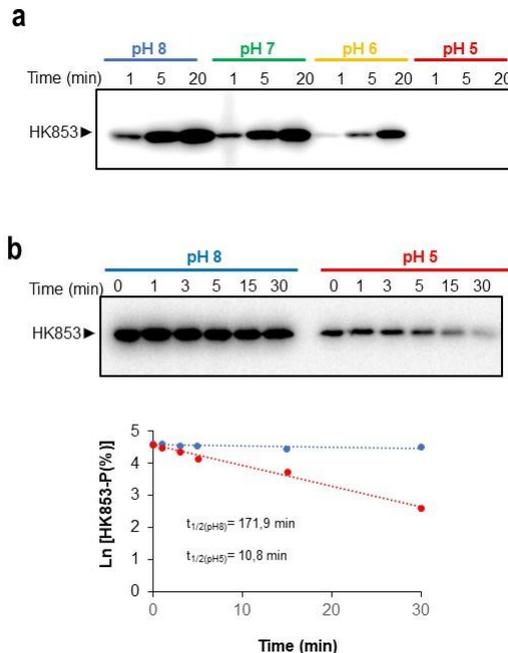


Figura 4.28. Autofosforilación de HK853. (a) Autofosforilación de HK853 con el tiempo a diferentes pHs utilizando [γ - ^{32}P] ATP. **(b)** Estabilidad de la HK-P en pH 5 y 8 y cálculo de la vida media.



La estabilidad de HK853 fosforilada no se vio afectada a pH 8 ya que se mantuvo prácticamente estable durante los 30min y mostrando una vida media ~2h. Sin embargo, a pH 5 se fue produciendo una pérdida de fosforilación con el tiempo calculando una vida media de HK853-P a pH 5 de ~10 min. Este resultado podría explicar la baja fosforilación observada a pHs ácidos, pero no explicaba la ausencia total de autofosforilación observada a pH 5.0 y la disminución de actividad a medida que el pH se iba acidificando. Por lo tanto, estos resultados apoyan que la pérdida de actividad, tanta quinasa como fosfatasa, era debida al cambio en la protonación de la His a pH ácidos, evitando que el residuo pueda actuar como un nucleófilo.

Finalmente, se analizó la influencia del pH en la actividad de fosfotransferencia. En la reacción de fosfotransferencia la hidrólisis del enlace P-N de la P-His está promovido por el grupo carboxilo del Asp fosforilable del RR. Este grupo presenta un pKa de ~3.9 y, por lo tanto, su estado de protonación se ve poco afectado a un pH de 5. Además, a pH 5 la ionización del grupo imidazol de la His hace que sea mejor grupo saliente promoviendo la transferencia. Por ello, la química de la reacción anticipaba que esta reacción debe estar mucho menos influenciada por el cambio de pH entre 8 y 5. Para confirmarlo primero se fosforiló HK853 a pH 8 durante 10 min, y luego se intercambié el pH de la disolución tanto a pH 8 como a 5. Entonces se adicionó RR468 preparado en el pH correspondiente. (Figura 4.29).

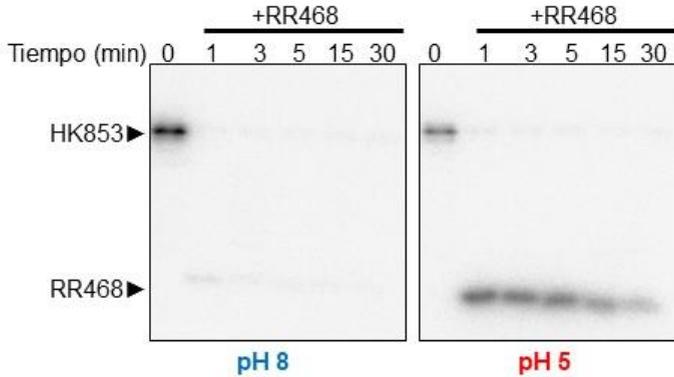


Figura 4.29. Fosfotransferencia de HK853 a RR468 en diferentes pHs. Autofosforilación de HK853 durante 10 min a T° ambiente (tiempo 0) y posterior incubación con RR468 durante diferentes tiempos (1, 3, 5, 15 y 30 min). Los ensayos se realizaron a pH 5 y 8.

En los dos pHs analizados, la banda correspondiente a HK853-P desapareció rápidamente, después de un minuto de incubación con RR468, es decir, al minuto se había transferido el 95% del fosforilo desde la HK al RR. Esto demostraba que HK853 podía transferir con similar eficiencia el grupo fosforilo a RR468 en los dos pHs, confirmando que la actividad de fosfotransferencia era menos dependiente de pH que las actividades de autofosforilación y fosfatasa. Como se ha mencionado previamente, HK853 tiene una gran actividad fosfatasa sobre RR468, por lo que durante la fosfotransferencia no se observa la banda correspondiente a RR468-P. Precisamente, ese es el caso a pH 8, sin embargo, a pH 5, se observa una acumulación de RR468-P durante los primeros minutos de reacción, lo que demuestra una disminución de la actividad fosfatasa a un pH ácido (Figura 4.29).

En resumen, los ensayos bioquímicos de las tres reacciones catalizadas por el sistema HK853-RR468, demuestran que la disminución del pH a valores ácidos como 5 tiene un impacto en el estado de ionización de los grupos que participan en ella modulando su actividad. Las actividades de autofosforilación y fosfatasa dependen principalmente del estado de ionización de la His, mientras que la fosfotransferencia depende también del Asp fosforilable. De esta forma, la influencia del pH sobre la actividad fosfatasa de las HKs no obedece a un cambio de rotámero en la His debido

al pH como se había propuesto en el modelo “*pH gated*”, sino a la naturaleza química de los residuos involucrados.

4.2.5. Influencia del pH en las actividades del sistema EnvZ-OmpR

El modelo “*pH gated*” se apoyaba en experimentos realizados con el TCS EnvZ-OmpR de *Salmonella typhimurium* para generalizarlo a la familia HisKA de HKs. En este TCS se reportó in vitro una disminución en la actividad fosfatasa en condiciones ácidas. Por esta razón se decidió evaluar el efecto del pH en las diferentes actividades catalizadas por el TCS EnvZ-OmpR de *Escherichia coli* y confirmar si se observaba un efecto atribuible al estado de protonación de los residuos catalíticos como en el caso de Hk853-RR468. En primer lugar, se comprobó la actividad quinasa o de autofosforilación de EnvZ a pHs 5, 6, 7 y 8 (Figura 4.30a). La capacidad de autofosforilación de EnvZ disminuye con el pH, observando a los 20 min una disminución del 50%, 75% y 90% a pH 7, 6 y 5 respectivamente, aunque no se llegaba a eliminar completamente la autofosforilación como ocurría con HK853.

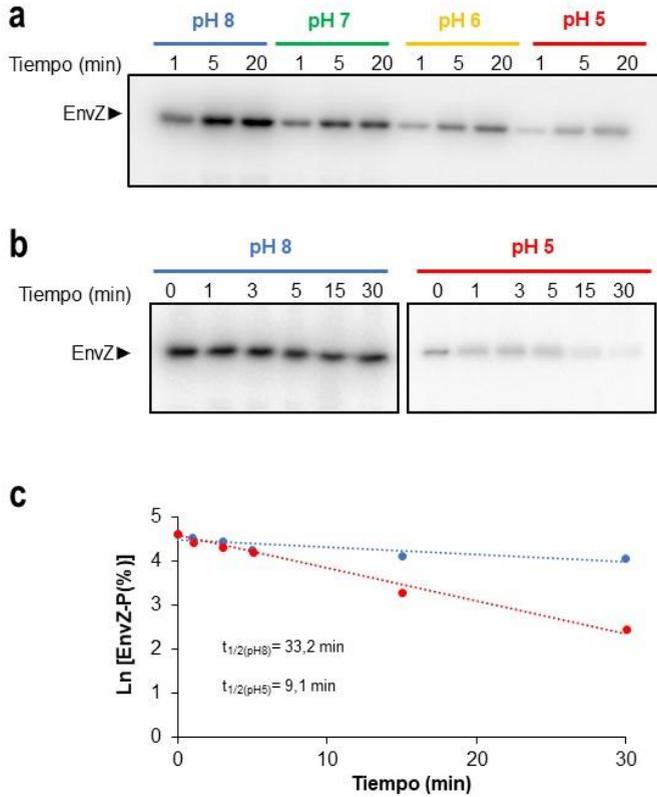


Figura 4.30. Autofosforilación y estabilidad de EnvZ. (a) Autofosforilación de EnvZ con el tiempo en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP a diferentes pHs. (b) Estabilidad de la fosforilación de EnvZ durante el tiempo a pH 5 y 8 una vez EnvZ se ha autofosforilado. (c) Vida media de EnvZ-P a pH 5 y 8.

También se comprobó la estabilidad del enlace P-N en EnvZ a pH 5 y 8 obteniendo un resultado similar al observado en HK853, donde la vida media era de 9 min a pH 5 y de ~30 min a pH 8 (Figura 4.30b y 4.30c).

También se analizó la actividad de fosfotransferencia de EnvZ al dominio receptor de OmpR tanto a pH 8 como pH 5. Para ello, se fosforiló previamente EnvZ durante 10 min y se añadió OmpR en una disolución a pH 5 y 8 (Figura 4.31). Para ambos pHs pudo observarse una rápida transferencia de fosforilo, ya que alrededor del 85% de la fosforilación de EnvZ se perdía en un minuto. Como ya se había descrito previamente, EnvZ

tiene una baja actividad fosfatasa por lo cual la pérdida de fosforilación de EnvZ se correlacionó con la presencia de banda fosforilada de OmpR (OmpR-P) que prácticamente no disminuía con el tiempo. OmpR muestra una nula fosforilación con AcP, por lo que nos era difícil generar OmpR-P para analizar la actividad fosfatasa. Sin embargo, aprovechamos la ventaja de la baja actividad fosfatasa de EnvZ observada en el ensayo de fosfotransferencia para analizar el efecto del ADP en esta última reacción. Si se añadía 2mM de ADP junto con OmpR en el ensayo de fosfotransferencia se observaba una drástica reducción de la banda OmpR-P a pH 8, desapareciendo la banda correspondiente a esta forma a los 5 min. Este hecho confirmaba que el nucleótido tiene una gran influencia en la actividad fosfatasa mediada por la HK. Por el contrario, a pH 5 la banda de OmpR-P es visible a tiempos tan largos como 30 min, indicando una fuerte disminución de la actividad fosfatasa.

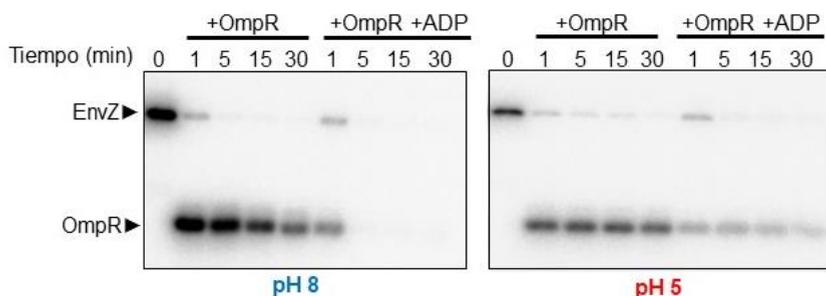


Figura 4.31. Fosfotransferencia de EnvZ a OmpR. Fosforilación de EnvZ durante 10 min a T° ambiente (tiempo 0) y posterior incubación en presencia de OmpR en ausencia y presencia de ADP durante 1, 5, 15 y 30 min. Los ensayos se realizaron a pH 5 y 8.

Estos resultados son muy similares a los que habíamos encontrado con el sistema HK853-RR468, lo que nuevamente descarta el modelo “pH-gated”. Por otro lado, nos ayuda a demostrar que los efectos observados en las distintas reacciones al modificar el pH se deben a la protonación de los residuos catalíticos.

4.3. Caracterización de una mutación clínica en el TCS *EnvZ-OmpR*

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1942, los antibióticos, junto con la vacunación, han sido las medicinas más valiosas para hacer frente a enfermedades infecciosas que previamente eran mortales. Sin embargo, tan solo dos años después de la implementación de la penicilina los trabajadores de la salud empezaron a notar una disminución en su eficiencia como tratamiento al observarse cepas bacterianas que eran resistentes a ésta (Tierney & Rather, 2019). Este hecho ha ocurrido con todos los antibióticos que se han obtenido o diseñado por lo que se ha incrementado la investigación para el desarrollo de nuevos compuestos además de intentar comprender los mecanismos adquiridos por las bacterias para la resistencia a éstos.

La resistencia a los antimicrobianos apareció como un mecanismo de defensa generado por procesos evolutivos naturales o la exposición continua a los antimicrobianos. Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los antimicrobianos a través de dos mecanismos principales: (1) un mecanismo intrínseco de mutación del material genético propio de la bacteria, como los que alteran la permeabilidad de la membrana, (2) a través de la adquisición de nuevo material genético mediante transferencia horizontal de genes o a partir de elementos genéticos móviles (Bhagirath et al., 2019). Estos mecanismos activan en la célula diferentes estrategias de defensa como son la síntesis de enzimas hidrolíticas, modificación del sitio activo, disminución de la permeabilidad de la pared celular y las bombas de eflujo, siendo estas últimas las más utilizadas.

Según la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA, por sus siglas en inglés), en la actualidad existe un grupo de bacterias patógenas que pueden escapar a todos los antibióticos utilizados en la actualidad. Este grupo ha sido denominado cepas ESKAPE e incluye a: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y varias especies de *Enterobacter* (Tiwari, 2018).

La familia de las Enterobacteriaceae son bacterias Gram negativas que tienen gran importancia en la salud, y que han reportado resistencias a casi

todos los antibióticos disponibles, incluso a los carbapenémicos que son el último recurso contra patógenos multirresistentes (Ventola, 2015). Dentro de la familia Enterobacteriaceae se encuentra la bacteria *Escherichia coli*, que produce gran cantidad de betalactamasas de amplio espectro que actúan como enzimas líticas de antibióticos. Por otra parte, muchas de las dianas de los antibióticos se encuentran en el citoplasma bacteriano y para acceder a ellas se deben cruzar las membranas bacterianas que en el caso de gramnegativos son dobles. La membrana externa forma, en muchos casos, una barrera permeable para antibióticos ya que suelen presentar porinas que permiten el paso de estos (Sawai et al., 1982; Choi & Lee, 2019). De hecho, mutantes deficientes en porinas presentan tasas más bajas de permeabilidad a los antibióticos betalactámicos y muestran una concentración mínima inhibitoria más alta que las cepas salvajes, siendo este un mecanismo de resistencia a antibióticos empleado por muchas bacterias (Sawai 1982; Choi & Lee, 2019).

En *E. coli*, las porinas principales de la membrana externa son OmpF, OmpC, PhoE y LamB (Ghosh et al., 1998). La expresión de los genes *ompF/ompC* se controla a través de un sistema de dos componentes, el sistema EnvZ/OmpR (Dam et al., 2017) que se encuentra en una amplia variedad de especies como *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, algunas especies de *Yersinia* y *Salmonella enterica* entre otras (Sun et al., 2009; Hirakawa et al., 2003). EnvZ/OmpR es un sistema prototipo y ha sido ampliamente estudiado como modelos para la señalización por TCS como se refleja en los estudios presentados en el apartado Resultados 4.2 de la presente tesis. EnvZ es una HK de la familia HisKA que sensa los cambios de osmolaridad, pH y limitación de nutrientes, ejecutando una respuesta a través de OmpR, su RR pareja. OmpR es un factor transcripcional que modula la expresión de los genes *ompF* y *ompC* (Mizuno et al., 1990). Se ha demostrado que en baja osmolaridad se generan altos niveles de OmpR fosforilado, lo que activa la transcripción de *ompF*. Por el contrario, en alta osmolaridad se observan bajos niveles de OmpR fosforilado lo que reprime la transcripción de *ompF* y activa la transcripción de *ompC* (Cai & Inouye, 2002).

En el año 2017 se reportó un aislado clínico de *E. coli* resistente a ertapenem, un nuevo carbapenémico. Esta cepa era productora de betalactamasas de amplio espectro y presentaba una mutación en OmpR, correspondiente al

residuo Gly63 a Val, además de una reducción en la expresión de las porinas OmpC y OmpF (Dupont, 2017). En 2018, una cepa de *E. coli* conjugada con el plásmido pNDM-HK, el cual contiene genes de resistencia a los betalactámicos extraídos de un aislado clínico en 2011 (Ho, 2011), desarrolló resistencia a los carbapenémicos después de incubaciones continuas con dosis altas de meropenem. El análisis de esta cepa identificó una mutación puntual en OmpR correspondiente al residuo Gly63 a Ser, y al igual que en el caso anterior demostraba baja expresión de porinas (Kong, 2018). Estos estudios demostraron que la mutación en el residuo de Gly63 impide la fosforilación de OmpR lo que disminuye la expresión de porinas. Así pues, estos datos proponen a OmpR como una potencial diana sometida a mecanismos intrínsecos de resistencia a antibióticos. Sin embargo, se desconoce por qué la bacteria explota la mutación de OmpR precisamente en el residuo Gly63 y qué impacto tiene esta mutación en la estructura y función de OmpR así como en el reconocimiento con EnvZ. El presente apartado de la Tesis tiene como objetivo el estudio de las bases moleculares del impacto de la mutación Gly63 en OmpR. Abordaremos este objetivo utilizando aproximaciones estructurales y la caracterización *in vitro* de este mutante en el contexto de su actividad regulatoria.

4.3.1. Efecto de la fosforilación de OmpR en el residuo Gly63

Un alineamiento de secuencias de OmpR con PhoB, cuya estructura cristalina es conocida, nos indica que el residuo Gly63 de OmpR ocuparía la posición Gly61 de PhoB, un residuo que se localiza al final del L β 3 α 3 del dominio REC involucrado en acomodar el grupo fosforilo. La posición en la que se encuentra esta mutación nos indica que los efectos observados podrían deberse a problemas en la fosforilación de OmpR, ya que el L β 3 α 3 sufre grandes cambios conformacionales en los RR por la fosforilación como se ha observado previamente (Casino et al., 2009).

La fosforilación de los RRs está relacionada con cambios conformacionales en el dominio REC (Robinson et al., 2000) que generalmente permiten la dimerización de los RR. La dimerización de los factores transcripcionales es necesaria para que reconozcan secuencias promotoras que en gran parte de las ocasiones son palindrómicas, regulando de este modo la transcripción de

genes. Por estas razones, mutaciones del RR que impidieran la fosforilación, y adoptar la estructura cuaternaria asociada a la activación, debería afectar a la unión de éste con las secuencias promotoras.

La Gly es un residuo altamente flexible al carecer de cadena lateral, de forma que mutaciones a Ser o Val observadas en las cepas resistentes o a cualquier otro aminoácido podría imponer restricciones al elemento estructural donde se encuentre. Tanto Ser como Val tienen cadenas laterales cortas y de tamaño similar, aunque el primero tiene un carácter polar mientras que el segundo es hidrofóbico. Para analizar el impacto de la restricción impuesta por introducir una cadena lateral en la posición de la Gly63 se realizaron las mutaciones a Ala (G63A), con la cadena lateral más corta posible, y Val (G63V), correspondiente a la primera mutación de resistencia descrita y que también es hidrofóbica como la Ala. Estas mutaciones se realizaron tanto en la proteína completa (Omp_{FL}) como en el dominio REC aislado (Omp_{REC}). Posteriormente, se analizó la fosforilación de estas variantes en presencia de un fosfodador como acetilfosfato (AcP) y fosforamidato (PAd). La detección de la forma fosforilada del RR se realizó utilizando el reactivo Phos-tag (Fujifilm Wako) en geles SDS-PAGE donde la especie fosforilada y la no fosforilada migran a diferente velocidad. Las formas salvajes de Omp_{REC} en presencia de AcP y PdA así como de Omp_{FL} en presencia de PAd se fosforilaron, evidenciado por la aparición de una banda con motilidad electroforética reducida en comparación con las proteínas no fosforiladas. Por otro lado, la adición de AcP y PAd a los mutantes G63V y G63A en Omp_{REC} así como de PAd a los mutantes en Omp_{FL} no produjo la aparición de la banda correspondiente a la forma fosforilada. Indicando que ambas mutaciones impiden o disminuyen la fosforilación. (Figura 4.32).

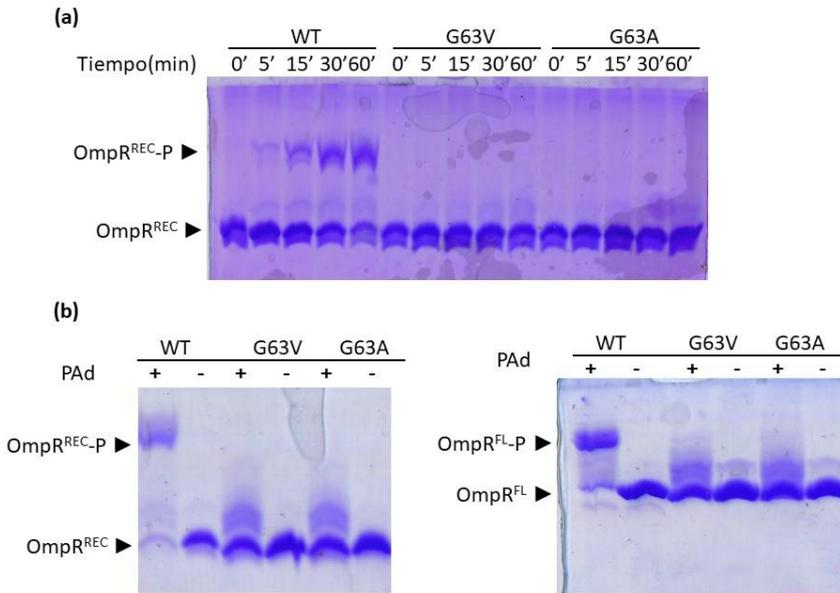


Figura 4.32. Fosforilación de OmpR_{FL} y OmpR_{REC} con AcP y PAd. Incubación de OmpR salvaje en presencia y ausencia de (a) AcP durante el tiempo (5, 15, 30 y 60 min) y (b) PAd durante 60 min. Adición de reactivo Phos-tag en geles SDS-PAGE para separar la especie fosforilada de la no fosforilada.

Tomando en cuenta que la fosforilación induce la dimerización de los RRs, se evaluó esta relación en los mutantes G63A y G63V en comparación con las proteínas salvajes. Para esto se realizaron cromatografías de exclusión molecular con OmpR_{FL} y OmpR_{REC} salvajes y mutantes, en ausencia y presencia del fosfodonor acetil fosfato (AcP) (Figura 4.33). Las proteínas no fosforiladas tanto de OmpR_{FL} como de OmpR_{REC} correspondientes a las cepas salvajes y mutantes mostraban cromatogramas con un pico mayoritario de volumen de elución (Ve) correspondientes a 12ml y 14ml, respectivamente. Estos volúmenes de elución se pueden atribuir a las proteínas en estado monomérico. Después de la incubación con AcP, las proteínas salvajes eluyeron en dos picos mayoritarios correspondientes a un Ve de 10.5ml y 12ml para OmpR_{FL}, y a un Ve de 12.5ml y 14ml para OmpR_{REC}. Los picos de elución en el menor Ve se corresponden, en cada caso, con la especie dimérica mientras que los de mayor elución se corresponden con la

especie monomérica mencionada anteriormente. Sin embargo, la incubación de OmpR_{FL} y OmpR_{REC} mutantes G63A y G63V con AcP no produjo dos picos de elución, sino que en todos los casos eluyeron en un Ve idéntico al observado para la especie monomérica. Esto confirma que las mutaciones impiden la fosforilación de OmpR y su correspondiente dimerización.

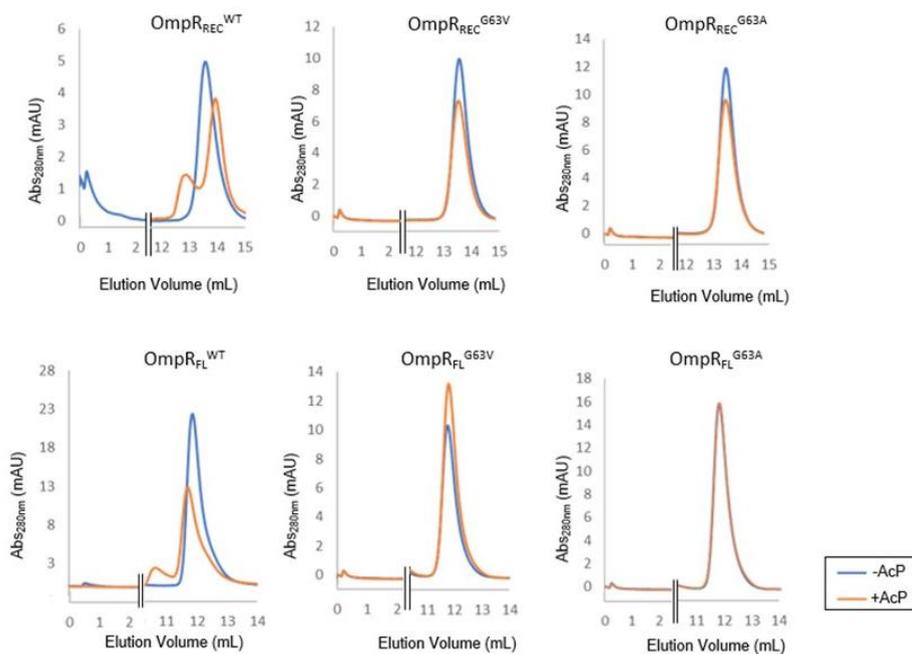


Figura 4.33. Cromatografía de exclusión molecular de OmpR. Cromatogramas donde se comparan los picos de elución de los constructos salvajes y mutantes de OmpR_{FL} y OmpR_{REC} en presencia y ausencia de AcP.

4.3.2. Interacción de los mutantes de OmpR en Gly63 con EnvZ

La falta de fosforilación observada en los mutantes G63A y G63V podría correlacionarse con la falta de flexibilidad en el L β 3 α 3, y por consiguiente con la imposibilidad de acomodar el grupo fosforilo. Por otra parte, la estructura de complejo HK853-RR468, muestra interacciones entre el ATP-lid de la HK y el L β 3 α 3 que han sido propuestas como de reconocimiento del estado de fosforilación (Casino et al., 2009). Es posible que las mutaciones en el residuo G63 puedan influenciar el reconocimiento entre OmpR y EnvZ, además de la fosforilación del RR. Para evaluar esta posibilidad se cuantificaron las constantes de unión entre EnvZ y OmpR en su forma WT y mutante en G63. Para ello utilizamos interferometría de biocapa (BLI) que nos permite determinar la constante de afinidad (K_D), así como las constantes de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Constantes de afinidad del sistema EnvZ-OmpR. Valores obtenidos para la K_D , k_{on} y k_{off} de las interacciones EnvZ-OmpR tanto con los constructos salvajes como con los mutantes.

Proteínas	K_D (μM)	k_{on} ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})
EnvZ – OmpR _{REC}	0,02	1,59	$2,64\cdot 10^{-2}$
EnvZ - OmpR _{REC} ^{G63A}	0,08	1,32	$1,21\cdot 10^{-1}$
EnvZ - OmpR _{REC} ^{G63V}	0,12	1,04	$1,25\cdot 10^{-1}$
Envz – OmpR _{FL}	0,20	0,25	$5,03\cdot 10^{-2}$
Envz - OmpR _{FL} ^{G63A}	0,57	0,11	$6,01\cdot 10^{-2}$
Envz - OmpR _{FL} ^{G63V}	1,19	0,10	$1,24\cdot 10^{-1}$

Las proteínas salvajes de OmpR_{FL} y OmpR_{REC} mostraron diferencias en sus constantes de afinidad para interactuar con EnvZ. La K_D correspondiente a OmpR_{REC} fue de $0.02\mu\text{M}$ y la de OmpR_{FL} fue de $0.2\mu\text{M}$, siendo un orden de magnitud más alta la afinidad de EnvZ por OmpR_{REC}. Esta diferencia se debe

a una disminución de 6.5 veces en el valor de la k_{on} para OmpR_{FL} con poca variación en la k_{off} . Esta menor afinidad mostrada por OmpR_{FL} podría estar causada por la presencia del dominio de unión al ADN que obstaculizaría la unión con la HK, explicando el incremento en la k_{on} . Datos previos de afinidad obtenidos para la interacción de EnvZ con OmpR_{FL} indican una K_D de 0.43 μ M (Mattison & Kenney, 2002), similar a la obtenida en nuestro caso.

Al comparar las interacciones de EnvZ con las proteínas mutantes de OmpR_{REC} se observa que las dos mutaciones muestran menor afinidad respecto a OmpR_{REC} salvaje, mostrando valores de K_D de 0.08 μ M para G63A y 0.12 μ M para G63V. La mutación a Ala presenta un menor efecto en la reducción de afinidad probablemente por el menor tamaño de la cadena lateral. Al observar los valores de k_{on} y k_{off} para ambos mutantes, el valor más afectado es la k_{off} (5 veces), indicando que el complejo es más propenso a la disociación. Resultados similares fueron observados con OmpR_{FL}, donde los mutantes mostraron una disminución en la afinidad respecto a los mutantes de OmpR_{REC}. Así pues, la mutación a Val mostraba menor afinidad (K_D de 1.2 μ M) que a Ala (K_D de 0.57 μ M) (Tabla 4.9) confirmando que las mutaciones en el residuo G63 tienen una fuerte influencia en la interacción de OmpR con EnvZ.

Posteriormente, evaluamos como esta disminución en la interacción EnvZ-OmpR influenciaba la fosfotransferencia desde la HK al RR. Para ello, se diseñaron ensayos donde previamente se fosforilaba EnvZ con [γ -³²P] ATP radioactivo durante 30 minutos y posteriormente se incubaba con las variantes salvajes y mutantes de OmpR_{FL} y OmpR_{REC}. (Figura 4.34).

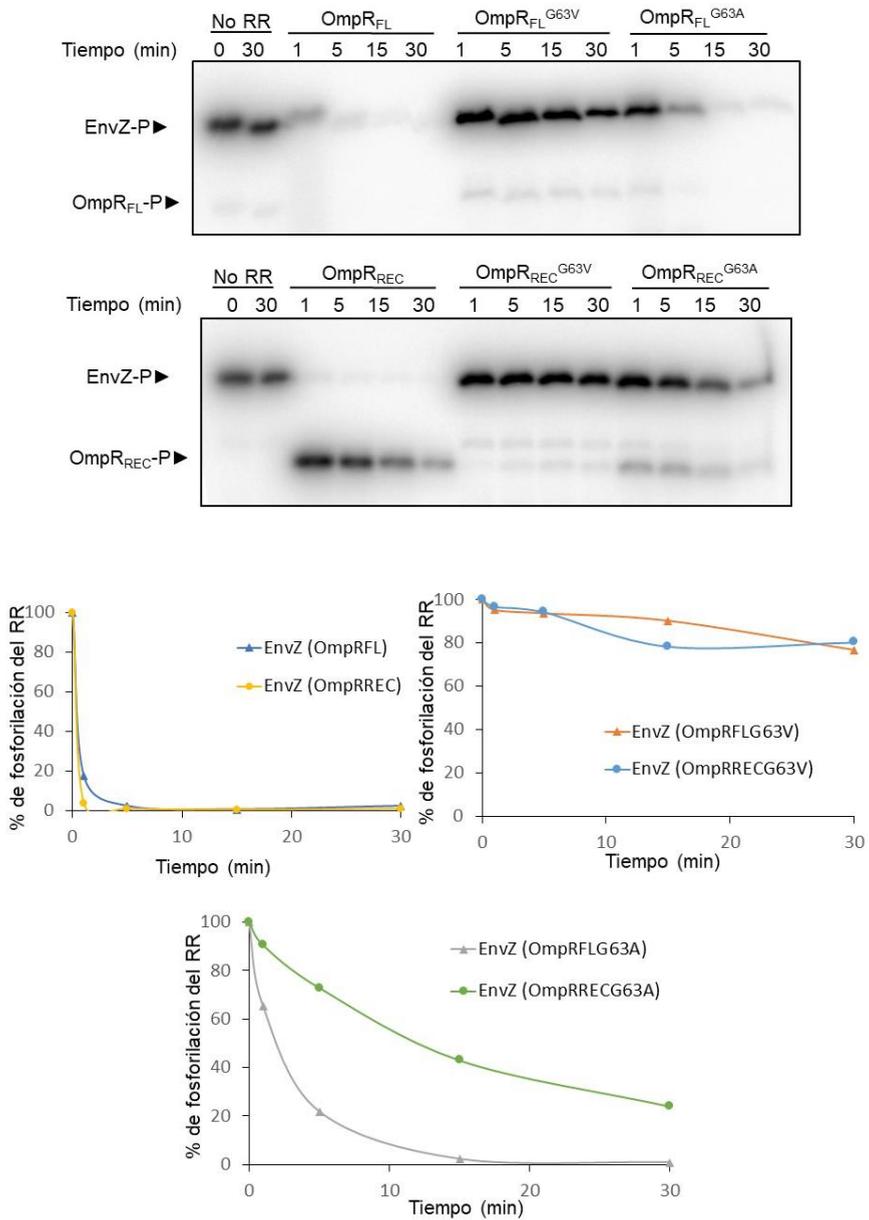


Figura 4.34. Ensayo de fosfotransferencia EnvZ- OmpR. EnvZ fosforilado con ATP [γ - 32 P] y posterior incubación con los constructos de OmpR tanto salvajes como mutantes. Cuantificación correspondiente al % de fosforilación de la HK en la presencia de cada uno de los constructos.

Como se observa en la Figura 4.34, la fosfotransferencia de EnvZ a OmpR_{FL} y OmpR_{REC} salvajes fue completa en un minuto. Sin embargo, la acumulación de banda fosforilada de OmpR fue observada únicamente para OmpR_{REC}. Esto indicaba que EnvZ presentaba una fuerte actividad fosfatasa sobre OmpR_{FL} pero muy reducida sobre OmpR_{REC}. Por otra parte, EnvZ no mostró fosfotransferencia al mutante G63V de OmpR_{FL} o OmpR_{REC}. Sin embargo, se apreció una baja fosfotransferencia de EnvZ al mutante G63A de OmpR_{FL} coincidente con una reducción progresiva de la banda fosforilada de EnvZ. La fosfotransferencia es mayor a OmpR_{FL} donde a los 15 minutos de incubación casi se ha completado. Por el contrario, la banda de EnvZ-P todavía se observa a los 30 min de incubación con OmpR_{REC}. En cualquier caso, la transferencia de fosforilo desde EnvZ al mutante G63A fue más lenta que a OmpR salvaje. Como ocurrió con la proteína WT, para el mutante G63A la forma fosforilada de OmpR_{REC} se acumula, pero no así para OmpR_{FL}, indicando que EnvZ también tiene capacidad fosfatasa sobre esta forma mutante de OmpR. El hecho de que el mutante G63A acepte grupo fosforilo de EnvZ pero no así de un pequeño fosfodador como AcP o PAd indica que la interacción con EnvZ favorece o ayuda que OmpR pueda adquirir el cambio conformacional para fosforilarse.

La actividad de fosfotransferencia de EnvZ a OmpR también se analizó por Western-blot utilizando el anticuerpo anti-N1-phosphoHis (1-pHis) que detecta His fosforilada. (Figura 4.35). Para ello, EnvZ se incubó en presencia de ATP y posteriormente se adicionó OmpR manteniendo la incubación durante 30 min. Como se observa en la Figura 4.35, en ausencia de OmpR, se detectó la banda correspondiente a EnvZ fosforilada (EnvZ-P). La adición de OmpR_{FL} y OmpR_{REC} salvaje produjo la desaparición completa de la banda correspondiente a EnvZ-P en un minuto, lo que se adscribe a una rápida fosfotransferencia. Al igual que en los ensayos de fosforilación con ATP radioactivo, no se observó fosfotransferencia cuando EnvZ se incubó con los mutantes G63V, en OmpR_{FL} y OmpR_{REC}, es decir, no se observó desaparición de banda correspondiente a EnvZ-P. Sin embargo, la incubación de EnvZ con el mutante G63A produjo desaparición de banda correspondiente a EnvZ-P, detectándose fosfotransferencia, aunque en menor proporción que con las proteínas salvajes. En general, los estudios de fosfotransferencia realizados mediante detección de EnvZ-P, ya sea en presencia de ATP radioactivo o con anticuerpos anti-phosphoHis, han generado resultados similares. Estos

resultados han demostrado que la mutación G63V tiene un efecto negativo para OmpR afectando a la interacción con EnvZ y la fosfotransferencia. Mientras, la mutación G63A parece tener un menor impacto en OmpR, que mantiene las actividades de fosfotransferencia y fosfatasa, aunque reducidas.

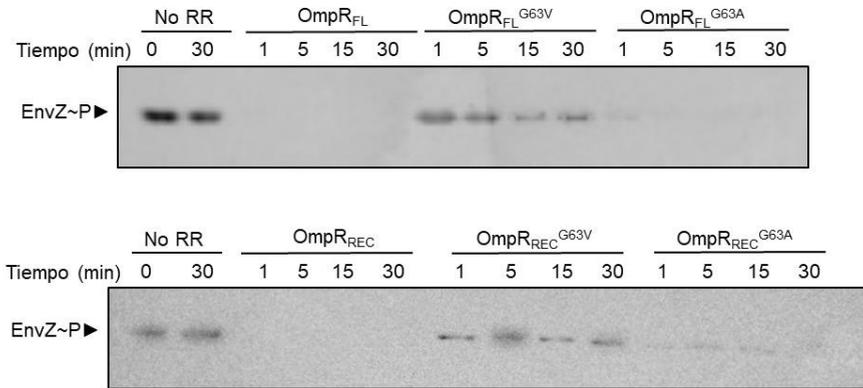


Figura 4.35. Ensayos de fosfotransferencia EnvZ-P-OmpR. Detección de EnvZ-P utilizando el anticuerpo anti-N1-phosphoHis. La disminución de banda correspondiente a EnvZ-P cuando está presente el RR determina la actividad de fosfotransferencia.

4.3.3. Interacción de los mutantes de OmpR en Gly63 con los promotores *ompF* y *ompC*

Los mutantes de OmpR G63V y G63A han demostrado ausencia de fosforilación en presencia de fosfodadores, así como ausencia de dimerización. Estas dos características deberían tener un efecto en la capacidad de OmpR para interactuar con los promotores *ompF* y *ompC*; ya que el modelo actual de la familia de RRs OmpR/PhoB indica que la fosforilación induce la dimerización requerida para el reconocimiento y unión al ADN diana (Barbieri, 2013). Para confirmar este punto se realizaron ensayos de movilidad electroforética (EMSA) con OmpR_{FL}, salvaje y mutantes, y los promotores *ompF* y *ompC* en presencia y ausencia de los fosfodadores AcP y PAd (Figura 4.36).

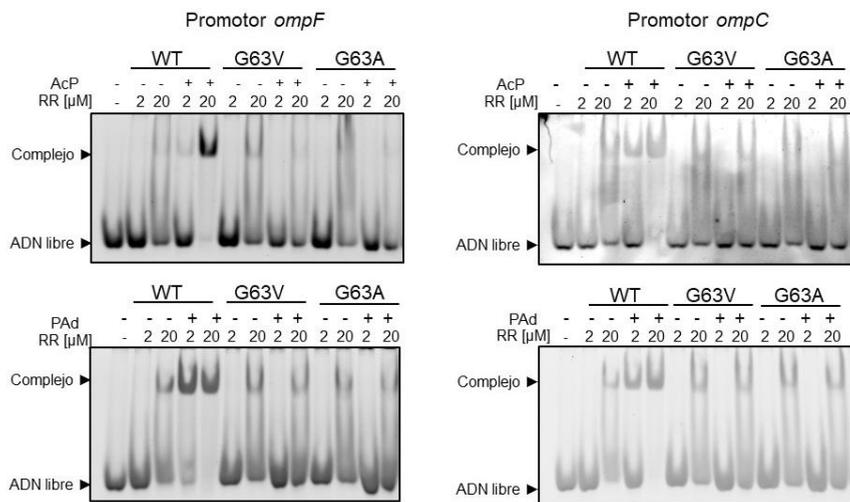


Figura 4.36. EMSA de $OmpR_{FL}$ en presencia de los promotores $ompF$ y $ompC$. Utilizando los constructos salvajes y mutantes de $OmpR_{FL}$ y $OmpR_{REC}$ se observa la capacidad de unirse a los promotores de los genes $ompF$ y $ompC$ en presencia y ausencia de un fosfodonador.

Como se ve en la Figura 4.36, en ausencia del fosfodonador, la incubación de ambos promotores $ompF$ y $ompC$ en presencia de $20\mu M$ $OmpR_{FL}$ ya sea salvaje o mutante, produce la aparición de una banda con menor movilidad electroforética que el ADN libre. Esta nueva banda se atribuye al complejo $OmpR_{FL}$:promotor, aunque presenta menor intensidad que la de ADN indicativo de un bajo nivel de unión. La incubación de ambos promotores con $2\mu M$ $OmpR_{FL}$ salvaje en presencia de fosfodonador estimula la unión a los promotores, aunque sigue quedando ADN libre. De esta forma, una concentración 10 veces menor de $OmpR_{FL}$ en presencia de fosforilación es suficiente para observar la formación del complejo $OmpR$:promotor, que no era apreciable a esta concentración de $OmpR$ en ausencia de fosforilación. La adición de $20\mu M$ $OmpR_{FL}$ salvaje en presencia de fosfodonador elimina toda señal de ADN libre, pasando este a formar complejo con $OmpR$. Estos resultados confirman que la fosforilación de $OmpR_{FL}$ aumenta la afinidad por el ADN estimulando la interacción con sus ADN diana como ha sido demostrado previamente (Barbieri, 2013). Como era de esperar, la presencia de los fosfodonadores con los mutantes G63V y G63A no estimula la unión a ninguno de los dos promotores. Únicamente se observa la banda correspondiente al complejo $OmpR$:promotor cuando la concentración de

proteína es de 20 μM , de forma similar a lo que ocurre en el RR salvaje en la ausencia de fosfodonadores. Como la intensidad de esta banda es similar en presencia y ausencia de fosfodonadores, OmpR no fosforilado puede unirse al ADN como ha sido reportado anteriormente (Head et al., 1998).

Estos resultados confirman que la fosforilación de OmpR_{FL} estimula la unión a los promotores *ompF* y *ompC* y que alteraciones en la capacidad de fosforilación tiene un impacto en dicha unión, como ya se había sido descrito anteriormente (Mattison et al. 2002). Sin embargo, el hecho de observar unión de OmpR_{FL} a ambos promotores en ausencia de fosforilación, tanto en las variantes salvajes como mutantes, sugiere que la incubación de OmpR con secuencias específicas de ADN puede estimular la interacción de los dominios de unión al ADN con el promotor y al mismo tiempo promover la dimerización del dominio REC. De hecho, la banda atribuida al complejo proteína:promotor se encuentra en la misma posición en todos los casos, tanto en ausencia como en presencia de fosforilación, indicativo de que el dímero de OmpR se une al ADN en todos los casos (Barbieri et al., 2013). Dado que la familia OmpR/PhoB utiliza la superficie $\alpha 4$ - $\beta 4$ - $\alpha 5$ para la dimerización, y que el residuo Gly63 se localiza en el $\text{L}\beta 3\alpha 3$, el efecto de la mutación podría tener un impacto menor sobre dicha superficie.

4.3.4. Estructura cristalina de OmpR_{REC}^{G63V}

Para poder entender las bases moleculares del efecto de la mutación G63V en OmpR abordamos la resolución de la estructura tridimensional de OmpR_{REC}^{G63V} por cristalografía. La proteína generó cristales pertenecientes al grupo espacial $P2_12_12_1$ con celda 32,0 / 52,26 / 58,99 que difractaban los rayos X a una resolución de 1.6 Å (Tabla 4.10). Tras resolver la estructura por reemplazo molecular utilizando como modelo la estructura de OmpR_{REC}^{WT} (previamente resuelta por la Dra. Laura Miguel Romero en el laboratorio del Dr. Alberto Marina) se encontró en la unidad asimétrica una sola molécula OmpR_{REC}^{G63V}. Para evaluar el impacto de la mutación se comparó con la estructura de la forma OmpR_{REC}^{WT} que presenta BeF_3^- en su centro activo y mostraba la conformación fosforilada del domino REC. La superposición de ambas estructuras mostró un plegamiento general similar (RMSD 2,1643 para 219 residuos) con cambios importantes en la hélice $\alpha 3$ y el loop $\text{L}\beta 3\alpha 3$, así como cambios en $\beta 4$ y la hélice $\alpha 4$ que interaccionan con los elementos

anteriores. La mutación G63V tiene un fuerte impacto sobre el elemento donde se asienta. En OmpR_{REC}^{WT} el residuo G63 forma parte del Lβ3α3 pero en OmpR_{REC}^{G63V} pasa a formar parte de la hélice α3, de forma que se acorta la longitud de loop y cambia su disposición. Esta elongación de la hélice α3 induce el desplazamiento de su extremo N-terminal que se transduce a través de β4 a los elementos estructurales Lβ4α4 y la hélice α4 que acaban sufriendo fuertes desplazamientos (Figura 4.37). Estos cambios conformacionales se ven favorecidos por el carácter hidrofóbico de la mutación. El nuevo residuo de Val en el mutante se acomoda en un bolsillo hidrofóbico formado por las cadenas laterales de L54 (β3), L56 (Lβ3α3), y A37 (α2), promoviendo los desplazamientos observados en α3 y α4 y posiblemente estabilizando esta conformación (Figura 4.37, panel lateral).

Tabla 4.10. Tabla cristalográfica OmpR_{REC}^{G63V}. Información de los datos cristalográficos y de refinamiento. Los valores entre paréntesis corresponden a la celda de mayor resolución.

OmpR_{REC}^{G63V}	
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a, b, c (Å)	32,0 51,26 58.99
α, β, γ, (°)	90,0 90,0 90,0
Resolución (Å)	32,0 – 1,60 (1,63-1,60)
No. Reflexiones totales	120820
R_{merge}	0,063 (0,720)
I / σI	17,0 (2,9)
Completitud (%)	100 (100)
Redundancia	9 (9,2)
Rwork / Rfree	0,18 / 0,2275
No. átomos	1001
Proteína	967
Ligando/ión	0
Agua	34
Promedio factores B (Å²)	28,6
Distancia de enlace (Å)	0,0042
Ángulos de enlace (°)	1,198

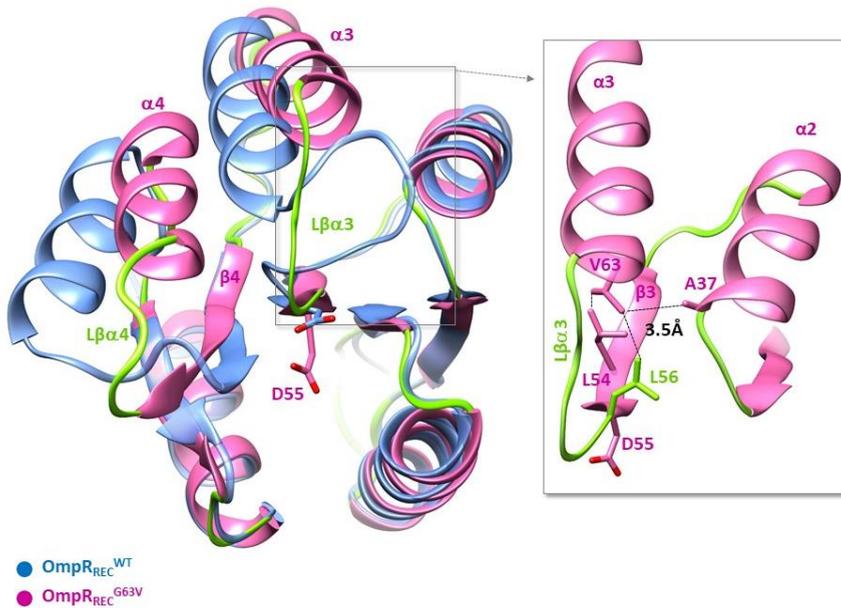


Figura 4.37. Superposición de las estructuras $OmpR_{REC}$. Superposición de las estructuras de $OmpR_{REC}$ salvaje (azul) y mutante G63V (magenta). Los loops de la estructura mutante están coloreados en verde. En el panel lateral se observan las interacciones que presenta la cadena lateral del residuo V63 formando el bolsillo hidrofóbico.

Una visión detallada del estado de activación de $OmpR_{REC}^{G63V}$ muestra una conformación inactiva según el modelo Y-T de activación para los RR que se ha comentado en los apartados anteriores (Mattison et al, 2002). Los desplazamientos inducidos en el $L\beta 3\alpha 3$ y en $\alpha 3$ por la mutación G63V induce cambios conformacionales que se propagan hasta el final de $\beta 4$ donde se encuentra el residuo catalítico T83 que se debe coordinar con el grupo fosforilo del fosfo-Asp. Estos cambios desplazan a T83 orientándose lejos del centro activo y afectando con ello al $L\beta 4\alpha 4$ y a $\alpha 4$. Al mismo tiempo, la cadena lateral de Y102 en $\beta 5$ se orienta alejada del centro activo para evitar colisionar con T83. Esta disposición de las cadenas laterales correspondientes a T83 y Y102 orientándose lejos del centro activo es la que presentan los RR en su estado no fosforilado y es completamente diferente a la observada en la estructura $OmpR_{REC}^{WT}$ en presencia de fosfomimético BeF_3^- (Figura 4.38). Cabe recalcar que, aunque la mutación también induce

movimientos en la cadena lateral del residuo fosforilable D55, esto no impide que siga interactuando con el residuo catalítico K105 y otros residuos catalíticos (Figura 4.38). Esto sugiere que los efectos de la mutación son más conformacionales que de pérdida de capacidad catalítica. De esta forma, el mutante G63V presentaría un estado no fosforilado de OmpR con dificultades en adquirir el estado fosforilado debido a las interacciones que mantiene la Val63 en el bolsillo hidrofóbico.

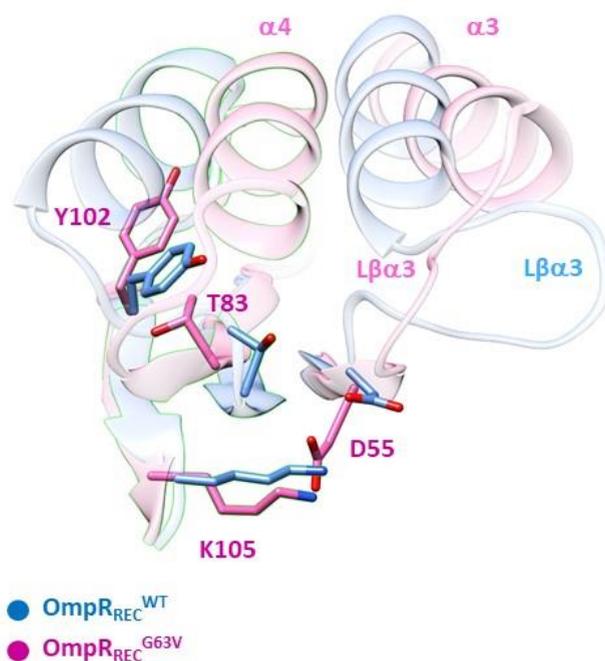


Figura 4.38. Movimientos de T83 y Y102 correspondientes al estado no fosforilado. Superposición de las estructuras de OmpR_{REC} salvaje (azul) y mutante (magenta) resaltando las cadenas laterales de D55, T83, Y102 y K105.

Para evaluar como los cambios conformacionales inducidos por la mutación G63V influyen en la capacidad de OmpR para dimerizar, se modeló un dímero mutante a partir del dímero canónico observado en la estructura de OmpR_{REC}^{WT} en estado fosforilado. Para ello se superpusieron dos moléculas de OmpR_{REC}^{G63V} sobre cada una de las moléculas del dímero fosforilado salvaje (Figura 4.39). Como miembro de la familia OmpR/PhoB de RR a las

que da nombre, $\text{OmpR}_{\text{REC}}^{\text{WT}}$ explota la superficie generada por los elementos $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ para dimerizar. El modelado mostro que el dímero de $\text{OmpR}_{\text{REC}}^{\text{G63V}}$ presentaba una drástica reducción de la superficie de interacción debido al desplazamiento de $\alpha 4$ que debilita la superficie $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$, pasando de ser de 1100 \AA^2 para el dímero de $\text{OmpR}_{\text{REC}}^{\text{WT}}$ a tan solo 278 \AA^2 para el dímero de $\text{OmpR}_{\text{REC}}^{\text{G63V}}$. Esta superficie de interacción es demasiado pequeña para realizar un dímero estable como indica el análisis por el software PISA (Krissinet, 2015). Además, este modelo no reproduce los cinco puentes salinos que se observan en el dímero $\text{OmpR}_{\text{REC}}^{\text{WT}}$, a excepción de la interacción entre R91 en $\alpha 4$ y E111 en $\alpha 5$ que muestra una colisión. Estos datos indican que el mutante G63V sería capaz de unir mediante dimerización a sus promotores como indicaron nuestros ensayos de EMSA, aunque con mucha menor afinidad. La presencia del ADN diana debe promover cambios conformacionales en el dominio REC, o alternativamente, esa unión se realiza en forma de monómeros, lo que explicaría que es independiente de fosforilación.

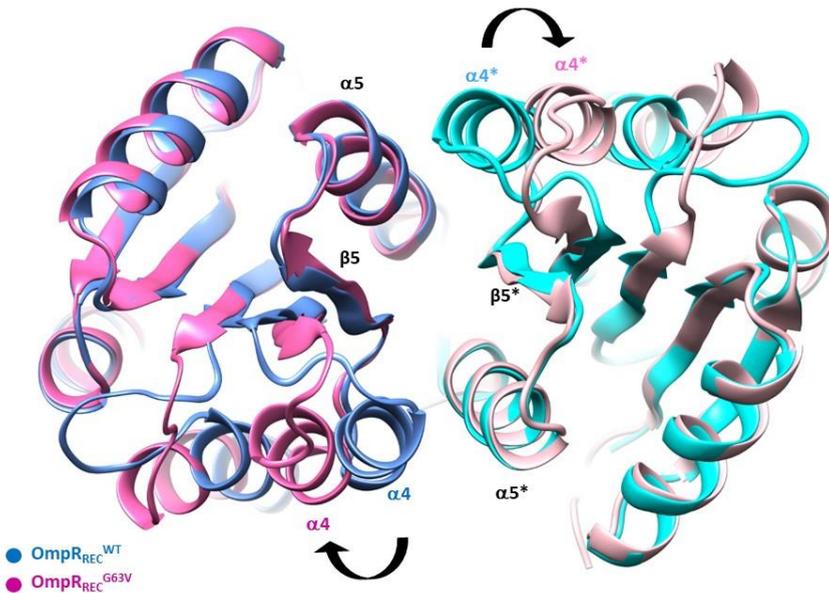


Figura 4.39. Modelo del dímero de $\text{OmpR}_{\text{REC}}^{\text{G63V}}$. Superposición del dímero canónico observado para OmpR_{REC} salvaje (azul) y el modelado en el mutante (magenta). La mutación refleja el impacto en el desplazamiento de $\alpha 4$ sobre la superficie de dimerización.

Utilizando como molde la estructura del complejo HK853-RR468^{M55A}, que se describió en el apartado Resultados 4.1, se generó un modelo del complejo EnvZ-OmpR en la reacción fosfatasa. Para eso se superpuso el dominio DHp de EnvZ (PDB: 4CTI) y las estructuras de OmpR tanto la salvaje como la mutante. En este modelo de complejo EnvZ-OmpR podemos observar como en el mutante OmpR_{REC}^{G63V} los movimientos generados en el Lβ3α3 obligan a la M57 a interponerse entre los residuos catalíticos, incluso generando un choque con la His342, al permanecer a una distancia de 2.85Å (Figura 4.40). Esto nos demuestra la dificultad que presenta EnvZ para fosforilar a este mutante y se correlaciona con los ensayos de fosfotransferencia descritos previamente.

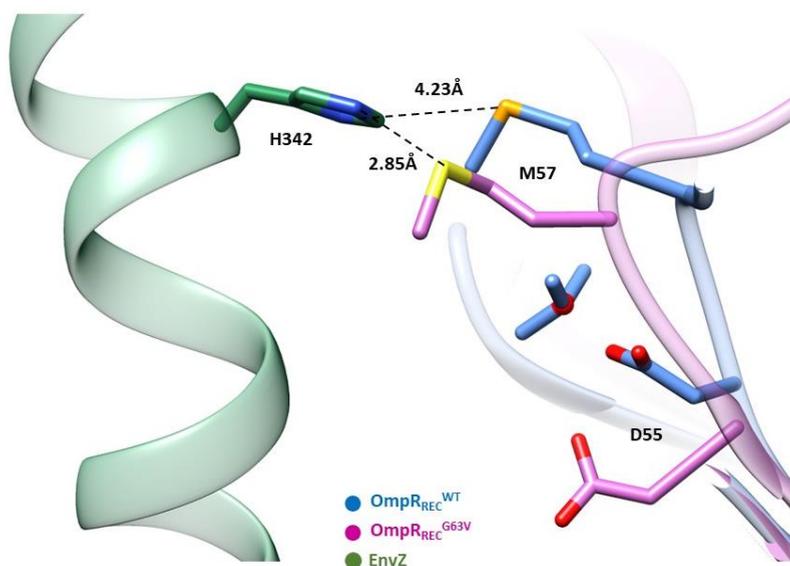


Figura 4.40. Modelo del complejo EnvZ-OmpR. Utilizando como modelo el complejo HK853-RR468^{M55A} se genera un modelo del complejo EnvZ-OmpR, donde se observan las cadenas laterales de los residuos catalíticos y de la M57 de OmpR.

En resumen, la mutación G63V muestra una conformación inactiva de OmpR donde el residuo V63 está localizado en α3. La presencia de esta mutación acorta el Lβ3α3 y causa un alargamiento de α3 que promueve la formación de un bolsillo hidrofóbico. El desplazamiento de α3 obliga a la M57 a colocarse en una posición que impide que la His catalítica se acerque,

disminuyendo la actividad de fosfotransferencia y fosfatasa. Este desplazamiento se extiende a $\beta 4$ y al $L\beta 4\alpha 4$ induciendo un desplazamiento en $\alpha 4$ que debilita la interacción del dímero a través de la superficie $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$. Sin embargo, los resultados obtenidos en los EMSAs indican que la presencia de un ADN específico puede estimular o promover la formación del dímero mutante G63V posiblemente a través de una superficie alterada de $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$. Otra posibilidad es que la forma monomérica de OmpR sea capaz de unirse con baja afinidad a sus dianas. En cualquier caso, la transcripción de genes *ompF* y *ompC* por el mutante G63V será mucho menor que por OmpR salvaje y por tanto se producirá una menor producción de porinas. Así pues, los resultados derivados de este estudio muestran las bases moleculares de la inhibición de la expresión de porinas por las mutaciones en el residuo G63 de OmpR que conllevan una resistencia indirecta a antibióticos.

4.4. Estudio evolutivo de la especificidad en el reconocimiento HK - RR

Existe gran cantidad de factores que determinan la especificidad en las interacciones proteína-proteína. Sin duda, para dos proteínas que interaccionan las mutaciones en una de ellas puede tener un fuerte impacto sobre su pareja por lo que se vean forzadas a co-evolucionar o a perder su interacción (DePristo et al., 2005; Aakre et al., 2015). Aunque este factor se ve fuertemente influenciado por las características que impone la función propia de cada una de las proteínas. La identificación de residuos que han co-evolucionado en una interacción proteína-proteína ha ayudado a identificar factores de especificidad (Ovchinnikov et al., 2014; Skerker et al., 2008). En base a esto, se han generado dos modelos para intentar explicar la evolución de proteínas y la especificidad en una interacción: (i) Modelo de la mutación compensatoria, consiste en la mutación de una proteína que interrumpe la interacción, pero si se da una mutación en la proteína complementaria se puede rescatar el reconocimiento; (ii) Modelo del intermediario promiscuo, cuando se da una mutación en una proteína y cambia su especificidad dándole la capacidad de interactuar con más de una diana hasta que una segunda mutación en otra molécula aumente la especificidad nuevamente (Kuriyan & Eisenberg, 2007).

Las proteínas señalizadoras se encuentran en grandes cantidades dentro de la célula y la gran mayoría ha evolucionado a partir de duplicaciones y divergencia genética. Estos procesos evolutivos tienen altas probabilidades de introducir interacciones inespecíficas o “crosstalk” que sería un paso intermedio característico del modelo promiscuo (Capra et al., 2012). Evitar la aparición de “crosstalk” es una presión selectiva muy importante para la co-evolución de las proteínas (Zarrinpar et al., 2003). Para ello, deben modificarse rápidamente los residuos involucrados en el reconocimiento entre proteínas que incluso posteriormente pueden llegar a adquirir una nueva función dentro de la célula (Salazar & Laub, 2015). Sin embargo, en la co-evolución también se producen efectos de epistasis de forma que un residuo está influenciado por uno o más residuos. Por lo tanto, mutaciones en dicho residuo puede tener efectos diferentes a los esperables bien promoviendo o inhibiendo interacciones (Starr & Thornton, 2016). Este

efecto epistático se ha puesto de manifiesto en el estudio de la especificidad de los TCSs (Podgornaia et al., 2013).

Los TCSs están involucrados en procesos de señalización para que la célula se adapte a cambios en el medio. Estos procesos de transmisión de la señal tienen que ser rápidos y eficientes para que se active la respuesta específica correspondiente. Dado que las bacterias presentan decenas y en algunos casos más de una centena de estos sistemas, la especificidad es un punto crítico para mantener una correcta señalización. Para ello, los TCSs presentan una alta fidelidad dentro de un mismo sistema HK-RR a pesar de que los dominios catalíticos, que se utilizan para el reconocimiento e interacción entre las HKs y RRs, presentan alta conservación. De esta forma, a pesar de la gran cantidad de TCS dentro de una misma célula procariota se ha reportado muy poco “crosstalk” durante la fosfotransferencia (Grimshaw et al., 1998; Skerker et al., 2005; Laub & Goulian, 2007; Siryaporn & Goulian, 2008). Es decir, cuando la HK está fosforilada es capaz de encontrar a su RR correspondiente a través de reconocimientos moleculares para llevar a cabo la fosfotransferencia de manera específica, evitando un “crosstalk” que podría activar distintas señales o procesos. Por otro lado, cuando algunas HKs no están fosforiladas son capaces de reconocer a su RR y realizar la actividad fosfatasa para cesar la transmisión de la señal (Capra et al., 2012). En este objetivo se intenta avanzar en el conocimiento de cómo los TCSs han adquirido, durante la evolución, la fidelidad en la interacción para evitar el “crosstalk” aun cuando en un mismo organismo existan decenas o centenas de sistemas.

4.4.1. Búsqueda de TCS que presenten “cross-talk”

Para comprender como ha evolucionado la especificidad o fidelidad en la interacción en los TCSs se realizó una búsqueda de bacterias que presentaran un solo sistema de TCS, idealmente compuesto por una HK y un RR, aunque podría incluir más de uno de estos RRs. El razonamiento detrás de esta búsqueda es un organismo con tan solo un TCS debería tener menos presión en su especificidad y por lo tanto su HK podría presentar

promiscuidad y permitiría reacciones cruzadas con RRs de otros TCS. Esta HK menos específica o poco evolucionada podría presentar “cross-talk” al no haber desarrollado un sistema de especificidad HK-RR. La comparación entre una HK poco evolucionada con una HK que presente alta especificidad puede ayudar a encontrar determinantes de especificidad. Para encontrar HKs únicas se utilizó la base de datos P2CS (Barakat, 2011) que anota y clasifica todas las proteínas de TCSs en todos los genomas y metagenomas de procariontes secuenciados. La búsqueda de organismos que presentaran una única HK y un único RR ó varios en su genoma, mostró que era poco frecuente ese hecho, rindiendo tan solo 4 casos correspondientes a *Chlamydia trachomatis* con una HK (HK_{Chtra}) y un único RR, *Chlamydia psittaci* con una HK (HK_{Chpsi}) y un solo RR, *Simkania negevensis* con una HK (HK_{Sneg}) y 6 RRs así como *Methanobrevibacter* sp. AbM4 con una HK (HK_{Met}) y 4 RRs (Tabla 4.11). Posteriormente se realizó un análisis de las secuencias de estas HKs para predecir la composición de sus dominios, utilizando el programa SMART (Letunic et al., 2015). A pesar de que algunas HK seleccionadas presentaban dominios transmembrana y dominios sensores citoplasmáticos tipo PAS y HAMP en su secuencia, este estudio se ha llevado a cabo con fragmentos que contienen la región catalítica completa formada por los dominios DHP y CA (Figura 4.41). Posteriormente, las secuencias de estos fragmentos se compararon con las secuencias de HK853 y de EnvZ para identificar los residuos catalíticos y llevar a cabo las reacciones de autofosforilación y fosfotransferencia típicas de HKs (Figura 4.42).

Tabla 4.11. Lista de organismos encontrados con el número de HKs y RR que corresponden.

Organismo	HK	RR
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1	1
<i>Chlamydia psittaci</i>	1	1
<i>Simkania negevensis</i>	1	6
<i>Methanobrevibacter</i> sp. AbM4	1	4

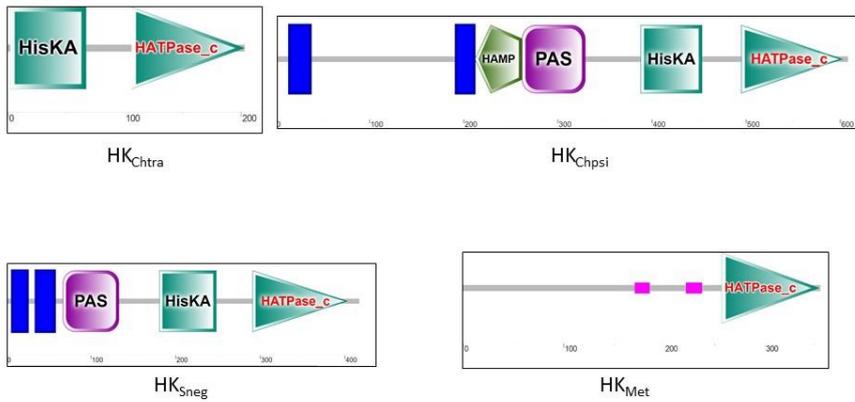


Figura 4.41. Predicción de dominios. Utilizando SMART (Letunic et al., 2015) se realizó una predicción de los dominios presentes en las HKs ancestrales identificadas.

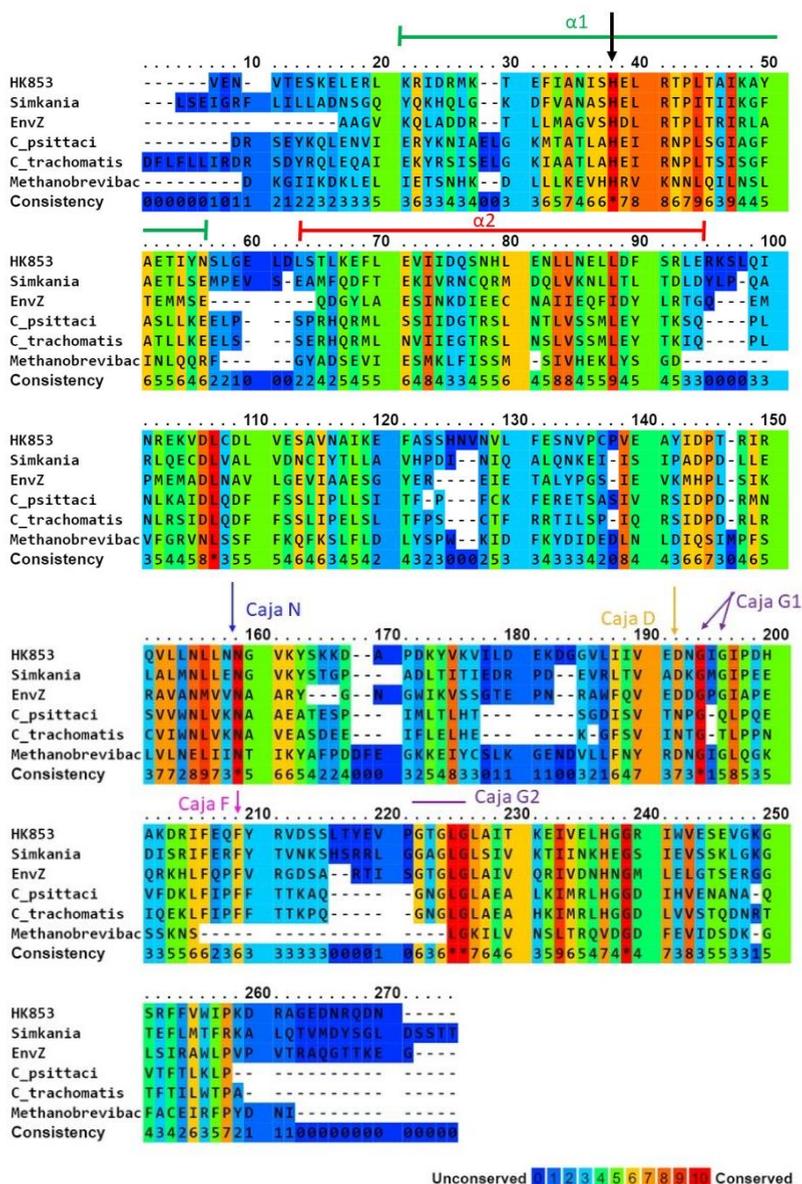


Figura 4.42. Alineamiento de secuencia correspondiente a las HKs ancestrales identificadas. El alineamiento realizado con Praline (Simossis & Heringa, 2005), incluye a las HKs: EnvZ y HK853. Se colorean los residuos de acuerdo con su conservación y se señalan las regiones correspondientes a las hélices α del dominio DHP y las cajas del dominio Caja, además se señala con una flecha negra la His catalítica.

De acuerdo con el alineamiento de secuencia presentado en la Figura 4.42, las HKs únicas presentan las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del dominio DHP donde la hélice $\alpha 1$ contiene la His fosforilable. Analizando los residuos cercanos a la His fosforilable se pudo identificar la familia a la que pertenecía cada una de las HKs, siendo HK_{Sneg} , HK_{Chpsi} y HK_{Chtra} de la familia HisKA, mientras que la HK_{Met} pertenecía a la familia HisKA_2.

Por otra parte, en el dominio CA se identificaron los residuos de las cajas involucradas en la unión y fijación del nucleótido (Figura 4.42). Las cajas N, F y gran parte de las regiones G1 y G2 se encuentran conservadas, pero en la caja D vemos una mutación a Asn en HK_{Chtra} y HK_{Chpsi} . La Asn es un residuo polar sin carga con un tamaño de cadena lateral similar al Asp, por lo que podría reducir la interacción que mantiene el Asp con la adenina del nucleótido. La HK_{Met} pertenecía a la familia HisKA_2 y por tanto presentaba características distintas a HisKA como la presencia de un ATP-lid corto y ausencia de la caja F (Herrou et al., 2017).

También se analizaron las secuencias de los RRs presentes en los microorganismos que contenían cada una de las HKs seleccionadas. En primer lugar, se realizó una predicción de dominios (Figura 4.43) observando que todos los reguladores presentaban un dominio REC, incluso RR_{Met589} presenta dos dominios REC en tándem en la misma secuencia. En el caso de RR_{Met573} , el programa SMART no predijo un dominio REC, pero otros programas como Pfam (El-Gebali et al., 2019) si lo hicieron por lo que también se incluyó en nuestros análisis. Algunos RRs presentan un dominio aislado REC o dominios efectores poco comunes en RRs como el dominio AAA procedente de dineínas o el dominio lactamasa B. De forma interesante, ninguno de ellos presentaba dominios efectores de unión a DNA.

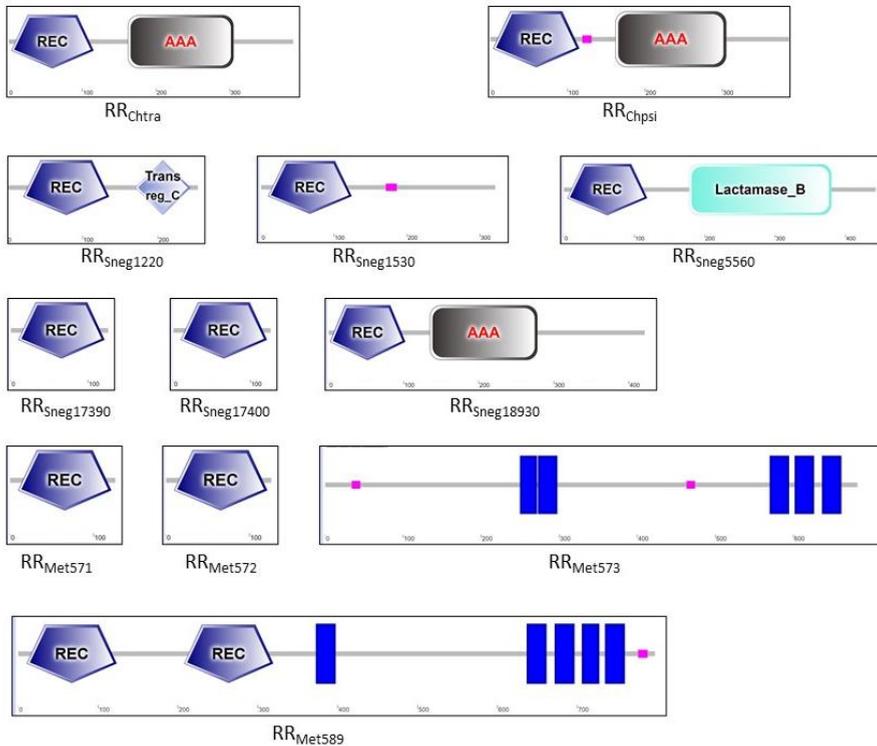


Figura 4.43. Predicción de dominios en los RR de los sistemas ancestrales. Utilizando el predictor de dominios SMART (Letunic et al., 2015) se realizó la predicción de dominios con las secuencias de los genes correspondientes.

Para nuestro estudio, se decidió trabajar únicamente con los dominios REC. En el caso de RR_{Met589} se trabajó con los dos dominios REC por separado llamándolos RR_{Met589-1} y RR_{Met589-2}. Así pues, se compararon las secuencias de todos los dominios REC con los dominios REC de RR₄₆₈ y OmpR para identificar los residuos catalíticos. En la Figura 4.44 se observa el alineamiento con las secuencias de RR_{Chtra} y RR_{Chpsi}, procedentes de *Chlamydia* que presentaban un único RR en su genoma. Estos dos RRs contienen el Asp fosforilable y los residuos catalíticos implicados en la fosforilación del RR.

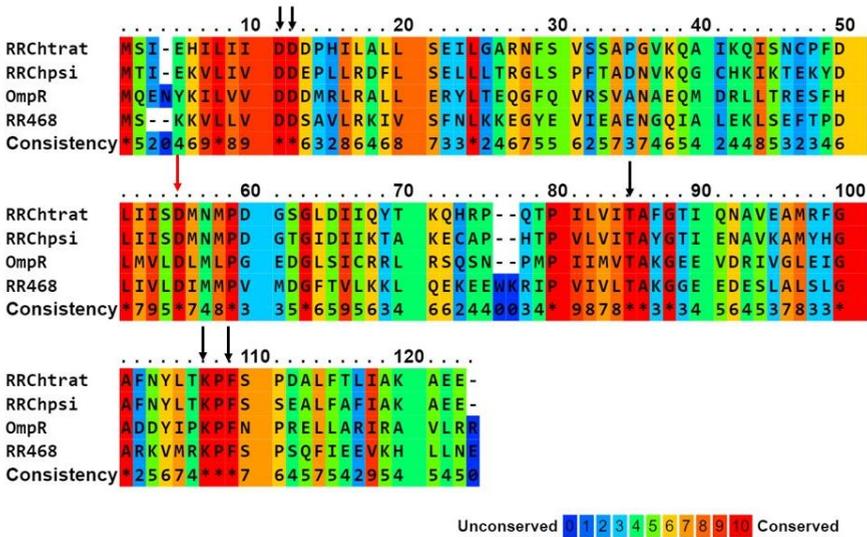


Figura 4.44. Alineamiento de secuencias de RR_{Chtra} y RR_{Chpsi}. Se comparan las secuencias con RR468 y OmpR_{Rec}, y se señalan con flechas negras los catalíticos a excepción del Asp fosforilable que se señala con una flecha roja.

En la Figura 4.45 se muestra el alineamiento de las secuencias realizado con los dominios REC de todos los RRs encontrados en *Simkania negevensis*. El Asp fosforilable se encuentra presente en las secuencias, sin embargo, no ocurre lo mismo con el resto de los residuos catalíticos. RR_{Sneg5560} no presenta el Asp catalítico del Lβ1α1, implicado en la estabilización del ión divalente, y en su lugar hay una Pro. Además, tampoco presenta la Lys catalítica del Lβ5α5 que interacciona con el grupo fosforilo. Por estas razones este RR no se incluyó en el estudio. Del mismo modo, los RR_{Sneg1530} y RR_{Sneg18930}, presentaban mutaciones en los residuos de Asp del Lβ1α1 implicados en la estabilización de ion divalente, así como en otros residuos catalíticos por lo que se descartaron en el estudio. Así pues, únicamente se trabajó con 3 RRs procedentes de este organismo (RR_{Sneg1220}, RR_{Sneg17390} y RR_{Sneg17400}).

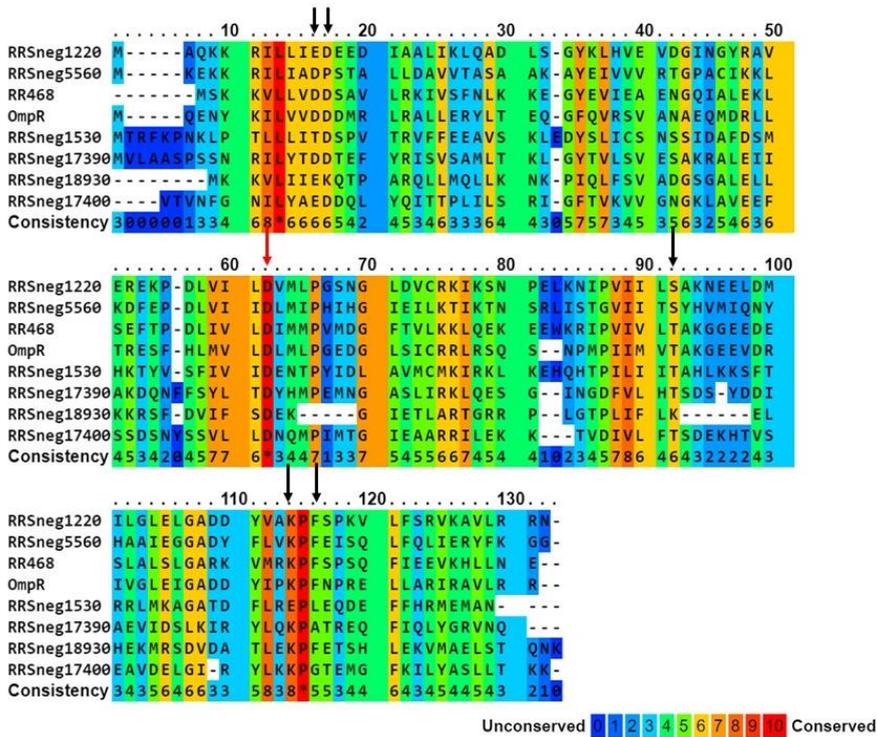


Figura 4.45. Alineamiento de secuencias de los RRs de *Simkania negevensis*. Se comparan las secuencias con RR468 y OmpR_{Rec}, se señalan con flechas negras los residuos importantes y con una flecha roja la conservación del Asp fosforilable.

El alineamiento de secuencia con los RRs de *Methanobrevibacter* sp. AbM4 (Figura 4.46) muestra que únicamente RR_{Met573} presentaba mutaciones importantes en los residuos catalíticos incluyendo el Asp fosforilable. Mientras, los dominios REC aislados procedentes de RR_{Met589}, presentan todos los residuos catalíticos. Por esta razón, RR_{Met573} no fue considerado para los análisis bioquímicos y se mantuvo por separado los dos dominios REC pertenecientes a RR_{Met589}.

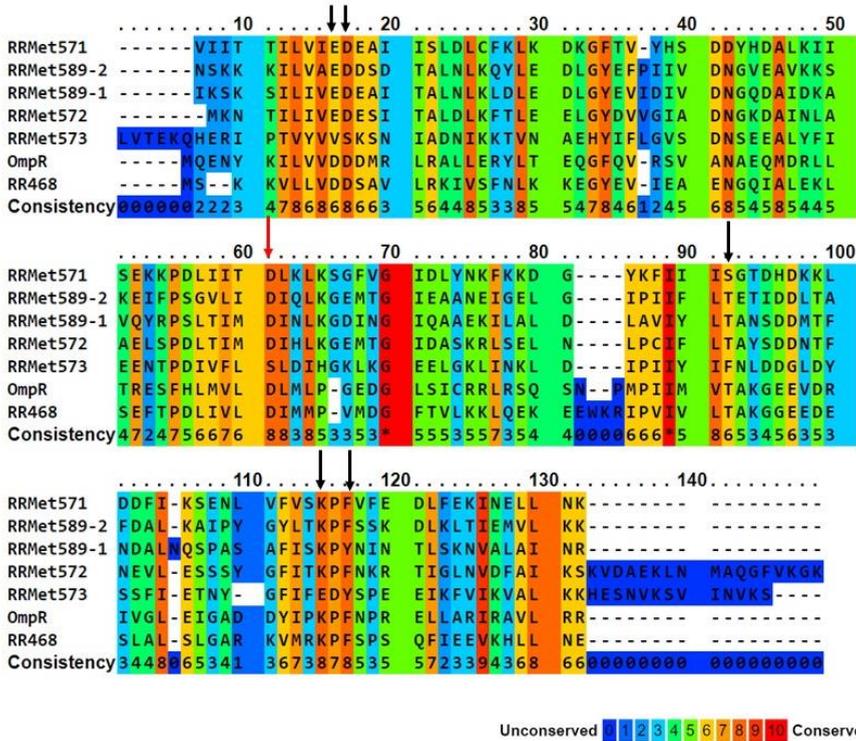


Figura 4.46. Alineamiento de secuencias de los RRs de *Methanobrevibacter sp.* Se comparan las secuencias con RR468 y OmpR_{Rec}, se señalan con flechas negras los residuos catalíticos excepto el Asp fosforilable que se señala con una flecha roja.

4.4.2. Autofosforilación de las HKs

De acuerdo con los alineamientos de secuencia, las HKs propuestas como únicas contenían los residuos catalíticos necesarios para realizar las actividades catalíticas típicas de los TCS. Así pues, en primer lugar, se comprobó la capacidad de autofosforilación para cada una de ellas, utilizando [γ - 32 P] ATP e incubando hasta 60 minutos (Figura 4.47).

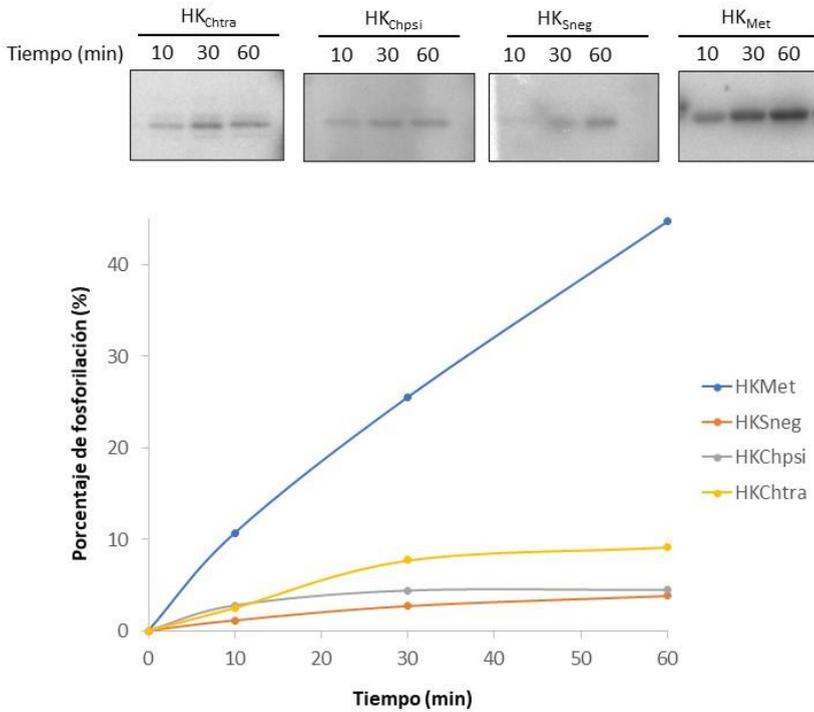


Figura 4.47. Autofosforilación HKs ancestrales. Utilizando de ATP-radioactivo e incubación a diferentes tiempos (10, 30 y 60 min). Se cuantifica para calcular el % de fosforilación de cada HK ancestral.

Como se observa en la Figura 4.47, todas las HKs únicas presentaban autofosforilación, aunque con diferente capacidad. Mientras que HK_{Chpsi}, HK_{Sneg} y HK_{Chtra} presentan una baja autofosforilación, entre 5-10% a los 60 min de incubación, HK_{Met} presentaba un aumento de casi 4 veces para la misma concentración. Una vez analizada la autofosforilación, se procedió a evaluar la actividad de fosfotransferencia.

4.4.3. Fosfotransferencia a los RRs

El análisis de fosfotransferencia de una HK al RR es clave para analizar la especificidad en la interacción. Ensayos de “phosphotransfer profiling” realizados por el grupo del Dr Michael Laub mostraban que la fosfotransferencia entre la HK y el RR que forma un TCS es muy rápida, llevándose a cabo en tiempo inferiores de 1-2 min. Sin embargo, si para observar esta reacción in vitro se requiere de un largo tiempo, superior a 30 o 60 min, estaríamos ante una transferencia inespecífica y esas dos proteínas nunca formarían un TCS in vivo (Salazar & Laub, 2015). La fosfotransferencia de las HKs HK_{Chpsi} y HK_{Chtra} se analizó con un RR, RR_{Chpsi} y RR_{Chtra} , respectivamente. Mientras, la fosfotransferencia de las HK_{Sneg} y HK_{Met} se analizaron con varios RRs, en concreto, tres para HK_{Sneg} (RR_{S1220} , RR_{S17390} , RR_{S17400}) y cuatro para HK_{Met} (RR_{MET571} , RR_{MET572} , $RR_{MET589-1}$ y $RR_{MET589-2}$). Como se puede observar en la Figura 4.48, las HKs HK_{Chpsi} , HK_{Sneg} y HK_{Chtra} no fosfotransfieren a los RRs provenientes del mismo organismo, a pesar de mantener 30 min de incubación. Esta ausencia de fosfotransferencia podría estar relacionada con la baja solubilidad que presentaban los RRs y que podría impedir el plegamiento adecuado del RR para su reconocimiento.

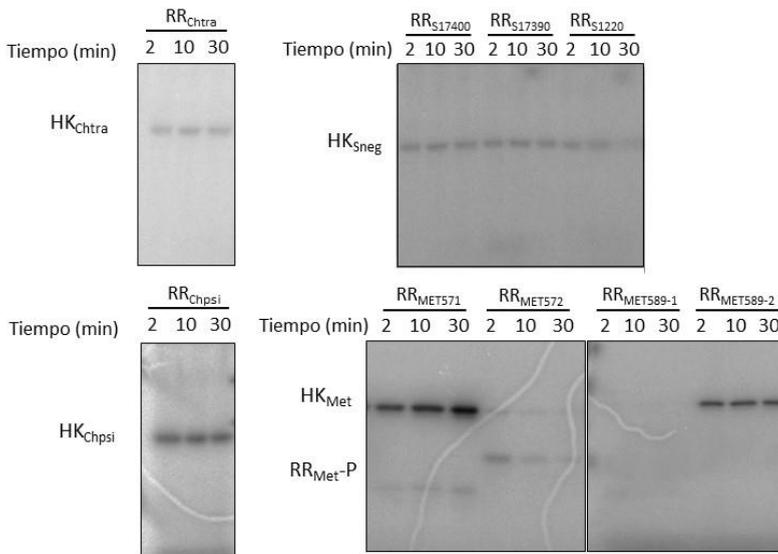


Figura 4.48. Reacción fosfotransferencia HKs ancestrales. Utilizando ATP-radioactivo se fosforiló la HK y posteriormente se añadió el RR correspondiente.

Mientras, la HK_{MET} presentó una fosfotransferencia desigual para los cuatro RRs presentes en el genoma de *Methanobrevibacter* sp observándose nula fosfotransferencia para RR_{MET589-2}, baja fosfotransferencia para RR_{MET571}, y muy alta fosfotransferencia para RR_{MET572} y RR_{MET589-1}. Además, se observó actividad fosfatasa para RR_{MET589-1} ya que la banda correspondiente a dicho RR fosforilado estaba ausente. Estos resultados demostraban que HK_{MET} mostraba una jerarquía o preferencia para fosfotransferir, es decir, diferente especificidad para cada RR y confirmaba un reconocimiento diferencial para la reacción de fosfotransferencia y fosfatasa. Esta jerarquía o cross-talk podría explotarse para regular la extensión de las distintas respuestas adaptativas con el tiempo.

La variabilidad de fosfotransferencia o cross-talk observado en HK_{Met} frente a RRs de un mismo organismo podía sugerir que las HKs de estudio podrían reconocer a otros RRs provenientes de distintos organismos mostrando un cross-talk más generalizado. Así pues, se realizaron estudios de fosfotransferencia con las HKs de estudio y RRs provenientes de diferentes organismos (Figura 4.49). En concreto, para el estudio de fosfotransferencia se incluyó OmpR de *E. coli*, RR468 de *T. marítima*, RcsB de *S. typhimurium* y SrrA de *S. elongatus*. OmpR y SrrA pertenecen a la familia OmpR/PhoB mientras que RcsB pertenece a la familia NarL/FixJ y RR468 es una RR que carece de dominio efector. En el caso de OmpR y SrrA los estudios de fosfotransferencia se realizaron con el dominio REC, en ausencia del dominio efector. Mientras, RcsB contenía el dominio efector correspondiente al dominio de unión a DNA. Como se muestra en la Figura 4.49, solamente las HK_{Sneg} y HK_{Chtra} mostraron fosfotransferencia detectable a RR468 a partir de los 10 min de incubación y una muy baja fosfotransferencia al dominio REC de OmpR. Esto demostraba cierto cross-talk entre las HKs únicas y RRs de otros organismos, aunque en baja medida.

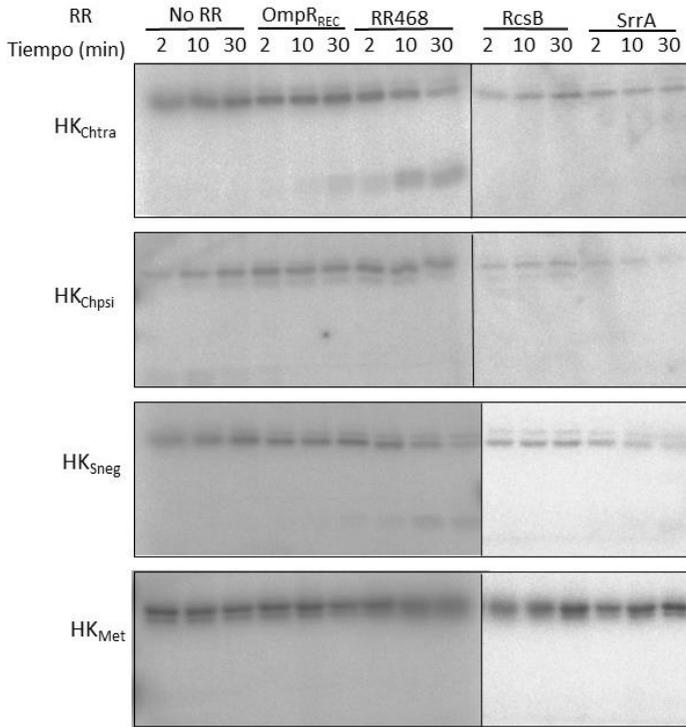


Figura 4.49. Fosfotransferencia de las HKs ancestrales a RRs de otros sistemas. Utilizando ATP-radioactivo se analizó la reacción de fosfotransferencia hacia RRs de otros organismos.

Para analizar las claves que permitían el cross-talk entre HK_{Sneg} y HK_{Chtra} y RR468, se analizó si estas HKs compartían similitud con HK853. Especialmente se analizó la región de la hélice $\alpha 1$ que principalmente interaccionaba con RR468 de acuerdo con la estructura del complejo HK853-RR468. Al comparar la región de la hélice $\alpha 1$ entre HK853, HK_{Sneg} y HK_{Chtra} demostró una alta homología de secuencia (60%), en concreto 72% con HK_{Sneg} y 47% con HK_{Chtra}. Esto podía explicar por qué HK_{Sneg} y HK_{Chtra} habían sido capaces de reconocer a RR468 e interaccionar para realizar la fosfotransferencia (Figura 4.50).

```

      .....10.....
HK853  SHELRTPLTA IKAYAETI
Simkania  SHELRTPTI IKGFAETL
C_trachomatis- HEIRNPLTS ISGFATLL
Consistency 3**8*6*8*4 *667*558

```

Figura 4.50. Alineamiento de secuencia entre HK853, HK_{Sneg} y HK_{Chtra} entre los residuos de $\alpha 1$ implicados en la interacción con RR468.

Sin embargo, seguía siendo extraño porque estas dos HKs no lograran fosfotransferir a sus propios RRs pero si lo hicieran a RRs que no pertenecían a sus propios organismos. Por otra parte, era posible que RR468 y OmpR también, compartieran similitud con los RR_{Chtra} y los RR_{Sneg} permitiendo el reconocimiento. Pero era probable que RR_{Chtra} y los RR_{Sneg} no fueran funcionales, ya que se producían como cuerpos de inclusión por razones de baja solubilidad o mal plegamiento, no invalidando que puedan interactuar con la única HK de su mismo organismo. La comparación global de RR_{Chtra} y los RR_{Sneg} con RR468 y OmpR (Tabla 4.12), demostró que RR_{Chtra} presentaba una baja homología de secuencia (24-28%) con los RRs de estudio. Mientras, RR_{Sneg} presentaba mayor homología de secuencia (34 y 40%) para RR468 y OmpR, respectivamente. Sin embargo, estos datos no correlacionaban mayor identidad de secuencia con la fosfotransferencia observada ya que se observó mayor fosfotransferencia a RR468 principalmente, y a OmpR en menor proporción, por parte de HK_{Chtra}.

Tabla 4.12. Identidad de secuencia entre los RRs de HK_{Chtra}, HK_{Sneg} y los RRs utilizados. Porcentaje de identidad de secuencia entre los dominios REC de los RRs. En negritas se resaltan los valores superiores a 24%.

	RR _{Sneg1220}	RR _{Sneg17390}	RR _{Sneg17400}	RR468	OmpR
RR _{Chtrat}	23.33	20.51	20.51	24.37	28.33
RR _{Sneg1220}	-	15.83	18.18	33.61	40.16
RR _{Sneg17390}	-	-	36.36	26.27	22.03
RR _{Sneg17400}	-	-	-	22.03	20.17

También se compararon los residuos de RR_{Chtra}, RR_{Sneg}, OmpR y RR468 correspondientes a la hélice $\alpha 1$ de los RR que previamente han sido descritos como los residuos involucrados en el reconocimiento HK-RR (Skerker et al., 2008; Capra et al., 2010; Podgornaia et al., 2013). De acuerdo con esta comparación (Figura 4.51), se observa conservación en la naturaleza de algunos residuos implicados en la interacción HK-RR como el residuo en posición 14 de RR468 (Leu), que corresponde a Leu en OmpR e Ile en RR_{Chtra} y RR_{Sneg1220}. También el residuo Ile en posición 17 de RR468, que corresponde a Leu en OmpR y Leu en RR_{Chtra} y RR_{Sneg1220}. Esta similitud podría explicar la fosfotransferencia observada.

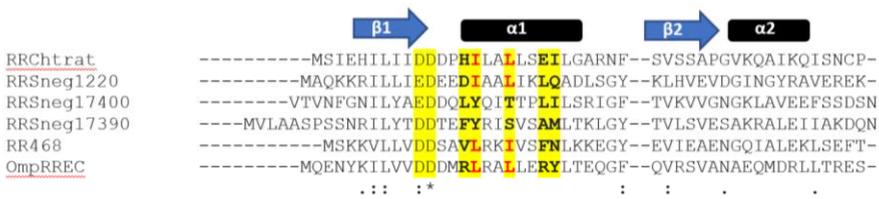


Figura 4.51. Alineamiento de secuencias entre los RRs de HK_{Chtra}, HK_{Sneg} y los RRs RR468 y OmpR utilizados de otros sistemas. En el alineamiento se señalan las estructuras secundarias correspondientes y se analizan los residuos de reconocimiento HK-RR de la cadena $\alpha 1$, resaltados en amarillo. En rojo se resaltan los residuos que son iguales.

4.4.4. Reconocimiento de HK_{Met} por RRs de Methanobrevibacter sp. Amb4

A pesar del ligero crosstalk detectado para HK_{Sneg} y HK_{Chtra}, ha sido la HK_{Met} quien ha mostrado un comportamiento esperable para un sistema único, ya que presentó promiscuidad dentro de sus múltiples RRs, aunque no presentó fosfotransferencia a RRs de otros organismos. Para explicar el diferente reconocimiento de HK_{Met} entre los RRs de *Methanobrevibacter* sp. Amb4, en primer lugar, se compararon las secuencias de estos RRs (Figura 4.51). Dicho análisis demostró que los RRs que mostraban alta fosfotransferencia, RR_{Met572} y RR_{Met589-1}, presentaban mayor homología de secuencia (53.3%) en comparación con el resto de RRs (Tabla 4.13). Sin

embargo, el RR_{Met589-2} que no mostró fosfotransferencia también presentaba alta identidad de secuencia con estos RRs (~42-44%).

Tabla 4.13. Porcentaje de homología de secuencia entre RRs de *Methanobrevibacter*. RRs utilizados en los estudios de fosfotransferencia. En negritas se resaltan los valores superiores a 40%.

	RR _{Met571}	RR _{Met572}	RR _{Met589-1}	RR _{Met589-2}
RR _{Met571}	-	29.41	28.33	29.17
RR _{Met572}	-	-	53.33	44.17
RR _{Met589-1}	-	-	-	42.15
RR _{Met589-2}	-	-	-	-

Con el fin de relacionar la variabilidad observada en la fosfotransferencia con los residuos implicados en reconocimiento, se compararon las secuencias de los dominios REC en los RRs de estudio, poniendo atención en las regiones implicadas en la interacción con la HK, la hélice $\alpha 1$ y los $\text{L}\beta 3\alpha 3$, $\text{L}\beta 4\alpha 4$ y $\text{L}\beta 5\alpha 5$ de los RRs. (Figura 4.52). (Podgornaia et al., 2013). Así pues, se observó mayor similitud entre los residuos de RR_{Met572} y RR_{Met589-1} que mostraban alta fosfotransferencia y que comprendían dichas regiones, lo que apoyaba la relación entre una mayor especificidad y mayor fosfotransferencia.

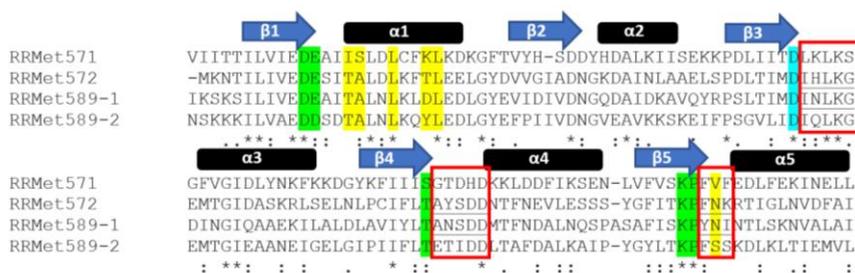


Figura 4.52. Alineamiento de secuencia de los RRs correspondientes para HK_{Met}. Alineamiento donde se señala en azul el Asp fosforilable, en verde los residuos altamente conservados y en amarillo los residuos variables que participan en el reconocimiento HK-RR. Además, con recuadros rojos se señalan las regiones correspondientes a los $\text{L}\beta 3\alpha 3$, $\text{L}\beta 4\alpha 4$ y $\text{L}\beta 5\alpha 5$, donde se han resaltado los residuos de RR_{Met572} y RR_{Met589-1} para presentan similitud.

Para comprender la especificidad en el reconocimiento entre HK_{Met} y los RRs $\text{RR}_{\text{Met572}}$ y $\text{RR}_{\text{Met589-1}}$ pues presentaban actividad de fosfotransferencia e incluso fosfatasa analizó la interacción HK-RR. Para ello, se visualizó la formación de complejo HK-RR mediante gel nativo y se analizó la afinidad para el complejo mediante la constante de disociación (K_D) obtenida por interferometría de biocapa (BLI). Como era esperable, la incubación de HK_{Met} en presencia de $\text{RR}_{\text{Met572}}$ y $\text{RR}_{\text{Met589-1}}$ confirmó la formación de complejo, observable a los 10 min de incubación (Figura 4.53).

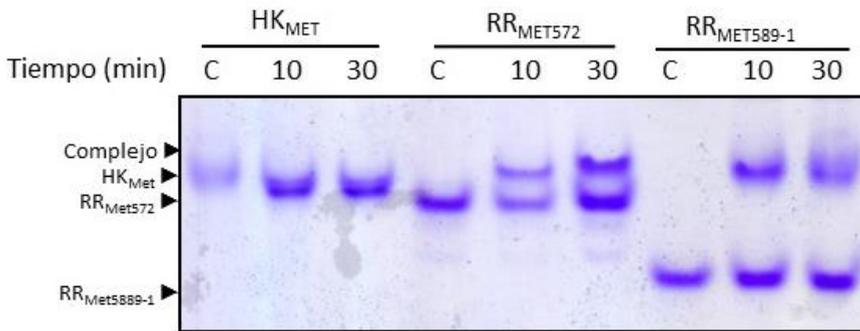


Figura 4.53. Gel nativo entre HK_{Met} y sus RRs. En el gel se muestra HK_{Met} en ausencia y presencia de $\text{RR}_{\text{Met572}}$ y $\text{RR}_{\text{Met589-1}}$ a tiempo 0, así como a los 10 y 30 minutos de incubación. Como control, cada RR se muestra en solitario.

El cálculo de afinidad entre HK_{Met} y los RRs $\text{RR}_{\text{Met571}}$ y $\text{RR}_{\text{Met589-2}}$ demostró una baja K_D para ambos complejos (Tabla 4.14). En el caso de $\text{RR}_{\text{Met572}}$ la interacción presentó una $K_D = 2,8\mu\text{M}$ y para $\text{RR}_{\text{Met589-1}}$ la K_D fue de $27,46\mu\text{M}$, es decir, casi diez veces mayor para el segundo. Este resultado mostraba que HK_{Met} presentaba mayor afinidad por $\text{RR}_{\text{Met572}}$. Esta diferencia podría explicarse observando los valores correspondientes a la constante de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) para cada uno de los RRs. $\text{RR}_{\text{Met589-1}}$ presenta una k_{on} cuatro veces menor que $\text{RR}_{\text{Met572}}$ pero también una k_{off} cuatro veces mayor. Esto quería decir que $\text{RR}_{\text{Met589-1}}$ se asocia menos rápido a HK_{Met} pero presenta mayor disociación del complejo. Este hecho puede permitir que HK_{Met} discrimine entre RRs, de forma que, aunque muestra alta fosfotransferencia a ambos, se pueda observar mayor actividad fosfatasa sobre $\text{RR}_{\text{Met589-1}}$.

Tabla 4.14. Constantes de afinidad entre HKMet y sus 4 RRs. Valores correspondientes a la constante de afinidad entre HK_{Met} y sus RRs, además de la k_{on} y k_{off} . Los valores son validados por el R^2 .

Proteína	K_D (μM)	k_{on}	k_{off}	R^2
RR _{MET571}	No detección			
RR _{MET572}	2,383	$4,78 \times 10^4$	$1,14 \times 10^{-1}$	0,99
RR _{MET589-1}	27,46	$1,78 \times 10^4$	$4,89 \times 10^{-1}$	0,99
RR _{MET589-2}	No detección			

4.4.2.1 Estructura de RR_{MET572} y RR_{MET589-1}

Para comprender cómo HK_{Met} discrimina entre sus RRs se realizó una aproximación estructural con RR_{Met572} y RR_{Met589-1}. Se intentó cristalizar la HK y cada RR por separado, así como formando complejo. En el caso de HK_{Met} se obtuvieron cristales de la proteína sola, pero difractaron a $\sim 4\text{\AA}$ y presentaban twinning, por lo que no se logró obtener la estructura. En el caso de los complejos no se obtuvieron cristales en ninguna condición. Para los RRs se obtuvieron datos a alta resolución tanto en ausencia como en presencia del fosfomimético BeF_3^- . Sin embargo, todas las estructuras obtenidas mostraron ausencia de fosfomimético en el centro activo (Tabla 4.15).

Tabla 4.15. Tabla cristalográfica. Datos cristalográficos y de refinamiento para las estructuras RR_{MET572} y RR_{MET589-1}.

	HK _{MET572}	HK _{MET589-1}
Recogida de datos		
Grupo espacial	I23	C2221
a, b, c (Å)	118,6 118,6 118,6	50,0 66,4 63,5
α, β, γ, (°)	90,0 90,0 90,0	90,0 90,0 90,0
Resolución (Å)	83,91-1,5 (1,53-1,50)	29,46-1,5 (1,53-1,5)
No. Reflexiones totales	42345	15644
R_{merge}	0,056 (0,798)	0,039 (0,392)
I / σ	20,6 (3,1)	25,7 (5,0)
Completitud (%)	100 (100)	99,4 (98,3)
Redundancia	10,9 (11,4)	7,2 (7,4)
Refinado		
Rwork / Rfree	0,1339 / 0,1901	0,1200 / 0,1771
No. átomos	2311	1028
Proteína	1999	921
Ligando/ión	10	-
Agua	302	107
Promedio factores B (Å²)	25,9	22,00
Desviaciones RMSD		
Distancia de enlace (Å)	0,029	0,027
Ángulos de enlace (°)	2,22	2,24

La estructura de RR_{Met589-1}, mostró una sola molécula en la unidad asimétrica que no mostraba la configuración canónica de los dominios REC debido a la ausencia de β5 (Figura 4.54a). El análisis del centro activo y su comparación con RR468 no fosforilado (PDB: 3DGF) y fosforilado (PDB: 3GL9), demuestra que presenta un estado no fosforilado. El Asp55 fosforilable no une fosfomimético y las cadenas laterales de la Lys105 catalítica y la Tyr107 en el Lβ5α5 no están orientadas hacia el centro activo a pesar de que la Thr82 catalítica en el Lβ4α4 si lo está (Figura 4.54b).

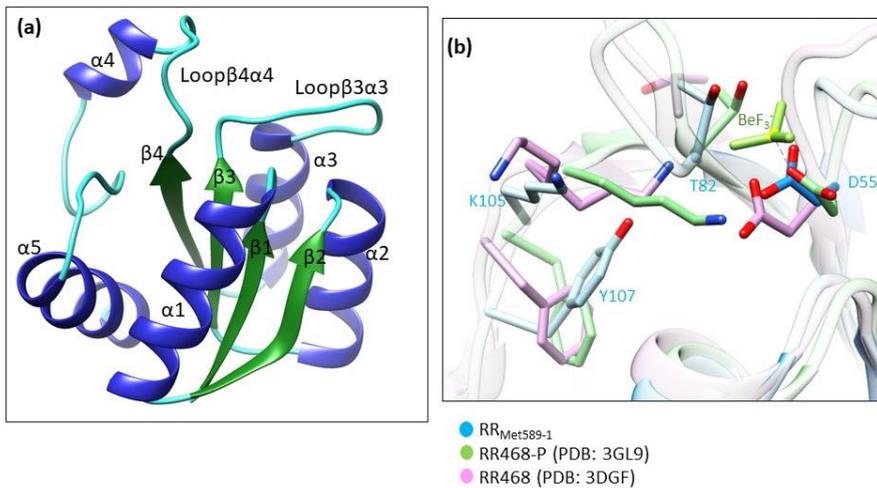


Figura 4.54. Estructura RR_{Met589-1}. (a) Se observan en diferentes colores cada una de las estructuras secundarias. (b) Acercamiento al centro activo y superposición con RR468 (PDB: 3DGF) y RR468-P (PDB: 3GL9), las cadenas laterales de los residuos catalíticos, D55, T82, K105.

Por otra parte, la estructura de RR_{Met572} muestra en la unidad asimétrica un dímero donde la hélice $\alpha 4$ de cada molécula está intercambiada formando un dímero cruzado o “swapped”. Además, las zonas de interacción entre las dos moléculas comprenden $\alpha 4$ y $\beta 5$ (Figura 4.55a). Este tipo de dimerización es atípica en los RRs, pero una dimerización a través de $\alpha 4$ se ha observado en otros RRs como MaeR (Miguel-Romero et al., 2017), Spo0A (Lewis et al., 2000), RegX3 (King-Scott et al., 2007) y CheY (Paithankar et al., 2019). Sin embargo, el movimiento que tiene el L $\beta 4\alpha 4$ es específico de RR_{Met572}. Esta diferencia parece deberse a la longitud del L $\beta 4\alpha 4$, que es mayor en los RRs descritos anteriormente (RR_{Met572} 5 residuos y MaeR 3 residuos) permitiendo mayor movimiento (Figura 4.55b). Finalmente, al analizar el centro activo (Figura 4.55c), se observa que el Asp56 fosforilable no une fosfomimético. Además, las cadenas laterales de la Thr83 y Lys105 catalíticas no se encuentran orientadas hacia al centro activo emulando el estado fosforilado, aunque la cadena lateral de la Phe107, que ocupa la posición de la Tyr en el mecanismo Y-T, si está orientada hacia el centro activo. Debe tenerse en cuenta que tanto la Lys catalítica como la Phe provienen de la subunidad contraria del dímero.

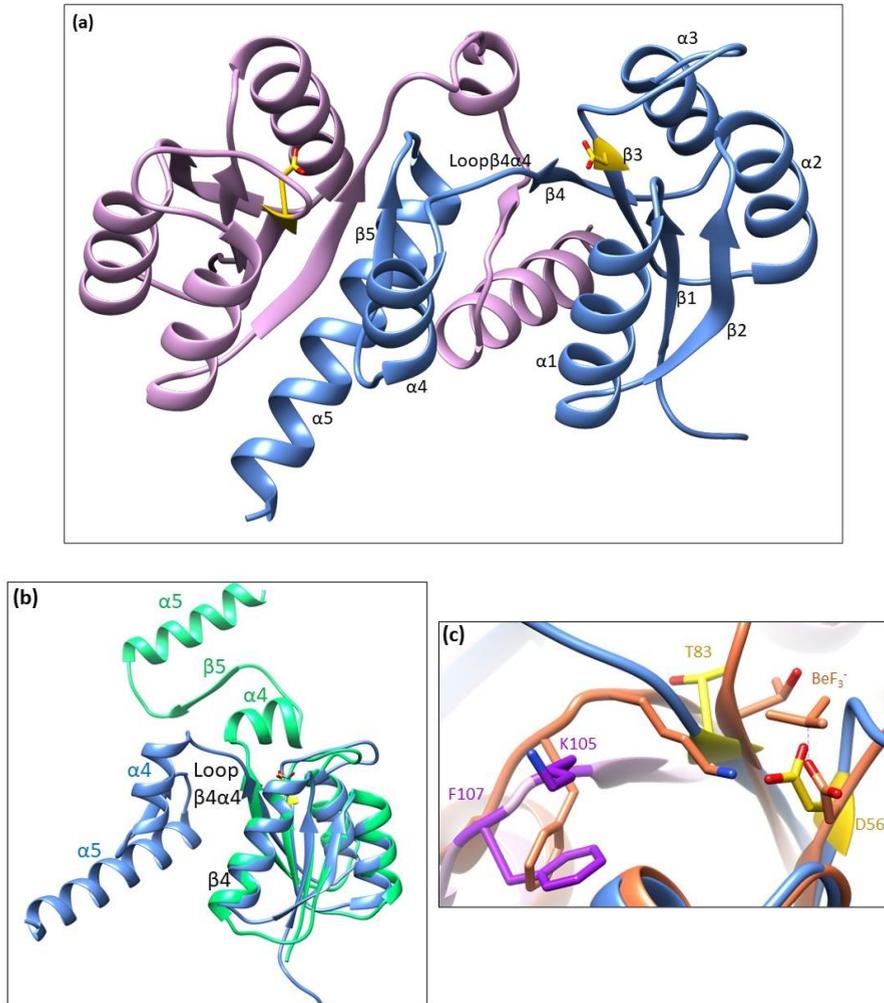


Figura 4.55. Estructura de RR_{MET572}. (a) En la estructura se aprecia el dímero cruzado (subunidades en morado y rosa) resaltando la cadena lateral del Asp56 fosforilable. (b) Comparación del “swapping” con MaeR (PDB: 5LWK), en color verde, marcando las estructuras secundarias que difieren en posición. (c) Acercamiento al centro activo donde se observan las cadenas laterales de los residuos catalíticos D56 y T83 de color amarillo. Además, K105 y F107 de la segunda subunidad están en morado. Se superpone RR468 fosforilado (PDB: 3GL9) en color naranja y se enseñan los residuos catalíticos correspondientes.

Una vez obtenidas las estructuras de ambos RRs, se superpusieron para identificar diferencias que pudieran explicar una posible discriminación en la interacción con HK_{Met} . Ambas estructuras muestran alta homología estructural hasta el final de $\beta 4$ lo que incluye la posición del Asp fosforilable (Figura 4.56). Sin embargo, a partir del $L\beta 4\alpha 4$ ambas estructuras muestran diferencias. Esto sugiere por una parte que la superficie de interacción entre la HK y el RR, en la que participan los loops $L\beta 4\alpha 4$ y $L\beta 5\alpha 5$, puede contener cierta variabilidad que explique un diferente reconocimiento en las reacciones de fosfotransferencia y fosfatasa. Por otra parte, la variación conformacional en el C-terminal de estos dos RRs puede exponer una superficie de interacción diferente para interactuar y activar dianas diferentes produciendo funciones efectoras diferentes y diversas. Sin duda, esta variabilidad efectora ofrece una ventaja adaptativa y explica porque *Methanobrevibacter*, una arquea anaerobia estricta fabricante de metano con un metabolismo muy acelerado, aun conteniendo una sola HK que debe activarse por una misma señal, puede producir diferentes respuestas adaptativas (Samuel et al., 2007).

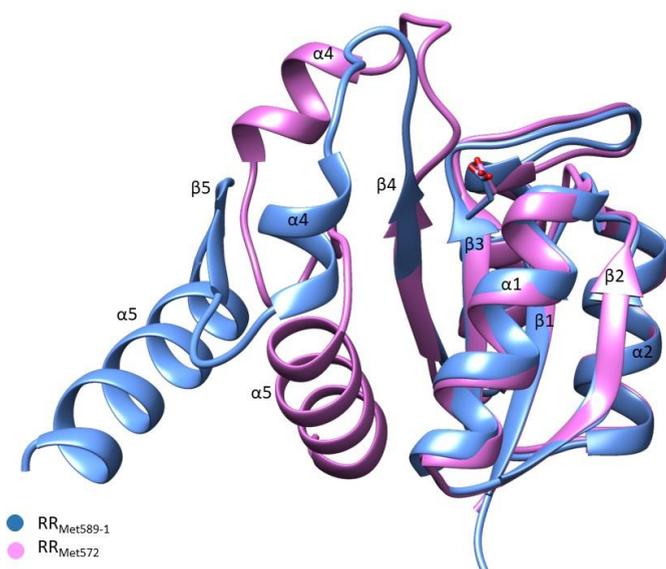


Figura 4.56. Superposición de RR_{Met589-1} y RR_{Met572}. En esta superposición se señalan las estructuras secundarias y el Asp catalítico.

5. Discusión General



Los TCSs juegan un papel central en modular la respuesta de las bacterias al detectar una señal extracelular. Gracias a su alta eficiencia, garantizan una respuesta rápida y adecuada para generar una adaptación a los cambios ambientales. Los resultados obtenidos durante este trabajo de Tesis nos ayudan a comprender mejor el mecanismo a través del cual se transduce la señal entre los componentes del sistema y analizar el reconocimiento entre HK y RR, así como la especificidad que existe en esta interacción.

5.1. Estudio funcional y estructural de la reacción de fosfotransferencia

La reacción de fosfotransferencia desde la HK al RR es clave para activar la respuesta celular. Estudios previos han sugerido que la autofosforilación de la HK en el residuo de His fosforilable conlleva unos cambios conformacionales que permiten el acercamiento del RR, permitiendo la interacción de residuos específicos con la HK para se produzca el reconocimiento HK-RR y se lleve a cabo la reacción de fosfotransferencia o fosfatasa (Trajten et al., 2016). En este trabajo, el complejo HK853 con el mutante del $L\beta\alpha 3$ RR468^{M55A} tiene afectada la reacción fosfatasa, pero no así la fosfotransferencia y algo similar ocurre con el mutante del $L\beta\alpha 4$ RR468^{E88A/E89A} aunque en menor medida. De esta forma, el reconocimiento HK-RR involucra también zonas periféricas cuya conformación cambia en función del estado de fosforilación de ambos componentes como se había mostrado anteriormente (Casino et al., 2009). Esto nos demuestra que la interacción HK-RR depende de la posición de los elementos de reconocimiento, tanto en la HK (hélice $\alpha 1$) como en el RR ($L\beta 3\alpha 3$ y $L\beta 4\alpha 4$), para favorecer la reacción de fosfotransferencia o fosfatasa.

Además, hemos podido ver el alcance de dicho reconocimiento y atrapar una conformación que se adscribe a la reacción de fosfotransferencia en la estructura del complejo mutante HK853-RR468^{M55A} donde se encuentra al fosfomimético BeF_3^- en el centro activo. Esta estructura se consiguió gracias a la mutación en el residuo M55 de RR468, la cual favorece la reacción de fosfotransferencia al permitir que la His catalítica se acerque al Asp fosforilable. Al comparar dicha conformación con la observada en el PDB: 3DGE que corresponde a la reacción fosfatasa (Casino et al., 2009), se

observan cambios en la HK, que son necesarios para reconocer al RR. En el dominio DHp, la hélice $\alpha 1$ se desplaza acercándose al RR y provocando el desplazamiento de la hélice $\alpha 2$.

El desplazamiento de la hélice $\alpha 1$ permite que la distancia entre el N ϵ de la H260, dador del grupo fosforilo, y el O del D53, aceptor de este grupo, sea de 5.3 Å. Esta estructura apoya, que la reacción de fosfotransferencia se lleva a cabo mediante un mecanismo disociativo, donde la distancia de coordinación entre el átomo saliente y el átomo entrante que unen el fosfato distan ≥ 4.9 Å, de forma que haya espacio suficiente para que se forme un metafosfato intermediario (Mildvan, 1997). En el complejo DesK-DesR, se encontró incluso una mayor distancia 7.6 Å (Trajtenberg et al., 2016), presentando la fosfotransferencia un mecanismo disociativo para la familia de HisKA_3. El mecanismo disociativo de fosfotransferencia ha sido descrito previamente en las estructuras de varias quinasas (Lahiri et al., 2002; Lim et al., 2010; Yousef et al., 2002; Bauer et al., 2013), en los TCSs (Li et al., 2013; Gao et al., 2019) e incluso en la autofosforilación de las HKs (Casino et al., 2014; Mechaly et al., 2014). En nuestra estructura tendríamos la conformación perteneciente al estadio final donde el grupo fosfato se encuentra estabilizado por D53, T83, K105, A84 y dos moléculas de agua, además del ion Mg²⁺. Para el estadio transitorio de la reacción, el metafosfato se movilizaría hacia el Asp gracias a las cargas positivas del ión magnesio en el centro activo del RR y a la Lys conservada (K105 en RR468), presentando una conformación pre-activada del RR (Trajtenberg et al., 2016; Gao et al., 2019; Buschiazzo & Trajtenberg, 2019).

Por otro lado, el desplazamiento del dominio DHp en el complejo HK853-RR468^{M55A} también ha tenido impacto sobre el dominio CA, para el cual no fue posible realizar su trazado, indicando que este dominio adquiere diferentes disposiciones en el cristal. Al analizar la comparación utilizada previamente (fosfotransferencia – fosfatasa) se lograron demostrar choques entre el DHp y el CA promoviendo su desplazamiento. Al comparar las dos reacciones en el complejo DesK-DesR se observa como el dominio CA presenta un cambio importante en su posición para la reacción de fosfotransferencia (Trajtenberg et al., 2016). Esta observación apoya la propuesta de que las reacciones de fosfotransferencia y fosfatasa no son reversas y que las conformaciones que adopta la HK para catalizar ambas reacciones es diferente. Además, estas estructuras indican que el papel jugado por el dominio CA en cada una de las reacciones es muy diferente.

Estudios previos con el TCS EnvZ-OmpR, han evaluado el papel del dominio CA en la reacción de fosfotransferencia y fosfatasa, mostrando que su contribución es mucho mayor para la segunda reacción. El dominio DHP en solitario en EnvZ es capaz de fosfotransferir de manera eficiente a OmpR (Park et al., 1998) pero la actividad fosfatasa se ve fuertemente afectada en ausencia del CA. Estos datos bioquímicos apoyan las observaciones estructurales que muestran la interacción del dominio CA durante la actividad fosfatasa, probablemente estabilizando la conformación del complejo HK-RR como se observa claramente en el PDB: 3DGE (Casino et al., 2009). Mientras que, por el contrario, las estructuras presentadas en la presente Tesis no muestran ninguna interacción con el dominio CA, que podría adquirir diferentes disposiciones durante la reacción de fosfotransferencia.

En la estructura del estado inactivo, no fosforilado de RR468 (PDB: 3DGF) (Casino et al., 2009), el residuo M56 está expuesto al solvente. Mientras, en el estado activo, fosforilado (PDB: 3GL9) (Casino et al., 2009), el $L\beta\alpha 3$ sufre un cambio conformacional que desplaza este residuo casi 180° para alojarse en un bolsillo hidrofóbico que reduce la flexibilidad del loop. Por otro lado, se ha descrito que la posición del residuo M55 (D+2), junto con los residuos T+1 y T+2, están relacionados con las variaciones en la capacidad de autofosforilación y autodesfosforilación. Además, mutaciones en estas posiciones pueden afectar la energía del estado de transición, facilitar el correcto posicionamiento de las estructuras, atacar moléculas de agua o incluso bloquear el contacto con el fosfodador (Immormino et al., 2016; Page et al., 2016; Thomas et al., 2013; Zapf et al., 1998). En nuestros estudios la mutación de M56A ha impedido la estabilización del $L\beta\alpha 3$ y ha tenido un efecto profundo impidiendo que se mantenga el estado fosforilado del RR. Por otra parte, la mutación M55A favorece la reacción fosfotransferencia al mismo tiempo que disminuye la fosfatasa, por lo que se puede decir que este residuo afecta a la energía del estado de transición modulando la tasa de las reacciones fosfotransferencia-fosfatasa como se ha sugerido en otros estudios (Immormino et al., 2016; Trajtenberg et al., 2016; Gao et al., 2019).

5.2. Estudio funcional y estructural de la influencia del pH en las reacciones enzimáticas

La His es un residuo muy utilizado en el centro activo de proteínas relacionadas con procesos catalíticos (Hedstrom, 2002; Yang et al., 2008), unión a metales (Cerdeira-Costa & Gomis-Ruth, 2014), sensores de pH (Wu et al., 2019), conducción de protones (Hu et al., 2010), o aceptores de fosforilación (Casino et al., 2009; Casino et al., 2010; Buschiazzo & Trajtenberg, 2019). Esto se debe al grupo imidazol de su cadena lateral, que presenta un pK_a cercano al pH fisiológico. El grupo imidazol en la His puede alternar entre dos tautómeros, uno aniónico neutro y otro totalmente protonado, en función del pH. Además, la cadena lateral puede adquirir diferentes disposiciones espaciales presentando rotámeros *gauche*- y *trans* que ayudan a modular la actividad de la His (Li & Hong et al., 2011).

Durante el desarrollo de esta Tesis se publicó un modelo en el que se indicaba que el rotámero adquirido por la His catalítica controlaba la actividad fosfatasa en las HKs de la familia HisKA. Este modelo llamado “pH-gated” sugería que el rotámero adquirido por la His, dependía del pH en el que se encontraba utilizando un rango de pH 5.2 – 6.5 donde cambiaba de estado (activo/inactivo) para la actividad fosfatasa (Liu et al., 2017). Para analizar este modelo se obtuvieron varias estructuras del complejo HK853-RR468 cristalizadas en un rango de pH de 5.3 a 7.5. Todas ellas presentan un rotámero *gauche*- en la His catalítica, lo que contradice al modelo “pH-gated” (Liu et al., 2017). Sin embargo, nuestro trabajo ha demostrado que la adquisición del rotámero no depende del pH, sino del estado catalítico de la HK. En el estado inactivo, cuando la HK no está fosforilada o está en reposo fosforilada esperando al RR para la fosfotransferencia, se adquiere el rotámero *gauche*-, mientras que en el estado activo donde se producen las reacciones de autofosforilación, fosfotransferencia o fosfatasa se adquiere el rotámero *trans*.

La presencia de la His como residuo catalítico en las HKs hace que las actividades catalíticas de autofosforilación y fosfatasa estén condicionadas por la química de su cadena lateral (Buschiazzo & Trajtenberg, 2019), y por tanto del pH donde se realicen las reacciones. Así pues, la actividad fosfatasa se ve reducida en las HKs cuando el pH es inferior a 6.0 debido al estado de protonación del grupo imidazol (cargado positivamente). En esta reacción, la

His actúa polarizando la molécula de agua que ataca al fosforilo, y por lo tanto la pérdida de carga del grupo imidazol disminuye su actividad, llegando a eliminarla por debajo de pH 5.0 como nuestros datos bioquímicos muestran. El mismo caso se observa en la reacción de autofosforilación donde la His no debe estar protonada para actuar, en este caso directamente, como nucleófilo en el ataque al fosfato y del ATP. En el caso de la fosfotransferencia, la hidrólisis del enlace P-N del fosfo-imidazol está promovida por el grupo ácido del Asp fosforilable cuyo pK_a es mucho menor de 5, por lo cual dicha actividad parece no verse afectada en el rango de pH 5.3 a 7.5. Más aun, la protonación del grupo imidazol de la His a pH inferiores a 6 hacen que sea un mejor grupo saliente, favoreciendo la transferencia. Nuestros datos confirman que la reacción de autofosforilación y fosfatasa decrecen de manera similar al modificar el pH ya que ambas reacciones dependen del estado de protonación de la His. Mientras, la reacción de fosfotransferencia se ve mínimamente influenciada en este rango de pHs. Todas estas observaciones demuestran que se debe analizar la química básica de una reacción para poder comprenderla. En el caso de los TCSs es importante tener en cuenta el estado de protonación de los residuos catalíticos para poder determinar si están actuando como un nucleófilo o como una base.

Por otra parte, las estructuras del complejo HK85-RR468 obtenidas a diferentes pHs (descritas en este trabajo) y que atrapan la conformación fosfatasa, confirman información previa en la que el dominio CA parece jugar un papel relevante estabilizando la actividad fosfatasa. Este hecho fue descrito por primera vez para el TCS EnvZ-OmpR (Zhu et al., 2000). La presencia de ADP unido al dominio CA aumenta el efecto estabilizador, indicando que el nucleótido promueve una correcta conformación en el complejo HK-RR durante la reacción fosfatasa. En las estructuras del complejo a diferentes pH podemos ver como el nucleótido estabiliza el ATP-lid de HK853, una región que está involucrada en promover contactos con el $L\beta\alpha 3$ de RR468. La correcta interacción entre el ATP-lid de HK853 con el $L\beta\alpha 3$ de RR468, así como entre el loop DHp-CA de HK853 con el $L\beta\alpha 4$ de RR468 en función del estado de fosforilación, promueve la especificidad para llevar a cabo cada reacción (Casino et al., 2009). Eso también se confirma con nuestros datos discutidos en el apartado anterior donde el dominio CA no parece participar en la reacción de fosfotransferencia y los residuos del $L\beta\alpha 3$ están involucrados en el equilibrio de las reacciones fosfotransferencia-fosfatasa.

5.3. Caracterización de una mutación clínica en el TCS EnvZ-OmpR

La presencia de antibióticos genera una presión selectiva sobre los microorganismos, lo cual les ha obligado a desarrollar diferentes estrategias para sobrevivir. Algunos organismos comparten nicho ecológico con organismos productores de antimicrobianos y eso les ha permitido desarrollar una resistencia intrínseca. Las estrategias utilizadas para adaptarse a la presencia de antibióticos se basan en, la generación de mutaciones en genes relacionados con el mecanismo de acción del antibiótico o la adquisición de genes de resistencia por transferencia lateral de genes (Munita & Arias, 2016). La alteración de algunos TCSs se ha descrito previamente como una fuente de resistencia a los antibióticos. En ocasiones la respuesta del TCS activa de manera directa la resistencia, pero también se puede dar una activación indirecta (Tierney & Rather, 2019). En ciertas ocasiones una mutación puede generar funciones adicionales a la proteína, como es el caso de la HK AarG de *Providencia stuartii*, una bacteria patógena nosocomial, que sobreexpresa 2-N acetiltransferasa para acetilar los aminoglucósidos (Rather et al., 1998). Para la HK CpxA y la resistencia a la amikacina en *E. coli* se determina por la sobreexpresión de bombas de eflujo (Rainwater & Silverman, 1990). Por otro lado, las HKs VraS y GraS de *Staphylococcus aureus* promueven la susceptibilidad a los antibióticos glicopeptídicos de dos maneras totalmente diferentes, bien incrementando la síntesis de peptidoglicano por VraS, o la modificación en la carga de la membrana bacteriana por GraS (Kato et al., 2008; Howden et al., 2008).

Sin embargo, hay escasos datos de mutaciones en RRs que produzcan resistencia a antibióticos. La mutación G63V observada en OmpR obtenida de un aislado clínico que presentaba resistencia a Ertapenem parece ser uno de los pocos casos (Dupont et al., 2017). La inducción de resistencia a Meropenem, un antibiótico de la familia de los carbapenémicos muy similar al Ertapenem, en laboratorio utilizando una cepa de *E. coli* y continua exposición al antibiótico. El mutante generado presentaba un cambio de G63 a Ser en lugar de a Val como se observó en el mutante clínico (Kong et al., 2018). Estos resultados confirmaron que la mutación en el residuo G63 de OmpR es una estrategia utilizada por *E. coli* para resistir carbapenicos. Los estudios indican que el mecanismo de resistencia es indirecto, ya que la

mutación en OmpR disminuye la expresión de porinas lo que tiene como efecto la reducción generalizada de permeabilidad en la membrana y disminuye de forma no selectiva la entrada de moléculas en la célula, entre ellas el antibiótico. Como se ha descrito en los resultados de este trabajo, el residuo G63 se encuentra al final del L β 3 α 3, una región que presenta gran movilidad y que está involucrada en el cambio conformacional para la transición entre el estado inactivo, no fosforilado, al estado activo, fosforilado, del RR. Esta Gly se encuentra altamente conservada en los RRs, lo que demuestra la importancia de su función. De hecho, un estudio en RR468 ha demostrado que la G61 (que ocupa la misma posición que la G63 en OmpR) forma un puente de hidrógeno con la L65 cuya ruptura es determinante para la transición entre el estado inactivo y activo (Banerjee et al., 2014).

La Gly es un aminoácido que no presenta cadena lateral, por lo cual es capaz de adquirir gran cantidad de disposiciones aumentando la flexibilidad de la región donde se encuentra. Esta característica la hace diferente a los otros 19 aminoácidos comunes. En este trabajo se han determinado las ventajas estructurales que presenta la presencia de Val en la posición G63. Las mutaciones a Val y Ser introducen una cadena lateral que restringe el espectro conformacional que puede adquirir la Gly. Por ello, se bloquea la transición entre los estados activos e inactivo, favoreciendo una conformación defosforilada del RR o estado inactivo que estructuralmente se traduce en un acortamiento del L β 3 α 3. La mutación G63A, que se estudió en paralelo, produce un estado intermedio de inactivación indicando que la restricción conformacional explica parcialmente el efecto de las mutaciones en esta posición. Nuestros datos estructurales con el mutante G63V indican que la nueva cadena lateral del residuo Val se acomoda en un bolsillo hidrofóbico generado por L54, L53 y A37, estabilizando de este modo la conformación inactiva y restringiendo aún más la movilidad para la transición al estado activo. Por su parte, los efectos intermedios observados con la mutación a Ala se justifican por el tamaño más corto de la cadena lateral lo que genera menor efecto hidrofóbico y menor restricción en el bolsillo hidrofóbico que se genera. En cuanto a la mutación a Ser, seguramente se restringen los cambios conformacionales pero la conformación que adquiera este mutante debe ser diferente.

5.4. Estudio evolutivo de la especificidad en el reconocimiento entre HK y RR

La alta especificidad que muestra una HK y su correspondiente RR indica que existe una gran afinidad para que cada HK realice las reacciones de fosforilación y desfosforilación únicamente con su correspondiente RR (Skerker et al., 2008). Esta especificidad está dada por un conjunto reducido de residuos, que en la HK suele ubicarse en la hélice $\alpha 1$ siguiendo a la His fosfoaceptora, que parecen co-evolucionar para mantener dicha especificidad (Salazar & Laub, 2015). En algunos microorganismos podemos encontrar decenas e incluso centenas de TCSs por lo cual la presión evolutiva ha mantenido la especificidad entre las HKs y sus correspondientes RRs (Podgornaia et al., 2013). Por el contrario, en organismos endosimbiontes que presentan solo un TCS, la presión selectiva disminuye y la especificidad se puede relajar. En nuestro estudio, analizamos 4 sistemas de organismos endosimbiontes para determinar si encontramos esta relajación en la especificidad. Encontramos que la HK de *Chlamydia trachomatis* (HK_{Chtra}) y la HK de *Simkania negevensis* (HK_{Sneg}) fueron capaces de fosfotransferir a RR468, un RR que pertenece a otro organismo, *T. marítima*. Dicha interacción, puede justificarse por la alta similitud de secuencia (60%) que se observa en los residuos de la hélice $\alpha 1$ de HK853, que interaccionan con RR468, con la hélice $\alpha 1$ de HK_{Chtra} y HK_{Sneg}. Precisamente, la hélice $\alpha 1$ de las HKs se corresponde con la zona principal de interacción HK-RR y juega un papel crucial en el reconocimiento. Esto se ha demostrado en el TCS EnvZ-OmpR, donde mutaciones en residuos de la hélice $\alpha 1$ de EnvZ cambia la especificidad incluso aboliendo la interacción con su propio RR (Salazar & Laub, 2015). También, la hélice $\alpha 1$ en el RR juega un papel relevante en el reconocimiento HK-RR y los RRs de *Chlamydia trachomatis* y *Simkania negevensis* que muestran cierta conservación en residuos hidrofóbicos en las posiciones 11 y 14 de RR468, donde encontramos Leu o Ile en casi todos los RRs contribuyendo al reconocimiento.

Por otra parte, la variabilidad en el reconocimiento HK-RR se demuestra en el estudio llevado a cabo entre la HK y los cuatro RRs de *Methanobrevibacter*. La HK_{Met} ha diversificado sus interacciones con cada uno de los cuatro RRs para producir menor o mayor fosfotransferencia, así como menor o mayor actividad fosfatasa. Se muestra mayor tasa de actividad de fosfotransferencia

y fosfatasa a RR_{Met589-1} mientras, la menor tasa en ambas actividades se muestra a RR_{Met589-2}. En la base de datos de dos componentes P2CS (Barakat, 2011), se encuentran varios sistemas similares al de *Methanobrevibacter* formados por una HK y varios RRs, pero todos pertenecen a organismos endosimbiontes. Esto hace pensar que estos sistemas han evolucionado modificando únicamente los RRs y presentando diferentes afinidades, lo que permite a la célula economizar en sistemas de señalización para producir varias respuestas adaptativas sin necesidad de adquirir mayor especialización.

Por otra parte, las estructuras obtenidas para los dos RRs de *Methanobrevibacter* que presentaban mayor fosfotransferencia y fosfatasa RR_{Met572} y RR_{Met589-1} demuestran que la hélice $\alpha 1$ de ambos RRs está altamente conservada y por tanto puede explicar un reconocimiento similar interaccionando con la hélice $\alpha 1$ de la HK (Podgornaia et al., 2013). Sin embargo, las estructuras de ambos RRs muestran diferencias en otras zonas que podrían explicar las diferencias en la actividad. RR_{Met589-1} muestra mayor actividad fosfatasa que RR_{Met572}, pero muestra una afinidad diez veces menor por la HK probablemente debido a una menor disociación producida por el aumento de la actividad fosfatasa. Además, ambos RRs se diferencian en la conformación que adoptan desde el L β $\alpha 4$ hasta el C-terminal, por lo que posiblemente la interacción de esta región con la HK estaría involucrada en las diferencias de reconocimiento. Esto confirma que organismos como *Methanobrevibacter* han desarrollado alternativas para presentar sistemas de señalización efectivos, donde han modificado las estructuras de sus RRs para diversificar las regiones de reconocimiento que determinaría variaciones en las tasas de respuesta. Esto apunta a que el sistema descrito en este trabajo presenta un modelo de regulación de la respuesta del RR no canónico, como los descritos en Gao et al., 2019.



6. Conclusiones



1. Los TCS muestran reconocimiento específico del estado de fosforilación de su pareja. En este proceso intervienen posiciones específicas del L β α 3 y L β α 4 en el RR que también intervienen en la estabilización de fosfo-RR.
2. El uso de variantes mutacionales de RR468 nos ha permitido observar por primera vez la reacción de fosfotransferencia para la familia HisKA de los TCS, confirmando que esta reacción y la reacción fosfatasa no son reversas, como se había propuesto en ensayos bioquímicos y genéticos. Además, las conformaciones que adquieren el complejo HK-RR para catalizarlas son muy diferentes.
3. El dominio CA en la HK no está implicado en la reacción de fosfotransferencia a diferencia de la reacción fosfatasa donde se requiere para la correcta disposición del RR.
4. El modelo de regulación por pH de la actividad fosfatasa en las HK de la familia HisKA es incorrecto ya que el rotámero de la His catalítica en estas enzimas no está determinado por el pH.
5. El pH determina el estado de protonación de la His fosforilable en HK853 y EnvZ; y por tanto modula su capacidad nucleofílica durante la actividad quinasa y fosfatasa en valores de pH alrededor del pKa del grupo imidazol. Sin embargo, la reacción de fosfotransferencia no se ve alterada a estos pHs ya que depende del grupo Asp aceptor.
6. El rotámero *gauche*- o *trans* adquirido por la cadena lateral de la His fosforilable está relacionado con el estado en el que se encuentra la HK, siendo el rotámero *gauche*- un estado inactivo o de reposo y el *trans* un estado activo o catalítico.
7. Mutaciones a Val en el residuo G63 de OmpR impiden la fosforilación del RR y su dimerización, así como en el reconocimiento de EnvZ, su HK pareja, disminuyendo su actividad promotora de los genes *ompF* y *ompC* que codifican para porinas. De este modo, se promueve la resistencia a carbapenémicos en *E. coli*. Por su parte, la mutación a Ala tiene un efecto intermedio tanto en la fosforilación como en el reconocimiento de EnvZ.
8. La presencia de una cadena lateral en la posición G63 reduce la flexibilidad del L β α 3. La mutación a Val permite que esta nueva cadena lateral se aloje en un bolsillo hidrofóbico que atrapa al RR en el estado inactivo, explicando su falta de fosforilación. Los cambios en el L β α 3 inducen el desplazamiento de la hélice α 4 e impiden la dimerización del RR requerida para su actividad transcripcional.

9. Los TCSs encontrados en *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Simkania negevensis* no presentaron fosfotransferencia desde las HKs a sus correspondientes RRs. Sin embargo, la similitud de secuencia con zonas de reconocimiento en HKs y RRs, de los sistemas pertenecientes a *Chlamydia trachomatis* y *Simkania negevensis* con HK853-RR468 permitieron que estas HKs pudieran fosfotransferir a RR468.
10. Las estructuras y los datos bioquímicos de RR_{Met589-1} y RR_{Met572} han mostrado diferencias estructurales en el C-terminal a partir del Lβ4. RR_{Met589-1} no mostraba la configuración canónica del dominio REC debido a la ausencia de β5 y RR_{Met572} mostró una conformación “swapped” o cruzada similar a los RRs RegX3 y MaeR, generada por los movimientos en el Lβ4. Claramente estos RRs muestran mecanismos no canónicos, lo que nos sugiere que presentan diferentes mecanismos de regulación.
11. Los ensayos bioquímicos del sistema perteneciente a *Methenobrevibacter* demuestra que, HK_{Met} transfiere de forma diferencial a los cuatro RRs, mostrando mayor fosfotransferencia a RR_{Met589-1} y RR_{Met572}, pero mayor actividad fosfatasa a RR_{Met589-1}. Además, los valores de KD muestran que HK_{Met} presenta una afinidad diez veces mayor por RR_{Met572} que por RR_{Met589-1}, probablemente debido a la disociación para llevar a cabo posteriormente la actividad fosfatasa.

7. Referencias



- Aakre CD, Herrou J, Phung TN, Perchuk BS, Crosson S, Laub MT. 2015. Evolving new protein-protein interaction specificity through promiscuous intermediates. *Cell*. 163(3):594–606
- Albanesi D, Martín M, Trajtenberg F, Mansilla MC, Haouz A, et al. 2009. Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106(38):16185–16190
- Albers S-V, Jarrell KF. 2015. The archaellum: how Archaea swim. *Front. Microbiol.* 6:23
- Ashby MK. 2006. Distribution, structure and diversity of “bacterial” genes encoding two-component proteins in the Euryarchaeota. *Archaea*. 2(1):11–30
- Ashenberg O, Keating AE, Laub MT. 2013. Helix bundle loops determine whether histidine kinases autophosphorylate in cis or in trans. *J. Mol. Biol.* 425(7):1198–1209
- Attwood PV, Piggott MJ, Zu XL, Besant PG. 2007. Focus on phosphohistidine. *Amino Acids*. 32(1):145–156
- Bahn Y-S. 2008. Master and commander in fungal pathogens: the two-component system and the HOG signaling pathway. *Eukaryotic Cell*. 7(12):2017–2036
- Banerjee R, Yan H, Cukier RI. 2014. Conformational transition of response regulator RR468 in a two-component system signal transduction process. *J. Phys. Chem. B*. 118(18):4727–4742
- Barakat M, Ortet P, Whitworth DE. 2011. P2CS: a database of prokaryotic two-component systems. *Nucleic Acids Res.* 39(Database issue):D771–6
- Barbieri CM, Wu T, Stock AM. 2013. Comprehensive analysis of OmpR phosphorylation, dimerization, and DNA binding supports a canonical model for activation. *J. Mol. Biol.* 425(10):1612–1626
- Barrett JF, Goldschmidt RM, Lawrence LE, Foleno B, Chen R, et al. 1998. Antibacterial agents that inhibit two-component signal transduction systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95(9):5317–5322
- Batchelor JD, Doucleff M, Lee C-J, Matsubara K, De Carlo S, et al. 2008. Structure and regulatory mechanism of *Aquifex aeolicus* NtrC4: variability

- and evolution in bacterial transcriptional regulation. *J. Mol. Biol.* 384(5):1058–1075
- Bauer J, Reiss K, Veerabagu M, Heunemann M, Harter K, Stehle T. 2013. Structure-function analysis of *Arabidopsis thaliana* histidine kinase AHK5 bound to its cognate phosphotransfer protein AHP1. *Mol. Plant.* 6(3):959–970
- Bax B, Carter PS, Lewis C, Guy AR, Bridges A, et al. 2001. The structure of phosphorylated GSK-3 β complexed with a peptide, FRATtide, that inhibits β -catenin phosphorylation. *Structure.* 9(12):1143–1152
- Beier D, Schwarz B, Fuchs TM, Gross R. 1995. In vivo characterization of the unorthodox BvgS two-component sensor protein of *Bordetella pertussis*. *J. Mol. Biol.* 248(3):596–610
- Bem AE, Velikova N, Pellicer MT, Baarlen P van, Marina A, Wells JM. 2015. Bacterial histidine kinases as novel antibacterial drug targets. *ACS Chem. Biol.* 10(1):213–224
- Bhagirath AY, Li Y, Patidar R, Yerex K, Ma X, et al. 2019. Two Component Regulatory Systems and Antibiotic Resistance in Gram-Negative Pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* 20(7):
- Bhate MP, Lemmin T, Kuenze G, Mensa B, Ganguly S, et al. 2018. Structure and Function of the Transmembrane Domain of NsaS, an Antibiotic Sensing Histidine Kinase in *Staphylococcus aureus*. *J. Am. Chem. Soc.* 140(24):7471–7485
- Bhate MP, Molnar KS, Goulian M, DeGrado WF. 2015. Signal transduction in histidine kinases: insights from new structures. *Structure.* 23(6):981–994
- Bilwes AM, Park S-Y, Quezada CM, Simon MI, Crane BR. 2003. Structure and function of cheA, the histidine kinase central to bacterial chemotaxis. In *Histidine kinases in signal transduction*, pp. 47–72. Elsevier
- Bott M. 1997. Anaerobic citrate metabolism and its regulation in enterobacteria. *Arch. Microbiol.* 167(2/3):78–88
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, et al. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 48(1):1–12

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254
- Brandon L, Dorus S, Epstein W, Altendorf K, Jung K. 2000. Modulation of KdpD phosphatase implicated in the physiological expression of the kdp ATPase of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 38(5):1086–1092
- Buschiazzo A, Trajtenberg F. 2019. Two-Component Sensing and Regulation: How Do Histidine Kinases Talk with Response Regulators at the Molecular Level? *Annu. Rev. Microbiol.* 73:507–528
- Cai SJ, Inouye M. 2002. EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 277(27):24155–24161
- Capra EJ, Laub MT. 2012. Evolution of two-component signal transduction systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 66:325–347
- Capra EJ, Perchuk BS, Lubin EA, Ashenberg O, Skerker JM, Laub MT. 2010. Systematic dissection and trajectory-scanning mutagenesis of the molecular interface that ensures specificity of two-component signaling pathways. *PLoS Genet.* 6(11):e1001220
- Capra EJ, Perchuk BS, Skerker JM, Laub MT. 2012. Adaptive mutations that prevent crosstalk enable the expansion of paralogous signaling protein families. *Cell.* 150(1):222–232
- Casino P, Miguel-Romero L, Marina A. 2014. Visualizing autophosphorylation in histidine kinases. *Nat. Commun.* 5:3258
- Casino P, Rubio V, Marina A. 2009. Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell.* 139(2):325–336
- Casino P, Rubio V, Marina A. 2010. The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20(6):763–771
- Cerdà-Costa N, Gomis-Rüth FX. 2014. Architecture and function of metalloproteinase catalytic domains. *Protein Sci.* 23(2):123–144
- Chan C, Paul R, Samoray D, Amiot NC, Giese B, et al. 2004. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(49):17084–17089

- Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM. 1993. Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science*. 262(5133):539–544
- Cheung J, Hendrickson WA. 2009. Structural analysis of ligand stimulation of the histidine kinase NarX. *Structure*. 17(2):190–201
- Cheung J, Hendrickson WA. 2010. Sensor domains of two-component regulatory systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 13(2):116–123
- Cheung J, Le-Khac M, Hendrickson WA. 2009. Crystal structure of a histidine kinase sensor domain with similarity to periplasmic binding proteins. *Proteins*. 77(1):235–241
- Choi U, Lee C-R. 2019. Distinct Roles of Outer Membrane Porins in Antibiotic Resistance and Membrane Integrity in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 10:953
- Cosgrove SE, Carmeli Y. 2003. The impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes. *Clin. Infect. Dis.* 36(11):1433–1437
- Dam S, Pagès J-M, Masi M. 2017. Dual Regulation of the Small RNA MicC and the Quiescent Porin OmpN in Response to Antibiotic Stress in *Escherichia coli*. *Antibiotics (Basel)*. 6(4):
- Depardieu F, Courvalin P, Msadek T. 2003. A six amino acid deletion, partially overlapping the VanSB G2 ATP-binding motif, leads to constitutive glycopeptide resistance in VanB-type *Enterococcus faecium*. *Mol. Microbiol.* 50(3):1069–1083
- DePristo MA, Weinreich DM, Hartl DL. 2005. Missense meanderings in sequence space: a biophysical view of protein evolution. *Nat. Rev. Genet.* 6(9):678–687
- Djordjevic S, Goudreau PN, Xu Q, Stock AM, West AH. 1998. Structural basis for methylesterase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95(4):1381–1386
- Djordjevic S, Stock AM. 1998. Structural analysis of bacterial chemotaxis proteins: components of a dynamic signaling system. *J. Struct. Biol.* 124(2-3):189–200

- Dubrac S, Msadek T. 2008. Tearing down the wall: peptidoglycan metabolism and the Walk/WalR (YycG/YycF) essential two-component system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 631:214–228
- Dupont H, Choinier P, Roche D, Adiba S, Sookdeb M, et al. 2017. Structural Alteration of OmpR as a Source of Ertapenem Resistance in a CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* O25b:H4 Sequence Type 131 Clinical Isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61(5):
- Dutta R, Inouye M. 2000. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 25(1):24–28
- El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, Luciani A, et al. 2019. The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res.* 47(D1):D427–D432
- Elsen S, Swem LR, Swem DL, Bauer CE. 2004. RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68(2):263–279
- Fabret C, Feher VA, Hoch JA. 1999. Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J. Bacteriol.* 181(7):1975–1983
- Ferrari FA, Trach K, LeCoq D, Spence J, Ferrari E, Hoch JA. 1985. Characterization of the *spo0A* locus and its deduced product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82(9):2647–2651
- Fields PI, Groisman EA, Heffron F. 1989. A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science.* 243(4894 Pt 1):1059–1062
- Fisher SL, Jiang W, Wanner BL, Walsh CT. 1995. Cross-talk between the histidine protein kinase VanS and the response regulator PhoB. Characterization and identification of a VanS domain that inhibits activation of PhoB. *J. Biol. Chem.* 270(39):23143–23149
- Fuhrer DK, Ordal GW. 1991. *Bacillus subtilis* CheN, a homolog of CheA, the central regulator of chemotaxis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173(23):7443–7448
- Gao R, Bouillet S, Stock AM. 2019. Structural basis of response regulator function. *Annu. Rev. Microbiol.* 73:175–197

- Gao R, Mack TR, Stock AM. 2007. Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem. Sci.* 32(5):225–234
- Gao R, Stock AM. 2009. Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:133–154
- Ghosh R, Steiert M, Hardmeyer A, Wang YF, Rosenbusch JP. 1998. Overexpression of outer membrane porins in *E. coli* using pBluescript-derived vectors. *Gene Expr.* 7(3):149–161
- Gileadi O, Burgess-Brown NA, Colebrook SM, Berridge G, Savitsky P, et al. 2008. High throughput production of recombinant human proteins for crystallography. *Methods Mol. Biol.* 426:221–246
- Gilles-Gonzalez MA, Ditta GS, Helinski DR. 1991. A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature.* 350(6314):170–172
- Grebe TW, Stock JB. 1999. The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol.* 41:139–227
- Grefen C, Harter K. 2004. Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk. *Planta.* 219(5):733–742
- Grimshaw CE, Huang S, Hanstein CG, Strauch MA, Burbulys D, et al. 1998. Synergistic kinetic interactions between components of the phosphorelay controlling sporulation in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry.* 37(5):1365–1375
- Gushchin I, Melnikov I, Polovinkin V, Ishchenko A, Yuzhakova A, et al. 2017. Mechanism of transmembrane signaling by sensor histidine kinases. *Science.* 356(6342):
- Haldimann A, Fisher SL, Daniels LL, Walsh CT, Wanner BL. 1997. Transcriptional regulation of the *Enterococcus faecium* BM4147 vancomycin resistance gene cluster by the VanS-VanR two-component regulatory system in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 179(18):5903–5913
- Hawser SP, Bouchillon SK, Lascols C, Hackel M, Hoban DJ, et al. 2012. Susceptibility of European *Escherichia coli* clinical isolates from intra-abdominal infections, extended-spectrum β -lactamase occurrence,

- resistance distribution, and molecular characterization of ertapenem-resistant isolates (SMART 2008-2009). *Clin. Microbiol. Infect.* 18(3):253–259
- Head CG, Tardy A, Kenney LJ. 1998. Relative binding affinities of OmpR and OmpR-phosphate at the ompF and ompC regulatory sites. *J. Mol. Biol.* 281(5):857–870
- Hedstrom L. 2002. Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* 102(12):4501–4524
- Henry JT, Crosson S. 2011. Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annu. Rev. Microbiol.* 65:261–286
- Herrou J, Crosson S, Fiebig A. 2017. Structure and function of HWE/HisKA2-family sensor histidine kinases. *Curr. Opin. Microbiol.* 36:47–54
- Herzberg O, Reddy P, Sutrina S, Saier MH, Reizer J, Kapadia G. 1992. Structure of the histidine-containing phosphocarrier protein HPr from *Bacillus subtilis* at 2.0-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89(6):2499–2503
- Hess JF, Bourret RB, Simon MI. 1988. Histidine phosphorylation and phosphoryl group transfer in bacterial chemotaxis. *Nature.* 336(6195):139–143
- Hirakawa H, Nishino K, Hirata T, Yamaguchi A. 2003. Comprehensive studies of drug resistance mediated by overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185(6):1851–1856
- Ho PL, Lo WU, Yeung MK, Lin CH, Chow KH, et al. 2011. Complete sequencing of pNDM-HK encoding NDM-1 carbapenemase from a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Hong Kong. *PLoS One.* 6(3):e17989
- Ho YS, Burden LM, Hurley JH. 2000. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *EMBO J.* 19(20):5288–5299
- Hoch JA. 1993. The phosphorelay signal transduction pathway in the initiation of *Bacillus subtilis* sporulation. *J. Cell Biochem.* 51(1):55–61
- Hoch JA. 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* 3(2):165–170

- Howden BP, Stinear TP, Allen DL, Johnson PDR, Ward PB, Davies JK. 2008. Genomic analysis reveals a point mutation in the two-component sensor gene *graS* that leads to intermediate vancomycin resistance in clinical *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(10):3755–3762
- 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(17):4538–4546
- Hsing W, Silhavy TJ. 1997. Function of conserved histidine-243 in phosphatase activity of EnvZ, the sensor for porin osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179(11):3729–3735
- Hu F, Luo W, Hong M. 2010. Mechanisms of proton conduction and gating in influenza M2 proton channels from solid-state NMR. *Science.* 330(6003):505–508
- Hulko M, Berndt F, Gruber M, Linder JU, Truffault V, et al. 2006. The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell.* 126(5):929–940
- Huynh TN, Noriega CE, Stewart V. 2010. Conserved mechanism for sensor phosphatase control of two-component signaling revealed in the nitrate sensor NarX. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107(49):21140–21145
- Huynh TN, Stewart V. 2011. Negative control in two-component signal transduction by transmitter phosphatase activity. *Mol. Microbiol.* 82(2):275–286
- Imamura A, Yoshino Y, Mizuno T. 2001. Cellular localization of the signaling components of *Arabidopsis* His-to-Asp phosphorelay. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65(9):2113–2117
- Immormino RM, Silversmith RE, Bourret RB. 2016. A variable active site residue influences the kinetics of response regulator phosphorylation and dephosphorylation. *Biochemistry.* 55(39):5595–5609
- Iuchi S, Weiner L. 1996. Cellular and molecular physiology of *Escherichia coli* in the adaptation to aerobic environments. *J. Biochem.* 120(6):1055–1063

- Jacob-Dubuisson F, Mechaly A, Betton J-M, Antoine R. 2018. Structural insights into the signalling mechanisms of two-component systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 16(10):585–593
- Janiak-Spens F, West AH. 2000. Functional roles of conserved amino acid residues surrounding the phosphorylatable histidine of the yeast phosphorelay protein YPD1. *Mol. Microbiol.* 37(1):136–144
- Jenal U, Galperin MY. 2009. Single domain response regulators: molecular switches with emerging roles in cell organization and dynamics. *Curr. Opin. Microbiol.* 12(2):152–160
- Kato Y, Suzuki T, Ida T, Maebashi K, Sakurai M, et al. 2008. Microbiological and clinical study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying *VraS* mutation: changes in susceptibility to glycopeptides and clinical significance. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 31(1):64–70
- Kim D-J, Forst S. 2001. Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology (Reading, Engl.)*. 147(Pt 5):1197–1212
- King-Scott J, Nowak E, Mylonas E, Panjekar S, Roessle M, et al. 2007. The structure of a full-length response regulator from *Mycobacterium tuberculosis* in a stabilized three-dimensional domain-swapped, activated state. *J. Biol. Chem.* 282(52):37717–37729
- Kong H-K, Pan Q, Lo W-U, Liu X, Law COK, et al. 2018. Fine-tuning carbapenem resistance by reducing porin permeability of bacteria activated in the selection process of conjugation. *Sci. Rep.* 8(1):15248
- Koretke KK, Lupas AN, Warren PV, Rosenberg M, Brown JR. 2000. Evolution of two-component signal transduction. *Mol. Biol. Evol.* 17(12):1956–1970
- Korycinski M, Albrecht R, Ursinus A, Hartmann MD, Coles M, et al. 2015. STAC-A New Domain Associated with Transmembrane Solute Transport and Two-Component Signal Transduction Systems. *J. Mol. Biol.* 427(20):3327–3339
- Krell T, Lacal J, Busch A, Silva-Jiménez H, Guazzaroni M-E, Ramos JL. 2010. Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annu. Rev. Microbiol.* 64:539–559

- Krissinel E. 2015. Stock-based detection of protein oligomeric states in jsPISA. *Nucleic Acids Res.* 43(W1):W314–9
- Kuriyan J, Eisenberg D. 2007. The origin of protein interactions and allostery in colocalization. *Nature.* 450(7172):983–990
- Kuroda M, Kuroda H, Oshima T, Takeuchi F, Mori H, Hiramatsu K. 2003. Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 49(3):807–821
- Lahiri SD, Wang P-F, Babbitt PC, McLeish MJ, Kenyon GL, Allen KN. 2002. The 2.1 Å Structure of *Torpedo californica* Creatine Kinase Complexed with the ADP-Mg²⁺ -NO₃ -Creatine Transition-State Analogue Complex[†], ‡. *Biochemistry.* 41(47):13861–13867
- Lassila JK, Zalatan JG, Herschlag D. 2011. Biological phosphoryl-transfer reactions: understanding mechanism and catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 80:669–702
- Laub MT, Goulian M. 2007. Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu. Rev. Genet.* 41:121–145
- Lee SY, Cho HS, Pelton JG, Yan D, Henderson RK, et al. 2001. Crystal structure of an activated response regulator bound to its target. *Nat. Struct. Biol.* 8(1):52–56
- Letunic I, Doerks T, Bork P. 2015. SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res.* 43(Database issue):D257–60
- Lewis RJ, Muchová K, Brannigan JA, Barák I, Leonard G, Wilkinson AJ. 2000. Domain swapping in the sporulation response regulator Spo0A. *J. Mol. Biol.* 297(3):757–770
- Li J, Zheng X, Guo X, Qi L, Dong X. 2014. Characterization of an archaeal two-component system that regulates methanogenesis in *Methanosaeta harundinacea*. *PLoS One.* 9(4):e95502
- Li P, Roberts BP, Chakravorty DK, Merz KM. 2013. Rational Design of Particle Mesh Ewald Compatible Lennard-Jones Parameters for +2 Metal Cations in Explicit Solvent. *J. Chem. Theory Comput.* 9(6):2733–2748

- Li S, Hong M. 2011. Protonation, tautomerization, and rotameric structure of histidine: a comprehensive study by magic-angle-spinning solid-state NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 133(5):1534–1544
- Lim K, Pullalarevu S, Surabian KT, Howard A, Suzuki T, et al. 2010. Structural basis for the mechanism and substrate specificity of glycoamine kinase, a phosphagen kinase family member. *Biochemistry.* 49(9):2031–2041
- Lingzhi L, Haojie G, Dan G, Hongmei M, Yang L, et al. 2018. The role of two-component regulatory system in β -lactam antibiotics resistance. *Microbiol Res.* 215:126–129
- Liu Y, Rose J, Huang S, Hu Y, Wu Q, et al. 2017. A pH-gated conformational switch regulates the phosphatase activity of bifunctional HisKA-family histidine kinases. *Nat. Commun.* 8(1):2104
- Lois AF, Ditta GS, Helinski DR. 1993. The oxygen sensor FixL of *Rhizobium meliloti* is a membrane protein containing four possible transmembrane segments. *J. Bacteriol.* 175(4):1103–1109
- Lukat GS, Lee BH, Mottonen JM, Stock AM, Stock JB. 1991. Roles of the highly conserved aspartate and lysine residues in the response regulator of bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 266(13):8348–8354
- Lukat GS, McCleary WR, Stock AM, Stock JB. 1992. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89(2):718–722
- Lyon GJ, Novick RP. 2004. Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides.* 25(9):1389–1403
- Maeda T, Wurgler-Murphy SM, Saito H. 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature.* 369(6477):242–245
- Makino K, Shinagawa H, Amemura M, Nakata A. 1986. Nucleotide sequence of the *phoR* gene, a regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 192(3):549–556
- Marina A, Mott C, Auyzenberg A, Hendrickson WA, Waldburger CD. 2001. Structural and mutational analysis of the PhoQ histidine kinase catalytic

- domain. Insight into the reaction mechanism. *J. Biol. Chem.* 276(44):41182–41190
- Marina A, Waldburger CD, Hendrickson WA. 2005. Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *EMBO J.* 24(24):4247–4259
- Martínez-Hackert E, Stock AM. 1997. Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *J. Mol. Biol.* 269(3):301–312
- Mascher T, Helmann JD, Uden G. 2006. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70(4):910–938
- Matsumura P, Rydel JJ, Linzmeier R, Vacante D. 1984. Overexpression and sequence of the *Escherichia coli* cheY gene and biochemical activities of the CheY protein. *J. Bacteriol.* 160(1):36–41
- Mattison K, Kenney LJ. 2002. Phosphorylation alters the interaction of the response regulator OmpR with its sensor kinase EnvZ. *J. Biol. Chem.* 277(13):11143–11148
- Mattison K, Oropeza R, Byers N, Kenney LJ. 2002. A phosphorylation site mutant of OmpR reveals different binding conformations at ompF and ompC. *J. Mol. Biol.* 315(4):497–511
- Mechaly AE, Sassoon N, Betton J-M, Alzari PM. 2014. Segmental helical motions and dynamical asymmetry modulate histidine kinase autophosphorylation. *PLoS Biol.* 12(1):e1001776
- Miguel-Romero L, Casino P, Landete JM, Monedero V, Zúñiga M, Marina A. 2017. The malate sensing two-component system MaeKR is a non-canonical class of sensory complex for C4-dicarboxylates. *Sci. Rep.* 7(1):2708
- Milani M, Leoni L, Rampioni G, Zennaro E, Ascenzi P, Bolognesi M. 2005. An active-like structure in the unphosphorylated StyR response regulator suggests a phosphorylation-dependent allosteric activation mechanism. *Structure.* 13(9):1289–1297
- Mildvan AS. 1997. Mechanisms of signaling and related enzymes. *Proteins.* 29(4):401–416

- Mizuno T. 1997. Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res.* 4(2):161–168
- Mizuno T, Shinkai A, Matsui K, Mizushima S. 1990. Osmoregulatory expression of porin genes in *Escherichia coli*: a comparative study on strains B and K-12. *FEMS Microbiol. Lett.* 56(3):289–293
- Moukhametzianov R, Klare JP, Efremov R, Baeken C, Göppner A, et al. 2006. Development of the signal in sensory rhodopsin and its transfer to the cognate transducer. *Nature.* 440(7080):115–119
- Munita JM, Arias CA. 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.* 4(2):
- Nagahashi S, Mio T, Ono N, Yamada-Okabe T, Arisawa M, et al. 1998. Isolation of CaSLN1 and CaNIK1, the genes for osmosensing histidine kinase homologues, from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, Engl.)*. 144 (Pt 2):425–432
- Ninfa AJ, Magasanik B. 1986. Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83(16):5909–5913
- Nishijyo T, Haas D, Itoh Y. 2001. The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 40(4):917–931
- Nixon BT, Ronson CW, Ausubel FM. 1986. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes ntrB and ntrC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83(20):7850–7854
- Ortet P, Whitworth DE, Santaella C, Achouak W, Barakat M. 2015. P2CS: updates of the prokaryotic two-component systems database. *Nucleic Acids Res.* 43(Database issue):D536–41
- Ota IM, Varshavsky A. 1993. A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science.* 262(5133):566–569

- Ovchinnikov S, Kamisetty H, Baker D. 2014. Robust and accurate prediction of residue-residue interactions across protein interfaces using evolutionary information. *Elife*. 3:e02030
- Page SC, Immormino RM, Miller TH, Bourret RB. 2016. Experimental Analysis of Functional Variation within Protein Families: Receiver Domain Autodephosphorylation Kinetics. *J. Bacteriol.* 198(18):2483–2493
- Paithankar KS, Enderle M, Wirthensohn DC, Miller A, Schlesner M, et al. 2019. Structure of the archaeal chemotaxis protein CheY in a domain-swapped dimeric conformation. *Acta Crystallogr. Sect F, Struct. Biol. Commun.* 75(Pt 9):576–585
- Pao GM, Saier MH. 1997. Nonplastid eukaryotic response regulators have a monophyletic origin and evolved from their bacterial precursors in parallel with their cognate sensor kinases. *J. Mol. Evol.* 44(6):605–613
- Park H, Saha SK, Inouye M. 1998. Two-domain reconstitution of a functional protein histidine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(12):6728–6732
- Parkinson JS, Kofoid EC. 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* 26:71–112
- Perego M. 1998. Kinase-phosphatase competition regulates *Bacillus subtilis* development. *Trends Microbiol.* 6(9):366–370
- Podgornaia AI, Casino P, Marina A, Laub MT. 2013. Structural basis of a rationally rewired protein-protein interface critical to bacterial signaling. *Structure.* 21(9):1636–1647
- Podgornaia AI, Laub MT. 2015. Protein evolution. Pervasive degeneracy and epistasis in a protein-protein interface. *Science.* 347(6222):673–677
- Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H. 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 “two-component” osmosensor. *Cell.* 86(6):865–875
- Qin L, Cai S, Zhu Y, Inouye M. 2003. Cysteine-scanning analysis of the dimerization domain of EnvZ, an osmosensing histidine kinase. *J. Bacteriol.* 185(11):3429–3435

- Rainwater S, Silverman PM. 1990. The Cpx proteins of *Escherichia coli* K-12: evidence that *cpxA*, *ecfB*, *ssd*, and *eup* mutations all identify the same gene. *J. Bacteriol.* 172(5):2456–2461
- Rather PN, Paradise MR, Parojcic MM, Patel S. 1998. A regulatory cascade involving AarG, a putative sensor kinase, controls the expression of the 2'-N-acetyltransferase and an intrinsic multiple antibiotic resistance (Mar) response in *Providencia stuartii*. *Mol. Microbiol.* 28(6):1345–1353
- Reibel R, Ernst RK, Gowen BB, Miller SI, Hinnebusch BJ. 2004. Variation in lipid A structure in the pathogenic yersiniae. *Mol. Microbiol.* 52(5):1363–1373
- Robinson VL, Buckler DR, Stock AM. 2000. A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. *Nat. Struct. Biol.* 7(8):626–633
- Romeo T. 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol. Microbiol.* 29(6):1321–1330
- Saita E, Abriata LA, Tsai YT, Trajtenberg F, Lemmin T, et al. 2015. A coiled coil switch mediates cold sensing by the thermosensory protein DesK. *Mol. Microbiol.* 98(2):258–271
- Salazar ME, Laub MT. 2015. Temporal and evolutionary dynamics of two-component signaling pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* 24:7–14
- Samuel BS, Hansen EE, Manchester JK, Coutinho PM, Henrissat B, et al. 2007. Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(25):10643–10648
- Sanders DA, Gillece-Castro BL, Stock AM, Burlingame AL, Koshland DE. 1989. Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. *J. Biol. Chem.* 264(36):21770–21778
- Sawai T, Hiruma R, Kawana N, Kaneko M, Taniyasu F, Inami A. 1982. Outer membrane permeation of beta-lactam antibiotics in *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22(4):585–592
- Shah N, Gaupp R, Moriyama H, Eskridge KM, Moriyama EN, Somerville GA. 2013. Reductive evolution and the loss of PDC/PAS domains from the genus *Staphylococcus*. *BMC Genomics.* 14:524

- Shu CJ, Zhulin IB. 2002. ANтар: an RNA-binding domain in transcription antitermination regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* 27(1):3–5
- Sidote DJ, Barbieri CM, Wu T, Stock AM. 2008. Structure of the *Staphylococcus aureus* AgrA LytTR domain bound to DNA reveals a beta fold with an unusual mode of binding. *Structure.* 16(5):727–735
- Simossis VA, Heringa J. 2005. PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. *Nucleic Acids Res.* 33(Web Server issue):W289–94
- Siryaporn A, Goulian M. 2008. Cross-talk suppression between the CpxA-CpxR and EnvZ-OmpR two-component systems in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* 70(2):494–506
- Skerker JM, Perchuk BS, Siryaporn A, Lubin EA, Ashenberg O, et al. 2008. Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems. *Cell.* 133(6):1043–1054
- Skerker JM, Prasol MS, Perchuk BS, Biondi EG, Laub MT. 2005. Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol.* 3(10):e334
- Starr TN, Thornton JW. 2016. Epistasis in protein evolution. *Protein Sci.* 25(7):1204–1218
- Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. 2000. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 69:183–215
- Stock JB, Ninfa AJ, Stock AM. 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev.* 53(4):450–490
- Stock JB, Stock AM, Mottonen JM. 1990. Signal transduction in bacteria. *Nature.* 344(6265):395–400
- Sun S, Berg OG, Roth JR, Andersson DI. 2009. Contribution of gene amplification to evolution of increased antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Genetics.* 182(4):1183–1195
- Szurmant H, Ordal GW. 2004. Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68(2):301–319

- Tamayo R, Choudhury B, Septer A, Merighi M, Carlson R, Gunn JS. 2005. Identification of *cptA*, a *PmrA*-regulated locus required for phosphoethanolamine modification of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium lipopolysaccharide core. *J. Bacteriol.* 187(10):3391–3399
- Thomas SA, Immormino RM, Bourret RB, Silversmith RE. 2013. Nonconserved active site residues modulate CheY autophosphorylation kinetics and phosphodonor preference. *Biochemistry.* 52(13):2262–2273
- Tierney AR, Rather PN. 2019. Roles of two-component regulatory systems in antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 14:533–552
- Tiwari V. 2019. Post-translational modification of ESKAPE pathogens as a potential target in drug discovery. *Drug Discov. Today.* 24(3):814–822
- Trajtenberg F, Graña M, Ruétalo N, Botti H, Buschiazzi A. 2010. Structural and enzymatic insights into the ATP binding and autophosphorylation mechanism of a sensor histidine kinase. *J. Biol. Chem.* 285(32):24892–24903
- Trajtenberg F, Imelio JA, Machado MR, Larrieux N, Marti MA, et al. 2016. Regulation of signaling directionality revealed by 3D snapshots of a kinase:regulator complex in action. *Elife.* 5:
- Ulrich LE, Koonin EV, Zhulin IB. 2005. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* 13(2):52–56
- Uden G, Bongaerts J. 1997. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1320(3):217–234
- Varughese KI, Tsigelny I, Zhao H. 2006. The crystal structure of berylliofluoride SpoOF in complex with the phosphotransferase SpoOB represents a phosphotransfer pretransition state. *J. Bacteriol.* 188(13):4970–4977
- Velikova N, Fulle S, Manso AS, Mechkarska M, Finn P, et al. 2016. Putative histidine kinase inhibitors with antibacterial effect against multi-drug resistant clinical isolates identified by in vitro and in silico screens. *Sci. Rep.* 6:26085
- Ventola CL. 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T.* 40(4):277–283

- Weiss V, Magasanik B. 1988. Phosphorylation of nitrogen regulator I (NRI) of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85(23):8919–8923
- West AH, Stock AM. 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* 26(6):369–376
- Wilke KE, Francis S, Carlson EE. 2015. Inactivation of multiple bacterial histidine kinases by targeting the ATP-binding domain. *ACS Chem. Biol.* 10(1):328–335
- Wilkinson JQ, Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ. 1995. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by never-ripe. *Science*. 270(5243):1807–1809
- Willett JW, Kirby JR. 2012. Genetic and biochemical dissection of a HisKA domain identifies residues required exclusively for kinase and phosphatase activities. *PLoS Genet.* 8(11):e1003084
- Wolanin PM, Thomason PA, Stock JB. 2002. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* 3(10):REVIEWS3013
- Wu J, Ohta N, Zhao JL, Newton A. 1999. A novel bacterial tyrosine kinase essential for cell division and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96(23):13068–13073
- Wu R, Gu M, Wilton R, Babnigg G, Kim Y, et al. 2013. Insight into the sporulation phosphorelay: crystal structure of the sensor domain of *Bacillus subtilis* histidine kinase, KinD. *Protein Sci.* 22(5):564–576
- Wu W, Celma CC, Kerviel A, Roy P. 2019. Mapping the ph sensors critical for host cell entry by a complex nonenveloped virus. *J. Virol.* 93(4):
- Wuichet K, Cantwell BJ, Zhulin IB. 2010. Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 13(2):219–225
- Xu Q, Deller MC, Nielsen TK, Grant JC, Lesley SA, et al. 2014. Structural insights into the recognition of phosphopeptide by the FHA domain of kanadaplin. *PLoS One.* 9(9):e107309

- Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. 2008. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*. 132(3):387–396
- Yousef MS, Fabiola F, Gattis JL, Somasundaram T, Chapman MS. 2002. Refinement of the arginine kinase transition-state analogue complex at 1.2 Å resolution: mechanistic insights. *Acta Crystallogr. Sect. D, Biol. Crystallogr.* 58(Pt 12):2009–2017
- Zapf J, Madhusudan M, Grimshaw CE, Hoch JA, Varughese KI, Whiteley JM. 1998. A source of response regulator autophosphatase activity: the critical role of a residue adjacent to the Spo0F autophosphorylation active site. *Biochemistry*. 37(21):7725–7732
- Zarrinpar A, Park S-H, Lim WA. 2003. Optimization of specificity in a cellular protein interaction network by negative selection. *Nature*. 426(6967):676–680
- Zheng L, Yan M, Fan F, Ji Y. 2015. The Essential WalK Histidine Kinase and WalR Regulator Differentially Mediate Autolysis of *Staphylococcus aureus* RN4220. *J. Nat. Sci.* 1(6):
- 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(14):7808–7813
- Zschiedrich CP, Keidel V, Szurmant H. 2016. Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *J. Mol. Biol.* 428(19):3752–3775