

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**Caracterización funcional de un sistema de
quimiosensado de *Halomonas titanicae* KHS3**

Fernando E. Ramos Ricciuti

Directora de Tesis: Dra. Claudia Alicia Studdert

Codirectora de Tesis: Dra. Karina Herrera Seitz

Laboratorio de Microbiología Molecular

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral

-2023-

*Se te ha concedido el atributo divino,
tenlo mientras habitas un mundo sin dueño.
Se te ha ordenado mantenerlo encendido,
¡obedece! y suéltalo cuando sea el momento.*

AGRADECIMIENTOS

El final de esta gran aventura llegó, aunque no puedo poner punto final a este cúmulo de palabras sin antes agradecer a todas aquellas personas que de una u otra manera me ayudaron a transitar este largo camino.

En primer lugar, por supuesto, a mi directora. Gracias Clau, gracias por haber caminado a mí lado, por todas las enseñanzas, oportunidades y consejos. No sólo tuve la suerte de encontrar a una profesional inteligente, formada, pensadora, crítica, meticulosa, ocurrente y creativa, sino que también descubrí una persona muy sensible, cálida y empática, alguien con quien siempre pude hablar y discutir de cualquier cosa. A veces uno no nota lo valiosa que son ciertas palabras y miradas, y cuan alentadoras puede llegar a ser. Gracias por todo, realmente te admiro mucho.

A mi codirectora, Kari. Por la guía, los consejos, truquillos protocolares y todas esas palabras y consejos que con calidez y humor característicos siempre nutrieron mi formación.

Este trabajo no hubiese sido posible sin la Universidad Nacional del Litoral, gracias a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por haberme formado. Gracias al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, a su directora Dra. Raquel Chan y a sus integrantes, por brindarme el espacio para llevar a cabo esta etapa y hacerme sentir como en casa.

Gracias a mis compañeras de laboratorio, Ro, Ana, Ailén, Mariana, Lu, Pame. No sólo por el apoyo desinteresado que me brindaron todos estos años en el laboratorio, sino también por todas esas palabras que me ayudaron a enfrentar varias seguidillas de fracasos. Sin ustedes no sé si hubiese podido resistir, gracias.

Gracias a esas amigas y amigos que me acompañaron de una u otra manera en este camino. Gracias Mariana, Nacho, Ale, Gabi por haber escuchado tantas veces las desaventuras de escribir el producto de tantos años de trabajo.

Gracias a mi familia. Gracias mamá, papá, por todas las enseñanzas, por haber forjado de algún modo esa curiosidad y entusiasmo por el mundo natural que hace tantos años me acompañan. Gracias por el apoyo, la paciencia y la comprensión. Gracias José, por las palabras justas y por compartirme tu particular punto de vista, gracias por enseñarme que si algo se hace con pasión siempre vale la pena.

A mis compañeros de vida. Gracias Santi y Mati por alentarme, apoyarme, soportarme, acompañarme. Siempre me hacen sentir valioso. Gracias Moscú, por tu compañía incondicional; incluso mientras te escribo estas palabras estás a mí lado tratando de subirte al teclado.

Todos fueron pilares en los que me apoyé para finalizar esta etapa, sin ustedes no hubiese sido posible ¡Muchas gracias!

APORTES CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS

Este proyecto de tesis pretende conocer aspectos básicos sobre la funcionalidad y estructuración de un sistema de quimiosensado no canónico de *Halomonas titanicae* KHS3 en el que interviene una diguanilato ciclasa.

Parte de los resultados de este trabajo fueron publicados en:

Balmaceda, R. S., Ramos Ricciuti, F. E., Redersdorff, I. E., Veinticinque, L. M., Studdert, C. A., & Herrera Seitz, M. K. (2022). Chemosensory pathways of *Halomonas titanicae* KHS3 control chemotaxis behaviour and biofilm formation. *Microbiology (Reading, England)*, 168(10), 10.1099/mic.0.001251. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001251>

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	9
RESUMEN	13
ABSTRACT	15
INTRODUCCIÓN	17
I. Generalidades sobre sistemas bacterianos de quimioseñalización	17
¿Qué son los sistemas de dos componentes?.....	18
Un sistema de dos componentes particular: el sistema de quimiotaxis de <i>Escherichia coli</i>	19
Detalles moleculares del modelo canónico de quimiotaxis.....	23
Los quimiorreceptores modulan la actividad de la quinasa CheA.....	23
CheA y CheW interactúan con las MCPs para formar grandes complejos de señalización.....	25
El aparato de adaptación es una característica distintiva.....	28
Sistemas no canónicos: <i>Pseudomonas</i> como modelo.....	29
II. <i>Halomonas titanicae</i> KHS3	33
Sistemas homólogos a los de quimiotaxis de <i>Halomonas titanicae</i> KHS3.....	34
OBJETIVOS	37
Objetivo general	37
Objetivos específicos	37
CAPÍTULO I: Estudios estructurales del dominio de unión a ligando de Htc10	39
Objetivos	41
Materiales y métodos	42
Material biológico y medios de cultivo.....	42
Cepas.....	42
Medios de cultivo.....	42
Cebadores.....	42

Plásmidos	42
Clonado de <i>ldbHtc10</i>	43
Amplificación del gen	43
Digestión enzimática de ADN.....	43
Ligación.....	43
Preparación de células competentes	44
Transformación	44
Análisis de transformantes	44
Mutación en residuos puntuales de LBDHtc10.....	44
Expresión de la proteína recombinante en la fracción soluble	44
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	45
Purificación de LBDHtc10 recombinante	45
Ensayos de desplazamiento de la temperatura de desnaturalización (TSA).....	46
Cristalografía de proteínas por difracción de rayos X.....	46
Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)	47
Resultados	49
Clonado y expresión de LBDHtc10	49
Ligandos de LBDHtc10.....	50
Estructura de LBDHtc10	53
Interacción con guanina.....	55
Mutantes puntuales de LBDHtc10	57
Determinación de afinidad por ITC.....	59
Comparación con otras MCPs.....	61
Discusión	62
CAPÍTULO II: Interacción de las proteínas del sistema Che2 con los sistemas de quimiotaxis .	65
Objetivos	68
Materiales y métodos.....	69
Material biológico y medios de cultivo	69
Cepas	69
Medios de cultivo	69
Cebadores	69
Plásmidos	70
Construcción de plásmidos.....	70
Obtención de CheR2 mutante.....	71
Ensayos de quimiotaxis en placas de agar blando.....	71
Ensayos de rotación flagelar.....	71
Ensayos de metilación por inmunodetección de receptores	71
Detección de péptidos por espectrometría de masas	72
Resultados	74

Complementación funcional de mutantes de <i>Escherichia coli</i>	74
Interferencia en la quimiotaxis por altos niveles de CheW	76
Análisis de los residuos involucrados en la formación de complejos de señalización	77
Especificidad en las reacciones de metilación.....	79
Metilación de Htc10 en presencia de sus ligandos	83
Discusión	85
CAPÍTULO III: Fenotipo asociado a Che2	91
Objetivos	94
Materiales y métodos.....	95
Material biológico y medios de cultivo	95
Cepas	95
Medios de cultivo	95
Cebadores	95
Plásmidos	96
Clonado de <i>cheR2</i>	96
Transferencia de plásmidos a <i>Halomonas</i>	96
Construcción de mutantes	97
Inmunodetección con Htc10.....	97
Ensayos de <i>biofilm</i> por tinción con cristal violeta.....	98
Ensayos de movilidad.....	98
Análisis de <i>swimming</i> en placas de agar blando.....	98
<i>Twitching</i> en placas de agar duro	98
Inspección directa al microscopio	99
Ensayos de adherencia en placa de poliestireno.....	99
Morfología de colonias y macrocolonias	99
Resultados	100
Sobreexpresión de CheR2 en <i>Halomonas titanicae</i> KHS3 y una mutante $\Omega htc10$	100
Construcción y fenotipo de mutante $\Delta cheB2$	103
Caracterización de la capacidad de adherencia	106
Participación de di-GMPc en la formación de biofilm.....	108
Discusión	110
CONCLUSIONES	115
BIBLIOGRAFÍA	117
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	133
Anexo I: Secuencia completa del <i>cluster che2</i> de <i>Halomonas titanicae</i> KHS3	133
Anexo II Secuencia de las proteínas de la vía Che2 codificada en el <i>cluster che2</i> de <i>Halomonas titanicae</i> KHS3	136
Anexo III Datos de difracción de rayos X	138

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

4HB	<i>four-helix bundle</i>
% m/V	porcentaje masa-volumen
% V/V	porcentaje volumen a volumen
(NH ₄) ₂ SO ₄	sulfato de amonio
(NH ₄)HCO ₃	bicarbonato de amonio
°C	grados Celsius
ΔG	cambio de energía libre de Gibbs
ΔH	cambio de entalpía
ΔS	cambio de entropía
ΔT_m	desplazamiento de temperatura de desnaturalización
μg	microgramo
μL	microlitro
μM	micromolar
Å	ángstrom
A	absorbancia
ADP	adenosín difosfato
Amp	ampicilina
Amp ^R	resistencia a ampicilina
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
ATP	adenosín trifosfato
BCIP	fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo
CaCl ₂	cloruro de calcio
CCW	sentido antihorario

Cit	citrato de sodio
Cm	cloranfenicol
Cm ^R	resistencia a cloranfenicol
CV	cristal violeta
CW	sentido horario
dF/dT	primera derivada de la fluorescencia respecto al tiempo
DGC	diguanilato ciclasa
di-GMPc	diguanilato cíclico
dNTPs	mezcla equimolar de desoxirribonucleótido
DO	densidad óptica
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
F	fluorescencia
FeCl ₃	cloruro férrico
Fen	fenantreno
Ftal	ftalato
g	gramo
Glic	glicerol
Gluc	glucosa
GTP	guanosín trifosfato
Gua	guanina
h	hora
H ₂ O	agua
H ₃ PO ₄	ácido fosfórico
HAMP	<i>histidine kinases, adenylyl cyclases, methyl-accepting proteins, phosphatases</i>
HCl	ácido clorhídrico
Hip	hipoxantina
HK	histidín quinasa
HK-OFF	estado histidín quinasa inactiva
HK-ON	estado histidín quinasa activa
HPt	dominio de fosfotransferencia de histidina
IMAC	cromatografía de afinidad con metales inmovilizados
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
ITC	calorimetría de titulación isotérmica
J	joule
K	kelvin
K ₂ HPO ₄	fosfato dipotásico
K ₃ PO ₄	fosfato tripotásico

K_a	constante de asociación
K_d	constante de disociación
kDa	kilodalton
KH_2PO_4	fosfato monopotásico
KJ	kilojoule
Km	kanamicina
Km^R	resistencia a kanamicina
KPE	<i>buffer</i> de fosfato
L	litro
LB	medio Luria Bertani
LBD	dominio de unión a ligando
LBDHtc10	dominio de unión a ligando del receptor Htc10
log [ligando]	logaritmo de la concentración de ligando
M	molar
mA	miliamperios
MCP	<i>methyl-accepting chemotaxis protein</i>
mg	miligramo
MgCl_2	cloruro de magnesio
MgSO_4	sulfato de magnesio
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MM	marcador de masa molecular
MR	reemplazo molecular
NaCl	cloruro de sodio
NaSal	salicilato de sodio
NBT	cloruro de nitroazul de tetrazolio
NH_3	amoníaco
nL	nanolitro
nm	nanómetro
nM	nanomolar
P	grupo fosfato
$\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$	pirofosfato
PAE	<i>predicted aligned error</i>
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa

pH	potencial de hidrógeno
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	polifluoruro de vinilideno
RC	Rojo Congo
RMSD	desviación cuadrática media
RR	dominio <i>receiver</i> o regulador de respuesta
s	segundo
SAD	difracción anómala a longitud de onda única
SD	subdominio
SDS	dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
Se-Met	selenometionina
Suc	succinato de sodio
<i>T</i>	temperatura
TB	medio derivado del medio Luria Bertani, sin extracto de levadura
TBE	<i>buffer</i> Tris-borato-EDTA
T_m	temperatura de desnaturalización
TM	transmembrana
TPR	repeticiones tetra trico péptidos
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
TSA	ensayo de desplazamiento de la temperatura de desnaturalización
<i>V</i>	volumen
WT	tipo salvaje o <i>wild type</i>
x g	fuerza centrífuga relativa
YE	extracto de levadura

RESUMEN

Halomonas titanicae KHS3 es una bacteria ambiental que presenta ciertas características que la vuelven biotecnológicamente interesante, como halotolerancia, capacidad de sintetizar polihidroxicanoatos y de metabolizar compuestos xenobióticos.

Con el fin de estudiar a fondo el sistema de quimiotaxis de *H. titanicae* KHS3 se ha obtenido la secuencia completa de su genoma, y su análisis bioinformático reveló que éste contiene dos *clusters* de genes tipo quimiotaxis que llamamos *che1* y *che2*. El *cluster che1* posee un conjunto de genes cuya organización y grado de homología hacen presumir que serían los responsables del comportamiento quimiotáctico convencional de esta bacteria, y el *cluster che2* presenta genes con características particulares que lo hacen similar a sistemas no canónicos encargados de funciones alternativas. *che2* codifican un solo quimiorreceptor (Htc10), una histidín quinasa (CheA2), dos proteínas acopladoras (CheW2 y CheW3), un regulador de respuesta de dominio único (CheY2) y una diguanilato ciclasa con dominio regulador de respuesta en el extremo amino-terminal (DGC2), y proteínas de adaptación (CheR2 y CheB2). Esta tesis aborda el estudio de aspectos básicos de esta vía de señalización (Che2) codificada en el *cluster che2*, y para una mejor comprensión el trabajo se ha organizado en tres capítulos.

El primer capítulo es una búsqueda de estímulos químicos de Htc10. Para esto, el dominio de unión a ligando predicho de este receptor se clonó en un vector de expresión que facilitó su purificación. Las pruebas *in vitro* realizadas con la proteína recombinante mostraron que ciertos derivados de purina le otorgan estabilidad térmica, sugiriendo que podrían unirse en sitios específicos. Los ensayos de ITC confirmaron que hipoxantina y guanina tienen gran afinidad por este dominio, con K_d de 2,5 μM y 7,0 μM , respectivamente. Además, mediante cristalografía por difracción de rayos X se pudo determinar que tiene una topología de tipo doble Cache, coincidente con las predicciones informáticas previas, y que una molécula de hipoxantina o guanina se une al subdominio distal. Además, se identificaron los

residuos involucrados en dicha interacción, y esa predicción fue validada por el análisis de mutantes específicos.

Por otra parte, en el Capítulo II se puso a prueba la hipótesis de que las dos vías de quimiosensado de *H. titanicae* KHS3, Che1 y Che2, señalizan de forma independiente. Para ello se realizaron ensayos de complementación en cepas de *E. coli* mutadas en ciertos genes de quimiotaxis con los respectivos genes homólogos de *H. titanicae* KHS3, y se evaluó el comportamiento en placas de agar blando o el patrón de metilación de receptores por *western blot*. Los resultados mostraron que a diferencia de las proteínas del sistema Che1, ni CheW2, ni Htc10 ni CheR2 fueron capaces de interactuar con la maquinaria quimiotáctica de *E. coli*, sugiriendo que esta vía ensambla independientemente a los sistemas canónicos y que no interactúa directamente con éstos. Los alineamientos de secuencia permitieron identificar reemplazos de residuos en las superficies de interacción de los complejos de señalización que podrían determinar la especificidad observada.

Finalmente, el Capítulo III incluye un análisis de los efectos fenotípicos de mutaciones en ciertos genes de la vía Che2 en *H. titanicae* KHS3. Se generaron alteraciones por delección de *cheB2*, interrupción de *htc10* o sobreexpresión de *cher2*, y se evaluó la capacidad de formación de biopelículas (por cuantificación con cristal violeta de la biomasa adherida a microtubos) y la movilidad en medio líquido (por observación directa al microscopio y por análisis en placas de agar blando). Los resultados muestran que cuando la vía está sobreactivada aumenta la biomasa adherida y disminuye la movilidad, sugiriendo que el sistema Che2 podría estar implicado en la formación de biopelículas o *biofilms*. La reversión parcial del *biofilm* exacerbado al expresar una fosfodiesterasa exógena apoya la hipótesis de que estos efectos se deben a un aumento en la concentración del mensajero intracelular di-GMPc. La inspección de la morfología de colonias y macrocolonias en presencia de Rojo Congo indica que las respuestas río abajo podría involucrar un aumento en la producción de exopolisacáridos, consistente con el sistema similar Wsp de *P. aeruginosa*.

En resumen, el presente trabajo aporta evidencias de que Che2 forma complejos independientes a Che1, que hipoxantina y guanina se unen específicamente al dominio sensor periplasmático de Htc10, y que alteraciones genéticas en la vía Che2 en *H. titanicae* afectan la formación de *biofilm* y la movilidad celular en medio líquido. Este aporte podría tener implicaciones en la comprensión de la evolución y la diversidad de los sistemas de quimiotaxis en diferentes bacterias, y abre las puertas a futuras caracterizaciones en esta especie con potenciales aplicaciones biotecnológicas.

ABSTRACT

Halomonas titanicae KHS3 is an environmental bacterium with certain characteristics that make it biotechnologically interesting, such as halotolerance, and the ability to synthesize polyhydroxyalkanoates and metabolize xenobiotic compounds.

To study the chemotaxis system of *H. titanicae* KHS3, its complete genome sequence was obtained. The bioinformatic analysis revealed that it contains two chemotaxis-like gene clusters, which were called *che1* and *che2*. The *che1* cluster possesses a set of genes whose organization and sequence homology suggest that they are responsible for the conventional chemotactic behavior of this bacterium, while the *che2* cluster presents genes with characteristics that make it similar to non-canonical systems responsible for alternative functions. The *che2* genes encode a single chemoreceptor (Htc10), a histidine kinase (CheA2), two adaptor proteins (CheW2 and CheW3), a single domain response regulator (CheY2), a diguanylate cyclase with a response regulator domain at the amino terminus (DGC2), and adaptation proteins (CheR2 and CheB2). This thesis addresses the study of basic aspects of this signaling pathway (Che2) encoded in the *che2* cluster, and for a better understanding the work has been organized into three chapters.

The first chapter is a search for chemical stimuli of Htc10. For this purpose, the predicted ligand-binding domain of this receptor was cloned into an expression vector to facilitate its purification. *In vitro* tests with the recombinant protein showed that certain purine derivatives confer thermal stability, suggesting that they could bind at specific sites. ITC assays confirmed that hypoxanthine and guanine have high affinity for this domain, with K_d of 2.5 μM and 7.0 μM , respectively. In addition, X-ray diffraction crystallography revealed that it has a double Cache-like topology, consistent with previous computational predictions, and that a single molecule of hypoxanthine or guanine binds to the distal subdomain. Residues involved in this interaction were identified, and such prediction was validated through the analysis of specific mutant proteins.

On the other hand, Chapter II tested the hypothesis that the two chemosensing pathways of *H. titanicae* KHS3, Che1 and Che2, signal independently. To do so, complementation assays were performed in *E. coli* strains mutated in certain chemotaxis genes with the respective homologous genes of *H. titanicae* KHS3, and their behavior on soft agar plates or the receptor methylation pattern by western blot was evaluated. The results showed that, unlike the proteins of the Che1 system, neither CheW2, nor Htc10 nor CheR2 were able to interact with the chemotactic machinery of *E. coli*, suggesting that this pathway assembles independently from canonical systems and does not directly interact with them. Sequence alignments allowed the identification of residue replacements in the interaction surfaces of the signaling complexes that could determine the observed specificity.

Finally, Chapter III includes a brief analysis of the phenotypic effects of mutations in certain genes of the Che2 pathway in *H. titanicae* KHS3. Alterations were generated by deletion of *cheB2*, disruption of *htc10*, or overexpression of *cheR2*, and the capacity for biofilm formation (by quantification of biomass adhered to microtubes with crystal violet) and motility in liquid medium (by direct observation under microscope and by soft agar plate assays) was evaluated. The results show that when the pathway is overactivated, the adhered biomass increases and mobility decreases, suggesting that the Che2 system could be involved in biofilm formation. The partial reversal of the exacerbated biofilm by expression of an exogenous phosphodiesterase supports the hypothesis that these effects are due to an increase in the concentration of the intracellular messenger c-di-GMP. Inspection of colony and macrocolony morphology in the presence of Congo Red indicates that downstream responses could involve an increase in exopolysaccharide production, consistent with the similar Wsp system from *P. aeruginosa*.

In summary, this study provides evidence that Che2 forms complexes independently of Che1, that hypoxanthine and guanine specifically bind to the periplasmic sensing domain of Htc10, and that genetic alterations in the Che2 pathway in *H. titanicae* affect biofilm formation and cell motility. This contribution could have implications for understanding the evolution and diversity of chemotaxis systems in different bacteria and enables future characterizations in this species with potential biotechnological applications.

INTRODUCCIÓN

I. Generalidades sobre sistemas bacterianos de quimioseñalización

Varias son las peculiares características que permiten a una célula mantenerse con vida, una de las más fascinantes es la irritabilidad, es decir, la capacidad de *darse cuenta* del medio que la rodea y *actuar* en consecuencia.

Las bacterias, por supuesto, no son una excepción. De hecho, son particularmente hábiles en percibir el medio y generar respuestas fisiológicas rápidas y adecuadas, lo que les posibilita habitar diferentes ambientes, algunos muy cambiantes otros incluso muy hostiles. Estos diminutos seres son la forma de vida más abundante de nuestro planeta, y si bien muchos se encuentran libres en el ambiente, otros son feroces patógenos capaces de invadir distintos organismos o mutualistas que desarrollaron fuertes vínculos con diversos eucariotas. Por tanto, el estudio de los mecanismos involucrados en la detección y procesamiento de los estímulos del entorno, además de ser intelectualmente interesante, tiene relevancia médica y económica. No obstante, nuestros modelos actuales lejos están de brindarnos una *completa* comprensión de las complejas herramientas, desarrolladas por evolución, que existen detrás de estos fenómenos.

Podríamos decir que los mecanismos moleculares más caracterizados son aquellos especializados en detectar *sustancias químicas*, y genéricamente se denominan **sistemas de quimiosensado o quimioseñalización**. Dentro de este grupo se encuentran los famosos **sistemas de dos componentes**, gracias a los cuales muchas bacterias pueden modular la expresión de sus genes, el patrón de movimiento, o la actividad de ciertas proteínas, como transportadores de membrana o enzimas, en respuesta a la presencia de ciertas moléculas en el medio circundante.

¿Qué son los sistemas de dos componentes?

El advenimiento de nuevas tecnologías de clonado y secuenciación de ácidos nucleicos en la década del 70, trajo consigo grandes avances en el campo de la biología molecular. En este contexto, en 1986 Nixon, Ronson y Ausubel publicaron un trabajo de secuenciación de los genes *ntrB* y *ntrC* de *Bradyrhizobium*, cuyos productos se sabía que regulan la expresión de genes involucrados en la asimilación de nitrógeno (Nixon et al., 1986). La comparación de las secuencias obtenidas con las bases de datos disponibles puso en evidencia que algunos de los posibles genes homólogos de *ntrB* (es decir, que tienen relación evolutiva cercana) también funcionan de a *pares* para regular la expresión génica en respuesta a ciertos estímulos ambientales (como por ejemplo *envZ*, que junto a *ompR* regulan la expresión de porinas en respuesta a cambios de osmolaridad). Para explicar la transducción de señales por los productos de estos pares génicos, Nixon y colaboradores propusieron un modelo al que llamaron **sistemas regulatorios de dos componentes**.

El esquema básico consiste en dos proteínas, una capaz de sensor el ambiente y la otra encargada de desencadenar la respuesta celular, que se comunican por fosfotransferencia (Papon & Stock, 2019). En la Figura 1 se encuentra una representación de este modelo, que ha sido pulido por incontables investigaciones posteriores.

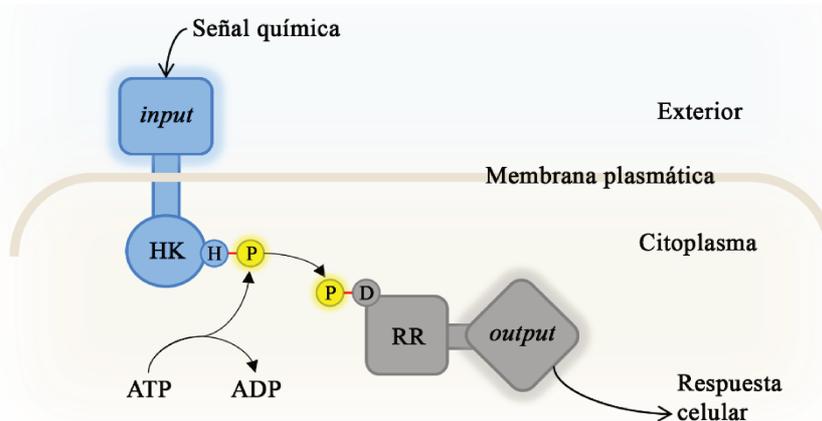
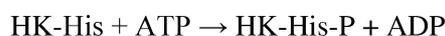


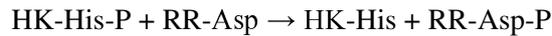
Figura 1. Sistema de dos componentes clásico anclado a la membrana plasmática. El residuo His (H) del dominio histidín quinasa (HK) de la proteína sensora (celeste) es capaz de recibir el grupo γ -fosforilo (P) del ATP, mediante una reacción catalizada por la misma HK y modulada por la señal detectada por el dominio *input*. El grupo P se transfiere al residuo Asp (D) del dominio regulador de respuesta (RR) de la proteína efectora (gris), y esta modificación conlleva la respuesta del sistema, mediante el dominio *output*.

Las proteínas sensoras suelen estar ancladas en la membrana plasmática y están compuestas por dos dominios unidos, uno *input* o sensor, normalmente extracelular, y uno histidín quinasa (HK) intracelular. Los estímulos son detectados selectivamente por el dominio sensor y la señal viaja hacia el citoplasma gracias a cambios conformacionales que, finalmente, modularán la actividad quinasa. En su conformación activa, HK es capaz de autofosforilarse en un residuo conservado de histidina (Figura 1):

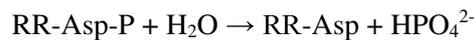


La segunda proteína, típicamente citosólica, consta de un dominio *receiver* o regulador de respuesta (RR), con un residuo conservado de aspartato susceptible a ser fosforilado, y un dominio *output* o

efector. Para que el Asp se fosforile, el dominio RR debe aproximarse a HK fosforilada y catalizar su propia fosforilación utilizando fosfohistidina como sustrato:



El dominio *output* es el encargado de generar la respuesta celular. Podría ser, por ejemplo, un factor de transcripción inhibido por RR no fosforilado, en cuyo caso la respuesta del sistema está relacionada con la regulación de la expresión de ciertos genes a nivel transcripcional. Normalmente, la célula es capaz de restablecer las condiciones intracelulares previa al estímulo mediante la desfosforilación de RR, una hidrólisis espontánea que puede ser catalizada por fosfatasas específicas o por el dominio HK inactivo al que está asociado:



De esta manera, los sistemas de dos componentes, en muchos casos con sofisticadas variaciones evolutivas, permiten a las células adaptar su fisiología en función de las señales detectadas por sus proteínas sensoras, y así, poder tomar provecho de entornos ventajosos y enfrentar los desfavorables. Ver reseñas (Sourjik & Armitage, 2010; Zschiedrich et al., 2016).

Si bien estos sistemas están ampliamente distribuidos en bacterias no son exclusivos de éstas, también están presentes en arqueas y en ciertos eucariotas no animales, y su esquema de funcionamiento está muy conservado (Wuichet et al., 2010).

Un sistema de dos componentes particular: el sistema de quimiotaxis de *Escherichia coli*

Es bien sabido que ciertas células son capaces de direccionar sus movimientos para acercarse o alejarse de ciertas sustancias, denominadas atrayentes o repelentes respectivamente. Este fenómeno de *movilidad* en respuesta a *gradientes químicos* se conoce como **quimiotaxis**, y desde su descubrimiento ha sido extensamente investigado en diversos microorganismos, aunque el modelo más estudiado es la famosa bacteria intestinal *Escherichia coli*.

Este bacilo es capaz de explorar su entorno gracias a la presencia de entre cuatro y seis proyecciones extracelulares, conocidas como **flagelos** (ver Figura 2 A), que le permiten desplazarse en medio líquido. Cada flagelo está constituido por tres grandes complejos de naturaleza proteica (Figura 2 B): un largo **filamento** extracelular, un **cuerpo basal** y una estructura flexible curvada conocida como **gancho**.

El filamento es un cilindro rígido y hueco cuyo movimiento impulsa a la célula (Yonekura et al., 2003). Está principalmente conformado por miles de subunidades de una proteína globular conocida como flagelina (o FliC), que se ubican en once filas paralelas, levemente inclinadas, situadas alrededor del eje principal (O'Brien & Bennett, 1972); cada fila se denomina protofilamento (Figura 2 B). Dependiendo de la interacción entre flagelinas en los protofilamentos, estos pueden ser de dos tipos, R (con curvatura dextrógira respecto al eje longitudinal, independientemente de los otros protofilamentos) o L (que es levógira), y ambos pueden estar presentes en el mismo filamento (Nedeljković et al., 2021). Un filamento *normal* de *E. coli* es una superhélice levógira compuesta por nueve protofilamentos tipo L y dos de tipo R.

La base de cada filamento está unida mediante el gancho a una estructura altamente organizada conocida como cuerpo basal, que no sólo se encarga de anclar el filamento a la superficie celular, sino que también tiene un papel fundamental en el movimiento flagelar. Se trata de un conjunto de anillos alrededor de un eje cilíndrico (Figura 2 C y D) que conforman literalmente un motor molecular capaz de utilizar el flujo de protones a través de la membrana, a favor del potencial electroquímico, para rotar el complejo en los dos sentidos posibles, horario (CW, por *clockwise*) o antihorario (CCW, por *counterclockwise*) (Walz & Caplan, 2002). Asimismo, este sentido de rotación afecta la conformación del filamento. Cuando el motor gira CCW (visto desde el extremo distal del filamento hacia el cuerpo celular (Berg, 2003) genera, en la superhélice levógira del filamento, una onda helicoidal responsable de impulsar la célula (Macnab, 2003). Pero si el motor cambia el sentido de rotación a CW, se genera una torsión que produce cambios estructurales que aumentan la proporción de protofilamentos tipo R, lo que ocasiona que el filamento adopte conformaciones dextrógiras, como semienrollado o *curly* tipo I (Calladine, 1978). Estos cambios son reversibles, es decir si el motor vuelve a rotar CCW el filamento volverá a adoptar su conformación inicial.

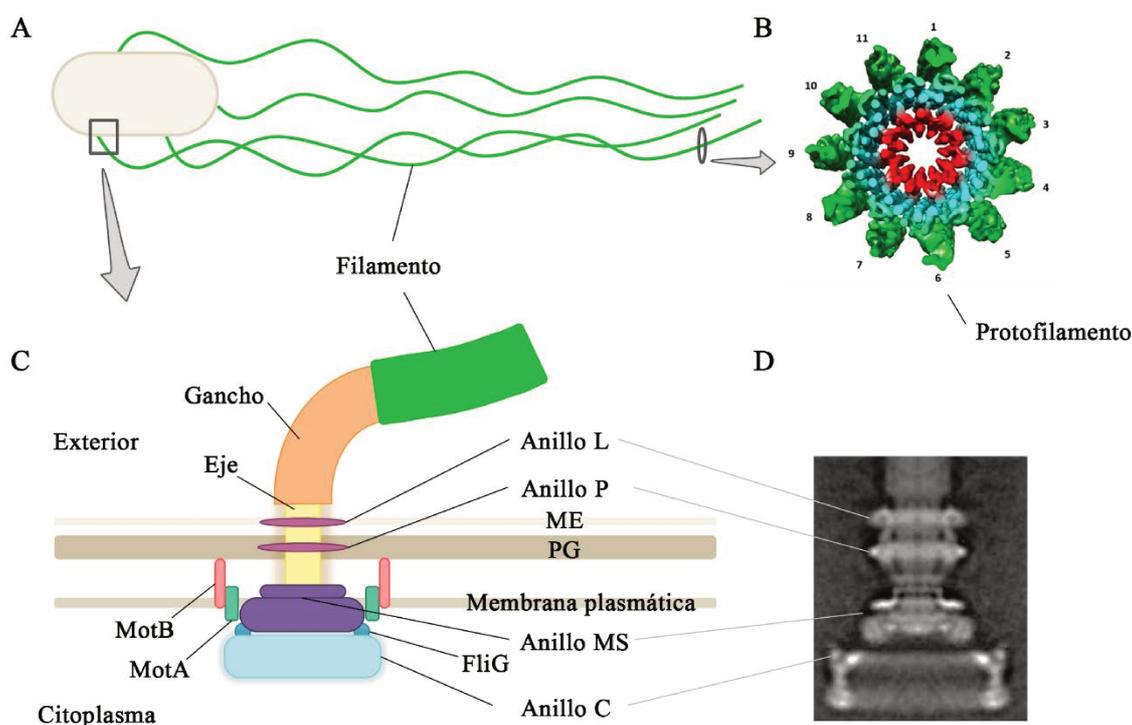


Figura 2. Flagelo bacteriano del bacilo Gram negativo *E. coli*. A. Esquema global de una célula mostrando 4 flagelos peritricos, es decir distribuidos alrededor de la superficie celular. B. Corte transversal de un filamento. La disposición de flagelinas (monómeros) genera un patrón de 11 protofilamentos alrededor de un cilindro hueco. Adaptado de (Nedeljković et al., 2021). C. Esquema de la base de un flagelo, mostrando el cuerpo basal conectado con la base del filamento mediante el gancho. El cuerpo basal está compuesto por un conjunto de anillos alrededor de un eje principal cuyos nombres provienen de las estructuras a las que están asociadas: L (de lipopolisacárido), P (por peptidoglucano) y MS (por membrana plasmática y supramembrana) (DePamphilis & Adler, 1971a, 1971b; Ueno et al., 1992). Además, contiene un motor constituido por un rotor (anillo citoplasmático C junto a la proteína FliG), responsable de la generación de torque, y un estator (arreglos de las proteínas de membrana MotA y MotB), que contiene los canales de H⁺ y el anclaje con la capa de peptidoglucano (Francis et al., 1994; Khan et al., 1992; Macnab, 2003). PG: capa de peptidoglucano; ME: membrana externa. D. Micrografía electrónica de transmisión del cuerpo basal, mostrando los anillos L, P, MS y C. Adaptado de Berg, 2003).

El movimiento global de la bacteria está afectado por el movimiento individual de sus flagelos. Cuando todos giran CCW, sus filamentos forman un haz paralelo al eje longitudinal que impulsa a la bacteria en rápidas **corridas** hacia adelante (Schuster & Khan, 1994). Si uno o más flagelos pasan a rotar CW, sus filamentos sufren cambio de estructura y abandonan el haz, generando propulsiones caóticas conocidas como **tumbos**, que permiten a la célula redireccionar su trayectoria. De este modo, la bacteria es capaz de explorar eficientemente el espacio alternando entre corridas y tumbos (Figura 3).

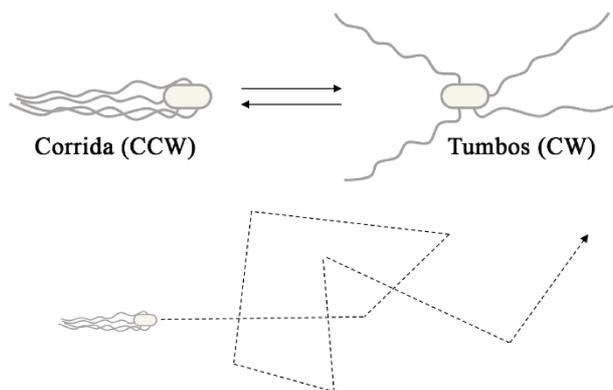


Figura 3. Esquemización del patrón de movimiento de *E. coli*. Esta bacteria se desplaza por corridas en línea recta (rotación flagelar CCW) alternadas por tumbos de redirección (rotación CW). Con línea de puntos se esquematiza el movimiento bacteriano. La frecuencia de tumbos es menor que la de corridas y está determinada por la presencia de los estímulos químicos del entorno.

El cambio en el sentido de rotación flagelar está controlado por un sofisticado sistema de dos componentes denominado **sistema de quimiotaxis** (Hazelbauer & Lai, 2010; Parkinson et al., 2015; Sourjik & Armitage, 2010). Contiene una histidín quinasa (HK) conocida como CheA, que en su forma activa fosforila al respectivo regulador de respuesta (RR), una proteína citosólica de dominio único llamada CheY capaz de difundir hasta los cuerpos basales.

La rotación de los motores flagelares es por defecto CCW, pero cuando la forma fosforilada de CheY (CheY-P) interactúa con el anillo C del cuerpo basal flagelar (Sarkar et al., 2010), cambia el sentido de rotación a CW, y en consecuencia se genera un tumbo. Sin embargo, gracias a la acción de la fosfatasa específica CheZ la vida media de CheY-P es muy corta, de este modo cuando el sistema está inactivo la célula se desplaza a través de corridas (CCW), y sólo mientras CheA está activamente generando CheY-P aumenta la proporción de tumbos (CW).

El modelo básico del sistema de quimiotaxis se basa en dos posibles estados de actividad de la quinasa, activo e inactivo, y las condiciones extracelulares modulan la transición entre ambos como lo esquematiza la Figura 4 (Hazelbauer et al., 2008).

En este sistema, la magnífica tarea de detectar selectivamente la amplia variedad de compuestos a los que la bacteria puede responder es llevada a cabo por proteínas transmembrana peculiares que se denominan en forma genérica quimiorreceptores o MCPs (del inglés *methyl-accepting chemotaxis protein*). Éstas comunican a CheA la presencia de estímulos químicos en el entorno, detectados por sus regiones extracelulares, mediante cambios conformacionales que atraviesan la membrana plasmática.

Así, en condiciones desfavorables, representadas por concentraciones decrecientes de atrayentes o creciente de repelentes, las MCPs adoptan una conformación tal que mantienen a la quinasa activa (HK-ON), generando altas concentraciones de CheY-P, y por tanto favorecen los tumbos con cambios de dirección en búsqueda de ambientes mejores. Pero cuando los quimiorreceptores detectan aumento en la concentración de atrayentes (o disminución en la de repelentes), que indican condiciones favorables, cambian la conformación de sus dominios citosólicos e inactivan la quinasa (HK-OFF), favoreciendo corridas en línea recta. Así, podríamos decir que existe un equilibrio entre el estado HK-ON y el HK-OFF, y que la presencia de atrayentes desplaza dicho equilibrio hacia la forma HK-OFF. Es importante mencionar que para el correcto acoplamiento entre las MCPs y CheA es esencial la presencia de la proteína especializada CheW.

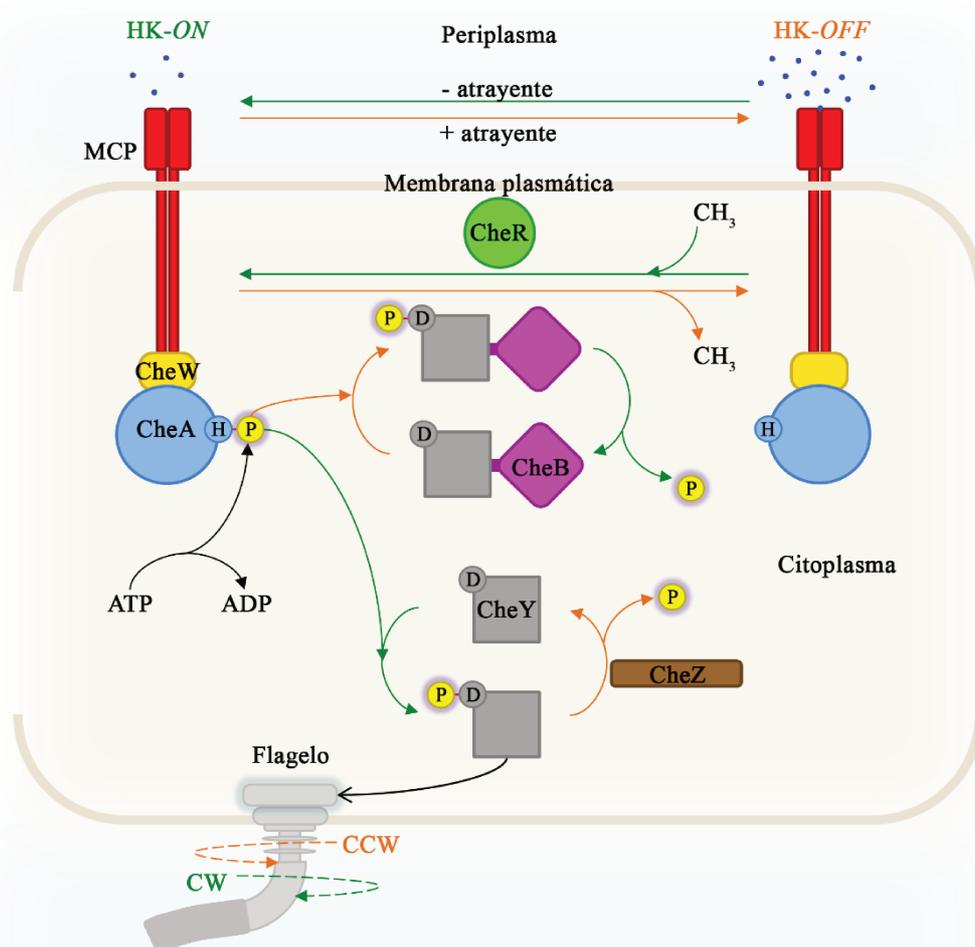


Figura 4. Sistema de quimiotaxis de *E. coli*. Los receptores (MCP), la quinasa (CheA) y la proteína acopladora (CheW) forman un complejo ternario con dos posibles estados: quinasa activa (HK-ON, color verde oscuro) o inactiva (HK-OFF, color naranja). Cuando la quinasa está activa, se autofosforila en un residuo de His (H) y luego transfiere el grupo fosforilo (P) a residuos conservados de Asp (D) del dominio regulador de respuesta de CheB y a CheY. En el esquema, las líneas verdes son las reacciones que llevan la síntesis de CheY fosforilado, el cual genera que el flagelo rote en sentido CW (flecha con línea punteada): disminución de la concentración de atrayentes, o metilación de MCP catalizada por CheR. Por otro lado, las líneas naranjas corresponden a situaciones en la que disminuye la concentración de CheY fosforilado, de modo que el flagelo rotará CCW: aumento de la cantidad de atrayente, o demetilación de MCPs, catalizada por CheB fosforilada. Adaptado de (Hazelbauer et al., 2008).

De esta manera, el modelo explica la capacidad de controlar los movimientos flagelares en función de cambios en la concentración de una determinada sustancia química. Sin embargo, el sistema de quimiotaxis le permite a *E. coli* detectar gradientes de concentración de una sustancia a lo largo de varios órdenes de magnitud, y esto se debe a la presencia de un aparato de adaptación compuesto por proteínas, denominadas CheR y CheB, capaces de modificar el estado de metilación de la región citoplasmática de las MCPs, causando cambios conformacionales que terminan restableciendo la actividad de CheA a los niveles previos al estímulo. CheR es una metiltransferasa que cataliza la reacción de metilación de residuos específicos de glutamato de las MCPs que forman complejo en estado HK-OFF y, por otro lado, CheB es una metilesterasa que tiene mayor afinidad por las MCPs en estado HK-ON y cataliza la hidrólisis de grupos metilglutamato. Así, por ejemplo, cuando un compuesto sensado por las MCPs desplaza el equilibrio del complejo de señalización hacia la forma HK-OFF, CheR aumenta su actividad y, consecuentemente, aumenta el grado de metilación de las MCPs, lo que genera que el complejo adquiera conformación HK-ON, y la bacteria experimente aumento de tumbos. En esta condición, será necesaria mayor concentración de quimioefector para volver a desplazar el equilibrio hacia la forma HK-OFF y que la bacteria retome las corridas. CheB genera el efecto opuesto, equilibrando la acción de CheR. Además de su dominio catalítico, CheB contiene un dominio RR, susceptible de ser fosforilado por CheA y así aumentar la actividad del dominio catalítico, lo que afecta la velocidad de los procesos de demetilación. La acción conjunta de estas enzimas permite restablecer la condición previa al estímulo, por lo que la célula puede hacer comparaciones temporales del quimioefector presente, y de ese modo, detectar un amplio rango de concentraciones (Hazelbauer & Lai, 2010).

Este elegante modelo da cuenta del comportamiento quimiotáctico de *E. coli*, pero no es exclusivo de éste. Se han identificado sistemas homólogos en diversas bacterias, algunos de los cuales también han sido extensamente estudiados.

Detalles moleculares del modelo canónico de quimiotaxis

En la presente sección se expondrán detalles relevantes sobre el funcionamiento de este sistema, con el objetivo de contextualizar apropiadamente al lector y facilitar la comprensión de los resultados y discusiones incluidas en los capítulos posteriores.

Los quimiorreceptores modulan la actividad de la quinasa CheA

Escherichia coli es capaz de responder a diversos de compuestos gracias a la presencia de 5 quimiorreceptores, Tar, Tsr, Tap, Trg y Aer, siendo los dos primeros los más abundantes (Parkinson et al., 2015). Tar, nombrado así por *taxis to aspartate and repellents* (Springer et al., 1977), es el receptor que media la respuesta hacia los atrayentes L-aspartato y maltosa y hacia ciertos repelentes como Ni²⁺ y Co²⁺ (Hazelbauer, 1975; Mesibov & Adler, 1972; Springer et al., 1977; Tso & Adler, 1974), y Tsr, por *taxis to serine and repellents* (Parkinson, 1975), es el encargado de la quimiotaxis hacia L-serina (y análogos como α -aminoisobutirato) y hacia el autoinductor general de *quorum sensing* AI-2 (Bansal

et al., 2008; Hazelbauer et al., 1969; Hegde et al., 2011; Springer et al., 1977). Las MCPs Tap y Trg están a cargo de la quimiotaxis hacia dipéptidos y pirimidina (Liu & Parales, 2008; Manson et al., 1986), y ribosa y galactosa (Harayama et al., 1979), respectivamente. Finalmente, Aer es responsable de la respuesta a oxígeno a través de la detección del estado redox de su cofactor asociado (Bibikov et al., 1997). Gran parte de lo que sabemos actualmente sobre MCPs deriva de las investigaciones que han sido dedicadas principalmente a Tar y Tsr.

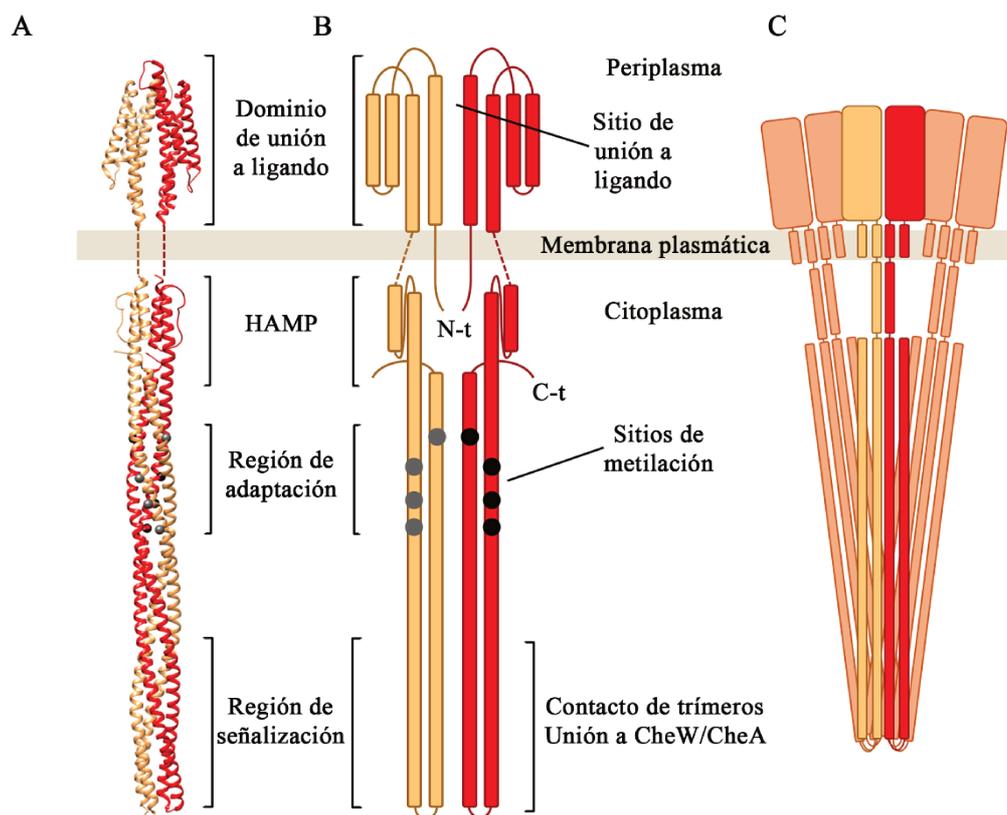


Figura 5. Modelos de MCPs de *E. coli*. **A.** Estructura de un homodímero de Tsr, compuesto por región periplasmática PDB:3ATP (Tajima et al., 2011) y región citoplasmática PDB:3ZX6 (Ferris et al., 2014). **B.** Representación esquemática del receptor de serina Tsr. Pueden observarse sus módulos: dominio sensor o de unión a ligando, flanqueado por dos hélices transmembrana, dominio HAMP (compuesto por hélices paralelas), y horquilla citoplasmática con una región de adaptación (con sitios para modificaciones postraduccionales, pelotas negras y grises) y una de señalización (que interactúa con CheA y CheW). **C.** Esquema de un trímero de dímeros. Los trómeros pueden estar constituidos por dímeros del mismo receptor o ser mixtos.

Las MCPs normalmente se encuentran formando trímeros de dímeros (Ames et al., 2002; Kim et al., 1999; Studdert & Parkinson, 2004). Cada unidad dimérica presenta regiones con distinto grado de conservación (Falke & Hazelbauer, 2001) (Figura 5). En el extremo N-terminal de cada polipéptido suele encontrarse la zona menos conservada, el dominio sensor o de unión a ligando (LBD, por *ligand binding domain*), que en Tar, Tsr, Tap y Trg, está flanqueado por dos hélices transmembrana, TM1 (N-terminal) y TM2 (C-terminal), de modo que queda expuesto al espacio periplasmático. Estos LBDs adoptan una topología de un manojo de cuatro α -hélices denominado 4HB (por *four-helix bundle*) (Á. Ortega et al., 2017; Yeh et al., 1993) en cuyas superficies se encuentran los sitios específicos para la unión con los respectivos ligandos. Ciertos quimioefectores se unen directamente al LBD [como serina

en Tsr (Lin et al., 1994) o aspartato en Tar (Milburn et al., 1991)], pero otros requieren de una proteína periplasmática capaz de mediar dicha unión; como maltosa, que se une a Tar gracias a la proteína de unión a maltosa MBP, por *maltose binding protein* (Gardina et al., 1992). De cualquiera de las dos formas, cuando el quimioefector se une al LBD se desencadena una serie de cambios estructurales reversibles que afectan la dinámica conformacional de la región citoplasmática. En Tar, por ejemplo, se ha demostrado que estos cambios empiezan por un pequeño desplazamiento de la hélice TM2 de 1,6 Å en dirección perpendicular a la membrana (Chervitz & Falke, 1996).

En el extremo C-terminal de TM2, en el citosol, se encuentra un dominio modular presente también en otros sistemas, conocido como HAMP [por su presencia en *histidine kinases*, *adenyl cyclases*, *methyl-accepting proteins* y *phosphatases* (Aravind & Ponting, 1999)]. Está compuesto por unos 50 residuos en forma de dos α -hélices paralelas (Figura 5) conectadas por un *linker* flexible (Hulko et al., 2006), que en el dímero forma un haz de hélices cuya conformación está fuertemente influenciada por la posición de TM2 (Bi et al., 2018).

Cuando el dominio HAMP sufre una perturbación estructural afecta la conformación de una larga horquilla flexible, con estructura α -hélice superenrollada antiparalela, en la que dos vueltas de hélice corresponden a una héptada de aminoácidos (Parkinson et al., 2015). En base al análisis bioinformático de miles de quimiorreceptores predichos, Alexander y Zhulin plantearon que los receptores se pueden agrupar en *familias* según la cantidad de héptadas presentes en esta horquilla de señalización (Alexander & Zhulin, 2007). Por ejemplo, los receptores de la familia 38H tienen 19 héptadas de aminoácidos en cada rama de esta horquilla. Este dominio altamente conservado de aproximadamente 550 residuos contiene sitios específicos tanto de unión a CheA, CheW y otras MCPs, como de metilación. La conformación de este subdominio, influenciada por la presencia de ligandos y por el estado de modificación de los residuos de la zona de adaptación, modula la actividad de CheA (Gao et al., 2019).

CheA y CheW interactúan con las MCPs para formar grandes complejos de señalización

La quinasa CheA es una proteína grande compuesta por alrededor de 650 residuos que forman cinco dominios separados por *linkers* de distintas longitudes (Figura 6)(Baker et al., 2006). Estos dominios son estructural y funcionalmente distintos, y esto permitió estudiarlos como módulos independientes (Swanson et al., 1993).

Anteriormente se mencionó que las histidín quininasas (HKs) son capaces de autofosforilarse en un residuo de His, a partir de ATP, y luego transferir el grupo fosforilo a un dominio regulador de respuesta (RR). El residuo de His clave para esta fosfotransferencia se encuentra en el extremo N-terminal de CheA (en posición 48 de CheA de *E. coli*) formando parte un de un dominio compuesto principalmente por cuatro α -hélices y denominado P1, que pertenece a la familia de dominios proteicos HPT (por *histidine phosphotransfer domain*) (Zhou et al., 1995). Cuando ese residuo de histidina está fosforilado, es capaz de transferir su grupo fosforilo a un residuo Asp del dominio *receiver* del RR CheY (Sanders et al., 1989), mediante una reacción catalizada por el propio RR (Lukat et al., 1992). El dominio P2,

conectado a P1 por un *linker* muy flexible de aproximadamente 25 residuos, es el encargado de unirse con CheY y mantenerlo próximo a P1, aumentando la concentración local y, consecuentemente, la velocidad de fosfotransferencia. Consta de cuatro hebras- β antiparalelas enfrentadas a dos α -hélices, formando un núcleo hidrofóbico que mantiene los residuos que participan en la interacción con CheY expuestos al solvente (McEvoy et al., 1996).

La mayoría de las HKs, incluyendo a CheA, forman homodímeros que se autofosforilan en conformación *trans*, es decir, una HK cataliza la transferencia del grupo γ -fosforilo de una molécula de ATP hacia el N3 del grupo imidazol de la His de P1 de la subunidad adyacente (Figura 6 C). El dominio medio P3 es el que permite esta dimerización (Swanson et al., 1993); está formado por dos hélices antiparalelas que se empaquetan junto a las hélices análogas de la otra subunidad, y forman un arreglo estable (Bilwes et al., 1999).

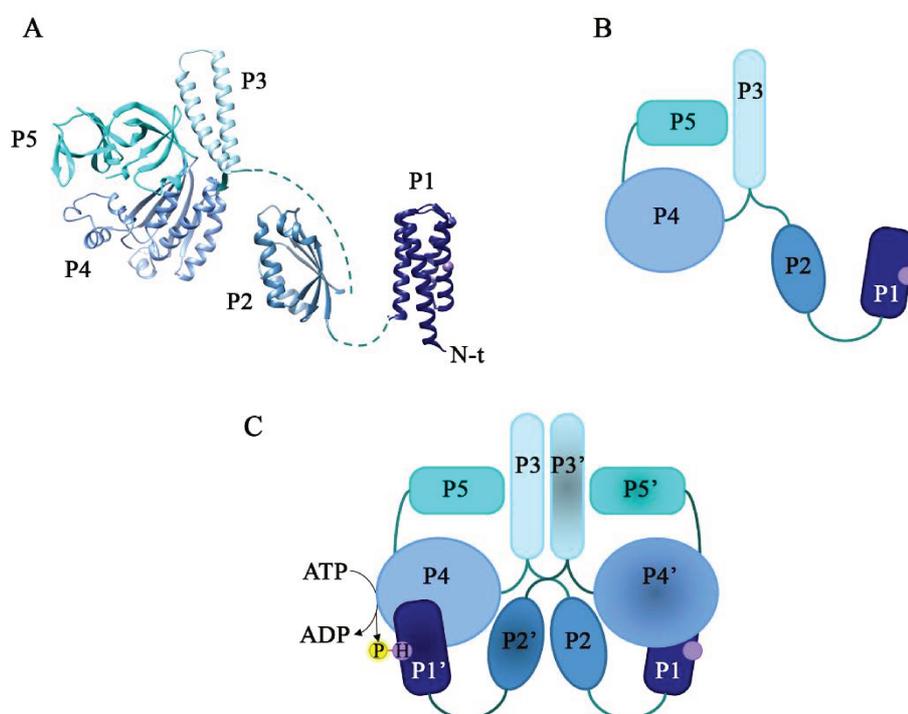


Figura 6. Representaciones de la histidín quinasa CheA. **A.** Estructura cristalina de los dominios P1 PDB:1TQG (Quezada et al., 2004), P2 PDB:1U0S (Park et al., 2004) y P3P4P5 PDB:1B3Q (Bilwes et al., 1999), unidos por una línea de puntos que representa *linkers* flexibles, de CheA de *Thermotoga maritima*. **B.** Esquema de CheA mostrando sus 5 dominios. La His fosforilable se marcó como una esfera violeta. **C.** Arquitectura de un homodímero de CheA, que se mantiene unido por la interacción entre P3 y P3'. P4 cataliza la fosforilación del residuo de His (H) de P1' de la subunidad adyacente, utilizando ATP como sustrato (P4' fosforila a P1).

En el extremo C-terminal de P3, luego de un conector flexible, se encuentra el dominio P4 con actividad quinasa, es decir, que cataliza la fosforilación de la histidina (Muok et al., 2020). Se compone de un núcleo central con tres α -hélices empaquetadas contra cinco hojas β , y otras tres hélices que rodean el sitio de unión a Mg^{2+} (que funciona como cofactor) y ATP (Bilwes et al., 1999). En estado HK-ON, la conformación es tal que P4 está próximo a P1 y P2, lo que estimula su actividad enzimática (Parkinson et al., 2015).

El último dominio de CheA, P5, es el encargado de la regulación, ya que recibe la información conformacional de las MCPs gracias a que interactúa con la proteína acopladora CheW. P5 y CheW comparten topología; ambos contienen dos subdominios estructurales (SD1 y SD2), cada uno compuesto por cinco hebras- β entrelazadas que forman un barril torcido (Bilwes et al., 1999; Li et al., 2007). Como puede observarse en la Figura 7 D, los barriles de distintas moléculas interactúan en sentido cabeza-cola formando anillos pseudo-hexagonales (Briegel et al., 2012; Li et al., 2013). A su vez, los barriles de una misma molécula están separados por una hendidura central hidrofóbica con la que se unen a un dímero del trímero de MCPs.

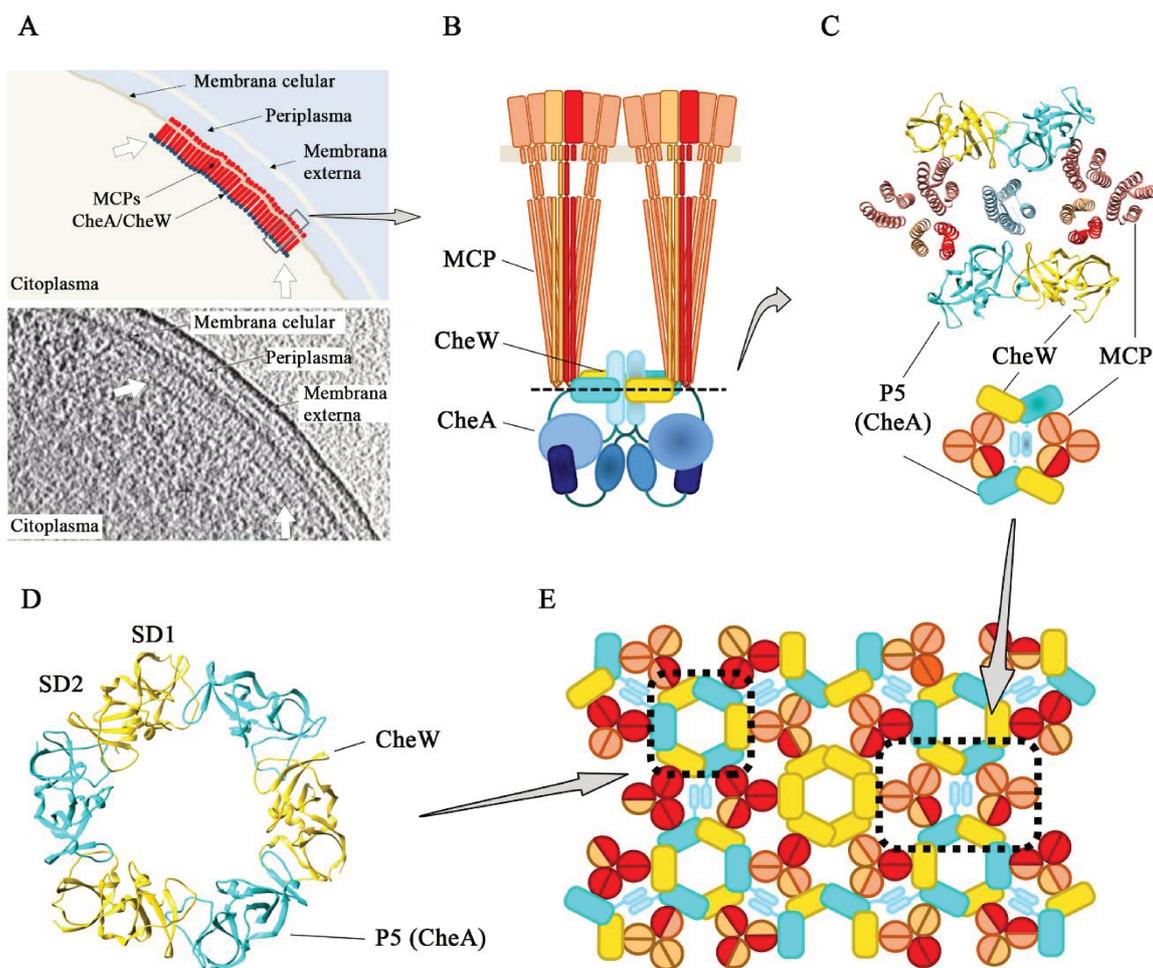


Figura 7. Complejo de señalización de quimiotaxis. **A.** Micrografía electrónica (abajo) y su esquema (arriba) mostrando estos complejos que suelen ubicarse en los polos de la célula. Adaptado de (Hazelbauer et al., 2008). **B.** Vista longitudinal de la unidad estructural que compone los complejos de señalización. Cada unidad está compuesta por un homodímero de CheA (se observa cada unidad con sus cinco dominios en tonos azules, y una de las subunidades tiene sombreado) y un par de CheWs (dorado), unidas a dos trímeros de dímeros de MCPs (tonos rojizos). **C.** Vista transversal de la unidad estructural, a la altura de la línea punteada de B. Abajo se muestra un esquema y arriba la respectiva estructura PDB:6S1K (Cassidy et al., 2020). **D.** Estructura cristalina de los anillos pseudo-hexagonales de CheW (amarillo) y el dominio P5 de CheA (cian), PDB:4JPB (Li et al., 2013). Cada proteína cuenta con dos barriles β torcidos (SD1 y SD2); SD1 de P5 interactúa con SD2 de CheW, y viceversa. **E.** Las unidades estructurales se ensamblan en un complejo de mayor tamaño. Cada trímero interactúa con tres anillos hexagonales, uno de los dímeros interactúa con P5 y los otros dos con CheWs.

Los contactos entre estas proteínas generan grandes complejos estables y ordenados, pocos por célula, que se ubican principalmente en los polos (Figura 7 A) (Maddock & Shapiro, 1993; Zhang et al.,

2007). En la Figura 7 B y C se observa un esquema de la unidad estructural de estos arreglos y las interacciones entre sus proteínas: un homodímero de CheA (cada subunidad forma parte de un anillo P5/CheW distinto) se une a dos trímeros de dímeros y a dos moléculas de CheW. El ensamblaje de estas unidades forma una red funcional de señalización (Figura 7 E), en la que cada receptor puede modular a varias quinasas, otorgando alta sensibilidad por amplificación (Ud-Din & Roujeinikova, 2017). Además, la integración de las múltiples señales detectadas permite a la bacteria explorar eficientemente ambientes con gradientes mixtos.

El aparato de adaptación es una característica distintiva

Los receptores de quimiotaxis pueden ser covalentemente modificados por la acción de CheR y CheB, lo que afecta la actividad de CheA. La metilación de las MCPs contrarresta los efectos de la unión del ligando y contribuye al fenómeno de adaptación al restablecer la actividad de señalización de los receptores a pesar de la presencia continua del estímulo.

Por un lado, CheR es una proteína de menos de 300 residuos que forman dos dominios, uno N-terminal, que consta de cuatro hélices empaquetadas perpendicularmente, y uno C-terminal conectados por un *linker* corto (Djordjevic & Stock, 1997). El núcleo del dominio C-terminal, capaz de unir S-adenosilmetionina (SAM), consiste en una variación de un plegamiento de Rossmann en la que una lámina- β de siete hebras está flanqueada por α -hélices (Figura 8 A). CheR cataliza la transferencia directa de un grupo metilo de SAM al carboxilo de la cadena lateral de ciertos residuos específicos de glutamato del dominio citoplasmático de los receptores de quimiotaxis (Springer & Koshland, 1977), generando como subproducto S-adenosilhomocisteína (SAH):

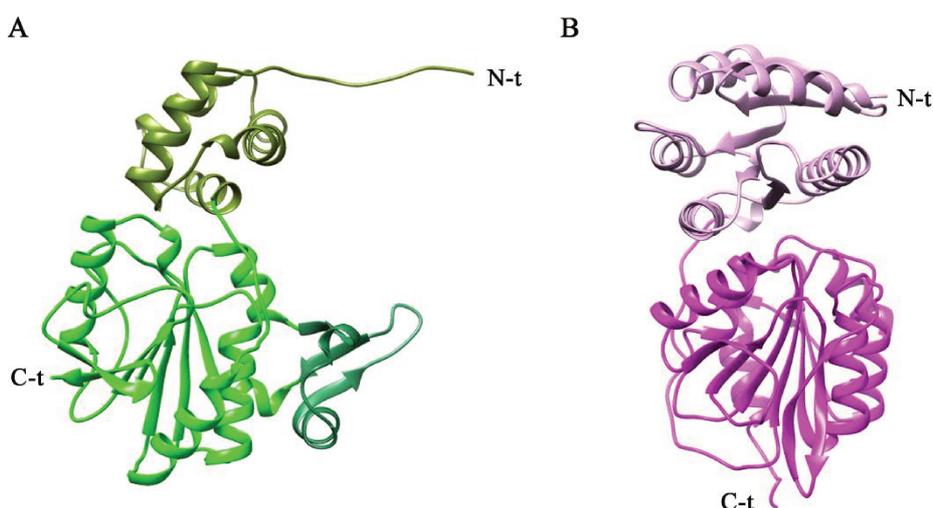


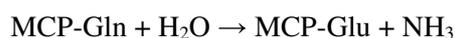
Figura 8. Estructura de las proteínas de adaptación. **A.** Estructura de CheR de *Salmonella enterica* PDB:1AF7 (Djordjevic & Stock, 1997). Con verde oliva el dominio N-terminal (N-t) y con verde claro el dominio C-terminal (C-t); el subdominio β de este último se ha coloreado con verde más oscuro. **B.** Estructura de CheB de *S. enterica* PDB:1A2O (Djordjevic et al., 1998). El dominio fosforilable N-t se coloreó de rosa claro y el catalítico C-t de fucsia.

La topología del dominio C-terminal de CheR se encuentra en otras metiltransferasas dependientes de SAM previamente caracterizadas, sin embargo, en CheR se ha identificado la inserción de un subdominio adicional, al que se llamó subdominio β , que como lo muestra la Figura 8 A consiste en tres hebras- β y una α -hélice (Djordjevic & Stock, 1998). Este *loop*, junto al dominio N-terminal, está involucrado en la unión a los cinco residuos C-terminal de algunos quimiorreceptores (Barnakov et al., 1999; Djordjevic & Stock, 1998; Wu et al., 1996), lo que permite el reclutamiento de la enzima.

CheB2, por otro lado, es la proteína encargada de revertir la modificación generada por CheR. Se trata de una enzima de aproximadamente 350 residuos capaz de catalizar la hidrólisis de los ésteres metílicos restituyendo los residuos de glutamato (Stock & Koshland, 1978):



Cada receptor contiene múltiples sitios de modificación en dos regiones de la secuencia polipeptídica que espacialmente están próximas (ver Figura 5). El receptor de aspartato de *E. coli* Tar, por ejemplo, contiene cuatro sitios principales susceptibles a ser modificados (Terwilliger et al., 1983; Terwilliger & Koshland, 1984), dos de los cuales son glutamatos (E302 y E491) y dos glutaminas (Q295 y Q309). La reacción de deamidación necesaria para que las glutaminas cambien a glutamatos, y así puedan ser metiladas por CheR, también es catalizada por CheB:



En cuanto a su organización, CheB se compone de dos dominios funcionales separables, uno C-terminal con el sitio activo, y un dominio regulador N-terminal que incluye el sitio de fosforilación y controla la actividad metilesterasa (Lupas & Stock, 1989; Stewart, 1993). El dominio catalítico comparte una similitud estructural con CheR (Figura 8 B), lo que podría reflejar un origen evolutivo común, aunque esta enzima no utiliza un cofactor de nucleótidos (West et al., 1995).

Sistemas no canónicos: *Pseudomonas* como modelo

Es común que proteínas que funcionan conjuntamente estén codificadas en genes que están próximos en el genoma, formando grupos o *clusters*, lo que ayuda a que la bacteria regule su expresión conjuntamente. Este es el caso del sistema de quimiotaxis de *Escherichia coli*; sus genes forman un *cluster* conocido como *che* (por *chemotaxis*) que codifica *cheA*, *cheW*, *tar*, *tap*, *cheR*, *cheB*, *cheY* y *cheZ* (ver Figura 9 A). Los genes de los receptores Tsr, Trg y Aer están distribuidos en el genoma.

Con la secuenciación masiva de genomas completos se ha evidenciado que existen *clusters* homólogos a *che* en diversos organismos. A diferencia de lo que ocurre en *E. coli*, en muchas bacterias y especialmente en las ambientales, existen múltiples sistemas de transducción de señales de este tipo y un gran número de genes de quimiorreceptores, hecho que se correlaciona con la mayor exposición a entornos cambiantes. Además, varias de las proteínas que forman el núcleo central de estos sistemas suelen presentar duplicaciones (con distinto grado de conservación) y/o contener dominios adicionales. Se estima que cada una de estas vías son adaptaciones de un esquema básico moldeado evolutivamente

para cumplir diversas funciones celulares, entre las que se encuentra la quimiotaxis (Alexandre et al., 2004; Wuichet & Zhulin, 2010).

Un ejemplo particularmente interesante es el patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa*, que tiene cinco *clusters* tipo quimiotaxis en su genoma (Figura 9 A) que codifican proteínas que forman cuatro complejos de señalización independientes (Figura 9 B, C, D y E), conocidos como Che I (*cluster* I y V), Che II (*cluster* II), Wsp (*cluster* III o *wsp*) y Chp (*cluster* IV), y un total de 26 MCPs que señalizan por estas rutas (D. R. Ortega et al., 2017; Stover et al., 2000).

Debido a la gran cantidad de trabajos dedicados a estas vías, *Pseudomonas* es un excelente modelo de estudio de la compleja quimioseñalización en bacterias ambientales. Para una descripción detallada puede consultarse (Matilla et al., 2021).

Che I de *P. aeruginosa* es bastante similar al sistema Che de *E. coli* en cuanto a estructura, funcionalidad y localización subcelular (Güvener et al., 2006; Kato et al., 1999), y la mayoría de MCPs (23 de las 26 totales) señalizan por esta vía (D. R. Ortega et al., 2017). Esta bacteria presenta un único flagelo polar, por lo que cuando su motor rota en sentido horario (CW) no genera tumbos, como los antes descritos, sino movimientos rectos en sentido opuesto al de desplazamiento por corridas (rotación CCW) (Cai et al., 2016; Qian et al., 2013). En este caso, la frecuencia y duración de la pausa del motor flagelar son esenciales para el comportamiento quimiotáctico que Che I controla.

En cuanto a los genes del *cluster* II, sus productos forman un grupo en el polo celular, pero en regiones distintas a Che I (Güvener et al., 2006; D. R. Ortega et al., 2020), que le permite señalar de manera independiente mediante un único receptor citoplasmático denominado McpB (D. R. Ortega et al., 2017, 2020). Si bien se ha determinado que los genes de este *cluster* se expresan en fase estacionaria (Schuster et al., 2004), la función de este sistema en gran parte se desconoce, aunque ha sido relacionado con quimiotaxis (Ferrández et al., 2002; Hong et al., 2004) y virulencia (Garvis et al., 2009). Sin embargo, los experimentos que lo vinculan con quimiotaxis no han podido ser posteriormente replicados (Güvener et al., 2006; Watts et al., 2011), y los reportes de virulencia no indican ningún mecanismo de acción del regulador de respuesta CheY2 fosforilado.

Por otro lado, Chp (por *chemosensory pili*) está asociado con un tipo particular de movilidad sobre superficies sólidas, denominada *twitching*, que se basa en ciclos de extensión, adhesión a la superficie y retracción de un apéndice polar conocido como pili tipo IV (Darzins, 1994; Whitchurch et al., 2004). La extensión es resultado de la polimerización de la subunidad proteica que compone el pili, PilA, y la retracción es producto de la despolimerización (Merz et al., 2000; Skerker & Berg, 2001). Al igual que Che II, Chp es modulado por un único receptor, PilJ, (D. R. Ortega et al., 2017) que en su conformación activa genera que la quinasa, ChpA, fosforile a los dos reguladores de respuesta que contiene este sistema, PilG y PilH. Éstos, a su vez, interactúan con las enzimas encargadas de polimerización y despolimerización (Bertrand et al., 2010). Además, PilG y PilH se relacionan con un sistema asociado a la adenil ciclasa CyaB (Fulcher et al., 2010; Inclan et al., 2016), por lo que cuando Chp está activo

también controla la síntesis de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), que estimula la producción del pili y de factores de virulencia (Beatson et al., 2002; Berry et al., 2018; Fulcher et al., 2010).

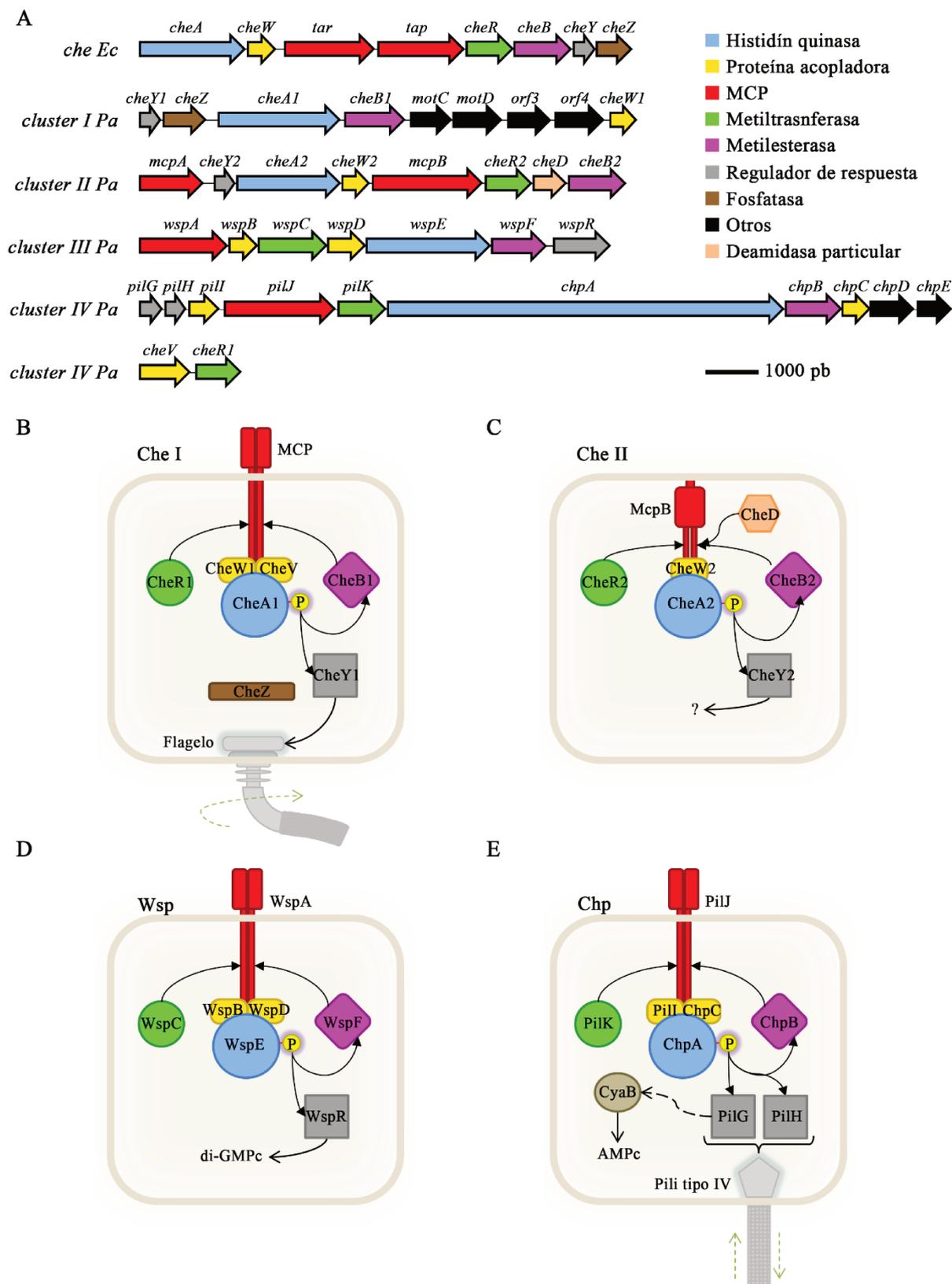


Figura 9. Sistemas de quimioseñalización de *P. aeruginosa* PAO1. A. Representación esquemática de los cinco clusters (I-V) tipo quimiotaxis de *P. aeruginosa* (*Pa*), y en la parte superior el cluster *che* de *E. coli* (*Ec*). El código de colores se muestra en la parte superior izquierda, aunque muchos productos tienen dominios extra (como *wspR*,

que tiene un dominio adicional diguanilato ciclasa), son híbridos (como *cheV*, una CheW fusionada a un dominio CheY), no forman parte del modelo canónico de quimiotaxis (CheD), o, hasta donde se sabe, no forman parte del núcleo central de la vía (color negro). **B.** Sistema Che1 (*clusters* I y V), funcionalmente similar a Che de *E. coli*. **C.** Modelo de funcionamiento de Che II (*cluster* II). McpB no tiene dominios transmembrana, pero se encuentra anclada mediante dominios HAMP. No hay reportes sobre el mecanismo de acción de CheY2. McpA, aunque esté codificada en el *cluster* II, señala por Che I. **D.** Sistema Wsp (*cluster* III). En su estado fosforilado, el regulador de respuesta fusionado a un dominio diguanilato ciclasa (WspR) aumenta su actividad enzimática produciendo di-GMPc que tiene consecuencias en la formación de biopelículas. **E.** Sistema Chp (*cluster* IV). Cuando los reguladores de respuesta PilG y PilH están fosforilados, interactúan con el aparato de polimerización y despolimerización del pili tipo IV (permitiendo la movilidad tipo *twitching*) y con el sistema que incluye la enzima CybB, favoreciendo la síntesis de AMPc.

Cabe mencionar que se planteó la hipótesis de que una señal mecánica podría estimular esta vía: las células planctónicas (de vida libre, no adheridas) extienden y retraen su pili mientras nadan, pero cuando esta estructura retráctil se adhiere a un sustrato, la posterior retracción genera una tensión que induciría una modificación que la célula lee químicamente a través de la interacción entre PilA y PilJ (Persat et al., 2015).

Finalmente, la cuarta vía de *P. aeruginosa*, denominada Wsp (por *wrinkly spreader phenotype*), tiene la notable particularidad de que su regulador de respuesta, WspR, no se une a la base de ninguna estructura de movimiento, sino que, al estar fusionado a un dominio con actividad enzimática, cumple una función alternativa (Wuichet & Zhulin, 2010). Esta enzima es una **diguanilato ciclasa** (DGC), que cataliza la síntesis de diguanilato cíclico (di-GMPc) a partir de GTP (Hickman et al., 2005):



Esta vía también es controlada por un único quimiorreceptor receptor, WspA, de localización tanto polar como lateral (Güvener & Harwood, 2007; O'Connor et al., 2012), que modula la actividad de la quinasa asociada, WspE. Cuando WspR está fosforilada se estimula su actividad enzimática, de modo que aumentan los niveles de di-GMPc en la célula y se desencadenan respuestas río abajo relacionadas con la formación de biopelículas (De et al., 2008; Hickman et al., 2005; Huangyutitham et al., 2013). Las biopelículas o *biofilms* son comunidades bacterianas embebidas en una matriz extracelular que las mantiene unidas y normalmente adheridas a alguna interfase (Costerton et al., 1999).

Si bien el modelo de quimiotaxis puede explicar gran parte del funcionamiento de los sistemas no canónicos, tanto sus mecanismos moleculares característicos como las señales que los controlan, no están completamente dilucidados y su estudio constituye un activo campo de investigación.

II. *Halomonas titanicae* KHS3

Halomonas titanicae KHS3 es una cepa bacteriana aislada en nuestro laboratorio a partir de una muestra marina contaminada con hidrocarburos tomada del puerto de Mar del Plata, Argentina (D'Ippólito et al., 2011). Este bacilo Gram negativo, perteneciente al linaje *Gammaproteobacteria*, es móvil debido a flagelos peritricos y muestra fuerte respuesta quimiotáctica hacia diversos compuestos que puede metabolizar, como glucosa, glicerol, citrato, salicilato y fenantreno (Figura 10) (Gasperotti et al., 2018).

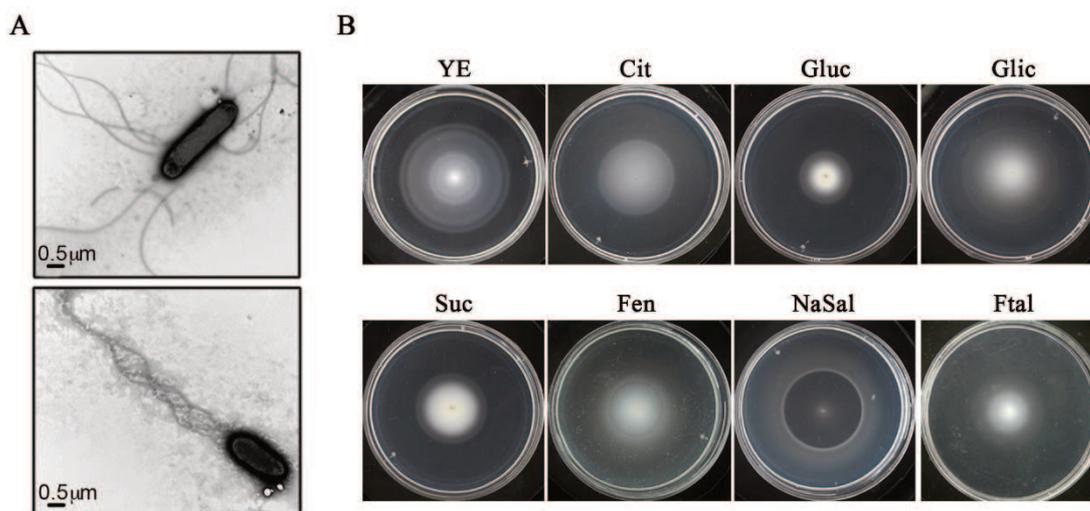


Figura 10. Células de *H. titanicae* KHS3 y su comportamiento quimiotáctico. **A.** Imágenes de esta cepa bacteriana obtenidas por TEM (microscopía electrónica de transmisión). Dos tipos de disposición de flagelos se observaron: desordenados (arriba) o formando un haz (abajo). **B.** Quimiotaxis en placas de agar blando (detalles de esta técnica se presentan en el Capítulo II) con medio mínimo suplementado con diversas fuentes de carbono: extracto de levadura (YE) 0,25% m/V, citrato de sodio (Cit) 25 mM, glucosa (Gluc) 25 mM, glicerol (Glic) 25 mM, succinato de sodio (Suc) 25 mM, fenantreno (Fen) 50 μg/mL, salicilato de sodio (NaSal) 25 mM y ftalato (Ftal) 50 μg/mL. Adaptado de (Gasperotti et al., 2018).

Los microorganismos del género *Halomonas* han cobrado importancia en los últimos años desde el punto de vista biotecnológico (Yin et al., 2014). Su habilidad para degradar compuestos xenobióticos y la capacidad de crecer en un amplio rango de concentraciones de NaCl, en algunos casos hasta 25% m/V (Sánchez-Porro et al., 2010), los convierten en un interesante blanco para procesos de biorremediación. Otra aplicación relevante que se podría mencionar es la producción de poliésteres naturales biodegradables (polihidroxialcanoatos) que pueden servir como sustitutos a los derivados plásticos del petróleo (Chen & Jiang, 2018).

Sin embargo, actualmente hay escasa o nula información acerca de la quimiotaxis y de otras vías de señalización en estos organismos. Con el objetivo de estudiar aspectos básicos de estos sistemas, se utilizó la cepa *H. titanicae* KHS3 como modelo, y se obtuvo la secuencia completa de su genoma (Gasperotti et al., 2015).

Sistemas homólogos a los de quimiotaxis de *Halomonas titanicae* KHS3

El análisis de la secuencia genómica reveló la presencia de varios genes homólogos a los de quimiotaxis de *Escherichia coli* dispuestos en dos *clusters* o grupos (Gasperotti et al., 2018), a los que llamamos *che1* (RO22_21445-RO22_21485) y *che2* (RO22_21155-RO22_21190), y cada uno codifica un *set* completo de proteínas.

Los genes del *cluster che1* (*che1 Ht*) tienen una organización semejante a los del *cluster che* de *E. coli* (*che Ec*) (Figura 11), y el grado de homología entre ambos sistemas es relativamente alto (Gasperotti et al., 2018), lo que hace presumir que éste sería el responsable del comportamiento quimiotáctico convencional de la bacteria. Los genes codificados en este *cluster* incluyen tres MCPs (*htc11*, *htc12* y *htc13*), una histidín quinasa (HK) *cheA1*, una proteína acopladora *cheW1*, un regulador de respuesta (RR) de dominio único *cheY1*, una fosfatasa específica *cheZ1*, y un sistema de adaptación compuesto por una metiltransferasa *cheR1* y una metilesterasa *cheB1*.

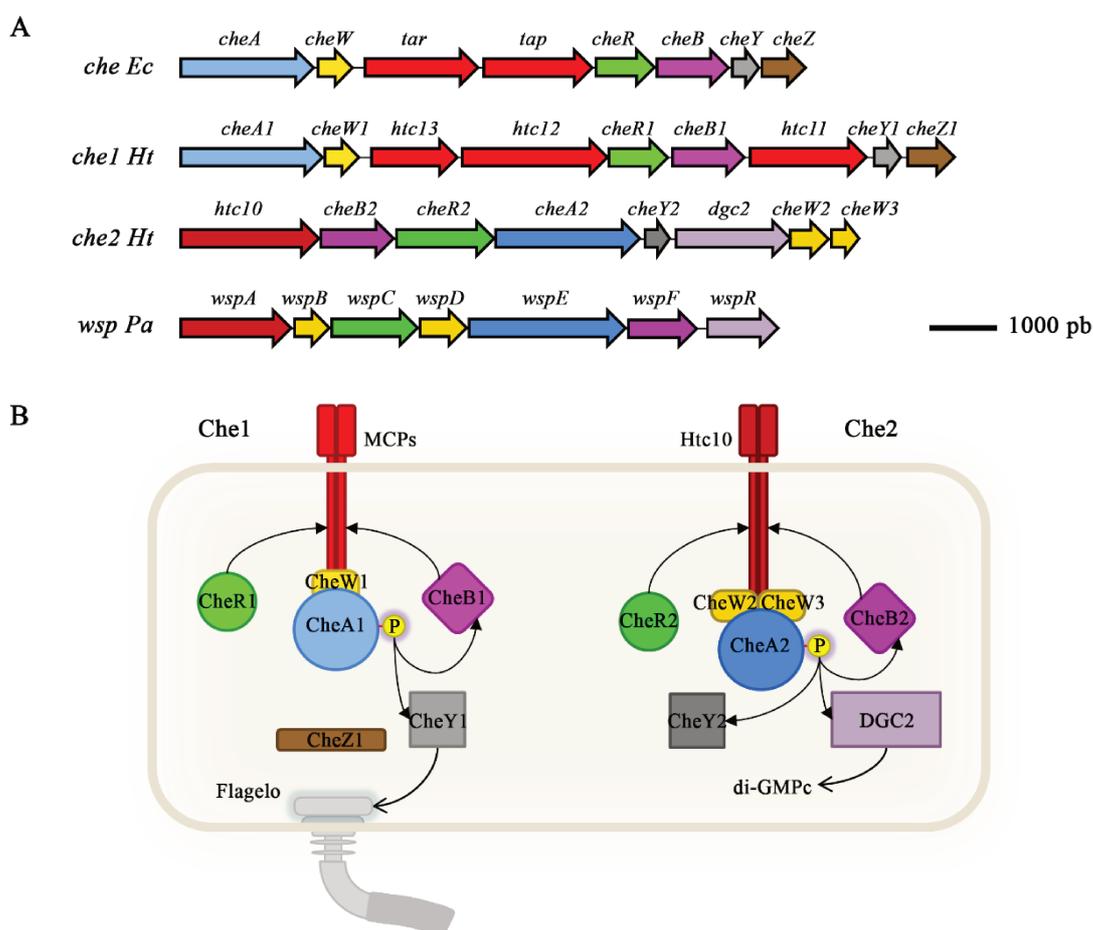


Figura 11. Sistemas de señalización tipo quimiotaxis de *H. titanicae* KHS3. A. Grupos de genes *che1* y *che2* de *H. titanicae* (*Ht*), junto al *cluster che* de *E. coli* (*Ec*) y al *cluster wsp* de *P. aeruginosa* (*Pa*). Los genes de los *clusters che Ec* y *che1 Ht* siguen el código de colores de la Figura 9, y los de *che2 Ht* y *wsp Pa* tienen tonos similares, pero más oscuros. B. Sistemas de señalización Che1 y Che2, e hipótesis de funcionamiento independiente de ambas vías (Gasperotti et al., 2018).

El *cluster che2* (Figura 11), por otra parte, codifica presuntamente un quimiorreceptor (*htc10*), dos proteínas acopladoras (*cheW2* y *cheW3*), una HK (*cheA2*), tres proteínas con dominios RR (una de

dominio único, *cheY2*, una asociada a un dominio diguanilato ciclasa predicho, *dgc2*, y una unida a una metilesterasa canónica, *cheB2*), y finalmente una metiltransferasa (*cheR2*) (Gasperotti et al., 2018). Las secuencias de estos genes están anexadas como material suplementario (Anexo I). Sus respectivos productos formarían un sistema de señalización, que denominamos Che2, cuyas secuencias (disponibles en el Anexo II) muestran menor conservación respecto a las proteínas del sistema Che de *E. coli* que la observada para las proteínas de la vía Che1. Además, las proteínas codificadas en el *cluster che2* presentan ciertas características particulares (Gasperotti et al., 2018). CheA2 carece del dominio de unión a CheY (P2) pero contiene un dominio RR adicional en el extremo C-terminal, y a CheW3 le faltan dos hebras- β que formarían el barril de la subunidad SD1, importantes para la interacción con la quinasa. La metiltransferasa CheR2 está fusionada a un dominio extra C-terminal compuesto por repeticiones tetra trico péptidos (TPR, por *tetratricopeptide repeat*), que son dominios ubicuos en la naturaleza, incluso presentes en eucariotas, caracterizados por 2-20 repeticiones de una horquilla α -hélice antiparalela de 34 residuos, y que se han vinculado con la unión a otras proteínas y la formación de complejos multiproteicos funcionales (Perez-Riba & Itzhaki, 2019), aunque su rol preciso en sistemas de quimiosensado de este tipo no ha sido dilucidado (Muñoz-Martínez et al., 2012). Por otro lado, DGC2 presenta, en su extremo N-terminal, un dominio HPt (*histidine phosphotransfer domain*, similar a P1 de CheA) N-terminal y dos RR, indicando que la fosfotransferencia podría involucrar un mecanismo de *phosphorelay* (Stock et al., 2000), es decir, CheA2 se fosforilaría en His de P1, el grupo fosforilo se transferiría intramolecularmente a Asp de su RR, luego a His del dominio HPt de DGC2 y finalmente a un Asp de alguno de los RR de esta última. La presencia de dominios RR fusionados a la diguanilato ciclasa permite suponer que, similar a Wsp, el sistema Che2 podría estar involucrado en alguna función celular alternativa a la de quimiotaxis relacionada con la síntesis de di-GMPc.

El análisis preliminar de las horquillas citosólicas de todos los receptores predichos de *H. titanicae* KHS3 (los tres del *cluster che1*, el que está codificado en *che2* y otros 21 dispersos por el genoma) permitió clasificarlos en las familias propuestas por Alexander y Zhulin (Alexander & Zhulin, 2007): todos pertenecen a la familia 36H excepto Htc10, el receptor presente en el *cluster che2*, que se clasificó en el grupo 40H. Trabajos previos indican que los trímeros de dímeros están formados por MCPs que pueden ser de igual o distinta especificidad, pero necesariamente de igual longitud (es decir, que pertenezcan a la misma familia) (Herrera Seitz et al., 2014), por lo que el quimiorreceptor Htc10 podría ensamblar y señalizar de manera independiente.

Este proyecto de tesis abordará el estudio de aspectos básicos sobre la funcionalidad y organización del sistema de transducción de señales del que participa el *cluster che2* de *H. titanicae* KHS3. El Capítulo I es un estudio de la estructura y los ligandos específicos de Htc10, el Capítulo II incluye un análisis de la función de ciertas proteínas de este sistema y del cruzamiento de la señalización con el sistema Che1, y finalmente el Capítulo III un acercamiento al fenotipo relacionado con la vía Che2.

Esta caracterización no sólo aportará al conocimiento del sistema codificado en el *cluster che2*, sino que también es una contribución al entendimiento general de los sistemas de quimiosensado de esta especie biotecnológicamente interesante.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar un sistema de transducción de señales relacionado con quimiotaxis, denominado Che2 y codificado en el *cluster che2*, del aislamiento ambiental *Halomonas titanicae* KHS3.

Objetivos específicos

1 – Caracterizar la movilidad y la capacidad de formación de *biofilm* de *Halomonas titanicae* KHS3.

Se evaluará el comportamiento de la cepa salvaje en cuanto a estas características usualmente afectadas por los niveles intracelulares de diguanilato cíclico.

2 – Evaluar el rol del *cluster che2* en la movilidad y formación de *biofilm*.

Se generarán mutantes por delección en genes principales del *cluster* por técnicas de reemplazo génico y/o se sobreexpresarán genes exógenos, y luego se comparará el comportamiento con el de la cepa salvaje.

3 – Analizar la función de cada proteína del *cluster che2*.

Como herramienta para estudiar las funciones de las proteínas del *cluster che2* de *H. titanicae* KHS3, se realizarán ensayos de complementación en células de *Escherichia coli*. Con respecto a los

componentes característicos del *cluster* se evaluará su función de distintas maneras. Para el receptor, se analizará su capacidad de activar la quinasa CheA de *E. coli*, y también se clonará y expresará su dominio periplasmático y se evaluará la capacidad de unir ligandos *in vitro*. Para la metiltransferasa y la diguanilato ciclasa, se evaluarán específicamente sus capacidades de metilar el receptor del *cluster* o incrementar los niveles intracelulares de di-GMPc, respectivamente.

4 – Analizar las proteínas del *cluster che2* en cuanto a interacción entre ellas o con otras proteínas de quimiotaxis de *Halomonas*.

Se evaluará la especificidad de las metiltransferasas codificadas en los dos *cluster* de quimiosensado de *H. titanicae* KHS3, y la posible interacción de las proteínas del sistema Che2 con las de los sistemas de quimiotaxis.

CAPÍTULO I

Estudios estructurales del dominio de unión a ligando de Htc10

Los receptores tipo quimiotaxis o quimiorreceptores (MCP, por *methyl-accepting chemotaxis protein*) son proteínas capaces de captar señales ambientales específicas y, mediante cambios conformacionales, activar o inhibir la respuesta del sistema de transducción de señales al cual están vinculados. Para esto, las MCPs cuentan con un dominio sensor o de unión al ligando (LBD, por *ligand binding domain*) normalmente extracelular, ya que está flanqueado por dos segmentos transmembrana, y una larga horquilla citoplasmática (Parkinson et al., 2015). Esta horquilla es la que interactúa con otras proteínas de la vía, por lo que su secuencia está bastante conservada. Por el contrario, los dominios sensores son las regiones menos conservadas y pueden adoptar distintos plegamientos; esto se debe a que han sido evolutivamente moldeados para unir un sinnúmero de moléculas (Gavira et al., 2020). La estructura de un LBD se puede determinar de manera experimental (por ejemplo, por cristalografía por difracción de rayos X) o por modelado computacional, aunque existen pocas familias estructurales comparado con el enorme repertorio de ligandos que sensan (Á. Ortega et al., 2017).

La cantidad y la especificidad de receptores depende del hábitat al cual la cepa bacteriana está adaptada. El análisis del genoma de la bacteria marina *Halomonas titanicae* KHS3 reveló que ésta contiene un total de 25 MCPs, 23 de las cuales contienen LBDs y en su mayoría con el mismo plegamiento que los receptores de *Escherichia coli* (4HB, por *four-helix bundle*), aunque también hay representantes de otras familias estructurales (Gasperotti et al., 2018).

Uno de los 25 receptores de *H. titanicae*, denominado Htc10, es el que se encuentra codificado en el *cluster che2*, y la mayor longitud de su dominio citoplasmático es indicio de que se ensamblaría en complejos de señalización independientes de las otras MCPs. A partir del modelado molecular de su LBD se hipotetiza que Htc10 tiene una topología de tipo doble Cache (Gasperotti et al., 2018).

Cache es un tipo de dominio *extracelular* particularmente distribuido en bacterias, que tiene un papel en el reconocimiento de moléculas pequeñas en una amplia gama de proteínas, incluyendo los canales de calcio y los receptores de quimiotaxis (*chemotaxis*), de donde proviene su nombre. Los dominios Cache se caracterizan por una región N-terminal, con tres hebras- β y una α -hélice, y una porción C-terminal que consta de algunas hebras- β seguida de una región relativamente desestructurada (Anantharaman & Aravind, 2000). Por otro lado, la familia estructural doble Cache se caracteriza por la presencia de dos dominios Cache en tándem, uno distal y otro proximal a la membrana plasmática, que comparten una α -hélice principal. Los ligandos normalmente se unen de manera directa al subdominio Cache distal (Gavira et al., 2018; Liu et al., 2015; Mckellar et al., 2015; Ud-Din et al., 2020), aunque también se ha reportado la unión directa al Cache proximal (Machuca et al., 2017), o la unión indirecta mediada por una proteína periplasmática (Glekas et al., 2012).

Actualmente no existe un método que permita predecir el ligando de una determinada MCP a partir de la secuencia o la estructura de su LBD. Esto podría revertirse acrecentando las respectivas bases de datos, lo que alienta a estudiar no sólo la especificidad de quimiorreceptores, sino también su mecanismo de monitoreo de señales.

El presente capítulo incluye el clonado y la expresión del LBD de Htc10 (LBDHtc10), búsqueda de ligandos *in vitro* y su cristalización en presencia de los posibles ligandos. Estos estudios son un aporte esencial a la caracterización del sistema de quimiosensado del *cluster che2*.

Objetivos

- Clonar y expresar en forma recombinante el LBD de Htc10
- Identificar posibles ligandos de LBDHtc10 a través de ensayos *in vitro*
- Determinar la estructura de LBDHtc10 en presencia de ligandos mediante cristalografía de proteínas por difracción de rayos X
- Validar los resultados estructurales obtenidos mediante experimentos de mutagénesis

Materiales y métodos

Material biológico y medios de cultivo

Cepas

En este capítulo se utilizaron las siguientes cepas bacterianas:

- *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen): F– *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galE15 galK16 rpsL* (Str^R) *endA1* λ –*
- *E. coli* BL21 (Novagen): F– *ompT gal dcm lon hsdS_B*(r_B– m_B–) [*malB+*]_{K-12}(λ^S)

Medios de cultivo

Los cultivos de *E. coli* se crecieron en LB: triptona (Difco) 1% m/V, extracto de levadura (Difco) 0,5% m/V, NaCl (Baker) 0,5% m/V. En caso de utilizar antibióticos, se agregó al medio kanamicina (Km, Genbiotech) 50 μ g/mL y/o cloranfenicol (Cm, Fluka) 25 μ g/mL. Para placas el medio se suplementó con agar (Difco) 1,2% m/V.

Cebadores

Tabla 1. Cebadores o primers diseñados para clonado o QuickChange. F significa *forward* y R *reverse*. La secuencia de los sitios de restricción se marca con negrita.

Nombre	Secuencia	Descripción	Sitio
nFR3	5'-AAAACCATGGGACTTCAAGCACGTTACACAGC-3'	Clonado de <i>lbdhlc10</i> (F)	NcoI
nFR8	5'-GAAACTCGAGCTCCAGGAAGCGCTCGTG-3'	Clonado de <i>lbdhlc10</i> (R)	XhoI
nFR51	5'-GGTCGGGGCTACTTTTTCCAAGTGC-3'	Mutación Y125F (F)	
nFR52	5'-GCGCAGTTGGAAAAAGTAGCCCCGACC-3'	Mutación Y125F (R)	
nFR53	5'-CGCTTACGAGCTAGCTTTAGCTAGCGACACCTTCTC-3'	Mutación N161A y D163A (F)	
nFR54	5'-GAGAAGGTGTCGCTAGCTAAAGCTAGCTCGTAAGCG-3'	Mutación N161A y D163A (R)	
nFR55	5'-CCTTTGTGTACGTCGCTTATCGCAGCACG-3'	Mutación N177A (F)	
nFR56	5'-CGTGCTGCGATAAGCGACGTACACAAAGG-3'	Mutación N177A (R)	

Plásmidos

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este capítulo.

Nombre	Características	Fuente
pET28a	Km ^R , inducible por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)	Novagen

pKJE7	Cm ^R , codifica las chaperonas DnaK-DnaJ-GrpE, inducibles por L-arabinosa	Takara Bio Inc
pFR2	Derivado de pET28a que codifica el LBD de Htc10 de KHS3, clonado entre los sitios NcoI y XhoI	Este trabajo
pLBDHtc10-FNDN	Derivado de pFR2, con la mutación Y125F	Este trabajo
pLBDHtc10-YAAN	Derivado de pFR2, con las mutaciones N161A y D163A	Este trabajo
pLBDHtc10-FAAN	Derivado de pFR2, con las mutaciones Y125F, N161A y D163A	Este trabajo
pLBDHtc10-YNDA	Derivado de pFR2, con la mutación N177A	Este trabajo
pLBDHtc10-FAAA	Derivado de pFR2, con las mutaciones Y125F, N161A, D163A y N177A	Este trabajo

Clonado de *lbdhtc10*

Amplificación del gen

El fragmento que codifica para el dominio periplasmático del quimiorreceptor Htc10, LBDHtc10, (94-927) se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por *polymerase chain reaction*), usando ADN genómico purificado como molde y los *primers* nFR3 y nFR8 (sus secuencias se muestran en la Tabla 1). La mezcla de reacción contenía Taq (PB-L Productos Bio-lógicos) 1,5 U, dNTPs (PB-L Productos Bio-lógicos) 0,5 mM, MgCl₂ (PB-L Productos Bio-lógicos) 3 mM, 0,25 μM de cada oligonucleótido (Tabla 1) y *buffer* 1X de reacción (PB-L Productos Bio-lógicos). Los ciclos de PCR fueron: (95 °C, 1 min) x 1; (95 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; 72 °C, 1 min) x 31; (72 °C, 5 min) x 1, en termociclador T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad). El producto fue visualizado por electroforesis en geles de agarosa 1% m/V en *buffer* TBE 1X [tris(hidroximetil)aminometano -Tris, SigmaAldrich- 89 mM llevado a pH 8,0 con HCl 6 M -Cicarelli-, ácido bórico 89 mM -Genbiotech-, ácido etilendiaminotetraacético -EDTA, SigmaAldrich- 2 mM].

Digestión enzimática de ADN

Tanto el producto de amplificación (previamente purificado con el *kit* comercial EasyPure Quick Gel Extraction Kit de Transgenbiotech) como el vector de expresión pET28a (obtenido con el *kit* comercial EasyPure Plasmid MiniPrep Kit) fueron digeridos con las enzimas NcoI (Thermo Fisher) y XhoI (Thermo Fisher). Las reacciones fueron realizadas en las condiciones recomendadas por el fabricante.

Ligación

La ligación de ADN se llevó a cabo con T4 ADN ligasa (Promega) empleando una relación 3:1 inserto:vector en *buffer* provisto por el fabricante. La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C.

Preparación de células competentes

Para la obtención de células competentes, 25 mL de LB fueron inoculados 1% V/V con un cultivo saturado de *E. coli* y se incubaron a 37 °C. Después de 1,5 h, las células se cosecharon (5000 x g 10 min), se resuspendieron en 10 mL de CaCl₂ (Merck) 0,1 M frío, y se incubaron 30 min en baño de hielo. Pasado este tiempo se centrifugó de nuevo, y finalmente las células se resuspendieron en 2,5 mL de CaCl₂ 0,1 M (a 4 °C) con glicerol 15% V/V.

Transformación

Para la transformación de *E. coli*, 200 µL de células competentes se incubaron junto al producto de ligación en baño de hielo por 30 min. Luego de realizar choque térmico de 2 min a 42 °C, se agregaron 800 µL de LB y se incubaron 30 min a 37 °C. Finalmente, las células transformadas se seleccionaron en placas de LB suplementado con antibiótico.

Análisis de transformantes

Algunas colonias de *E. coli* Top10 transformantes se cultivaron en medio LB líquido suplementado con antibiótico, y se obtuvo su ADN plasmídico mediante EasyPure Plasmid MiniPrep Kit. Posteriormente se verificó la presencia del gen mediante PCR (en las mismas condiciones que fueron descritas anteriormente) y posterior secuenciación (Macrogen Inc, Korea). La construcción obtenida se denominó pFR2 (ver Tabla 2).

Mutación en residuos puntuales de LBDHtc10

Las mutaciones puntuales en LBDHtc10 se generaron por mutagénesis sitio dirigida por PCR (QuickChange), usando pFR2 como molde, la polimerasa Pfx (Invitrogen) y *primers* llevando las mutaciones deseadas (sus secuencias se encuentran en la Tabla 1). Los ciclos en termociclador fueron: (94 °C, 1 min) x 1; (94 °C, 1 min; 58 °C, 1 min; 68 °C, 15 min) x 21; (68 °C, 10 min) x 1. El producto de amplificación se digirió con DpnI (Thermo Fisher) por 1,5 h a 37 °C, para eliminar las especies metiladas o hemimetiladas, y luego se utilizó para transformar células *E. coli* Top10 competentes. Las construcciones fueron confirmadas por secuenciación.

Expresión de la proteína recombinante en la fracción soluble

Para determinar las mejores condiciones de expresión de LBDHtc10, 25 mL de LB con el antibiótico correspondiente fueron inoculados 1% V/V con un cultivo saturado de células *E. coli* BL21 transformadas e incubados a 37 °C hasta una densidad óptica (DO), medida a 600 nm, de 0,4 aproximadamente. Se indujo la expresión proteica con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, PB-L Productos Bio-lógicos) 0,1 o 0,5 mM, con o sin L-arabinosa (Merck) 0,5% m/V, con agitación 4 h o toda la noche, a 18, 28, o 37 °C. Luego, el cultivo se centrifugó a 5000 x g durante 10 min a 4 °C y el precipitado se resuspendió a DO 20 con *buffer* Tris-HCl 25 mM pH 8,0, suplementado con NaCl 300

mM, lisozima de clara de huevo (Genbiotech) 1 mg/mL y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, SigmaAldrich) 1 mM. Esta suspensión se sonicó en Sonics Vibra-Cell VCX-600 Ultrasonic Processor, con 60 ciclos de 2 s de sonicado y 3 s de descanso. El extracto resultante (proteínas totales) fue centrifugado durante 45 min a 23000 x g a 4 °C y, luego, tanto el precipitado (fracción insoluble) como el sobrenadante (fracción soluble) se separaron y se guardaron a -20 °C. En las siguientes expresiones, la fracción soluble se obtuvo a partir de 1 L de cultivo, con inducción con IPTG 0,1 mM a 18 °C, siguiendo el protocolo recién expuesto. En todos los casos, la presencia de LBDHtc10 se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los extractos proteicos totales se obtuvieron a partir de cultivos celulares cosechados, lavados con *buffer* KPE (K₃PO₄ -Merck- 10 mM pH 7, EDTA 0,1 mM), resuspendidos en 50 µL de *buffer* de siembra (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, glicerol 10% V/V, dodecilsulfato sódico -SDS, Merck- 2% m/V, Bromophenol Blue BPB -Fluka- 0,1% m/V) y sometidos a ebullición por alrededor de 5 min. Las muestras se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, por *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), para lo cual 10-15 µL de muestra se sembraron en geles desnaturizantes acrilamida (SigmaAldrich) 15% m/V, bisacrilamida (Promega) 0,4% m/V, y se corrieron 2 h a 20 mA en *buffer* de corrida Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina (MP) 250 mM, SDS 0,1% m/V. Una vez finalizada la corrida, se incubó el gel con solución fijadora (etanol -Merck- 40% V/V, ácido acético -Cicarelli- 10% V/V) por 30 min, y finalmente se tiñó con una suspensión coloidal 0,75 mg/mL azul de Coomassie G-250 (Biopack), H₃PO₄ (Cicarelli) 1,5% m/V, (NH₄)₂SO₄ (Merck) 7,5% m/V, etanol 25% V/V. Los geles fueron fotografiados con cámara Canon PowerShot SX540 HS.

Purificación de LBDHtc10 recombinante

La proteína presente en el extracto soluble se purificó mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) en ÄKTA Explorer 100 (GE Healthcare), a 4 °C. El extracto proteico crudo fue sembrado en columnas HisTrap 1 mL, previamente equilibradas con *buffer* Tris-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol (Merck) 10 mM. La elución se realizó en el mismo *buffer*, pero con gradiente lineal de imidazol hasta 300 mM. Las fracciones fueron recolectadas en alícuotas de 2 mL, mientras se monitoreaba la absorbancia a 280 nm, y examinadas por SDS-PAGE. Las fracciones purificadas más concentradas fueron reunidas y cuantificadas.

En los casos de las muestras destinadas a cristalizar, LBDHtc10 se sometió a posterior purificación por cromatografía de exclusión por tamaño en escala preparativa. Para esto, las fracciones obtenidas por IMAC fueron reunidas y concentradas por ultrafiltración con tubos cónicos con membrana (Vivaspin 6 mL 10 kDa MWCO, Sartorius) hasta un volumen aproximado de 2 mL y la muestra así obtenida fue cargada en una columna Superdex 200 (GE Healthcare). La elución se realizó con Tris-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 300 mM. Las fracciones de esta cromatografía fueron recolectadas en alícuotas de 5 mL,

evaluadas por SDS-PAGE, concentradas por ultrafiltración y almacenadas a -80 °C para su posterior cristalización.

Durante las purificaciones, la concentración proteica fue determinada mediante la absorbancia a 280 nm o mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para este último, 20 µL de solución proteica fueron agregados a 1 mL de reactivo de Bradford (azul de Coomassie G-250 0,1 mg/mL, etanol 4,75% V/V, H₃PO₄ 8,5% m/V) y, luego de 10 min de reacción en oscuridad a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia a 595 nm. La calibración se realizó con una curva patrón de albúmina de suero bovino (SigmaAldrich), 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0 mg/mL, disuelta en *buffer* de purificación.

Ensayos de desplazamiento de la temperatura de desnaturalización (TSA)

Con LBDHtc10 purificado se realizaron ensayos de desplazamiento de la temperatura de desnaturalización (TSA, por *thermal shift assay*) (Mckellar et al., 2015). Para éstos, 30 µL de soluciones proteicas (10 µM) con SYPRO Orange (SigmaAldrich) 5X, en Tris-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, con o sin guanina 40-1200 µM (SigmaAldrich) o hipoxantina 1-10000 µM (SigmaAldrich), se sometieron a un ciclo de desnaturalización térmica con medición de fluorescencia en el termociclador StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific): 2 min a 20 °C, seguido de un incremento gradual de temperatura (rampa continua al 1% de la máxima velocidad de aumento del equipo) hasta 80 °C. Con los datos obtenidos en cada experimento se construyó la curva de fluorescencia vs. temperatura y la curva correspondiente a la primera derivada de la fluorescencia vs. temperatura, a partir de las cuales se calculó la temperatura de desnaturalización (T_m). Los gráficos se realizaron con GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows.

Cristalografía de proteínas por difracción de rayos X

La cristalización de LBDHtc10 se realizó en colaboración con la Dra. María Natalia Lisa, de la Plataforma Argentina de Biología Estructural y Metabólica (PLABEM) del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), y el Dr. Marco Bellinzoni, del Institut Pasteur, París, Francia.

Los cribados de cristalización de LBDHtc10 nativa se llevaron a cabo usando el método de gota sentada, en placas de 96 pocillos preparadas con el robot dispensador Crystal Gryphon (Art Robbins Instruments). Como precipitantes en estos ensayos se usaron los *kits* comerciales PEGRx 1, PEGRx 2, Crystal Screen, Crystal Screen 2, Natrix y Natrix 2 (Hampton), mezclando 250 nL de la solución proteica (10 mg/mL en Tris-HCl 25 mM pH 8, suplementada con guanina 1,2 mM) con 250 nL de las distintas soluciones de precipitantes de los *kits*, incubando a 20 °C por 45 días. Los cristales obtenidos fueron crioprotectados con glicerol 25% V/V y sometidos a enfriado rápido en nitrógeno líquido. La difracción de rayos X se realizó en el sincrotrón Diamond (Reino Unido), empleando una longitud de onda de 0,9795 Å.

Para el faseo experimental por difracción anómala a longitud de onda única (SAD, por *single-wavelength anomalous diffraction*), se cristalizó LBDHtc10 marcado con selenometionina (Se-Met-

LBDHtc10, 30 mg/mL) junto a guanina o hipoxantina (2 mM en ambos casos), utilizando nuevamente el método de gota sentada, en placas de 96 pocillos. Éstas se prepararon usando un robot dispensador Mosquito (TTP Labtech), mezclando 200 nL de solución de proteína y 200 nL de solución de reservorio. Las placas de cristalización se almacenaron a 18 °C y los cristales se dejaron crecer por 10 días. La difracción se realizó en el sincrotrón European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France), empleando una longitud de onda de 0,967697 Å.

En cada caso, los datos de difracción se indexaron e integraron con XDS (Kabsch, 2010) y se escalaron con Aimless (Evans & Murshudov, 2013) del paquete de programas CCP4 (Winn et al., 2011). Para resolver la estructura cristalográfica de Se-Met- LBDHtc10, se usó Crank-2 (Skubák & Pannu, 2013) con parámetros por defecto, a fin de determinar la subestructura de selenio, calcular las fases iniciales por SAD, modificar la densidad electrónica y construir un modelo inicial de manera automática. El mapa de densidad electrónica obtenido fue interpretable y permitió reconocer la topología de un dominio doble caché en la unidad asimétrica. Sin embargo, el modelo creado automáticamente resultó incompleto y tenía una estereoquímica deficiente. Por lo tanto, un modelo *ab initio* de LBDHtc10 construido usando trRosetta (Yang et al., 2020) se ajustó como cuerpo rígido en el mapa de densidad electrónica y se usó para completar y corregir las coordenadas atómicas del polipéptido. El modelo cristalográfico preliminar así obtenido fue refinado mediante ciclos iterativos de modelado manual con Coot (Emsley et al., 2010), empleado para aplicar restricciones estereoquímicas, y de refinado cristalográfico de las coordenadas atómicas y los parámetros de desplazamiento atómico con Refmac (Murshudov et al., 2011). Por otro lado, la estructura de LBDHtc10 nativa fue resuelta mediante reemplazo molecular con Phaser (McCoy et al., 2007), utilizando las coordenadas atómicas de Se-Met-LBDHtc10 disponibles a partir del experimento SAD. Después de ciclos sucesivos de modelado manual con Coot y refinado cristalográfico con Refmac, la molécula de ligando fue ubicada en un mapa *mFo-DFc* y la estructura de LBDHtc10 más guanina fue refinada hasta la convergencia.

Los modelos finales fueron validados través del servidor MolProbity (Chen et al., 2010).

Los gráficos moleculares fueron realizados con UCSF Chimera versión 1.11.2, desarrollados por Resource for Biocomputing, Visualization and Informatics de la Universidad de California, San Francisco.

Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

Las muestras purificadas por IMAC fueron enviadas al Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) para ser analizadas por calorimetría de titulación isotérmica (ITC, por *isothermal titration calorimetry*) por el Dr. Alejandro Cagnoni. Las mediciones se realizaron a 25 °C utilizando un calorímetro NanoITC (TA Instruments). Se prepararon soluciones de hipoxantina y guanina (0,25-1 mM) en *buffer* Tris-HCl 25 mM pH 8, NaCl 300 mM. Las muestras de proteína (25-70 µM) se introdujeron en la celda de reacción y se titularon con 20 inyecciones sucesivas de 2,5 µL de

solución de ligando a un espacio de 300 s. El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el Software Nano Analyze.

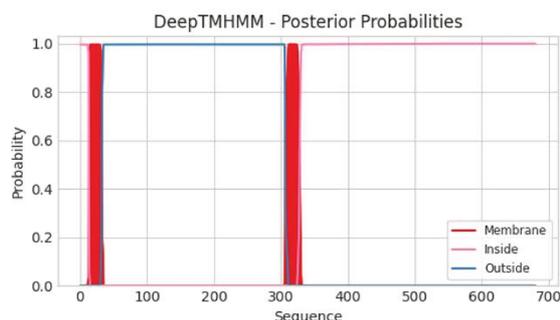
Resultados

Clonado y expresión de LBDHtc10

Con el fin de realizar ensayos que permitieran identificar posibles ligandos del quimiorreceptor Htc10 de *Halomonas titanicae*, decidimos clonar y expresar su dominio periplasmático en un vector de expresión que permitiera producir la proteína para su caracterización posterior.

El análisis de la secuencia del producto génico de *htc10* (RO22_21155, 2043 pb) en el servidor DeepTMHMM (Hallgren et al., 2022), nos permitió reconocer dos posibles segmentos transmembrana, TM1 (residuos 14-32) y TM2 (residuos 307-327), una región periplasmática de 274 aminoácidos flanqueada por TM1 y TM2 (residuos 33-306) y finalmente una extensión citoplasmática de 353 aminoácidos (residuos 328-680). La secuencia de Htc10 y los resultados de la predicción se muestran en la Figura 12. En base a esto, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar la región del gen correspondiente al dominio periplasmático de unión a ligando (LBDHtc10), para luego ser clonado en el vector de expresión pET28a (inducible por IPTG) con una etiqueta de 6 residuos de His en el extremo C-terminal. La construcción se denominó pFR2 y se utilizó para transformar células de *Escherichia coli* BL21.

A



B

```

MMARWKSPLRLRLFLSFGTVLAFAMLLALYLQARSHSQARLDNLLNQELPAQVKGAAHINLSLSQDLAISESLANSYFIEQWV
REGLPEERQNDIAAYLARLMEQLDTELLFIAAQHQGRGYFQLRNGEFLQRIQPPGSEDDWYHFTDSDNAYELNLDSDTFSPD
DAFVYVNYRSTVNAANGRPLVVAGAGLDLSQMASLIDDFRLGGSGHASLLSAEGELLVRSGEAKRSESAPTVATATEALPEQAS
QRLQLQNEQLQVHEATRDRGQEVLVSTIWLPELQRYLMVEVDKKAYLASTHERFLESSGIGLLILLVGLLVLYPLTGSLIRPLIDFQ
RQLKDITYSLDLSRRVSTDDKAELGDLANQTNEELLERSRAIAAVAKNAQALTQVADRLAKTAGLSGVHGSIDHEASQTMAAAV
EEMASSVAEITSTMEELSTSSTQIADHSQSVVDVANQTLERSRKSSAMQLLQSKMQDIRSDSEQSLTEIMTLGAKSKQINKVME
LINTLAAQTKLIAFNAALEASSAGESGRRFVSVASEIRRLADSVTDSTQIEAHTDDIQTAINRLVASEKGAASSIEQGVEASMS
TAQDLEALLKAASQTSSAAQQLSLSTQQQKTASSQVVMALRDI DTASSRNAHSVRSITDISQDMIHMSAELNALVQEFTLTNKNR
    
```

Figura 12. Segmentos transmembrana (TM) de Htc10. A. Resultado del análisis de la secuencia Htc10 con el servidor DeepTMHMM. B. Secuencia de Htc10 mostrando TM1 y TM2 (en rojo), los segmentos citosólicos (en rosa) y la región periplasmática (en azul). Se subrayó la zona correspondiente a los cebadores diseñados para amplificar la porción del gen correspondiente a LBDHtc10.

Ensayos preliminares mostraron dificultades para expresar LBDHtc10 en varias condiciones. Inicialmente se probaron distintos tiempos de inducción (4 h o toda la noche), temperaturas de inducción (18, 28 y 37 °C) y cantidades de inductor (0,1 y 0,5 mM IPTG). En ningún caso se observó un producto proteico abundante del tamaño esperado en la fracción soluble (32,4 kDa, se indica con la flecha roja en la Figura 13), por lo que se decidió probar la expresión de LBDHtc10 en presencia de las chaperonas DnaK, DnaJ y GrpE, codificadas en el plásmido pKJE7 inducible por L-arabinosa (Schröder et al.,

1993). En células transformadas con pKJE7 se observó claramente la aparición de una banda del tamaño esperado para LBDHtc10 dependiente del agregado de IPTG, tanto en presencia como en ausencia de L-arabinosa (últimas 6 calles de la Figura 13), indicando que la expresión basal de las chaperonas es suficiente para proteger la expresión de LBDHtc10. Dado que la presencia de arabinosa conduce a la aparición de productos proteicos no deseados, para purificar LBDHtc10 la misma se expresó con IPTG 0,1 mM sin adicionar arabinosa.

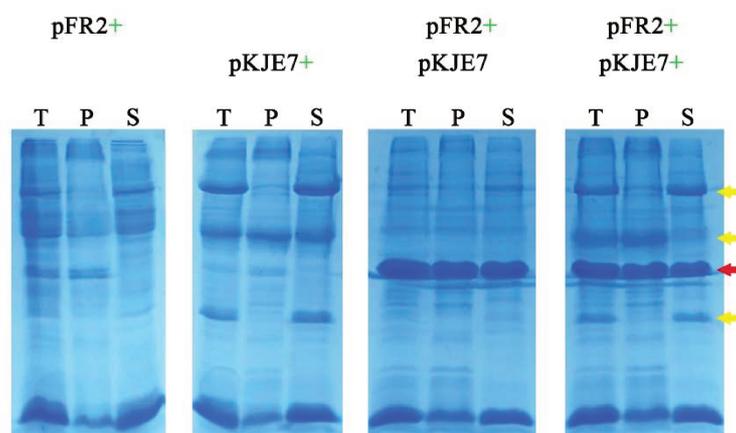


Figura 13. Expresión de LBDHtc10. SDS-PAGE acrilamida/bisacrilamida 15/0,4% m/V mostrando la expresión de LBDHtc10 en diversas condiciones de inducción. 25 mL de cultivo de células *E. coli* BL21 transformadas con pFR2 (LBDHtc10, inducible por IPTG) y/o pKJE7 (chaperonas DnaK, DnaJ y GrpE, inducibles por L-arabinosa) se indujeron o no con IPTG 0,1 mM o L-arabinosa 0,5% m/V, con agitación toda la noche, a 18 °C (el signo + junto al plásmido indica presencia del respectivo inductor). Luego de romper las células por sonicación, se guardó una alícuota del extracto celular total (T) y el resto fue centrifugado para separar las fracciones soluble (S) e insoluble (P). Las flechas amarillas muestran la posición de las chaperonas (21,5 kDa, 41,1 kDa y 69,1 kDa) y la flecha roja la posición de LBDHtc10 (32,4 kDa).

Ligandos de LBDHtc10

Con las condiciones de expresión establecidas, se prosiguió a purificar la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC, por *immobilized metal affinity chromatography*), para luego buscar posibles ligandos por medio de ensayos de desplazamiento de la temperatura de desnaturalización (TSA, por *thermal shift assay*). En éstos, la proteína en estudio se desnaturaliza por un aumento gradual de temperatura en presencia del fluoróforo SYPRO Orange, que se une de manera inespecífica a sus regiones hidrofóbicas. En soluciones acuosas la fluorescencia del SYPRO Orange es baja, debido a la interacción con moléculas de agua, pero a medida que la proteína se despliega y expone sus residuos hidrofóbicos, la fluorescencia de esta sustancia aumenta (Pantoliano et al., 2001). La temperatura a la cual la mitad de las moléculas de proteína se encuentran en estado nativo y la otra mitad en estado desplegado se conoce como temperatura de desnaturalización o *melting* (T_m) (Hall, 2019); ésta corresponde al punto de inflexión en la curva de fluorescencia frente a temperatura o al mínimo en la curva de la primera derivada (ver Figura 14 A y B como ejemplo). La presencia de un ligando específico de la proteína usualmente induce una estabilización térmica, debido a las interacciones intermoleculares, por lo que los ensayos de TSA permiten analizar posibles ligandos mediante la medición del desplazamiento de la T_m (ΔT_m) (Mckellar et al., 2015).

La búsqueda de ligandos de Htc10 se realizó en el marco de la Tesis doctoral (Gasperotti, 2018) que se hallaba en curso en nuestro laboratorio. En este cribado, LBDHtc10 purificado se agregó en placas fenotípicas comerciales (placas Biolog), que consisten en placas de 96 pocillos conteniendo diferentes compuestos de concentración desconocida (fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre o aditivos nutricionales para microorganismos) y luego se sometió a incrementos de temperatura mientras se medía la fluorescencia. Los resultados obtenidos se encuentran presentados en la Tabla 3; ciertos compuestos conteniendo bases nitrogenadas desplazaron la T_m en al menos 2 °C. En ensayos posteriores realizados con 8 de estas 10 sustancias, utilizando soluciones de concentración conocida (10 mM), hipoxantina y guanina, a diferencia de los otros compuestos, generaron aumentos significativos de la T_m de LBDHtc10 (Tabla 3), por lo que fueron seleccionadas como posibles ligandos.

Tabla 3. Desplazamientos de T_m (ΔT_m , °C) en los ensayos de TSA realizados con LBDHtc10. ΔT_m es $T_{mL} - T_{m0}$, donde T_{m0} es T_m en ausencia de ligando (57,5 °C) y T_{mL} es T_m con ligando. La segunda columna muestra los valores de ΔT_m del cribado realizado sobre placas Biolog y la tercera columna los resultados de los análisis con 10 mM de estos compuestos. Estos datos fueron extraídos de Tesis doctoral (Gasperotti, 2018).

Compuesto	ΔT_m (°C)	
	Placas Biolog	Soluciones 10 mM*
Inosina	3,0	3,0
Guanina	6,0	6,0
Guanosina	2,5	0,5
Timina	2,0	1,7
Timidina	2,0	0,0
Uracilo	3,0	3,0
Xantina	2,5	-8,0
Guanosina 2-monofosfato	2,5	N/D
Hipoxantina	8,0	15,0
2-deoxy-inosina	6,5	N/D

* N/D: no determinado.

Posteriores ensayos de TSA, realizados en el contexto de la presente tesis, mostraron resultados acordes a los informados previamente (Figura 14 A y B). Además, tanto hipoxantina como guanina fueron capaces de modificar la T_m de LBDHtc10 en función de sus concentraciones, como se muestra en la Figura 14 C y D. Para ambos derivados purínicos se observó una correlación entre la concentración del ligando y el aumento de la T_m en los intervalos analizados, indicando que la estabilización de la proteína depende de la concentración de ligando. Para hipoxantina el mayor desplazamiento medido fue 15,9 °C (correspondiente a 10 mM) y para guanina 5,4 °C (1,2 mM).

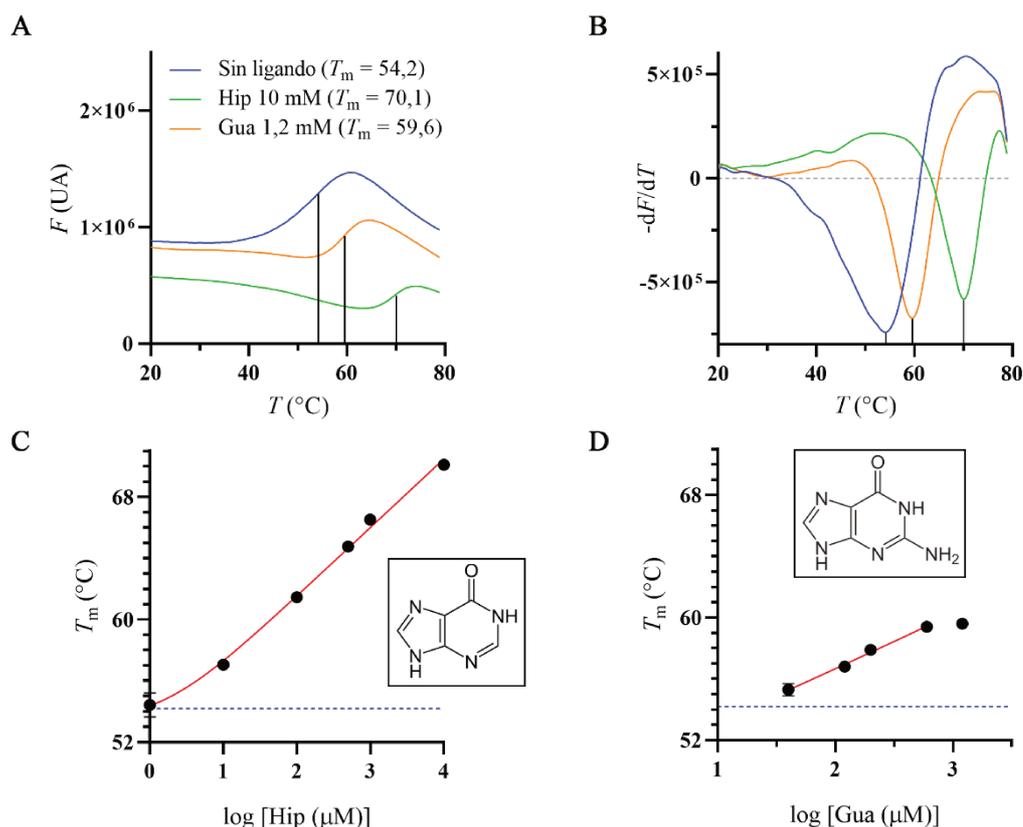


Figura 14. Resultados de los ensayos de TSA con LBDHtc10 en presencia de hipoxantina (Hip) o guanina (Gua). **A.** Fluorescencia (F , unidades arbitrarias) vs. temperatura (T , °C) de la muestra, sin ligando (curva azul) o con Hip (sólo se muestra el resultado a concentración 10 mM, curva verde) o Gua (sólo para 1,2 mM, color naranja). Con línea negra vertical se marca el punto de inflexión de cada curva, correspondiente a la temperatura de *melting* (T_m). **B.** Curvas de la primera derivada de la fluorescencia ($-dF/dT$) vs. T , siguiendo el mismo código de color que en A. Con línea punteada gris se marca $-dF/dT = 0$. T_m corresponde al mínimo de esta curva (marcado con línea negra). **C.** Valores experimentales de T_m vs. log de la concentración de ligando (log [ligando]) para Hip (1, 10, 100, 500 μM , 1 y 10 mM). La línea punteada azul marca la T_m de la proteína en ausencia de ligando (54,2 °C). La curva roja es el ajuste no lineal de los datos, según la ecuación (1). Con esta regresión se calculó la constante de disociación (K_d) para el complejo LBDHtc10-Hip, 1,6 μM ($R^2 = 0,9940$). **D.** Curva para Gua (40, 120, 200, 600 μM y 1,2 mM), siguiendo el mismo código de colores que en C. En este caso, la regresión reveló que $K_d = 2,3 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,9827$). En los gráficos C y D se agregaron las estructuras de los compuestos analizados.

Los ensayos de TSA permiten detectar fácilmente uniones proteína-ligando, aunque tradicionalmente esta técnica sólo fue empleada para análisis cualitativo. Recientemente se publicó un modelo, enfocado en el equilibrio entre la proteína nativa y su forma desplegada, que permite realizar un análisis cuantitativo a partir de datos obtenidos en experimentos de TSA (Bhayani & Ballicora, 2022). Este modelo, basado en la ecuación de van't Hoff, supone que el ligando se une preferentemente a la forma plegada de la proteína; a partir del ajuste no lineal de los datos de T_m vs. log de la concentración de ligando (log [ligando]) se puede calcular la constante de disociación (K_d) del complejo proteína-ligando, que es una medida de la afinidad entre estas moléculas (un valor relativamente bajo implica una unión relativamente fuerte). En el caso de ligandos que se unen a un único sitio, dicho ajuste se realiza mediante la ecuación:

$$T_m = T_{m0} + A \cdot \log \left(1 + \frac{10^{\log[\text{ligando}]}}{K_d} \right) \quad (1)$$

Donde T_{m0} es T_m en ausencia de ligando y A es un parámetro que tiene en cuenta la entalpía de la reacción de desnaturalización. Se considera que K_d no varía significativamente en el intervalo de temperaturas analizadas.

Se utilizó la ecuación para ajustar los datos de la Figura 14 C y D, suponiendo que tanto hipoxantina como guanina se unen a un único sitio de LBDHtc10 y en ambos casos K_d fue del orden micromolar, siendo para hipoxantina ($K_d = 1,6 \mu\text{M}$) casi 1,4 veces menor que para guanina ($K_d = 2,3 \mu\text{M}$).

Estructura de LBDHtc10

Como se comentó en la introducción, las predicciones estructurales de LBDHtc10 revelaron que este dominio adoptaría una topología de tipo doble Cache. Con el objetivo de probar esta hipótesis e identificar los residuos involucrados en la unión de los ligandos, decidimos resolver la estructura cristalográfica de LBDHtc10, en colaboración con la Dra. María Natalia Lisa (PLABEM-IBR, Rosario, Argentina).

Para esto, LBDHtc10 se expresó en las condiciones establecidas anteriormente y se purificó por IMAC y cromatografía preparativa de exclusión por tamaño. Los cromatogramas y SDS-PAGE de algunas fracciones se muestran en la Figura 15 A y B. El extracto final se concentró por ultrafiltración hasta 30,3 mg/mL y su calidad se evaluó por TSA, cuyos resultados se muestran en la Figura 15 C y D. El perfil de la curva indicó que la proteína se encontraba plegada; además, los desplazamientos de la T_m debido al agregado de ligandos fueron consistentes con los valores antes informados.

Se obtuvieron cristales de LBDHtc10 en presencia de guanina 1,2 mM, mediante el método de difusión de vapor en gota sentada. La condición óptima para el crecimiento de los mismos fue $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 200 mM, cacodilato de sodio trihidrato 100 mM pH 6,5, polietilenglicol 8000 30% m/V. Los datos de difracción de rayos X revelaron que estos cristales pertenecían al grupo espacial $P2_12_12_1$ (Anexo III). A pesar de haber difractado los rayos X a alta resolución (2,1 Å), no fue posible resolver la estructura cristalográfica mediante reemplazo molecular (MR), ya que el modelo más cercano a LBDHtc10 que se encontraba disponible en el PDB presenta sólo 17% identidad de secuencia con el mismo [LBD del quimiorreceptor CtaA de *Pseudomonas fluorescens*, PDB:6PY5 (Ud-Din et al., 2020)].

Se preparó, entonces, LBDHtc10 marcado con selenometionina (Se-Met-LBDHtc10), en colaboración con el Dr. Marco Bellinzoni (Institut Pasteur, París, Francia), para obtener fases experimentales por difracción anómala a longitud de onda única (SAD, por *single-wavelength anomalous diffraction*). Se obtuvieron cristales isomorfos de Se-Met-LBDHtc10 en presencia de guanina (Se-Met-LBDHtc10-Gua) o hipoxantina (Se-Met-LBDHtc10-Hip), que pertenecieron al grupo espacial H32 y difractaron los rayos X a baja resolución, 3,6 Å y 3,5 Å, respectivamente.

Los modelos construidos para los cristales de Se-Met-LBDHtc10-Gua y Se-Met-LBDHtc10-Hip comprendían una única molécula de proteína por unidad asimétrica y mostraron que, efectivamente, la misma adopta una topología de tipo doble Cache, como se muestra en la Figura 16.

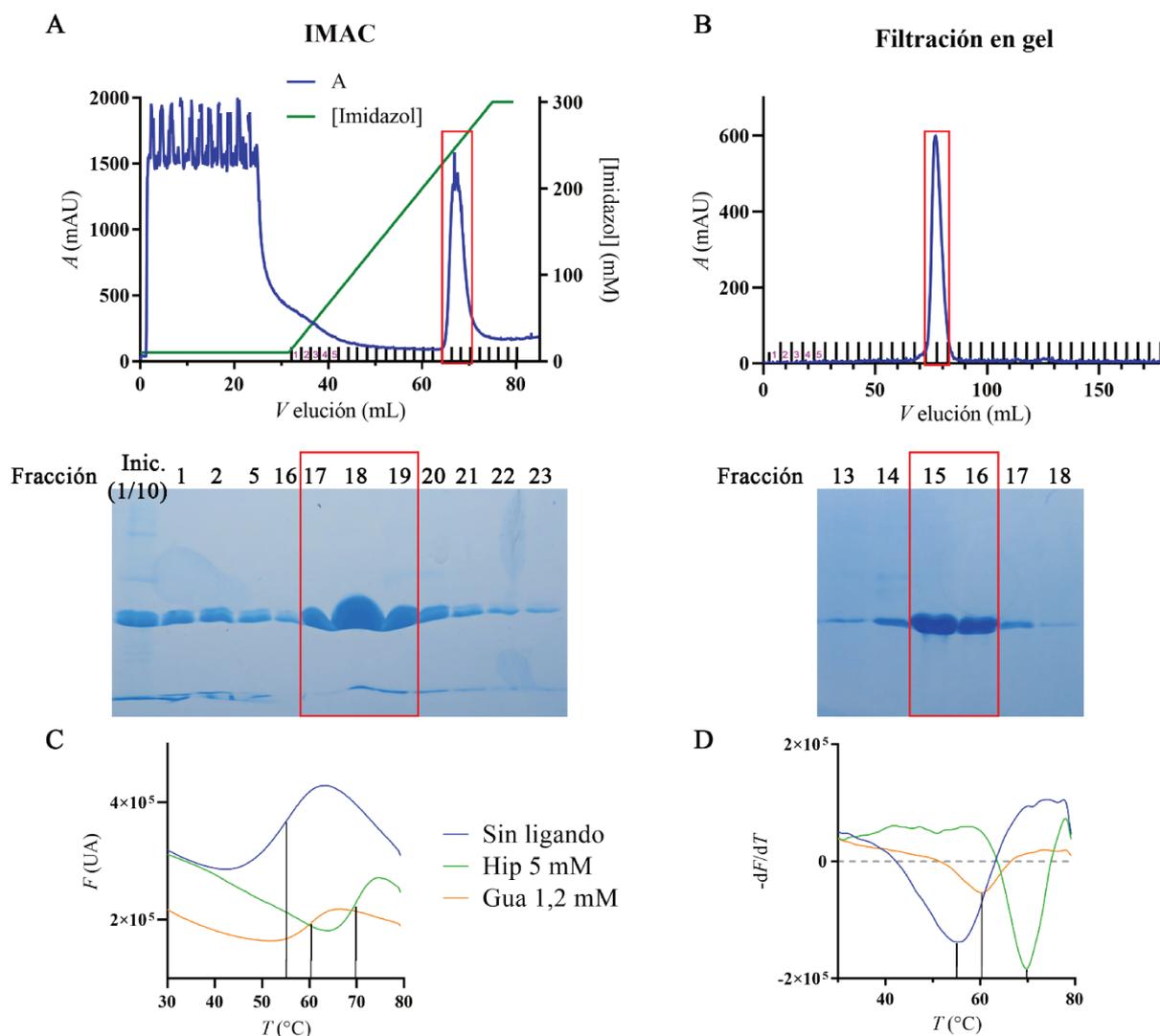


Figura 15. Purificación de LBDHtc10. El extracto crudo se purificó por IMAC y luego por cromatografía de exclusión molecular. **A.** Purificación IMAC. Arriba, cromatograma mostrando la absorbancia (A) a 280 nm vs. el volumen de elución (V elución) a partir del momento de inyección. La curva verde muestra el gradiente lineal de imidazol. Las fracciones colectadas (cada una de 2 mL) se marcan con líneas negras (con fucsia se numeran las 5 primeras). Abajo, SDS-PAGE acrilamida/bisacrilamida 15/0,4% m/V de las fracciones que están numeradas (Inic. significa fracción inicial, diluida 1/10). En ambos casos, las fracciones que fueron juntas (17, 18 y 19; 6 mL totales, 2,39 mg/mL) y sometidas a la próxima cromatografía se señalan con un cuadrado rojo. **B.** Filtración en gel preparativa. Arriba se muestra el cromatograma y las fracciones colectadas, cada una de 5 mL, siguiendo el mismo código que el cromatograma de A. Abajo, SDS-PAGE de algunas fracciones. Con un cuadro rojo se marcan las fracciones que fueron seleccionadas (15 y 16; 10 mL totales, 1,34 mg/mL). **C.** Resultados del ensayo TSA realizados con la proteína purificada. T_m sin ligando = 55,1 °C, ΔT_m hipoxantina 5 mM = 14,8 °C, ΔT_m guanina 1,2 mM = 5,1 °C. **D.** Curvas de derivada de la fluorescencia vs. la temperatura. Los valores de T_m se marcan en los gráficos con líneas verticales.

Al igual que otros integrantes de esta familia estructural, LBDHtc10 presenta un eje principal (que se ubicaría perpendicular a la membrana plasmática), el cual se encuentra compuesto por los elementos helicoidales $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (residuos 49-87), compartido por los subdominios Cache distal y proximal. Cabe aclarar que la numeración empleada para los residuos de LBDHtc10 corresponde a la posición de los mismos en la proteína nativa y no a la del producto proteico obtenido a partir del plásmido pFR2; este criterio se mantendrá a lo largo de todo el capítulo.

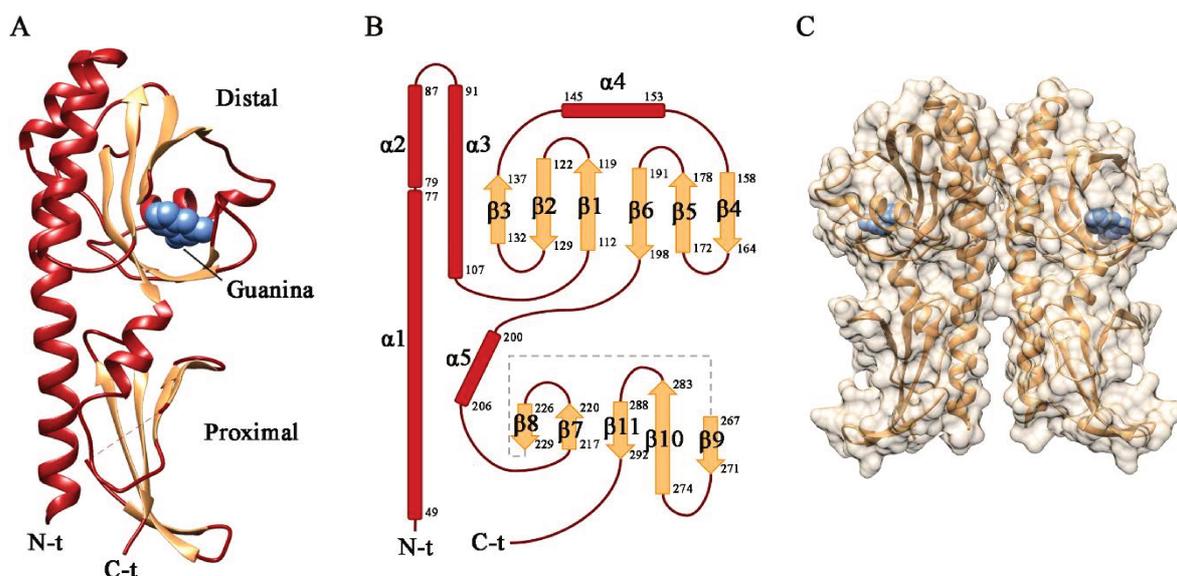


Figura 16. Estructura cristalográfica de Se-Met-LBDHtc10 junto a guanina. Resultados similares se obtuvieron para el complejo con hipoxantina. **A.** Topología doble Cache del monómero presente en la unidad asimétrica (con rojo oscuro las α -hélices y con naranja las hojas- β). Se muestra la densidad electrónica de una molécula de guanina en azul, asociada a la copa distal (N-terminal). Las regiones comprendidas entre residuos 32-47, 231-263 y 297-309 no mostraron densidad electrónica. **B.** Representación esquemática de LBDHtc10, siguiendo el mismo código de colores que en A, marcando la numeración de residuos y de estructuras secundarias. **C.** Dímero formado por péptidos cercanos (vinculados por una operación de simetría cristalográfica), mostrando la densidad de cada molécula e indicando con esferas azules las moléculas de ligando. En la región donde se solapan las superficies (A70-Q107) se identificaron enlaces de hidrógeno y puentes salinos que estabilizan la estructura.

El subdominio distal (residuos 91-198) consta de una lámina- β compuesta de seis hebras (β 1-6) y de dos α -hélices, una en el extremo N-terminal (α 3) y otra en medio de la lámina- β (α 4). Por otro lado, la copa proximal (residuos 200-292) está compuesta por α 5 y un núcleo central de cinco hebras- β (β 7-11). Los residuos 231-263, junto a los primeros y últimos en la construcción (32-47 y 297-309), no presentaron densidad electrónica, lo que podría reflejar alta flexibilidad en dichas regiones.

En el cristal, cada molécula de Se-Met-LBDHtc10 interactúa con una molécula cercana para formar un dímero con simetría C2 (Figura 16 C), con una superficie de contacto de aproximadamente 1000 \AA^2 . Dicha interacción está estabilizada mediante enlaces de hidrógeno y puentes salinos entre los residuos comprendidos en el segmento A70-Q107.

Los mapas de densidad electrónica obtenidos evidenciaron la presencia de un ligando (hipoxantina o guanina) unido a la copa distal (Figura 16 A). Sin embargo, la baja resolución no permitió determinar detalles moleculares de la unión.

Interacción con guanina

Para obtener más información sobre la interacción entre LBDHtc10 y sus ligandos, la estructura cristalina a alta resolución de la proteína en complejo con guanina ($2,1 \text{ \AA}$) fue resuelta por MR, usando las coordenadas atómicas de Se-Met-LBDHtc10 disponibles del experimento SAD.

Los mapas de densidad electrónica brindaron evidencia para la porción N-terminal de LBDHtc10, pero no para la región desde el residuo 209 hasta el extremo C-terminal de cada polipéptido. Por lo tanto, dicha región se eliminó y el modelo resultante, refinado hasta convergencia, se muestra en la Figura 17. No está claro si el dominio C-terminal de LBDHtc10 es muy flexible o si se degradó durante la cristalización (el servidor PeptideCutter predice varios sitios de corte de proteasas en este segmento). Sin embargo, al igual que Se-Met-LBDHtc10, los péptidos forman dímeros estabilizados por residuos localizados en el segmento 70-107, con una interfaz de 800 \AA^2 aproximadamente. La desviación cuadrática media (RMSD, por *root-mean-square deviation of atomic positions*) entre las cadenas de LBDHtc10 y de Se-Met-LBDHtc10 es de aproximadamente 1 \AA para 142 residuos alineados, sugiriendo que, al menos en presencia del ligando, la arquitectura tridimensional del Cache distal y sus interacciones intermoleculares son independientes del dominio C-terminal.

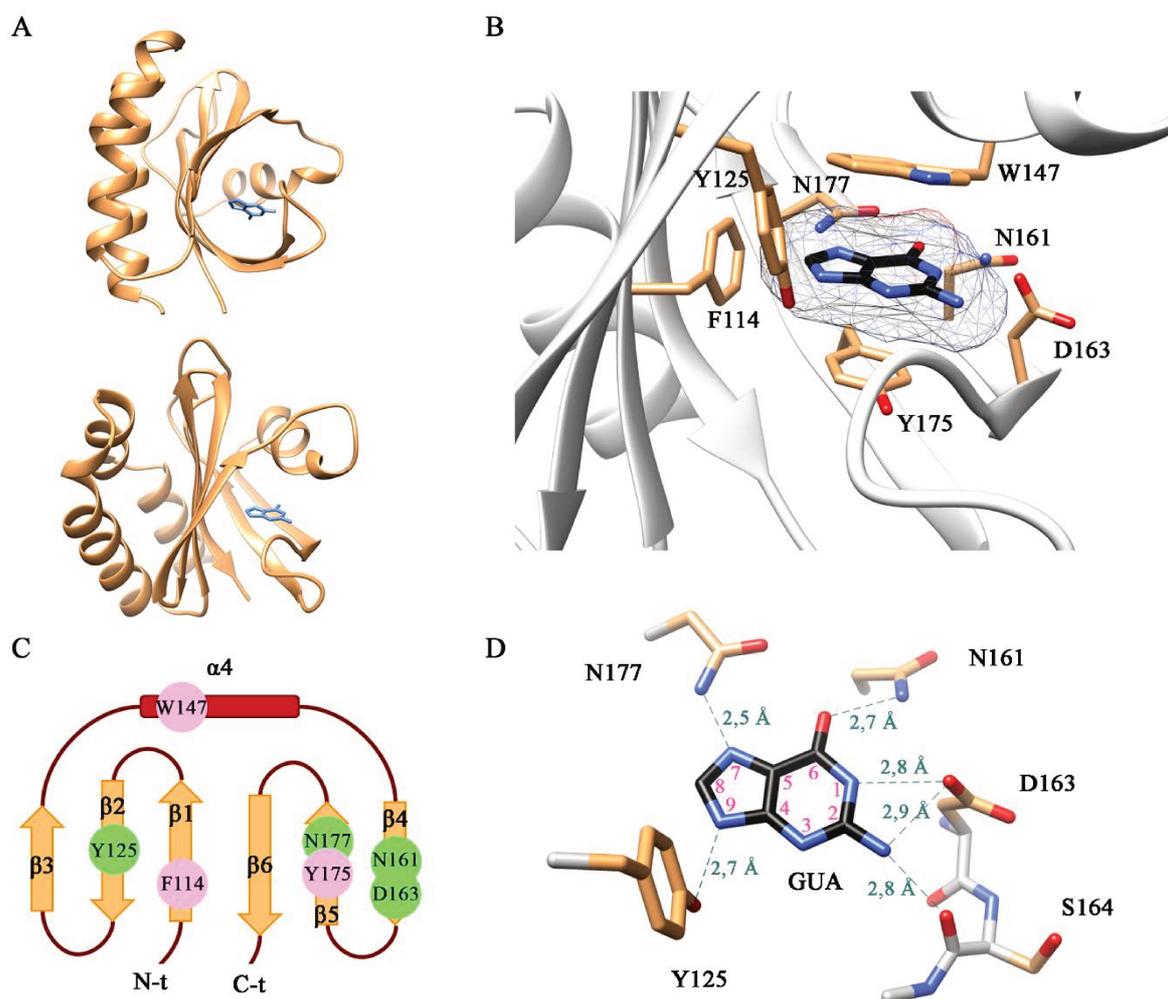


Figura 17. Estructura de LBDHtc10 suplementado con Gua. **A.** Vista lateral (arriba) y superior (abajo) del complejo LBDHtc10-Gua; la proteína se muestra en representación de cintas y el ligando con varillas. El subdominio proximal no presentó densidad electrónica, por lo que no forma parte del modelo **B.** Acercamiento de la región de LBDHtc10 que interactúa con Gua, mostrando como varillas los residuos que participan en contactos polares y apolares. **C.** Representación esquemática del dominio Cache distal de LBDHtc10, marcando la posición de los residuos mostrados en B, con círculos verdes (interacciones polares) o rosas (interacciones apolares). **D.** Detalle de las interacciones por puentes de H entre Gua y los residuos Y125, N161, D163, S164 y N177 de LBDHtc10. Con rojo se colorearon los átomos de O, con azul los de N, con blanco los de H, con naranja los C de las cadenas laterales, con gris los C de la cadena principal ($C\alpha$ y carbonilo) y, finalmente, con negro los átomos de

C de la molécula de Gua (con rosa se indica la numeración de los átomos de los anillos aromáticos fusionados). Las distancias interatómicas se muestran con líneas punteadas.

Los mapas de densidad electrónica evidenciaron una molécula de guanina unida a cada cadena de LBDHtc10, como se muestra en la Figura 17 A. En el complejo LBDHtc10-Gua, siete residuos establecen contactos no covalentes con el ligando (Figura 17 B). Las cadenas laterales de cuatro de ellos, Y125, N161, D163 y N177, contienen grupos polares que forman puentes de H con la molécula de guanina. Concretamente, el residuo Y125 (ubicado en la hebra- β 2; Figura 17 C) interactúa con el átomo N9 (Figura 17 D), el aminoácido N161 (hebra- β 4) con el oxígeno carbonílico en el C6, el residuo D163 (hebra- β 4) con el átomo N1 y el N del grupo amino en el C2 y el aminoácido N177 (hebra- β 5) con el átomo N7. Además, el carbonilo (en la cadena polipeptídica) del aminoácido S164 también forma un puente de hidrógeno con la amina extra cíclica de la molécula de guanina. Por otro lado, el complejo proteína-ligando también está estabilizado por fuerzas de dispersión de London. Las cadenas laterales de los residuos W147 y Y175 se encuentran ubicadas en planos paralelos, generando un entorno hidrofóbico que alberga a la molécula plana de guanina, a menos de 4 Å de los anillos indólico y fenólico en dichos aminoácidos. Asimismo, la cadena lateral del residuo F114 también establece interacciones hidrofóbicas con la molécula de guanina, ya que las distancias entre el átomo C8 de este ligando y los C bencénicos del aminoácido oscilan entre 3,2 y 3,5 Å.

Mutantes puntuales de LBDHtc10

Con el objetivo de testear la hipótesis de que los residuos marcados en la Figura 17 D interactúan mediante puentes de H con los ligandos guanina e hipoxantina, se decidió afectar la interacción proteína-ligando mediante la sustitución de los residuos N161, D163 y N177 por alanina o la mutación de Y125 por fenilalanina. Las mutaciones puntuales se introdujeron en LBDHtc10 mediante mutagénesis sitio dirigida (QuickChange), usando el vector pFR2 como molde. Se construyeron cinco plásmidos, cuyos nombres y mutaciones se indican en la Tabla 4, los cuales luego fueron utilizados para transformar células de *E. coli* BL21, junto con el plásmido de chaperonas pKJE7.

Las proteínas mutantes se expresaron siguiendo el mismo protocolo que para la forma salvaje o *wild type* (WT); con los extractos proteicos, purificados por IMAC, se realizaron ensayos de TSA en ausencia de ligandos y en presencia de hipoxantina (500 μ M) o guanina (600 μ M). A fin de facilitar la lectura, en la Figura 18 se brinda un detalle de cada mutante estudiada.

La Figura 19 muestra los valores de T_m y sus desplazamientos en las distintas condiciones. Para la forma WT (LBDHtc10-YNDN), estos resultados fueron consistentes con los informados anteriormente (barras azules). Por otro lado, todas las proteínas mutantes presentaron un valor de T_m menor que para la especie WT en ausencia de ligando (Figura 19 A), lo que indica una disminución de la estabilidad térmica en las condiciones analizadas. Sin embargo, los perfiles de las curvas de fluorescencia evidenciaron que todas estas proteínas se encontraban inicialmente plegadas (datos no mostrados).

Tabla 4. Mutantes de LBDHtc10. En la fila superior se lista la posición de los residuos que forman puentes de H con el ligando en la proteína salvaje. En las siguientes filas se recopilan los plásmidos con LBDHtc10 WT (pFR2) o mutantes; las sustituciones de aminoácidos (por Ala o Phe) están remarcadas en rojo.

Plásmido	Posición de residuos			
	125	161	163	177
pFR2	Y	N	D	N
pLBDHtc10-FNDN	F	N	D	N
pLBDHtc10-YAAN	Y	A	A	N
pLBDHtc10-FAAN	F	A	A	N
pLBDHtc10-YNDA	Y	N	D	A
pLBDHtc10-FAAA	F	A	A	A

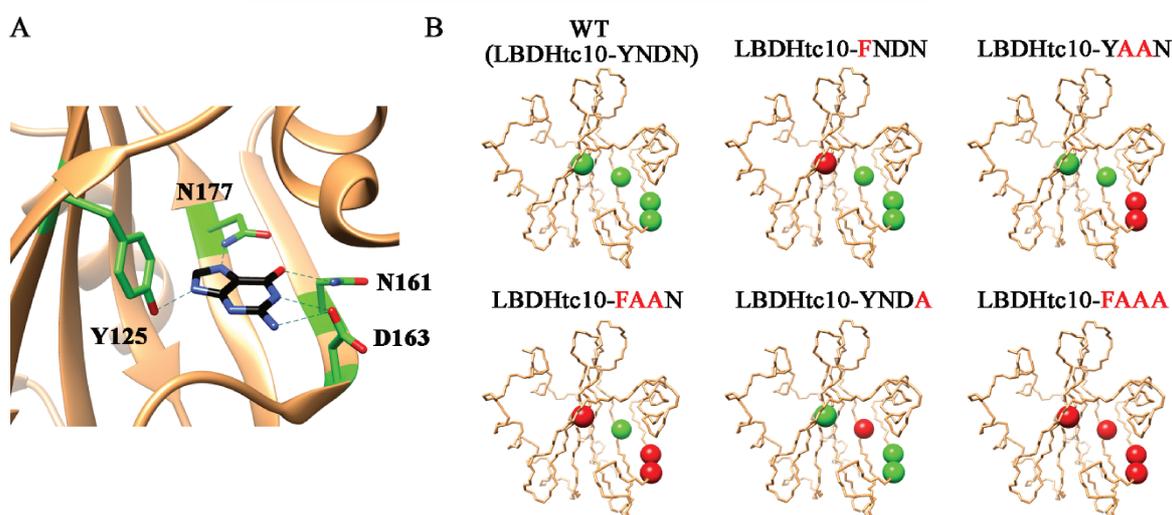


Figura 18. Mutaciones efectuadas en el dominio distal de LBDHtc10. A. Detalle de los residuos analizados (en verde) y sus interacciones con guanina (en negro) en LBDHtc10 WT. Los átomos de N se encuentran coloreados en azul y los de O en rojo. B. Copas distales de la proteína WT y las mutantes generadas; en cada caso se muestra el polipéptido con una línea y se señalan con esferas (verde: WT; rojo: sustituciones) los cuatro residuos analizados.

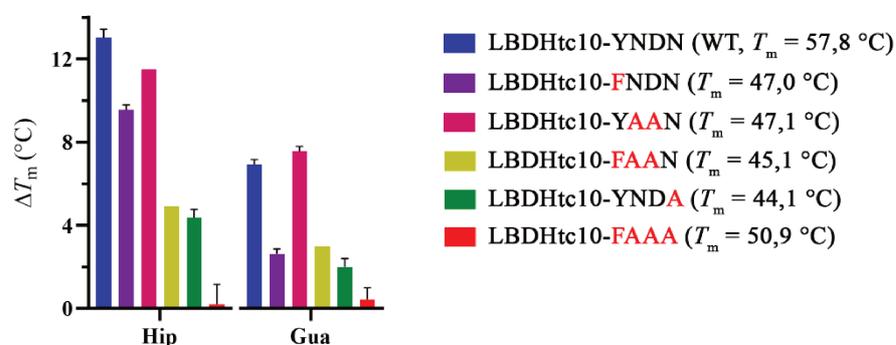


Figura 19. Resultados de los ensayos de TSA con LBDHtc10 WT o mutantes. ΔT_m en presencia de hipoxantina 500 μM o guanina 600 μM. En las referencias se indica el valor de T_m de cada proteína en ausencia de ligando.

En cuanto a las proteínas mutadas, la presencia de ligandos dio lugar a menores aumentos de la T_m que para la forma WT, lo que sugiere que las mutaciones introducidas indujeron una disminución en la

afinidad de la unión. La mutación Y125F en LBDHtc10-FNDN (barras violetas en la Figura 19) afectó el valor de ΔT_m para los dos ligandos, indicando que este residuo podría unir ambos, aunque el efecto fue más marcado para guanina. En el caso de la triple mutante LBDHtc10-FAAN (barras amarillas) el valor de ΔT_m frente a guanina resultó similar al de LBDHtc10-FNDN, lo cual es consistente con que la doble mutante LBDHtc10-YAAN (barras rosas) no indujo efectos significativos sobre ΔT_m . Sin embargo, para hipoxantina el valor de ΔT_m de la proteína triplemente mutada fue menor que para LBDHtc10-FNDN y LBDHtc10-YAAN, indicando un efecto acumulativo de las mutaciones, podría ser que estos residuos tengan distinta participación en el sensado de distintos ligandos.

El efecto generado por LBDHtc10-FAAN fue semejante al de la simple mutante LBDHtc10-YNDA (barras verdes en la Figura 19), lo que sugiere un importante rol de N177 en la unión a ligandos. Asimismo, la sustitución simultánea de los cuatro residuos estudiados (LBDHtc10-FAAA, barras naranjas) anuló la estabilización térmica otorgada por guanina o hipoxantina, indicando que la proteína mutante fue incapaz de unir estos compuestos.

Para poner a prueba la hipótesis de que las reducciones en los valores de ΔT_m se deben a disminuciones en la afinidad de unión, se determinaron los valores de K_d para LBDHtc10 WT, LBDHtc10-FNDN y LBDHtc10-FAAN.

Determinación de afinidad por ITC

La calorimetría de titulación isotérmica o ITC (por *isothermal titration calorimetry*) es una técnica muy utilizada para estudiar la termodinámica de las interacciones moleculares en solución.

Tabla 5. Perfiles termodinámicos determinados por ITC. Se muestran los parámetros experimentales asociados a la interacción de LBDHct10 WT o mutantes con hipoxantina o guanina.

Proteína	Ligando	K_d (μM)	K_a^* (M^{-1})	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/molK)	ΔG (kJ/mol)
LBDHtc10-YNDN (WT)	Hip	2,5	408300	-260	-765	-32
	Gua	7,0	143600	-83	-181	-29,4
LBDHtc10-FNDN	Hip	13,9	71860	-101	-242	-27,7
	Gua	25,0	40070	-690	-2224	-26,3
LBDHtc10-FAAN	Hip	140,4	7123	-548	-1763	-22
	Gua	117,8	8488	-182	-535	-22,4

* La constante de asociación (K_a) es K_d^{-1} .

En el caso de soluciones proteicas, se mide el calor liberado por la solución tras inyecciones sucesivas con un volumen determinado de ligando; a partir del ajuste de los datos normalizados de calor liberado por mol de ligando pueden determinarse el cambio de entalpía (ΔH), la estequiometría (n) y la

constante de disociación K_d para la interacción analizada (Pierce et al., 1999), como también, consecuentemente, calcularse la variación de la energía libre de Gibbs (ΔG) y de entropía (ΔS).

Los datos calorimétricos obtenidos (IBYME) para las proteínas estudiadas en esta sección se muestran en la Figura 20; los parámetros de unión resultantes del análisis de dichas curvas se informan en la Tabla 5.

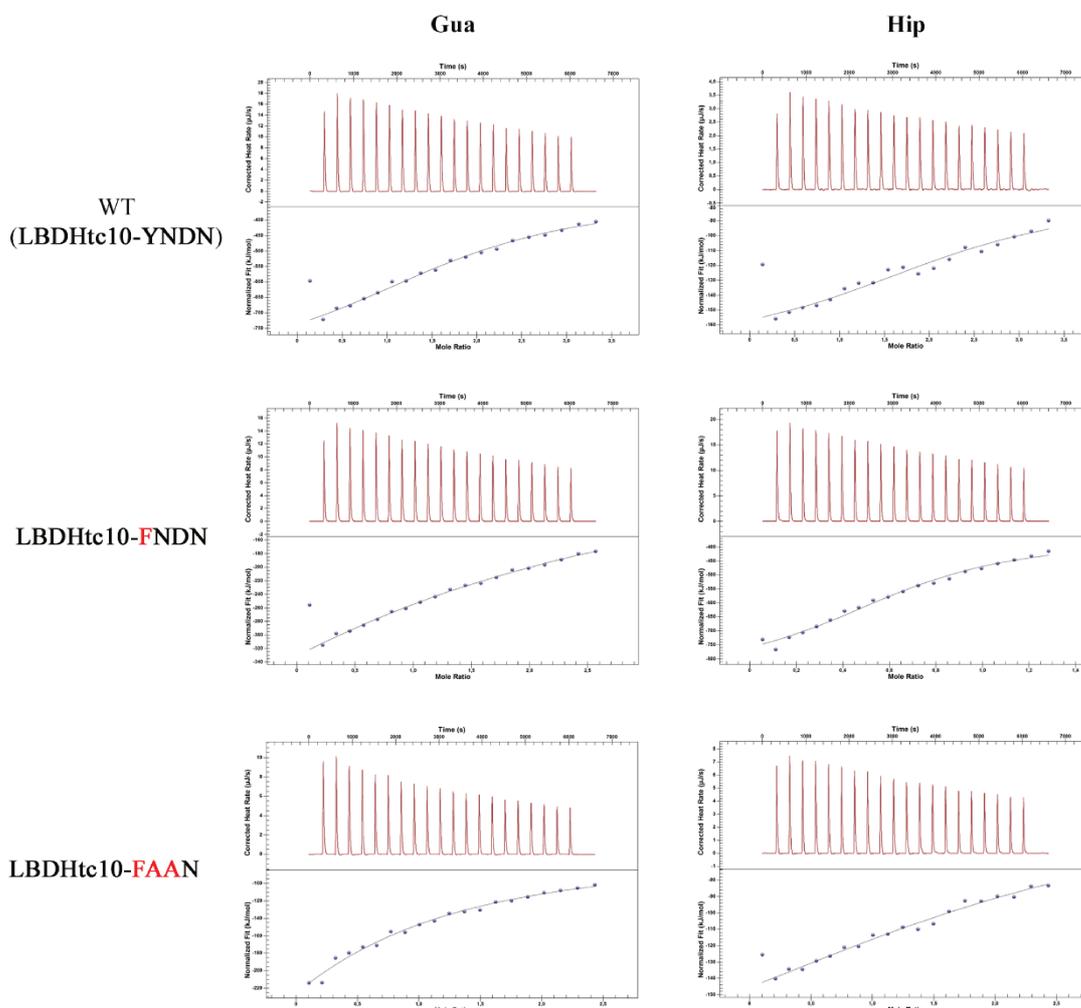


Figura 20. Análisis por ITC de la interacción de LBDHtc10 o mutantes con los ligandos guanina o hipoxantina, a 25 °C. Termogramas de cada proteína tras la adición de guanina (Gua, derecha) o hipoxantina (Hip, izquierda). En cada gráfico se muestran los datos crudos de calor liberado por inyección (arriba) y el calor normalizado por mol de ligando, junto a la curva de ajuste (abajo).

Tanto la proteína WT como las mutantes LBDHtc10-FNDN y LBDHtc10-FAAN evidenciaron afinidad por los dos ligandos evaluados y las isotermas de titulación indicaron un comportamiento exotérmico en todos los casos. La proteína salvaje mostró mayor afinidad por ambos ligandos que cualquiera de las mutantes, con valores de K_d en el orden micromolar (K_d hipoxantina = 2,5 μM ; K_d guanina = 7,0 μM). Estos valores son consistentes con los determinados mediante ensayos de TSA (K_d hipoxantina = 1,6 μM ; K_d guanina = 2,3 μM).

En cuanto a la mutante LBDHtc10-FNDN, las afinidades encontradas por las bases nitrogenadas fueron aproximadamente un orden de magnitud menores que para la proteína WT. Asimismo, la K_d para

hipoxantina (13,9 μM) resultó 1,8 veces menor que para guanina (25,0 μM). Finalmente, la triple mutante LBDHtc10-FAAN presentó los mayores valores de K_d , alrededor de 2 órdenes de magnitud mayores que para la proteína WT; la K_d para guanina (117,8 μM) fue levemente menor que para hipoxantina (140,4 μM), sugiriendo que la afinidad de LBDHtc10-FAAN se ve más afectada para este último compuesto.

Estos resultados son consistentes con lo observado en los ensayos de TSA, indicando que las disminuciones de ΔT_m observadas se corresponden efectivamente con alteraciones en la afinidad de la proteína por los ligandos.

Comparación con otras MCPs

Hasta el momento sólo se ha reportado un quimiorreceptor bacteriano capaz de sensar derivados purínicos, el cual también posee un plegamiento de tipo doble Cache, pero pertenece a una vía canónica de quimiotaxis. Se trata de McpH de *Pseudomonas putida*, que une hipoxantina, guanina, adenina, xantina y ácido úrico de forma directa (Fernández et al., 2016). Con el fin de examinar si los residuos involucrados en la interacción con ligandos identificados en Htc10 están conservados en McpH, se alinearon sus respectivos LBDs (Figura 21).

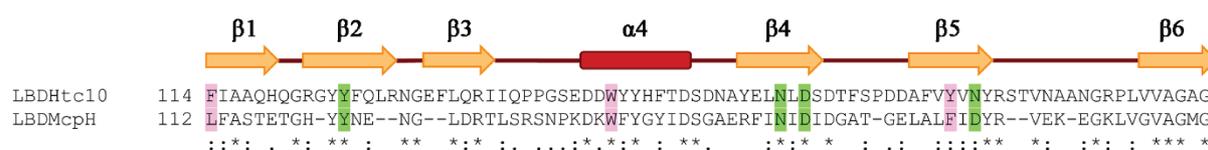


Figura 21. Alineamiento de los LBDs de Htc10 y McpH. Se muestra en cada caso la región de interacción con el ligando; el número a la izquierda indica la posición del primer residuo mostrado. El símbolo de la última línea indica conservación: asterisco (*, totalmente conservados), dos puntos (:, parcialmente conservados, los residuos tienen propiedades fisicoquímicas comunes) o un punto (., poco conservados). Con sombreado rosa se marca con la posición de los residuos de Htc10 que forman un bolsillo hidrofóbico involucrado en la unión de guanina y con verde los que establecen puentes de H. También se muestra la estructura secundaria de LBDHtc10, alineada con su secuencia.

El alineamiento muestra que, a pesar de la baja identidad de las secuencias (24%), los residuos analizados se encuentran altamente conservados. Entre los que forman puentes de H con guanina a través de sus cadenas laterales (sombreado verde en la Figura 21), Y125, N161 y D163 son idénticos en McpH Y122', N154' y D156' (' indica que se trata de un residuo de McpH), mientras que N177 está sustituida por D169'. En cuanto al entorno hidrofóbico generado por los anillos aromáticos de los residuos W147 y Y175 ubicados de modo paralelo al ligando (sombreado rosa en la Figura 21), éste podría ser provisto por los aminoácidos W140' y F167'. La alta conservación de los residuos analizados sugiere que el mecanismo de sensado es similar en ambos receptores.

Discusión

En el presente capítulo, se realizó un estudio estructural del dominio periplasmático de unión a ligando del quimiorreceptor Htc10 codificado en el *cluster che2* de *Halomonas titanicae* KHS3. El fragmento del gen *htc10* correspondiente a dicho dominio fue exitosamente clonado y su sobreexpresión en forma soluble fue posible gracias a la coexpresión basal (sin inducir) de las chaperonas DnaK, DnaJ y GrpE.

Los ensayos *in vitro* revelaron que LBDHtc10 presenta una temperatura de desnaturalización relativamente alta en las condiciones analizadas (entre 54,2 y 57,8 °C). A pesar de este alto valor, los primeros ensayos exploratorios en búsqueda de ligandos, realizados durante la Tesis doctoral (Gasperotti, 2018), se toparon con la dificultad de producir LBDHtc10 en forma nativa, hecho que pudo revertirse con el agregado de 2 M NaCl al *buffer* de purificación, denotando que la alta concentración de esta sal podría generar un efecto protector. Sin embargo, a lo largo de la presente tesis se usó medio con bajo contenido salino (0,3 M), hecho necesario para llevar a cabo los experimentos de cristalización, y la proteína siempre se purificó de forma plegada.

Asimismo, por medio de *thermal shift assays* se determinó que la presencia de ciertos derivados de purinas otorga gran estabilidad térmica a LBDHtc10. Particularmente, guanina e hipoxantina fueron capaces de modificar la T_m de LBDHtc10 en función de sus concentraciones, registrándose incrementos máximos de alrededor de 6 y 15 °C, respectivamente. El análisis por ITC confirmó que las interacciones son de naturaleza exotérmica, con valores de constante de disociación del orden micromolar, reflejando que ambas bases nitrogenadas presentan gran afinidad por el dominio extracelular de Htc10, siendo ésta mayor para hipoxantina ($K_d = 2,5 \mu\text{M}$) que para guanina, ($K_d = 7,0 \mu\text{M}$). Se obtuvieron resultados similares a partir de datos provenientes de ensayos de TSA ajustados según el modelo propuesto por Bhayani y Ballicora (Bhayani & Ballicora, 2022), que revelaron valores de $K_d = 1,6 \mu\text{M}$ para hipoxantina y $K_d = 2,3 \mu\text{M}$ para guanina.

Si bien existen registros sobre quimiorreceptores bacterianos que unen bases nitrogenadas, hasta el momento sólo se ha reportado una MCP, denominada McpH (PP0320), capaz de sensor hipoxantina y guanina, la cual pertenece a *Pseudomonas putida*. Fernández y colaboradores determinaron mediante ITC que las constantes de disociación de los complejos entre LBDMcpH y sus ligandos son, al igual que para LBDHtc10, del orden micromolar, siendo el valor de K_d también levemente menor para hipoxantina (3,6 μM) que para guanina ($K_d = 4,3 \mu\text{M}$) (Fernández et al., 2016).

Mediante cristalografía de proteínas por difracción de rayos X se confirmó que LBDHtc10 adopta una estructura doble Cache con disposición dimérica y que une una molécula de guanina o hipoxantina en la copa distal. Los residuos comprendidos entre los aminoácidos A70 y Q107 de las subunidades del dímero forman un manojo de cuatro hélices, similar a lo observado para la estructura cuaternaria de otros LBDs (Liu et al., 2015). Esta disposición podría tener relevancia fisiológica y apoya la hipótesis de que Htc10, al igual que las MCP de quimiotaxis, funciona como homodímero.

La estructura cristalográfica obtenida a alta resolución para LBDHtc10 en complejo con guanina reveló siete residuos de la proteína involucrados en la unión al ligando. Tres de ellos, F114, W147 y Y175, conforman un bolsillo hidrofóbico en el que se ubica la molécula sensada, mientras que los otros cuatro, Y125, N161, D163 y N177 establecen con la misma interacciones por puente de H. En general, la sustitución de alguno de estos últimos residuos por alanina (o fenilalanina) redujo la afinidad de LBDHtc10 por los derivados purínicos analizados, lo que se tradujo en un aumento de los valores de K_d correspondientes. En efecto, la mutación simultánea de Y125, N161, D163 y N177 inhibió completamente la estabilización térmica por el agregado de ligandos, sugiriendo que la sustitución de dichos residuos impide la unión de guanina o hipoxantina a Htc10.

Aun cuando la identidad de los residuos encargados del reconocimiento del ligando depende de la naturaleza química del mismo, la posición relativa de tales aminoácidos dentro del subdominio Cache distal suele estar bastante conservada en los miembros de esta familia estructural (Zhang & Hendrickson, 2010). El alineamiento de los dominios doble Cache de McpH y de Htc10 mostró que los residuos involucrados en la interacción con la molécula sensada están notablemente conservados. Esto, sumado a que ambos receptores presentan valores similares de K_d para guanina e hipoxantina, podría sugerir que los mismos tienen un mecanismo de sensado común, si bien McpH además es capaz de unir adenina, xantina, ácido úrico y purina con afinidades semejantes (Fernández et al., 2016). En cambio, LBDHtc10 no pareciera unir estos compuestos de la misma manera que guanina e hipoxantina ya que, en el *screening* realizado con placas Biolog, ni adenina ni ácido úrico modificaron significativamente la temperatura de desnaturalización de la proteína. No se probó el efecto de purina y sería interesante también indagar la afinidad por xantina, ya que esta base nitrogenada en alta concentración redujo la T_m de LBDHtc10 en aproximadamente 8 °C. En la posición equivalente al residuo N177 de Htc10, en McpH se encuentra un aspartato. Es interesante especular que tal reemplazo podría ser el responsable de la ampliación del espectro de ligandos, ya que el mismo no afecta significativamente la unión de guanina o hipoxantina, pero sí aumenta la afinidad por otras moléculas similares, tal vez al posibilitar interacciones adicionales con grupos funcionales específicos. Serán necesarios futuros experimentos para poner a prueba esta hipótesis y analizar la afinidad del dominio sensor de Htc10 por otros derivados purínicos.

Finalmente, cabe destacar que este es el primer reporte de la identificación de residuos de MCPs involucrados en el reconocimiento de hipoxantina y guanina. Más aún, en nuestro conocimiento, no existen publicaciones sobre ligandos químicos específicos de un quimiorreceptor perteneciente a una vía de tipo quimiotaxis no canónica. Por estas razones, consideramos que este aporte no sólo amplía el conocimiento sobre el sensado de derivados purínicos por proteínas pertenecientes a la familia estructural doble Cache, sino que sienta precedente y abre las puertas a nuevos estudios que develen detalles funcionales de receptores asociados a sistemas tipo quimiotaxis con funciones alternativas.

CAPÍTULO II

Interacción de las proteínas del sistema Che2 con los sistemas de quimiotaxis

Para adaptarse a entornos cambiantes, las bacterias, sobre todo las ambientales, suelen tener diversos sistemas de dos componentes capaces de detectar la información extracelular y comunicarla al interior. En los sistemas de quimiotaxis, las proteínas encargadas de esta tarea son quimiorreceptores (MCPs, por *methyl-accepting chemotaxis protein*) que normalmente constan de un dominio sensor extracelular y una larga horquilla citoplasmática, altamente conservada, capaz de interactuar tanto con otras proteínas de la vía, necesarias para generar la respuesta fisiológica (ver Figura 5, presente en la sección “Detalles moleculares del modelo canónico de quimiotaxis”, Introducción).

La detección de atrayentes a través los dominios extracelulares genera una determinada configuración de las horquillas que, mediante interacción con la proteína acopladora CheW, se comunican a la histidín quinasa CheA, disminuyendo su actividad (Hazelbauer & Lai, 2010). La estructura de CheW del sistema Che de *Escherichia coli*, y de otros organismos con sistemas homólogos también encargados de quimiotaxis, ha sido ampliamente caracterizada (Huang et al., 2019), y típicamente consta de dos subdominios estructurales (SD1 y SD2), cada uno de los cuales es un barril torcido compuesto por cinco hebras- β (Figura 22). La superficie del barril SD2 contiene los sitios de contacto para la interacción con el dominio P5 de CheA (que estructuralmente es similar a CheW, ver Figura 7 en la sección “Detalles moleculares del modelo canónico de quimiotaxis”, Introducción) y la integridad de esta interacción es indispensable para la correcta transmisión de la señal. El subdominio SD1 también interactúa con el dominio P5 de CheA, pero esta segunda interacción, más débil, cumple funciones estructurales más que de señalización (Li et al., 2013). Entre los dos barriles que constituyen los dos subdominios hay una hendidura hidrofóbica que se une con la base de los trímeros de dímeros

de MCPs. Debido a que interactúa con ambas proteínas, CheW posibilita la formación de grandes complejos de señalización.

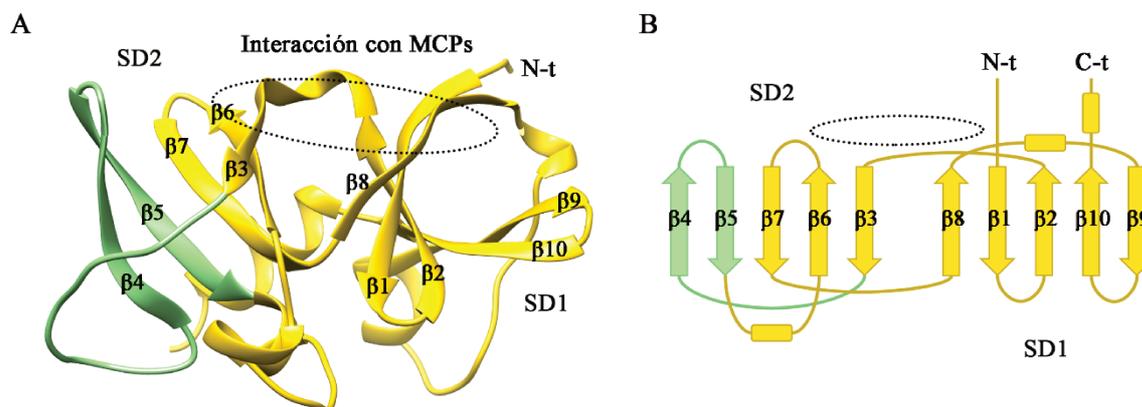


Figura 22. Proteína acopladora CheW de *E. coli*. **A.** Estructura cristalina PDB:6S1K (Cassidy et al., 2020). Se nombran las diez hebras- β que componen los dos subdominios (SD1 y SD2), además con línea de puntos se marca la región de interacción con MCPs, y con verde se colorearon las dos hebras y el loop que interactúa con el dominio P5 de CheA. **B.** Representación esquemática mostrando las diez hebras que componen los dos barriles.

La configuración en las horquillas de MCPs también está influenciada por el estado de metilación de su región de adaptación. La metiltransferasa CheR y la metilesterasa CheB (activada por fosfotransferencia de CheA) son las encargadas de adicionar y eliminar, respectivamente, grupos metilo a residuos conservados de glutamato (Hazelbauer & Lai, 2010). Cuanto mayor sea el número de residuos metilados mayor será la actividad de la quinasa (Borkovich et al., 1992), aunque la metilación de cada residuo ocurre a una velocidad característica e impacta de manera diferente en la quimiotaxis (Shapiro et al., 1995; Shapiro & Koshland, 1994). Asimismo, tanto las reacciones de metilación como las de desmetilación están fuertemente influenciadas por la conformación específica de los receptores (Kehry et al., 1984; Springer et al., 1982; Stock & Koshland, 1981).

Halomonas titanicae KHS3 es una bacteria marina que codifica en su genoma dos *clusters* tipo quimiotaxis, cuyos productos forman dos *sets* completos de proteínas, y un total de 25 MCPs que señalarían por estas vías.

El análisis de las secuencias y los modelos predichos sugiere que cada *cluster* codifica una vía de señalización distinta. El *cluster che1* codifica proteínas que presentan mucha similitud con las proteínas del sistema Che de *E. coli*, por lo que es natural suponer que su funcionamiento sea muy similar al del modelo canónico, y sea el encargado de modular el patrón de rotación flagelar. Por otra parte, los productos de los genes del *cluster che2* presentan mayor diferencia, en identidad de secuencia y presencia de dominios, con las proteínas del sistema Che. Puntualmente, los homólogos de CheA, CheW, CheR y CheY son los que muestran discrepancia más notoria entre los dos grupos quimiosensoriales de *H. titanicae* (ver sección “Sistemas homólogos a los de quimiotaxis”, Introducción), por lo que podrían ser importantes en asegurar la separación de las vías. Si bien no hay muchos organismos estudiados, ejemplos como *Pseudomonas aeruginosa* indican que en bacterias con varios sistemas cada uno señala de manera independiente (Matilla et al., 2021).

La comparación de las secuencias de los 25 receptores predichos evidencia que el receptor Htc10, el único codificado en el *cluster che2*, presenta una inserción de 14 residuos (dos héptadas) en cada rama de la horquilla citoplasmática respecto a las otras 24 MCPs, por lo que la longitud total del receptor Htc10 ensamblado en la membrana sería dos vueltas de hélice mayor que para todos los demás quimiorreceptores (Gasperotti et al., 2018).

En base a estos análisis informáticos preliminares, se puede suponer que las vías Che1 y Che2 de *H. titanicae* ensamblarían y señalarían de manera independiente, 24 MCPs a través de Che1, cuya función estaría relacionada con quimiotaxis, y Che2, sólo con Htc10, podría encargarse de alguna función alternativa vinculada con la producción de diguanilato cíclico, ya que uno de sus genes presenta un dominio diguanilato ciclasa predicho.

Este capítulo incluye un análisis de los elementos de especificidad involucrados en las dos vías quimiosensoriales de *H. titanicae* KHS3. Es necesario mencionar que parte de los resultados mostrados son compartidos con Tesis doctoral (Balmaceda, 2023), en particular los ensayos realizados con genes del *cluster che1*.

Objetivos

- Complementar mutantes en el *cluster che* de *Escherichia coli* con los respectivos genes homólogos del *cluster che2* de *Halomonas titanicae*
- Interpretar los resultados obtenidos teniendo en cuenta el análisis de la secuencia y de la estructura predicha de las proteínas involucradas en las interacciones
- Estudiar la especificidad de la metiltransferasa CheR2 por distintos quimiorreceptores, y el rol del dominio TPR en las reacciones de metilación
- Evaluar el efecto de los ligandos de Htc10 en su reacción de metilación

Materiales y métodos

Material biológico y medios de cultivo

Cepas

En este capítulo se utilizaron las siguientes cepas bacterianas:

- *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen): F– *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galE15 galK16 rpsL* (Str^R) *endA1* λ –*
- *E. coli* RP437 (Parkinson & Houts, 1982): *thr*(Am)-1 *leuB6 his-4 metF*(Am)159 *eda-50 rpsL136* [*thi-1 ara-14 lacY1 mtl-1 xyl-5 tonA31 tsx-78*]. Cepa salvaje para quimiotaxis
- *E. coli* RP1078 (Liu & Parkinson, 1989): derivada de RP437 [Δ (*cheW-tap*)2217]
- *E. coli* UU2610 (Zhou et al., 2011): derivada de RP437 [Δ *aer-1 yjgG::Gm* Δ (*tar-cheB*)4346 Δ *tsr-5547* Δ *trg-4543*]
- *E. coli* UU2611 (Zhou et al., 2011): derivada de RP437 [Δ *aer-1 yjgG::Gm* Δ (*tar-cheR*)4283 Δ *tsr-5547* Δ *trg-4543*]

Medios de cultivo

Los cultivos de *E. coli* se crecieron en LB: triptona (Difco) 1% m/V, extracto de levadura (Difco) 0,5% m/V, NaCl (Baker) 0,5% m/V; o TB: 1% m/V triptona, 0,5% m/V NaCl. En caso de utilizar antibióticos, se agregó al medio ampicilina (Amp, GenBiotech) 100 μ g/mL y/o cloranfenicol (Cm, Fluka) 25 μ g/mL. Para placas el medio se suplementó con agar (Difco) 1,2% m/V.

Cebadores

Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para clonado o QuickChange. F significa *forward* y R *reverse*. La secuencia de los sitios de restricción se marca con negrita.

Nombre	Secuencia	Descripción	Sitio
nFR1	5'-AAAAGCGGCCGCATGATGGCGCGCTGGAAATCCC-3'	Clonado de <i>htc10</i> (F)	NotI
nFR2	5'-AAAAGGATCCGAATTACACTCATCCGGTATCCTTATCAGCG-3'	Clonado de <i>htc10</i> (R)	BamHI
nFR6	5'-AAAACATATGATGACCGCTGAATTTCCCCG-3'	Clonado de <i>cheW2</i> (F)	NdeI
nFR7	5'-AAAAGGATCCTTTAACCGAGCCCCTGCTGG-3'	Clonado de <i>cheW2</i> (R)	BamHI
nFR9	5'-AAAATCTAGACATATGAGTGCGTTTGCTCCC-3'	Clonado de <i>cheR2</i> (F)	NdeI
nFR10	5'-AAAAGGATCCTTAACCCACTCCCTGGGTGG-3'	Clonado de <i>cheR2</i> (R)	BamHI

nFR20	5'-GCCAACGGACAGCTAGAGCCACCAACTGC-3'	Mutación I332* en <i>cheR2</i> (F)
nFR21	5'-GCAGTTGGTGGCTCTAGCTGTCCGTTGGC-3'	Mutación I332* en <i>cheR2</i> (R)

Plásmidos

Tabla 7. Plásmidos utilizados en este capítulo.

Nombre	Características	Fuente
pRR48	Amp ^R , vector de expresión inducible por isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)	(Studdert & Parkinson, 2005)
pKG116	Cm ^R , vector de expresión inducible por salicilato de sodio (NaSal)	(Burón-Barral et al., 2006)
pFR1	Derivado de pRR48 que codifica el gen <i>cheW2</i> de <i>H. titanicae</i> KHS3, clonado entre los sitios NdeI y BamHI	Este trabajo
pFR8	Derivado de pRR48 que codifica el gen <i>cheR2</i> de <i>H. titanicae</i> KHS3, clonado entre los sitios NdeI y BamHI	Este trabajo
pFR10	Derivado de pFR8, con la mutación I332*	Este trabajo
pFR7	Derivado de pKG116 que codifica el gen <i>htc10</i> de KHS3, clonado entre los sitios NotI y BamHI	Este trabajo
pPA770	Derivado de pRR48 que codifica el gen <i>cheW</i> de <i>E. coli</i>	(Studdert & Parkinson, 2005)
pRB1	Derivado de pRR48 que codifica el gen <i>cheW1</i> de <i>H. titanicae</i> KHS3	Tesis doctoral (Balmaceda, 2023)
pPA803	Derivado de pRR48 que codifica la fusión funcional <i>yfp-CheR Ec</i>	(Zhou et al., 2011)
pRB9	Derivado de pRR48 que codifica el gen <i>cheR1</i> de <i>H. titanicae</i> KHS3	Tesis doctoral (Balmaceda, 2023)
pCS12	Derivado de pKG116 que codifica el gen <i>tsr E. coli</i>	(Studdert & Parkinson, 2005)
pLP2	Derivado de pKG116 que codifica el gen <i>htc1 H. titanicae</i> KHS3	(Gasperotti et al., 2021)

Construcción de plásmidos

Los fragmentos que codifican los genes de *CheW2*, *Htc10* y *CheR2* fueron amplificados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando ADN genómico purificado como molde. Las mezclas de reacción y los ciclos de PCR fueron iguales a los especificados en el Capítulo I. Los productos de amplificación se digirieron con las respectivas enzimas de restricción (Thermo Fisher, ver Tabla 6), y luego se ligaron utilizando T4 ligasa (Promega) a los vectores apropiados según las indicaciones del fabricante. La transformación bacteriana se llevó a cabo según lo descrito en el

Capítulo I. Todas las construcciones fueron confirmadas por secuenciación de la región codificante completa (Macrogen Inc, Korea).

Obtención de CheR2 mutante

El plásmido pFR10 (que codifica CheR2 Δ TPR) se generó por mutagénesis sitio dirigida por PCR (QuickChange), usando pFR8 como molde, la polimerasa Pfx (Invitrogen) y los *primers* nFR20 y nFR21 (sus secuencias se encuentran en la Tabla 6), que llevan una mutación que genera un *stop* temprano antes de las repeticiones TPR. Los ciclos en termociclador fueron: (94 °C, 1 min) x 1; (94 °C, 1 min; 58 °C, 1 min; 68 °C, 15 min) x 21; (68 °C, 10 min) x 1. El producto de amplificación se digirió con DpnI (Thermo Fisher), y luego se utilizó para transformar células *E. coli* Top10 competentes. Nuevamente, la construcción fue confirmada por secuenciación.

Ensayos de quimiotaxis en placas de agar blando

El comportamiento quimiotáctico de las transformantes se estudió en placas de agar blando (agar 0,25% m/V) de TB suplementadas con antibiótico e inductor (Parkinson, 1976). Las placas fueron inoculadas a partir de colonia fresca e incubadas alrededor de 8 h a 32 °C antes de ser fotografiadas con cámara Canon PowerShot SX540 HS. Para medir los diámetros de los anillos de quimiotaxis se utilizó el programa ImageJ y los gráficos se realizaron con GraphPad Prism.

Ensayos de rotación flagelar

Para estos ensayos, cultivos celulares en fase exponencial media de *E. coli* UU2610 (Δ *cheR*, Δ *cheB*, Δ *mcpS*) transformada con pFR7, pCS12 o pKG116 (crecidos en presencia de Cm 25 μ g/mL y salicilato de sodio -NaSal- 1,2 μ M) fueron cosechados y lavados con *buffer* KPE (K₃PO₄ -Merck- 10 mM pH 7, ácido etilendiaminotetraacético -EDTA, SigmaAldrich- 0,1 mM), y finalmente resuspendidos con *buffer* de fijación (KPE conteniendo lactato de sodio 10 mM, NaCl 5 mM, L-metionina - Biopack- 0,1 mM, Cm 100 μ g/mL). Luego, 100 μ L de la suspensión celular se mezclaron con 5 μ L de dilución de anti-flagelina (anticuerpo cedido por Dr. Parkinson, University of Utah), y 20 μ L de esta última mezcla fueron colocados en un cubreobjetos. Se incubó 30 min, luego se lavó con KPE para eliminar las células sueltas, y finalmente se observaron 100 células (durante 15 s cada una) en microscopio óptico con aumento 100X para determinar el sentido de rotación (Parkinson, 1976) Cada célula observada se clasificó en una de cinco categorías: 100% CW, mayormente CW, 50/50 CW/CCW, mayormente CCW y 100% CCW. La suma ponderada de cada una de las categorías arroja un valor que representa el porcentaje de rotación CW (tumbos) para esa población celular.

Ensayos de metilación por inmunodetección de receptores

Se obtuvieron extractos proteicos totales a partir de cultivos líquidos de células competentes de *E. coli* UU2610 co-transformadas con pKG116 (o algún derivado expresando una MCP) y pRR48 (o algún

derivado expresando una metiltransferasa), e inducidos con NaSal 1,2 μM e isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, PB-L Productos Bio-lógicos) 5-100 μM . En los ensayos con ligandos de Htc10, los cultivos primero se crecieron solo bajo inducción del receptor (NaSal 0,6 μM), y luego de tomar una muestra se indujo la expresión de CheR2 (IPTG 5 μM) en presencia de diferentes cantidades de hipoxantina o guanina.

Los extractos proteicos se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, por *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) siguiendo el protocolo expuesto en el Capítulo I. Una vez finalizada la corrida electroforética, las proteínas fueron transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF), y tratadas con anticuerpo primario y secundario de manera sucesiva. Los anticuerpos policlonales primarios de conejo utilizados estaban dirigidos contra el dominio citoplasmático de Tsr de *E. coli* (Natocor, Córdoba, Argentina) o contra el dominio de unión a ligando de Htc10 de *H. titanicae* KHS3 (ICIVET, Esperanza, Argentina). Los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo estaban acoplados a fosfatasa alcalina (en cuyo caso el revelado se realizó en presencia de cloruro de nitroazul de tetrazolio -NBT, Genbiotech- 0,33 mg/mL y fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo -BCIP, Applichem- 0,17 mg/mL, en medio Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgSO₄ -Applichem- 5 mM) o Cy5 (detección con Typhoon 9400 Amersham).

En los casos indicados, las intensidades relativas de las bandas se calcularon mediante ImageJ (Schneider et al., 2012).

Detección de péptidos por espectrometría de masas

Extractos totales de célula conteniendo la proteína a analizar (CheW2 o Htc10) se resolvieron por SDS-PAGE, y después de la separación el gel se fijó con solución etanol (Merck) 40% V/V, ácido acético (Cicarelli) 10% V/V por 30 min, y finalmente se tiñó con suspensión coloidal 0,75 mg/mL azul de Coomassie G-250 (Biopack), H₃PO₄ (Cicarelli) 1,5% m/V, (NH₄)₂SO₄ (Merck) 7,5% m/V, etanol 25% V/V. Las distintas bandas por analizar se cortaron de los geles y se estudiaron por espectrometría de masas en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM, UBA).

Las muestras fueron reducidas con DTT 20 mM durante 45 min a 56 °C y alquiladas con Iodoacetamida 50 mM durante 45 min en oscuridad. Luego se digirió con la proteasa tripsina (corta a la derecha de K y R) durante toda la noche. Se realizó la extracción de los péptidos con acetonitrilo. La muestra fue liofilizada por Speed Vac y vuelta a resuspender con *buffer* (NH₄)HCO₃ 50 mM pH 8 y se dejaron digiriendo con Glu-C (corta a la derecha de E (y a veces corta un poco en D) durante toda la noche. La muestra fue liofilizada por Speed Vac y resuspendida con 10 μL de ácido fórmico 0,1% V/V. Se realizó un desalado pasando por zip Tip C18 (Merck). Se analizó por nanoHPLC (EASY-nLC 1000, ThermoScientific) acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap (Q-Exactive, ThermoScientific). La configuración del equipo permitió que la identificación de los péptidos se realice al mismo tiempo que los mismos se separan por cromatografía (MS/MS). La ionización de las muestras

se realizó por electrospray (EASY-SPRAY, ThermoScientific). El análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa ProteomeDiscoverer (ThermoScientific) utilizando como base de datos el proteoma de *H. titanicae* KHS3.

Resultados

Complementación funcional de mutantes de *Escherichia coli*

Si bien especulamos que la función del *cluster che2* de *Halomonas titanicae* KHS3 está relacionada con la producción de diguanilato cíclico, nos preguntamos si sus productos génicos son capaces de interactuar con las proteínas de quimiotaxis de *Escherichia coli*, ya que ambos *clusters* presentan cierto grado de homología y podrían presentar señalización cruzada. Para responder esta inquietud, decidimos clonar algunos genes de *che2* en vectores de expresión, y luego analizar el efecto de expresarlos *in vivo* en cepas de *E. coli* mutadas en los respectivos genes.

Por un lado, nos enfocamos en la proteína CheW2, para lo cual clonamos el gen completo (RO22_21185, 561 pb) en el vector de expresión controlada pRR48 (inducible por IPTG). La construcción se denominó pFR1, y se utilizó para transformar células de la cepa *E. coli* RP1078, mutante no quimiotáctica por carecer de la proteína acopladora CheW indispensable para conectar los receptores con la quinasa CheA.

La capacidad quimiotáctica se evaluó mediante ensayos de *swimming* en placas de agar blando 0,25% m/V (Adler, 1966; Parkinson, 1976). En éstos, las células se inoculan por punción, y a medida que la población bacteriana va creciendo y consumiendo los nutrientes circundantes se genera un gradiente radial de los mismos, siendo mayor la concentración en los puntos más alejados. Si las células presentan quimiotaxis hacia alguno de estos compuestos, podrán dirigir sus movimientos a través del medio semisólido para seguir el gradiente que ellas mismas generan y buscar las regiones de mayor concentración de nutrientes, generando anillos de quimiotaxis. En la Figura 23 A puede inspeccionarse el aspecto típico de estos anillos en la cepa mutante RP1078 complementada con el respectivo gen de CheW de *E. coli* (CheW *Ec*). Nótese que cuando esta cepa se complementó con vector vacío no se desarrollaron halos.

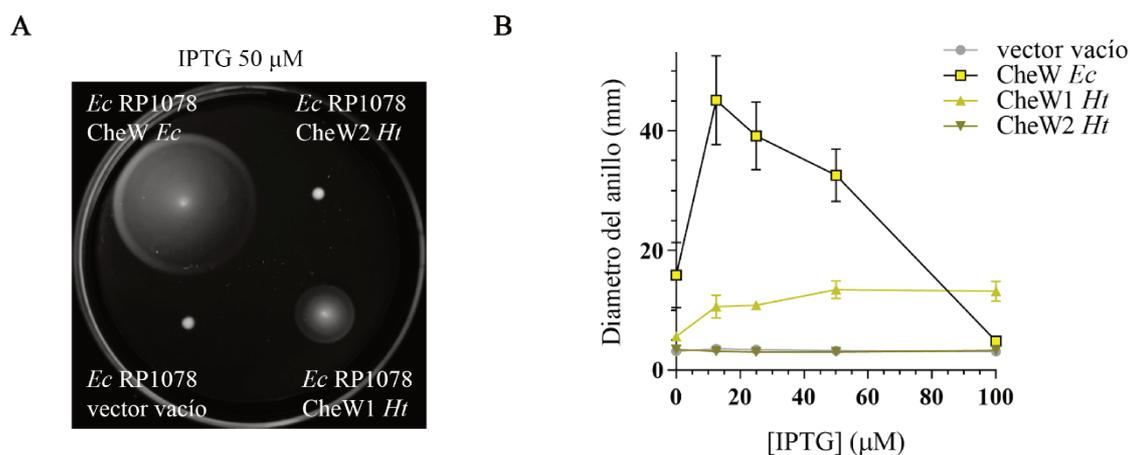


Figura 23. Complementación funcional de RP1078. A. Fotografía representativa de los experimentos en placas de agar blando con IPTG 50 µM, 8 h después de la inoculación por punción de células de la cepa mutante de *E. coli* (*Ec*) RP1078 (carente de *cheW*) transformadas con el gen que expresa CheW *Ec* (pPA770) o con vector vacío

(pRR48), o con las proteínas acopladoras de *H. titanicae* (*Ht*) CheW1 (pRB1) o CheW2 (pFR1). **B.** Cuantificación de los diámetros de los anillos quimiotácticos para distintos niveles de inducción.

La expresión de CheW2 de *H. titanicae* (CheW2 *Ht*) fue incapaz de complementar la función defectuosa de la mutante RP1078, aunque cuando la proteína acopladora que se expresó fue CheW1, del *cluster che1* de *H. titanicae* (CheW1 *Ht*), se restituyó parcialmente el fenotipo analizado (Figura 23).

Cabe mencionar que para descartar la posibilidad de que la falta de complementación se deba a problemas en la expresión de CheW2, analizamos extractos proteicos de la transformante por espectrometría de masas (CEQUIBIEM, Fac. Cs Ex y Nat, Univ de Bs As). La presencia de CheW2 *Ht* fue confirmada por la detección del péptido único LLGLPAPEGNSK.

Por otro lado, también se evaluó la capacidad del quimiorreceptor del *cluster che2* (*Htc10*) de interactuar con el complejo de quimiotaxis de *E. coli* y activar la quinasa. Para esto, se clonó el gen *htc10* (RO22_21155, 2043 pb) en el vector pKG116 (inducible por salicilato de sodio, NaSal), y la construcción (pFR7) se usó para transformar células de la cepa mutante *E. coli* UU2610 ($\Delta cheR$, $\Delta cheB$, $\Delta mcpS$). Al carecer de MCPs, esta bacteria es incapaz de formar complejos de señalización, por lo que no contiene CheA activa y sus flagelos sólo rotan en sentido CCW (Slocumt & Parkinson, 1985). Si se expresa una MCP que pueda interactuar con el aparato quimiotáctico y activar la quinasa, las células podrán experimentar rotaciones CW.

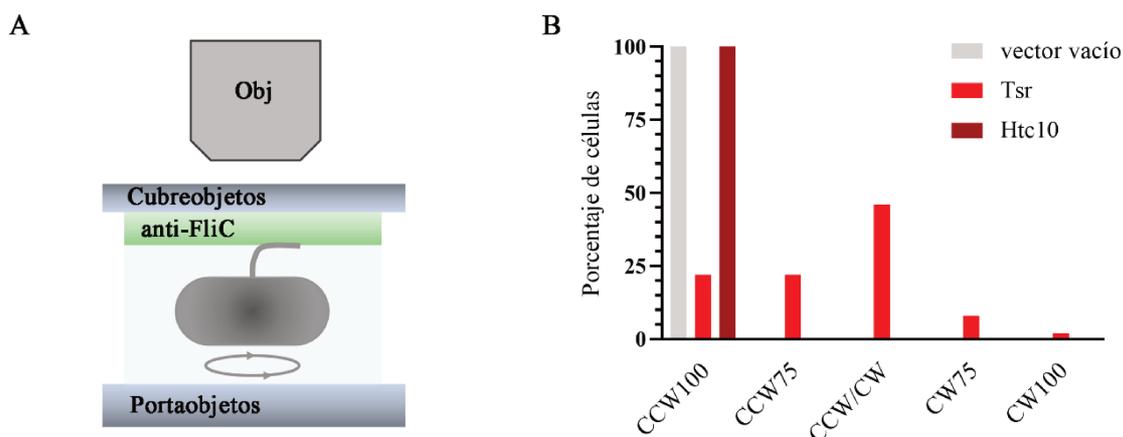


Figura 24. Evaluación de la activación de la quinasa por ensayos de rotación flagelar. **A.** Esquema del ensayo de rotaciones. Las células se fijaron al cubreobjetos mediante anticuerpo anti-flagelina (anti-FliC). Obj: lente de objetivo de microscopio. Adaptado de (Kinosita et al., 2020). **B.** Porcentaje de células de UU2610 expresando vector vacío (pKG116), Tsr (pCS12) o Htc10 (pFR7), con 1,2 μ M de inductor (NaSal), clasificadas en cinco categorías posibles: exclusivamente CCW (CCW100), CCW sesgada con reversiones (CCW75), reversiones frecuentes sin sesgo (CCW/CW), CW sesgada con reversiones (CW75) y exclusivamente CW (CW100). Para la asignación de categorías se observaron 100 células durante 15 s cada una.

El sentido de rotación flagelar de la cepa UU2610 expresando vector vacío, Tsr (receptor de serina de *E. coli*) o Htc10, se observó directamente al microscopio óptico a partir de bacterias fijadas al cubreobjetos por un único flagelo mediante un anticuerpo anti-flagelina (ver esquema de la Figura 24 A) de modo que se permita la rotación del cuerpo celular, y en la Figura 24 B se muestra el patrón de las células analizadas. Al expresar Tsr alrededor de 36% de la población bacteriana de la cepa UU2610 fue capaz de generar rotaciones CW (suma ponderada de las cinco categorías), mientras que con Htc10

(y vector vacío) todas las células presentaron exclusivamente rotación CCW, indicando que Htc10 fue incapaz de activar la quinasa CheA de *E. coli*.

Los resultados mostrados en Figura 23 y Figura 24, muestran que ni la proteína acopladora CheW2 ni el quimiorreceptor Htc10, del *cluster che2* de *H. titanicae*, fueron capaces de sustituir sus homólogos para la correcta transmisión de la señal quimiotáctica en células de *E. coli*.

Interferencia en la quimiotaxis por altos niveles de CheW

El efecto de disminución de quimiotaxis cuando los niveles de CheW son altos (como se observa en la Figura 23 B para IPTG 100 μ M) es un hecho bien documentado (Boukhvalova et al., 2002; Cardozo et al., 2010; Liu & Parkinson, 1989), y se debe a que el exceso estequiométrico de esta proteína afecta el ensamblaje normal de los complejos de señalización al interferir con las apropiadas interacciones quinasa-receptor y receptor-receptor.

Con el propósito de evaluar si CheW2 *Ht* es capaz de interferir con la quimiotaxis normal de *E. coli*, se expresó su gen en la cepa salvaje RP437 y se verificó el fenotipo en placas de agar blando. Los ensayos, mostrados en la Figura 25, revelaron que incluso a altos niveles de inducción la presencia de CheW2 *Ht* no afectó el comportamiento quimiotáctico.

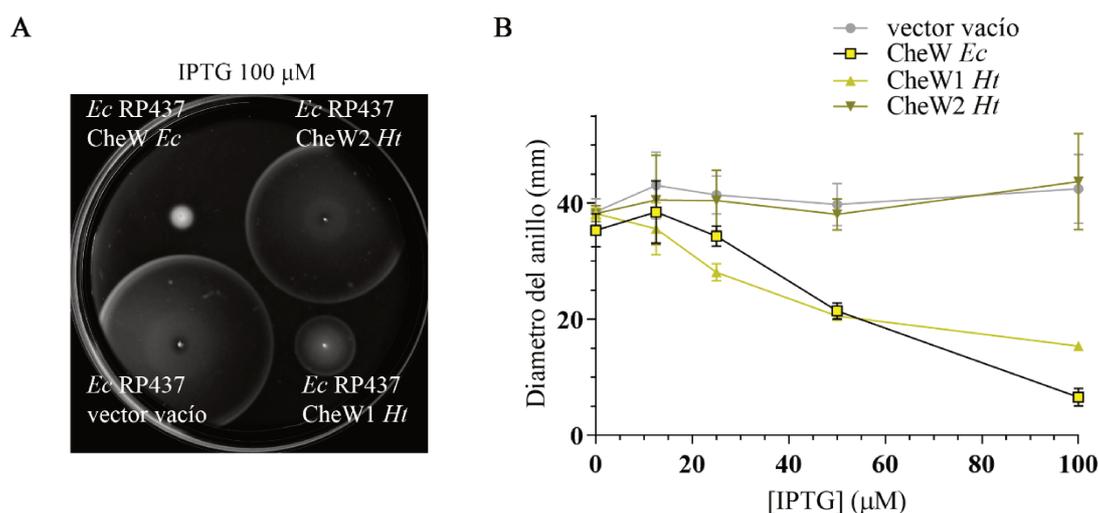


Figura 25. Interferencia en la quimiotaxis de la cepa salvaje RP437 por altos niveles de CheW. **A.** Placa de agar blando resultante de inocular RP437 expresando las proteínas acopladoras CheW1 *Ht* (pRB1) y CheW2 *Ht* (pFR1), o los respectivos controles (CheW *Ec*, pPA770, o vector vacío, pRR48) con IPTG 100 μ M. **B.** Cuantificación de la interferencia en función de la cantidad de inductor.

En este experimento también se expresó CheW *Ec* y vector vacío como controles, y nuevamente se analizó el efecto de CheW1 *Ht*, que, como se esperaba, mostró evidente interferencia. Contrariamente a lo que ocurre con CheW1, estos resultados sugieren que CheW2 no sólo no es capaz de permitir la correcta transmisión de la señal en células de *E. coli*, sino que ni siquiera pareciera interactuar ni con la quinasa ni con los receptores de estos complejos.

Análisis de los residuos involucrados en la formación de complejos de señalización

Con el fin de interpretar la ausencia de interacción entre CheW2 y el receptor Htc10 con la maquinaria de proteínas Che de *E. coli*, se realizó un análisis de las secuencias de las proteínas correspondientes y sus estructuras predichas.

Como se mencionó anteriormente, CheW es capaz de interactuar tanto con CheA como con MCPs. La interacción entre CheW y CheA se ha caracterizado en detalle utilizando diferentes métodos (Briegel et al., 2012; Li et al., 2013; Liu et al., 2012; Park et al., 2006), y se estima que la superficie de contacto más fuerte ocurre entre el subdominio SD2 de CheW y el subdominio SD1 de P5 de CheA (dominio estructuralmente semejante a CheW) e involucra dos hebras- β antiparalelas. En la Figura 26 A se muestra la estructura cristalina de estas proteínas de *E. coli*, y con esferas se marcan los residuos que participan en dicha interacción, principalmente formando una superficie hidrofóbica (residuos color beige), aunque existen puentes de H (por ejemplo, los residuos color naranja y rosa).

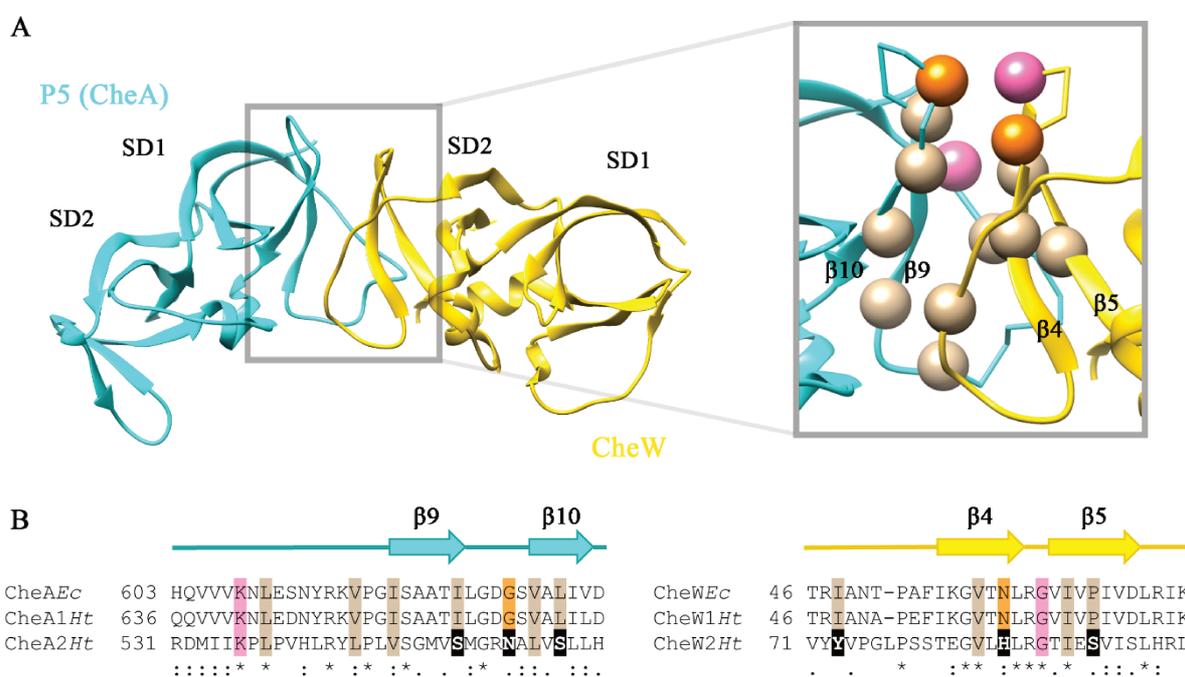


Figura 26. Interacción entre CheW y CheA. **A.** Estructura de CheW (dorado) y el dominio P5 similar a CheW de CheA (cian) de *E. coli* PDB:6S1K (Cassidy et al., 2020). Cada molécula consta de dos subdominios (SD1 y SD2), y a su vez cada uno está compuesto por cinco hebras- β entrelazadas que forman un barril torcido. Los residuos conservados involucrados en la interacción se muestran como esferas a la derecha. Los pares de residuos que interactúan directamente se muestran con el mismo color (rosa o naranja) y los residuos hidrofóbicos de la superficie de contacto se muestran en beige (Huang et al., 2019). **B.** Alineamiento de secuencias de CheA (izquierda) y CheW (derecha) 1 y 2 de *H. titanicae* y de *E. coli*, realizado con ClustalX. Sólo se muestra la región de interacción, el número a la izquierda indica la posición del primer residuo mostrado. Los residuos sombreados coinciden con las esferas de A, y los residuos de las proteínas del *cluster che2* que son diferentes de las conservadas se resaltan con negro. Los símbolos debajo indican conservación: asterisco (*, totalmente conservados), dos puntos (:, parcialmente conservados, los residuos tienen propiedades fisicoquímicas comunes) o un punto (., poco conservados). También se muestra la estructura secundaria de las proteínas de *E. coli*, alineada con su secuencia, resaltando el par de hebras- β involucrado en la interacción.

C. Alineamiento de secuencias de quimiorreceptores de *H. titanicae* KHS3, en el que también se incluyó el receptor de serina de *E. coli* Tsr para comparar. Los once residuos que son invariables en todas las MCPs de *E. coli* se sombreadon con rojo (Ames et al., 2002). Con sombreado negro se marcaron los residuos con carácter diferente y con gris los reemplazos conservativos. El residuo que está ubicado en la punta de la horquilla está marcado con naranja como referencia

Los alineamientos entre las secuencias correspondientes de CheW1 y CheW2, y los dominios P5 de CheA1 y CheA2 de *H. titanicae* (Figura 26 B) muestran que los residuos involucrados en esta interacción se conservan en las proteínas de la vía Che1 mientras que aparecen reemplazos significativos en las de Che2 (marcados con negro en la Figura 26 B). En particular, el par de residuos resaltado con naranja en la Figura 26 B (N en CheW y G en el dominio P5), que interactúan en el cristal, se conservan en CheW1 y CheA1, mientras que se reemplazan por una histidina en CheW2 y una asparagina en CheA2. Además, de los diez residuos hidrofóbicos que se conservan en la misma superficie de interacción, tres son reemplazados en CheW2/CheA2 por residuos con carácter polar.

Por otro lado, la interacción con MCPs ocurre principalmente a través del surco hidrofóbico que une los dos subdominios de CheW (Figura 27 A), y varios estudios han identificado residuos involucrados en dicha interacción (Ames et al., 2002; Boukhvalova et al., 2002; Piñas et al., 2016). Nuevamente, el alineamiento con CheW de *E. coli* muestra una conservación estricta para CheW1 y reemplazos significativos en la superficie correspondiente para CheW2 (Figura 27 B), lo que es consistente con la incapacidad de CheW2 para complementar la mutante de *E. coli*.

A su vez, una inspección detallada del alineamiento del extremo de la horquilla citoplásmica (Figura 27 C), altamente conservado en todas las MCPs predichas de *H. titanicae*, revela ciertas diferencias relevantes para Htc10. De los once residuos que son invariables en los cinco quimiorreceptores de *E. coli* (sombreado color rojo en la Figura 27 C), y en la mayoría de los receptores de quimiotaxis, sólo tres se conservan estrictamente en Htc10, mientras que los otros contienen reemplazos, tres de los cuales son conservativos (sombreado gris) y los cinco restantes de carácter significativamente diferente (sombreado negro).

Dado que estos residuos están involucrados tanto en las interacciones receptor-receptor como en las interacciones receptor-CheW (Ames et al., 2002), la divergencia de secuencia de Htc10, CheW2 y el dominio P5 de CheA2 ayuda a explicar la incapacidad de las proteínas codificadas en el *cluster che2* de *H. titanicae* KHS3 de incorporarse en los complejos de señalización de quimiotaxis de *E. coli*.

Especificidad en las reacciones de metilación

Además del análisis de la región de señalización, se estudió la especificidad de las metiltransferasas codificadas en los *clusters* de quimiosensado de *Halomonas*. En primer lugar, se clonó el gen *cheR2* en pRR48 (construcción pFR8) y se complementó la función quimiotáctica de la mutante UU2611 ($\Delta cheR$, $\Delta mcps$), que expresaba además el gen del receptor de serina *tsr*, en placas de agar blando. En la Figura 28 A se muestra que CheR2 no complementó el fenotipo de la mutante, sugiriendo que esta

metiltransferasa no tuvo actividad frente a Tsr de *E. coli*. En este experimento también se incluyó control positivo (CheR *Ec*) y negativo (vector vacío).

Para estudiar las reacciones de metilación se utilizó la cepa *E. coli* UU2610, que carece de receptores y el aparato de adaptación ($\Delta cheR$, $\Delta cheB$, $\Delta mcps$), en la que se co-expresó una determinada MCP (inducida por NaSal) junto a una determinada metiltransferasa (inducida por IPTG). Los extractos proteicos totales luego se analizaron mediante *western blot* en geles con bajo porcentaje de bisacrilamida, en los cuales las MCPs pueden resolverse de sus derivados metilados. La inmunodetección contra el quimiorreceptor de *E. coli* Tsr, que se muestra en las Figura 28 B, pone en evidencia cómo cambió el patrón de bandas de esta proteína cuando se expresó sola o junto a CheR *Ec*: la presencia de esta metiltransferasa generó una especie con mayor movilidad electroforética, y está plenamente caracterizado que este efecto se debe a metilación del receptor (DeFranco & Koshland, 1980). Como puede observarse en la última calle del *western blot*, CheR2 *Ht* no logró modificar el patrón de Tsr, lo que permite inferir que esta metiltransferasa fue incapaz de catalizar su metilación. En estos ensayos también se indagó el efecto de CheR1 *Ht*, y se observó que ésta sí fue capaz de metilar al menos a una cierta fracción de la proteína. Del mismo modo, al expresar en esta mutante de *E. coli* una MCP canónica de *H. titanicae* KHS3 [en particular el quimiorreceptor de benzoato Htc1 (Gasperotti et al., 2021)] se observó que CheR1 *Ht* pudo cambiar su movilidad electroforética, a diferencia de CheR2 *Ht* (Figura 28 C).

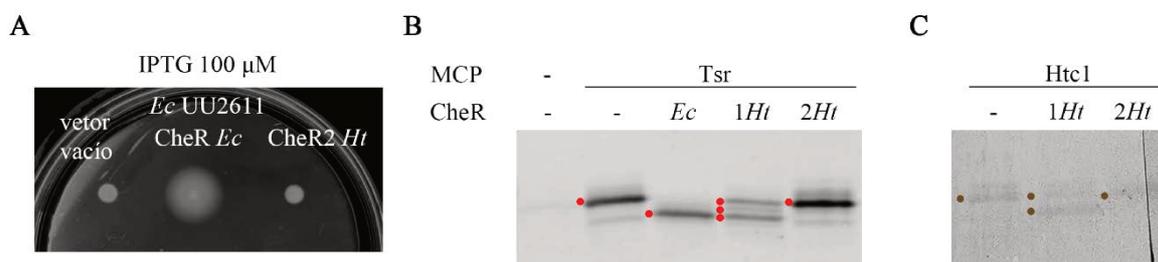


Figura 28. Análisis de la especificidad de las metiltransferasas por los receptores de quimiotaxis. **A.** Ensayos de quimiotaxis en placas de agar blando (0,25% m/V) de *E. coli* (*Ec*) UU2611 ($\Delta cheR$, $\Delta mcps$) complementada con CheR *Ec* (pPA803), CheR2 *Ht* (pFR8), o vector vacío (pRR48), y Tsr *Ec* (pCS12, expresión inducida con NaSal 0,6 μM). **B.** *Western blot* con geles con bajo porcentaje de bisacrilamida (acrilamida 11% m/V, bisacrilamida 0,075% m/V) detectado con anticuerpo anti-Tsr de extractos celulares de *E. coli* UU2610 ($\Delta cheR$, $\Delta cheB$, $\Delta mcps$) co-transformadas con vector vacío (pKG116) o derivado que expresa Tsr (pCS12), y vector vacío (pRR48) o derivado que expresa alguna variante de CheR (de *E. coli* o *H. titanicae*, ver Tabla 7), e inducidas con IPTG 100 μM y NaSal 1,2 μM. Las bandas correspondientes a Tsr se indican con círculos rojos. **C.** Ensayos similares a B realizados con el receptor Htc1 (pLP2). Las bandas de este receptor (también detectadas con anticuerpo anti-Tsr) se señalan con círculos marrones.

En cambio, cuando la MCP expresada fue la que está codificada en el *cluster che2*, Htc10, el resultado obtenido fue el opuesto (Figura 29 A). La expresión sin metiltransferasa permitió identificar la banda correspondiente a receptor sin modificación (banda 1 de la Figura 29 B), y mientras que la expresión de CheR1 *Ht* no generó ningún cambio evidente (Figura 29 A), ni siquiera a alta inducción con IPTG 100 μM (datos no mostrados), la presencia de CheR2 *Ht* originó la aparición de dos bandas de mayor movilidad electroforética (bandas 2 y 3 de la Figura 29 B). Al aumentar la concentración del

inductor del gen *cheR2* pudo observarse la aparición de una cuarta banda (banda 4 de la Figura 29 B), sugiriendo que la cantidad de enzima se relaciona con la modificación observada. Estos resultados indican que efectivamente también existen elementos de especificidad en el aparato de adaptación que aseguran que cada metiltransferasa modifique a los receptores de la vía a la que está asociada.

Las bandas 2, 3 y 4 de la Figura 29 B tienen movilidades diferentes, por lo cual se espera que cada una represente un patrón de metilación diferente, ya sea en número de residuos metilados o en la posición de la metilación. Con el fin de corroborar que el patrón de bandas de Htc10 efectivamente se debió a metilación, las muestras proteicas se separaron por SDS-PAGE en un nuevo gel acrilamida 11% m/V (bisacrilamida 0,075% m/V), y se cortaron las cuatro bandas para ser analizadas por espectrometría de masas (CEQUIBIEM). Las muestras fueron digeridas con tripsina (que corta en el lado carboxilo de Arg, R, y de Lys, K) y con Glu-C (que corta principalmente en el lado carboxilo de Glu, E, a veces en Asp, D).

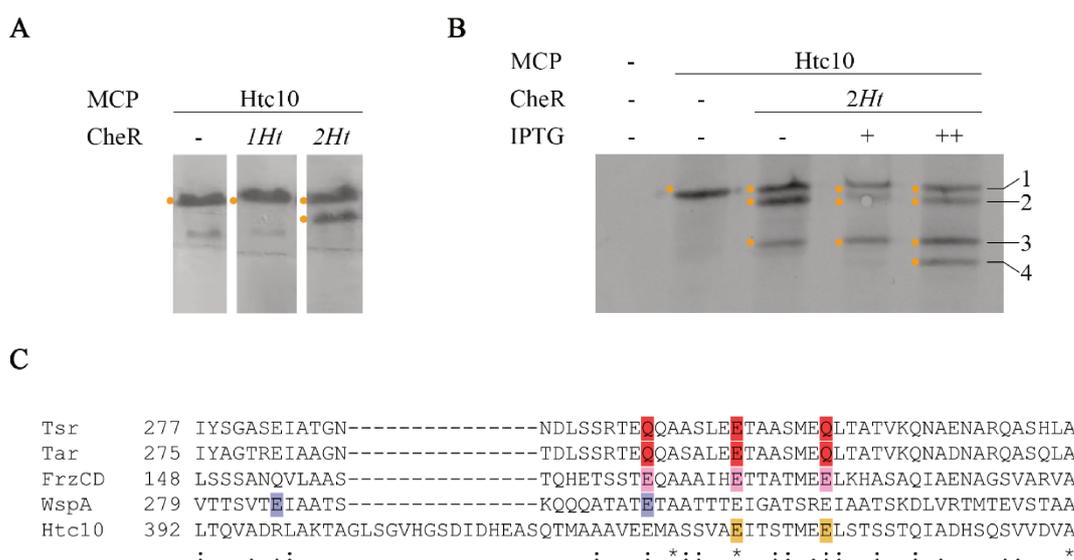


Figura 29. Metilación del receptor codificado en el cluster *che2*. **A.** Inmunodetección en geles acrilamida 11% m/V, bisacrilamida 0,075% m/V con anticuerpo contra Htc10 de extractos celulares de *E. coli* UU2610 (Δ *cheR*, Δ *cheB*, Δ *mcpS*) co-transformada con plásmido que expresa Htc10 (pFR7), y vector vacío (pRR48) o derivado que expresa CheR1 (pRB9) o CheR2 (pFR8) de *H. titanicae* (*Ht*). Inducción con IPTG 5 μ M y NaSal 1,2 μ M. **B.** Metilación de Htc10 por CheR2, con un procedimiento como el recién descrito, con distintas concentraciones de IPTG (inductor del gen *cheR2*): 0 (-), 5 (+), 100 (++) μ M. Las bandas correspondientes a Htc10 se marcaron con círculos naranjas, y en la quinta calle fueron además numeradas: 1 (receptor sin modificación); 2, 3 y 4 (receptor modificado). **C.** Alineamiento de MCPs mostrando los sitios de metilación determinados experimentalmente (sólo se muestra el brazo N-terminal de la región de adaptación). Se sombrearon Glu E (o Gln Q) metilables: con naranja los de Htc10, determinados por espectrometría de masas (E434, presente en las bandas 3 y 4, y E441, presente en la banda 2), con rojo los de los receptores de quimiotaxis Tar y Tsr de *E. coli* (Rice & Dahlquist, 1991; Terwilliger & Koshland, 1984), con rosa los del receptor FrzCD del sistema no canónico de *Myxococcus xanthus* (Scott et al., 2008) y con azul los del receptor WspA de la vía Wsp de *Pseudomonas putida* (Xu et al., 2022). Los símbolos debajo indican conservación siguiendo el mismo código de la Figura 26.

Los espectros confirmaron la presencia de Htc10 con más del 60% de cobertura, y además permitieron identificar, con alto grado de confianza, que Htc10 está modificado por metilación en las bandas 2, 3 y 4. En la banda 2 sólo se detectó la presencia de un grupo en posición Glu 441, y tanto en la banda 3 como en la 4 se encontró metilación en Glu 434. Las posiciones están separadas por siete

residuos, permitiendo que tanto el residuo E434 como E441 se encuentre sobre la misma cara de la α -hélice que compone la horquilla, similar a lo que ocurre con otras MCPs. Más aún, el alineamiento de Htc10 junto a otros receptores, canónicos (Tsr o Tar de *E. coli*) o no canónicos (FrzCD de *Myxococcus xanthus* y WspA de *Pseudomonas putida*), muestra que ambos residuos corresponden a sitios conservados en donde se metilan otras MCPs (Figura 29 C). Es necesario mencionar que, aunque la fragmentación fue adecuada para la identificación del péptido, la cobertura de la región donde se encontraron las modificaciones no fue suficiente para determinar fehaciente todos los sitios específicos de metilación (datos no mostrados), con lo cual no podemos descartar que en algunas de las bandas existan sitios adicionales a los determinados.

A diferencia de las metiltransferasas canónicas, CheR2 presenta un dominio adicional C-terminal compuesto por repeticiones tetra trico péptidos (TPR, por *tetratricopeptide repeat*) (Gasperotti et al., 2018). En la Figura 30 A se muestra la secuencia entera de CheR2, y con sombreado amarillo o gris se marcaron las cuatro TPR predichas por el servidor TPRpred (Karpenahalli et al., 2007). Con el fin de evaluar si este dominio extra participa en la actividad o la especificidad de la enzima, decidimos originar una mutación en el plásmido que codifica *cheR2* para generar un *stop* prematuro (mutación I332*, ver Figura 30 A) y consecuentemente una proteína trunca que carece de TPR (la mutación se confirmó por secuenciación completa del gen). Mediante ensayos de metilación como los descritos anteriormente, se pudo determinar que al igual que CheR2, CheR2 Δ TPR fue incapaz de metilar a Tsr *Ec* (Figura 30 B), y ambas generaron el mismo patrón de metilación para Htc10 *Ht* (Figura 30 C, se muestra sólo el efecto para IPTG 5 μ M, pero para IPTG 0 y 100 μ M ambas proteínas también generaron patrones semejantes, datos no mostrados). Estos resultados sugieren que, al menos en ensayos de expresión heteróloga en *E. coli*, la pérdida del dominio TPR no afecta la actividad ni la especificidad de CheR2.

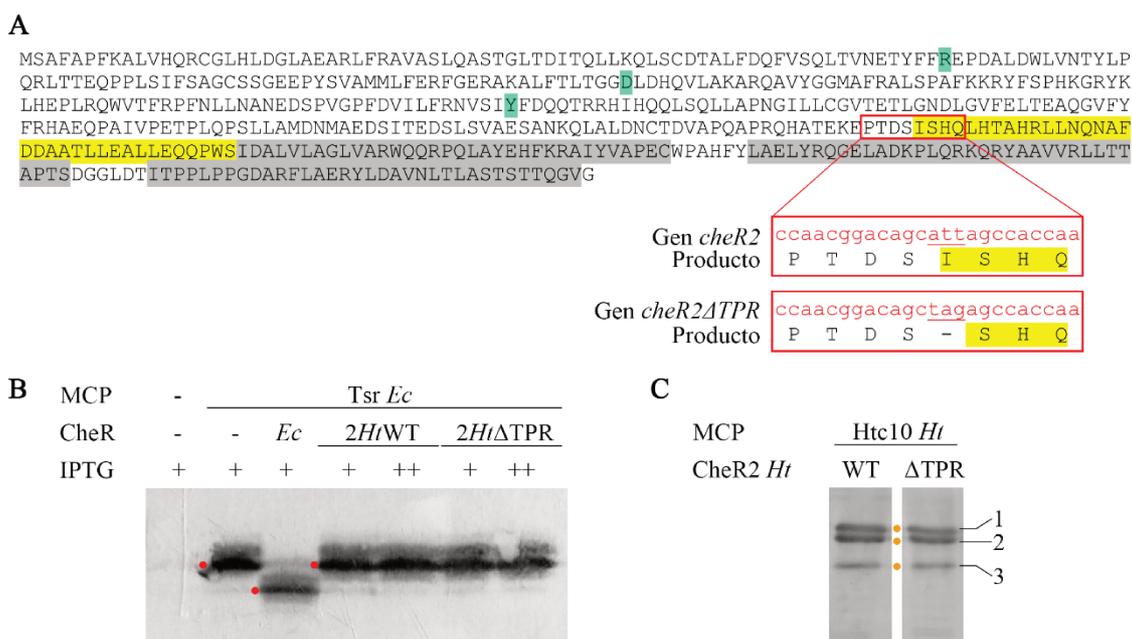


Figura 30. Metilación en ausencia del dominio C-terminal de CheR2. A. Secuencia de CheR2 de *H. titanicae* (*Ht*). Con sombreado verde se indican los residuos conservados que compondrían el sitio activo (Shiomi et al.,

2002) y con amarillo y gris se marcan las cuatro repeticiones tetra trico péptidos (TPR) predichas. Con un recuadro rojo se marca la zona donde se generó la mutación I332* en *CheR2* Δ TPR, y abajo se detalla la secuencia génica de esa región en *CheR2* tipo salvaje (WT) y mutante (Δ TPR). **B.** Ensayos de metilación en geles acrilamida 11% m/V (bisacrilamida 0,075% m/V) con extractos celulares de *E. coli* (*Ec*) UU2610 (Δ *cheR*, Δ *cheB*, Δ *mcps*) co-transformadas con plásmidos que codifican *tsr* (pCS12) y metiltransferasa. Inducción con IPTG 100 (+) o 500 (++) μ M y NaSal 1,2 μ M. Las bandas correspondientes a *Tsr* se marcaron con círculos rojos. **C.** Ensayo de metilación por inmunodetección contra *Htc10* (círculos naranjas). Se realizaron del mismo modo descrito en B, pero expresando el receptor *Htc10*. Inducción con IPTG 5 μ M y NaSal 1,2 μ M.

Metilación de *Htc10* en presencia de sus ligandos

En el Capítulo I, mediante análisis *in vitro*, se pudo determinar que guanina e hipoxantina se unen específicamente al dominio de unión a ligando de *Htc10*. Debido a que la metiltransferasa aumenta su actividad cuando las MCPs se unen a su ligando atrayente en los sistemas canónicos, como el de *E. coli* (Terwilliger et al., 1986), se decidió probar si los derivados purínicos mencionados afectan el patrón de metilación de *Htc10* generado por *CheR2*. Para ello, cultivos celulares de *E. coli* UU2610 transformados con pFR7 (codifica *htc10*, inducible por NaSal) y pFR8 (codifica *cheR2*, inducible por IPTG) se crecieron hasta fase media exponencial, con distinta inducción y cantidad de ligando, y sus extractos proteicos se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia usando anticuerpo contra *Htc10*.

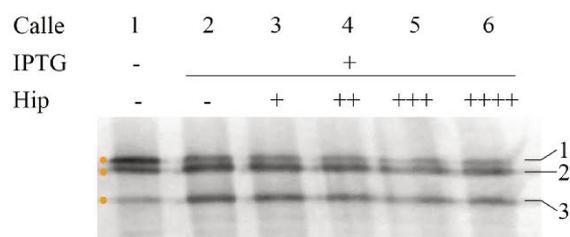


Figura 31. Efecto de hipoxantina en el patrón de metilación de *Htc10*. Ensayos de metilación por inmunodetección contra *Htc10* (círculos naranjas). Las muestras se obtuvieron a partir de extractos celulares de la mutante UU2610 transformadas con *htc10* (pFR7) y *cheR2* (pFR8), crecidos en presencia de NaSal 0,6 μ M, y sin (-) o con inducción de *cheR2* por IPTG 5 μ M (+), en este último caso junto a distintas cantidades de hipoxantina (Hip): 0 (-), 10 μ M (+), 100 μ M (++) , 500 μ M (+++) o 1 mM (++++). A la derecha se numeran las tres bandas observadas: 1 (receptor sin modificación); 2 y 3 (receptor metilado).

En todas las muestras se indujo *Htc10* con NaSal 0,6 μ M. La primera calle del *western blot* de la Figura 31 muestra actividad basal de *CheR2* (sin inducir), un patrón de tres bandas (consistente con la Figura 29), cuyas intensidades se calcularon mediante el software ImageJ a partir de cinco experimentos independientes: banda 1 (45% de la intensidad total), banda 2 (40%), banda 3 (15%). En la segunda calle se observa disminución de la intensidad de la banda 1 y aumento de la banda 3 al inducir *CheR2* con IPTG 5 μ M, lo que es congruente con una mayor proporción de receptor metilado. El análisis con ImageJ cuantificó esta observación: banda 1 (25% de la intensidad total), banda 2 (40%), banda 3 (35%). Estas muestras representan la situación inicial, y el resto de las calles se tratan de cultivos en los que se añadió al mismo tiempo IPTG 5 μ M y además distintas cantidades de hipoxantina. Si la presencia de ligandos aumentara la actividad de *CheR2* se espera que en estas últimas muestras las bandas más bajas (2 y 3) tengan mayor intensidad o que aparezcan nuevas bandas con mayor movilidad (como la banda 4

de la Figura 29); en caso contrario, si el ligando de Htc10 disminuyese la actividad de la metiltransferasa, podría no observarse cambios respecto a la primera calle.

Sin embargo, como puede observarse en la Figura 31 todas las muestras incubadas con hipoxantina presentaron un perfil similar a la situación sin ligando y la cuantificación también arrojó valores parecidos a los obtenidos para la segunda calle, indicando que en estos ensayos de expresión heteróloga en *E. coli* la actividad de CheR2 no se vio afectada por la presencia de hipoxantina en el rango de concentración analizado. Resultados semejantes se obtuvieron con guanina (datos no mostrados).

Ensayos realizados de esta manera con la metiltransferasa trunca (CheR2 Δ TPR) revelaron que la actividad de esta proteína tampoco se vio influenciada por la presencia de hipoxantina (datos no mostrados), reafirmando que, al menos cuando se expresaron en *E. coli*, ambas versiones de la metiltransferasa del *cluster che2* de *H. titanicae* KHS3 tuvieron comportamientos similares.

Discusión

La secuenciación del genoma de la cepa bacteriana *Halomonas titanicae* KHS3 reveló la presencia de dos grupos de genes tipo quimiotaxis, *che1* y *che2*, y su análisis previo sugiere que ambas vías ensamblarían de manera independiente, principalmente por consideraciones referidas a la longitud de la horquilla citoplasmática del único receptor codificado en el *cluster che2* (Gasperotti et al., 2018). En el presente capítulo se examinó esta hipótesis mediante ensayos *in vivo*, analizando la capacidad de ciertas proteínas del sistema Che2 de complementar mutantes en genes homólogos en *Escherichia coli*.

En primer lugar, se estudió la especificidad de la región de señalización, para lo cual se evaluó el rol de la proteína acopladora. A diferencia de lo que ocurre en el sistema Che de *E. coli*, el sistema Che2 de *H. titanicae* contiene dos proteínas acopladoras, CheW2 y CheW3. El modelado molecular previo (Gasperotti et al., 2018) indicó que CheW2 tiene una estructura canónica, es decir la típica estructura de dos barriles con cinco hebras- β cada uno, pero CheW3 carece de las dos hebras- β del subdominio SD2 ($\beta 4$ y $\beta 5$, y el *loop* que las conecta) encargadas de interactuar con la quinasa (ver Figura 32 A). Por tanto, es natural asumir que la proteína que interactúa con la quinasa y, consecuentemente, modula la actividad del regulador de respuesta sea CheW2. Por esta razón, se intentó complementar la mutante *E. coli* $\Delta cheW$ transformando con el gen *cheW2*, pero los resultados obtenidos en placas de agar blando mostraron que, a diferencia de lo que ocurre con CheW1, CheW2 no fue capaz de restituir la función defectuosa en quimiotaxis de la mutante.

La inspección detallada de los residuos que conforman la superficie de contacto entre CheW y CheA reveló que en el caso de las proteínas de Che2 aparecen ciertos reemplazos (puntualizados en la Figura 26) que parecieran ser los responsables, al menos en parte, de la incapacidad de CheW2 *Ht* de interactuar con CheA *Ec*. Además, existen reemplazos significativos en residuos importantes que conforman el surco de interacción con MCPs, sugiriendo que CheW2 también podría mostrar dificultades en interactuar con los quimiorreceptores de *E. coli*. Apoyan esta sugerencia los ensayos en placas de agar blando realizados con una cepa salvaje de *E. coli*, en los que altos niveles de CheW2, generados por elevada concentración de inductor, no interfirieron con la función quimiotáctica normal de la cepa, lo que permite asumir que los complejos de señalización estaban intactos.

Asimismo, como lo muestra el alineamiento de los dominios citoplasmáticos de las MCPs predichas de *H. titanicae*, también existen sustituciones relevantes en la punta de la horquilla del quimiorreceptor codificado en el *cluster che2* (Htc10). Estos residuos están involucrados en las interacciones receptor-receptor y receptor-CheW/CheA, por lo que estos reemplazos podrían ser responsables de la incapacidad de Htc10 de activar la quinasa de *E. coli*, observada en los ensayos de rotaciones. Cabe destacar que en nuestro laboratorio se ha demostrado que Htc1 sí es capaz de activar la quinasa de *E. coli* (Gasperotti et al., 2021). Htc1 es un receptor de quimiotaxis de *H. titanicae* que sensa benzoato y derivados, y, como muestra la Figura 27 C, presenta los once residuos analizados altamente conservados.

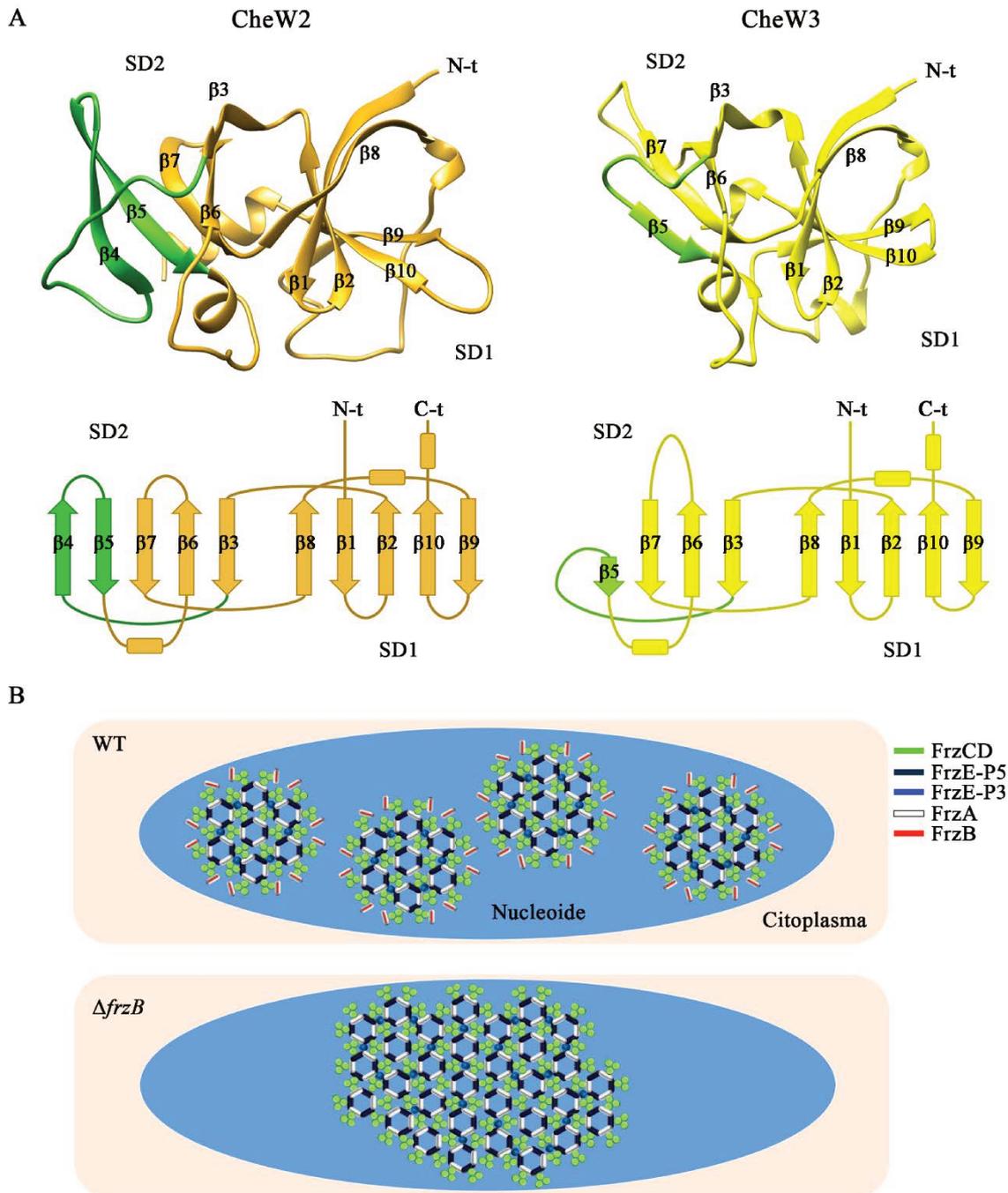


Figura 32. Proteínas acopladoras del cluster *che2*. **A.** Modelos moleculares de CheW2 (RO22_21185) y CheW3 (RO22_21190) de *H. titanicae* KHS3, obtenidos a partir de la base de datos AlphaFold Protein Structure Database (Varadi et al., 2022), construida mediante AlphaFold (Jumper et al., 2021). Se numeran las diez hebras- β y los dos subdominios (SD1 y SD2), equivalentes a CheW de *E. coli* (comparar con Figura 22), y con verde se coloreó la región que interactuaría con el subdominio SD1 de P5 de CheA. **B.** Hipótesis presentada por Guiseppi y colaboradores (Guiseppi et al., 2019) para explicar el efecto observado por la ausencia de la proteína acopladora FrzB en el sistema Frz de *M. xanthus*. Según esta propuesta FrzB puede unirse al receptor, pero al carecer de una de las regiones involucradas en la interacción con la quinasa asociada se interrumpen las conexiones laterales entre complejos de señalización en la cepa salvaje (WT), por lo que FrzB permite la formación de pequeños grupos que de otro modo colapsarían en un solo complejo, como ocurre en la mutante $\Delta frzB$. Adaptado de (Guiseppi et al., 2019).

En conjunto, estos resultados muestran que no sólo la mayor longitud de Htc10 aseguraría que las proteínas de las vías Che1 y Che2 se ensamblen en complejos independientes, sino que también las

sustituciones de aminoácidos en las superficies de interacción de los dominios que conforman los complejos de señalización podrían determinar en gran parte la especificidad de esas interacciones.

En cuanto al rol de CheW3, la comparación con el modelo canónico del sistema de quimiotaxis no permite hacer inferencias sobre su función, ya que éste contiene una sola proteína acopladora. El análisis masivo de genomas bacterianos muestra que muchos sistemas tipo quimiotaxis presentan más de una CheW (Wuichet et al., 2007), por lo que el estudio de proteínas acopladoras con particularidades estructurales o funcionales es relevante. Recientemente se ha publicado un trabajo en el que se estudió la función de una proteína estructuralmente similar a CheW3, denominada FrzB (también carece de las dos hebras- β del subdominio SD2), que forma parte de la vía no canónica Frz de *Myxococcus xanthus* (Guiseppi et al., 2019), la cual controla la frecuencia en la que las células cambian su dirección de movimiento (Zusman et al., 2007). A diferencia de FrzA, otra proteína homóloga a CheW que posee todos los elementos estructurales intactos, FrzB no es necesaria para la activación de la quinasa (Bustamante et al., 2004), pero se ha encontrado que desempeña un rol estructural aún no descifrado por completo. Las proteínas del sistema Frz forman varios complejos separados en el interior de la célula tipo salvaje, pero la ausencia de FrzB genera que esos complejos se agrupen en uno solo (Figura 32 B). Si bien todavía desconocemos la organización y localización de los complejos de proteínas del *cluster che2* en *H. titanicae*, es posible especular que CheW3 genere consecuencias estructurales similares a las observadas para FrzB en *M. xanthus*. En una tesina llevada a cabo en nuestro laboratorio [Tesina de grado (Maldonado, 2022)], se clonó el gen *cheW3* y su producto fue sobreexpresado en una cepa mutante de *H. titanicae* que presentaba la vía Che2 sobreactivada (en el Capítulo III se darán detalles de la mutante). La presencia de elevados niveles de CheW3 revirtió el fenotipo generado por dicha sobreactivación, sugiriendo que CheW3 puede competir con la proteína acopladora canónica CheW2 por las superficies de interacción, lo cual es consistente con la idea de un cierto rol estructural para la organización de los complejos cuando está presente en niveles normales.

Por otro lado, también se evaluó la especificidad de las metiltransferasas codificadas en los dos *clusters* de quimiosensado de *H. titanicae*, CheR1 y CheR2, mediante el análisis del nivel de metilación de los receptores por electroforesis en geles con bajo porcentaje de bisacrilamida. El análisis de extractos proteicos de células de una cepa de *E. coli* carente de CheR, CheB y MCPs mostró que ninguno de los receptores de quimiotaxis probados (Tsr de *E. coli* o Htc1 de *H. titanicae*) modificó su patrón de bandas cuando se expresaron junto a CheR2 *Ht*, lo que indica que esta metiltransferasa no fue capaz de catalizar la metilación de estas MCPs.

En cambio, cuando el receptor que se co-expresó junto a CheR2 fue Htc10, sí se pudo observar la aparición de nuevas bandas de mayor movilidad electroforética, reactivas al anticuerpo contra Htc10 y cuyo patrón está influenciado por concentración del inductor de *cheR2*. El supuesto de que estas bandas adicionales representan variantes de Htc10 con modificaciones postraduccionales fue confirmado por espectrometría de masas, lo que además permitió identificar dos residuos de glutamato susceptibles a ser metilados (E434 y E441) que se encuentran en la región de adaptación predicha por alineamientos.

Resultados opuestos se obtuvieron cuando la metiltransferasa expresada junto a receptores fue CheR1 *Ht*, indicando que también existen elementos de especificidad en el aparato de adaptación que aseguran que cada metiltransferasa modifique a los receptores de la vía a la que está asociada.

El análisis de la secuencia de CheR2 de *H. titanicae* KHS3 reveló la presencia de residuos conservados que conformarían el sitio activo, y, por otro lado, cuatro repeticiones tetra trico péptidos (TPR) en el extremo C-terminal (ver Figura 30). En cambio, CheR1 sólo presenta el núcleo catalítico característico de las metiltransferasas (Gasperotti et al., 2018), al igual que otras metiltransferasas canónicas. Si bien este dominio característico es conservado en las dos proteínas, el análisis previo de sus secuencias indicó que CheR1 *Ht* está más estrechamente relacionado con CheR de *E. coli* (56,3 % de identidad) que CheR2 *Ht* (32,7 % de identidad) (Gasperotti et al., 2018), lo que ayuda a explicar la especificidad registrada experimentalmente. Una observación particularmente interesante es que sólo CheR1 muestra una buena alineación en la región que involucra el subdominio β (ver Figura 8 para reconocer este subdominio en CheR de *Salmonella enterica*), mientras que CheR2 contiene una pequeña deleción (Gasperotti et al., 2018), sugiriendo que esta última podría tener dificultades para unirse al pentapéptido C-terminal que contienen ciertos quimiorreceptores y ser reclutada en el complejo de señalización, que esa es la función reportada para ese subdominio (García-Fontana et al., 2014; Shiomi et al., 2002). Cabe señalar que el pentapéptido C-terminal de Htc10 carece de secuencia consenso (NWETF), aunque sólo 11 de las 25 MCPs totales de *H. titanicae* KHS3 lo tienen (Gasperotti et al., 2018), proporción similar a lo que ocurre en *E. coli*.

En cuanto al dominio TPR, si bien es una variación del modelo canónico, es un dominio bastante común en CheRs que componen sistemas tipo quimiotaxis con funciones alternativas, aunque se desconoce su función específica en la adaptación (Muñoz-Martínez et al., 2012). Con el fin de evaluar si la pérdida de TPR afecta la actividad de CheR2 de *H. titanicae*, se generó una versión trunca de la proteína (CheR2 Δ TPR), por mutación puntual del plásmido que codifica *cheR2*, y se analizó su actividad contra Tsr *Ec* y contra Htc10 *Ht* mediante ensayos de metilación *in vivo* por expresión heteróloga en *E. coli*. Los resultados mostraron que la eliminación de este dominio adicional generó perfiles similares a los obtenidos con la proteína completa, lo que muestra que la fusión TPR no tiene relevancia en la actividad de esta metiltransferasa en las condiciones ensayadas.

Experimentos realizados con la metiltransferasa (FrzF) del sistema Frz de *M. xanthus* (Scott et al., 2008), también asociada a TPR, son las pocas pistas que disponemos actualmente acerca de la influencia de este dominio en la actividad de CheR. Los ensayos *in vitro* realizados por Scott y colaboradores (Scott et al., 2008) muestran que FrzF de longitud completa metiló un solo residuo conservado del receptor FrzCD, mientras que una versión trunca que carece del dominio TPR metiló ese residuo y dos adicionales, también en posiciones conservadas (en la Figura 29 C se marcan con rosa). Esto es indicio de que la presencia del dominio TPR inhibe la actividad catalítica, y si bien se desconoce el mecanismo de acción, Scott y colaboradores plantean la hipótesis de una barrera física que prevendría la metilación,

y la unión de TPR con otras proteínas desconocidas podría aliviar esta inhibición debido a un cambio conformacional.

No hay registro de ninguna CheR fusionada a TPR en la base de datos Protein Data Bank (PDB), por lo que el modelado por homología de secuencia sólo nos permite obtener dos modelos, uno para el dominio metiltransferasa N-terminal y otro para el TPR C-terminal, sin información sobre la interacción entre ellos. Sin embargo, la predicción molecular *de novo* de CheR2 entera generada mediante el programa de inteligencia artificial AlphaFold (Jumper et al., 2021), descargada de la base de datos AlphaFold Protein Structure Database (Varadi et al., 2022), parecería apoyar a la hipótesis de funcionamiento sugerida por Scott y colaboradores. En la Figura 33 se muestra dicho modelo, que consta de un dominio N-terminal metiltransferasa que contiene los residuos conservados que compondrían el sitio activo (esferas color verde claro) bloqueados por el dominio TPR C-terminal (gris), compuesto por tres repeticiones en tándem formando un pequeño α -selenoide y una α -hélice de 25 residuos en el extremo. Cabe señalar que la posición del largo *linker* de alrededor de 60 residuos que conecta ambos dominios es de muy baja confianza, por lo que su ubicación es incierta. El gráfico de error predicho (PAE, por *predicted aligned error*) de la Figura 33 B sugiere que la posición relativa de los dos dominios presenta un poco mayor de certidumbre, lo que podría indicar cierto grado de empaquetamiento.

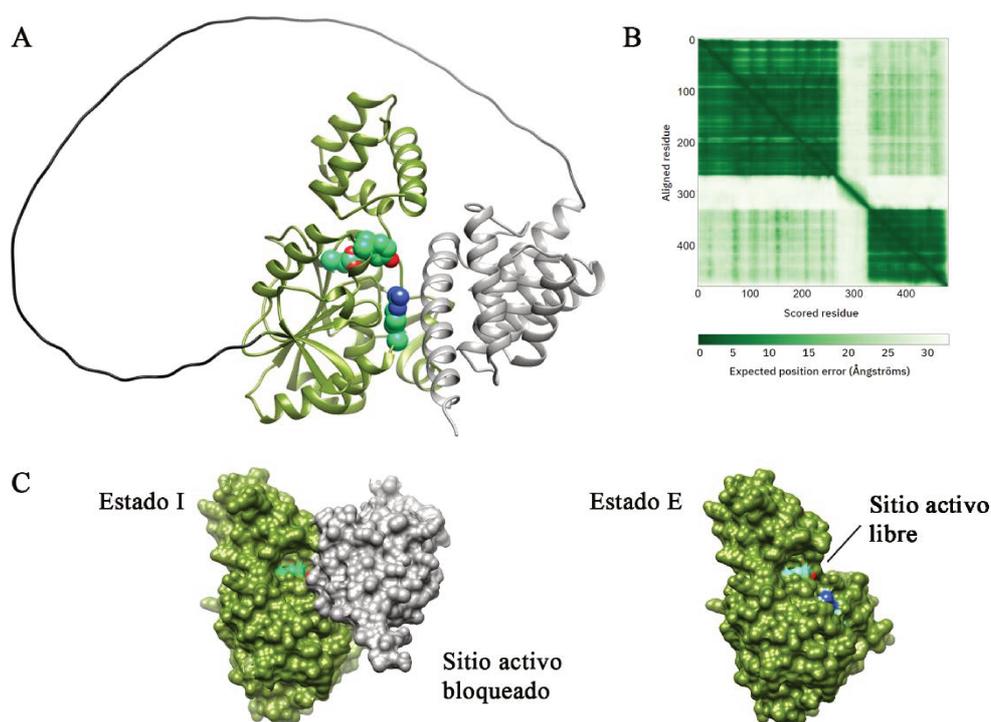


Figura 33. Modelado molecular de CheR2 mediante AlphaFold. **A.** Modelo molecular de CheR2 completa (RO22_21165), descargado de la base de datos AlphaFold Protein Structure Database (Varadi et al., 2022). Se coloreó el dominio metiltransferasa con verde oliva, el dominio TPR C-terminal con gris y el *linker* que los conecta con negro; y los residuos que componen el sitio activo se marcaron con esferas de color verde claro (los mismos residuos fueron resaltados con verde en la Figura 30), cuyos átomos de O son rojos y los N azules. **B.** Gráfico de error predicho (PAE). El color en la posición (x,y) indica el error de posición esperado por AlphaFold en el residuo x, cuando las estructuras pronosticadas y verdadera están alineadas en el residuo y. **C.** Superficie de CheR2

representando los supuestos dos posibles estados: inhibido I (modelo de proteína entera, sin *linker*) y estimulado E (versión trunca carente de dominio TPR), en los que se puede observar la exposición del sitio activo.

Sin embargo, los datos experimentales no apoyan esta observación. Si suponemos que en su entorno natural efectivamente CheR2 tiene dos estados influenciados por la posición del dominio TPR (ver Figura 33 C), inhibido (con el sitio activo bloqueado) o estimulado (con el sitio activo expuesto), de modo que sin dominio TPR la proteína estará estimulada, el hecho de que en los experimentos mostrados en este capítulo CheR2 y CheR2 Δ TPR den los mismos resultados podría ser una consecuencia particular del contexto celular de la cepa de *E. coli* donde se expresan. Es decir, podríamos imaginar que cuando la enzima es expresada en *E. coli* el rol inhibitorio de su dominio C-terminal se ve arruinado por algún factor externo, por ejemplo, la presencia de proteínas características de *E. coli* que interactúen directamente con el dominio TPR. Futuros experimentos *in vitro* o en la misma *Halomonas* podrían ayudar a probar esta hipótesis y a esclarecer el rol de este tipo de dominios en la funcionalidad de la enzima.

Finalmente, también se probó si la presencia de los ligandos específicos de Htc10 (determinados en el Capítulo I) afectaba la actividad metiltransferasa de CheR2, pero en ninguna condición analizada se observó una diferencia significativa en el patrón ni en la intensidad de las bandas inmunorreactivas. Como aún no se han reportados ligandos químicos para otro sistema que codifique una metiltransferasa fusionada a TPR, es difícil especular la relación entre la unión de compuestos específicos al receptor y actividad de la CheR en estos sistemas, y por ahora sigue siendo un misterio. En el contexto de la hipótesis recién planteada, una posible explicación es que los ligandos podrían influir *sólo* en la actividad del estado inhibido, en cuyo caso los resultados recopilados estarían afectados por la expresión heteróloga. A pesar de las múltiples ventajas de trabajar con cepas derivadas de *E. coli*, principalmente en cuanto a facilidad de manipulación molecular, es cierto que hay que destacar el problema de estudiar señalización por expresión de genes en este tipo cepas, ya que es posible perder o incorporar muchas interacciones con factores ajenos al núcleo central.

En resumen, las evidencias brindadas en este capítulo son consistentes con la hipótesis de que las proteínas involucradas en las dos vías de quimiosensado de *H. titanicae* KHS3 ensamblan en forma independiente, y se mantienen físicamente separadas para llevar a cabo distintas funciones celulares.

CAPÍTULO III

Fenotipo asociado a Che2

El *cluster che2 Halomonas titanicae* KHS3 codifica un conjunto de proteínas homólogas a las de los sistemas de quimiotaxis, y éstas constituyen una vía de señalización denominada Che2, que comparte ciertas características con el sistema Wsp de *Pseudomonas*. La más relevante de estas características es sin duda la presencia de una **diguanilato ciclasa** (DGC) fusionada a un dominio regulador de respuesta (ver sección “Sistemas homólogos a los de quimiotaxis de *Halomonas titanicae* KHS3”, Introducción). La vía Wsp es uno de los sistemas no canónicos más caracterizados, por lo que el conocimiento de su funcionamiento es indispensable para el estudio del *cluster che2* de *H. titanicae*.

En *P. aeruginosa*, la eliminación del gen *wspF*, que codifica la metilesterasa de la vía Wsp, genera altos niveles del mensajero intracelular diguanilato cíclico, di-GMPc, (Hickman et al., 2005) y un fenotipo caracterizado por colonias bacterianas pequeñas de aspecto rugoso (Figura 34), hecho que le dio nombre a la vía: *wrinkly spreader phenotype* (D’Argenio et al., 2002; Hickman et al., 2005). Esta mutante en *wspF* tiene el receptor WspA sobremetilado, presumiblemente por acción de la metiltransferasa WspC, y por tanto en una conformación que mantiene a la histidín quinasa WspE constitutivamente activa (Xu et al., 2022). En estas condiciones, la DGC WspR se encuentra fosforilada, y, consecuentemente, su actividad enzimática está aumentada (Chan et al., 2004; Hickman et al., 2005).

Además de cambios en la morfología de colonias, la estimulación de la vía produce aumento en la autoagregación y en la formación de biopelículas, y disminución de la movilidad (D’Argenio et al., 2002; Hickman et al., 2005). La delección de los respectivos genes *wspF* produce fenotipos similares en otras especies del género, como *P. fluorescens* (Spiers et al., 2002) y *P. putida* (Hueso-Gil et al., 2020).

Las biopelículas o *biofilms* son comunidades microbianas compuestas por células sésiles embebidas en una matriz rica en glúcidos, proteínas, lípidos, y ácidos nucleicos, que otorga gran resistencia ante

agentes antimicrobianos (Costerton et al., 1999). Un esquema del desarrollo de un *biofilm* de *P. aeruginosa* se muestra en la Figura 35.

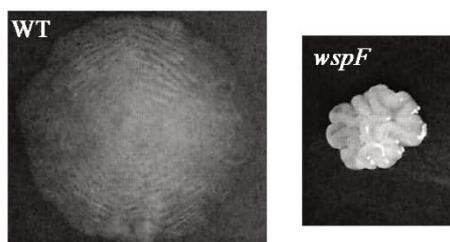


Figura 34. Morfología de colonias de cepas salvaje (WT) y mutante *wspF* de *P. aeruginosa* PAO1. El diámetro de la colonia WT es aproximadamente 0,3 cm. Adaptado de (D'Argenio et al., 2002).

Se ha demostrado que la molécula de señalización di-GMPc juega un papel clave en constitución y maduración de biopelículas en muchos microorganismos. El modelo actual asocia altos niveles de di-GMPc con un estilo de vida sésil y formación de *biofilm*, y bajos niveles con estilo de vida libre y móvil (célula planctónica) (Hengge, 2009; Jenal, 2004; Wolfe & Visick, 2008). La concentración intracelular de di-GMPc está regulada por proteínas DGC (motivo conservado GGDEF), responsables de su síntesis, y por proteínas con actividad de fosfodiesterasa (PDE por *phosphodiesterase*, con motivo conservado EAL o HD-GYP), que conducen a su degradación (Liu et al., 2022). Suelen encontrarse varios de estos dominios conservados en un mismo genoma de casi cualquier organismo del dominio Bacteria.

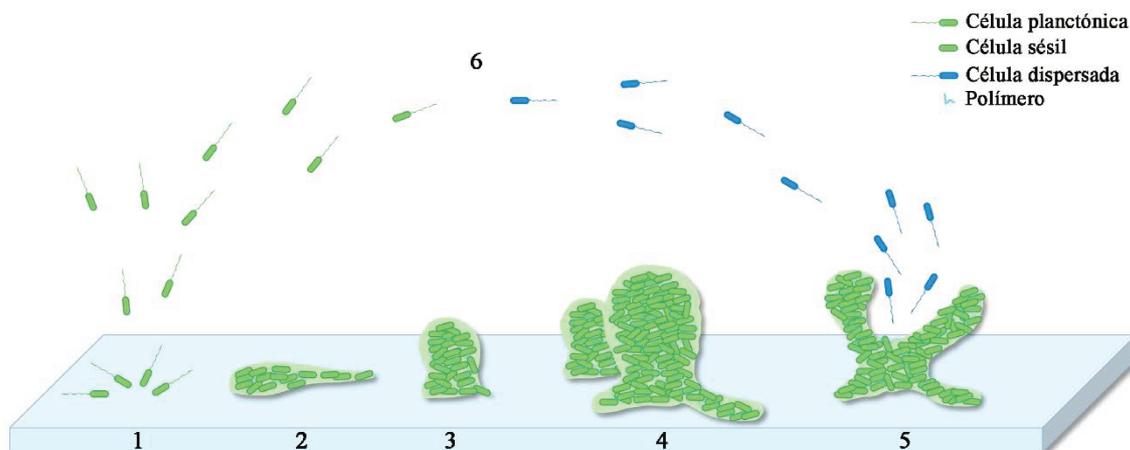


Figura 35. Ciclo de desarrollo de *biofilms* de *P. aeruginosa*. Se pueden distinguir seis etapas en este esquema: adhesión inicial reversible (1), adherencia irreversible (2), desarrollo de microcolonias (3), *biofilm* maduro (4), dispersión (5) y transición de células dispersadas a planctónicas (6). Adaptado de (Thi et al., 2020).

En el caso del patógeno oportunista *P. aeruginosa*, los *biofilms* son indispensables para el desarrollo de infecciones (Thi et al., 2020), por lo que su estudio cobró gran relevancia en las últimas décadas volviéndolo un organismo modelo. En esta especie, el aumento de los niveles de di-GMPc es consecuencia de la actividad de diversas DGCs, entre las que se encuentra WspR, y promueve la producción de exopolisacáridos y adhesinas, reduce la movilidad e inhibe la biosíntesis de la maquinaria flagelar (Ha & O'Toole, 2015).

Respecto a *H. titanicae* KHS3, su genoma codifica 36 proteínas con dominios DGC, una de las cuales, DGC2, se encuentra codificada en el *cluster che2*. Este capítulo incluye el estudio el rol fisiológico de la vía Che2 de la *H. titanicae* KHS3, mediante una estrategia similar a la utilizada en especies de *Pseudomonas*, que incluye la evaluación de fenotipos relacionados con *biofilm* y movilidad de la cepa salvaje y de cepas mutantes o sobreexpresantes de genes centrales de la vía.

Objetivos

- Obtener mutantes y sobreexpresantes de genes centrales del *cluster che2* de *Halomonas titanicae* KHS3
- Caracterizar la movilidad y la formación de biopelículas mediante ensayos *in vivo* en la cepa salvaje, y en sobreexpresantes y mutantes
- Evaluar el rol de di-GMPc en estos fenotipos
- Analizar el efecto de los ligandos en la formación de biopelículas

Materiales y métodos

Material biológico y medios de cultivo

Cepas

En este capítulo se utilizaron las siguientes cepas bacterianas:

- *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen): F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galE15 galK16 rpsL* (Str^R) *endA1* λ -*
- *E. coli* S17-1 λ pir+ (Simon et al., 1983): C600::RP-4 2-(Tc::Mu) (Kn::Tn7) *recA, thi, pro, hsdRM+* λ pir
- *Halomonas titanicae* KHS3 (D'Ippólito et al., 2011): aislamiento ambiental
- *H. titanicae* SF17 (este trabajo): derivada de KHS3 Ω *htc10* (*htc10*::pFR12)
- *H. titanicae* SF28 (este trabajo): derivada de KHS3 Δ *cheB2*

Medios de cultivo

Los cultivos de *E. coli* se crecieron en LB [triptona (Difco) 1% m/V, extracto de levadura (Difco) 0,5% m/V, NaCl (Baker) 0,5% m/V] o TB (1% m/V triptona, 0,5% m/V NaCl). Los de *H. titanicae* se crecieron en LB-2 (triptona 1% m/V, extracto de levadura 0,5% m/V, NaCl 2% m/V) o en medio mínimo H1-2 [K₂HPO₄ (Merck) 11,2 g/L, KH₂PO₄ (Merck) 4,8 g/L, (NH₄)₂SO₄ (Merck) 2,0 g/L, FeCl₃ (Fluka) 1,85 μ M, MgSO₄ (Applichem) 1 mM, NaCl 2% m/V] suplementado con extracto de levadura 0,25% m/V (H1-2-YE) o citrato de sodio (Biopack) 0,2% m/V (H1-2-Cit). En caso de ser necesario, se agregó al medio ampicilina (Amp, GenBiotech) 100 μ g/mL, kanamicina (Km, Genbiotech) 50 μ g/mL o cloranfenicol (Cm, Fluka) 25 μ g/mL. Para medio sólidos se agregó agar (Difco) 1,2% m/V.

Cebadores

Tabla 8. Oligonucleótidos usados en este capítulo. F significa *forward* y R *reverse*. La secuencia de los sitios de restricción se marca con negrita.

Nombre	Secuencia	Descripción	Sitio
nFR3	5'-AAAACCATGGGACTTCAAGCACGTTACACAGC-3'	Chequeo de conjugantes	
nFR8	5'-GAAACTCGAGCTCCAGGAAGCGCTCGTG-3'	Chequeo de conjugantes	
nFR9	5'-AAAATCTAGACATATGAGTGCGTTTGCTCCC-3'	Construcción de región flanqueante <i>downstream</i> a <i>cheB2</i> (F)	XbaI
nFR10	5'-AAAAGGATCCTTAACCCACTCCCTGGGTGG-3'	Construcción de región flanqueante <i>downstream</i> a <i>cheB2</i> (R)	BamHI
nFR13	5'-TCGATACGGCCAGTTCTCGC-3'	Amplificación de <i>cheB2</i> (F)	
nFR14	5'-GAGGAGCTGAGTGATGTCGG-3'	Amplificación de <i>cheB2</i> (R)	

nFR27	5'-AAAACTGCAGATGTCCATGGCTGCATGG-3'	Clonado de <i>cheR2</i> (F)	PstI
nFR28	5'-AAAATCTAGAAAGCGGCGAATATCCAGC-3'	Clonado de <i>cheR2</i> (R)	XbaI
M13R	5'-GCGGATAACAATTTACACAGG-3'	Primer universal utilizado para chequeos	

Plásmidos

Tabla 9. Plásmidos utilizados en este capítulo.

Nombre	Características	Fuente
pSEVA212S	Km ^R , origen de replicación R6K dependiente de λ pir. Conjugable	Colección SEVA (Silva-Rocha et al., 2013)
pSEVA311	Cm ^R , origen de replicación R6K dependiente de λ pir. Conjugable	Colección SEVA (Silva-Rocha et al., 2013)
pJN105	Derivado de pBBR1MCS-5 (Gm ^R) con <i>cassette araC-P_{BAD}</i>	(Newman & Fuqua, 1999)
pBBR1MCS-2	Derivado de pBBR1MCS (Km ^R)	(Kovach et al., 1995)
pVI520	Amp ^R , vector de expresión inducible por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Conjugable	(O'Neill et al., 1998)
pFR7	Derivado de pKG116 que codifica el gen <i>htc10</i> de KHS3, clonado entre los sitios NotI y BamHI	Capítulo II
pFR5	Derivado de pSEVA212S que contiene dos brazos homólogos flanqueantes a <i>cheB2</i> de KHS3	Este trabajo
pFR12	Derivado de pSEVA311 que contiene un fragmento interno de <i>htc10</i> de KHS3 de 809 pb, clonado en el sitio Sall	Este trabajo
pFR15	Derivado de pJN105 que codifica el gen <i>cheR2</i> de KHS3 con su propio sitio de unión a ribosoma predicho, clonado entre los sitios PstI y XbaI	Este trabajo
pFR17	Derivado de pBBR1MCS-2 que codifica el gen <i>cheR2</i> de KHS3 con su propio sitio de unión a ribosoma predicho, clonado entre los sitios EcoRI y XbaI	Este trabajo
pBBR1MCS1-I-SceI	Derivado de pBBR1-MCS1 (Cm ^R) que expresa la endonucleasa I-SceI	(Fu et al., 2014)
pVI1061	Derivado de pVI520 conteniendo el gen PP2258 de <i>Pseudomonas putida</i> con su sitio diguanilato ciclasa SGDEF inactivado por SAAF	(Österberg et al., 2013)

Clonado de *cheR2*

La región codificante de *CheR2* de *H. titanicae* KHS3 se amplificó mediante PCR estándar siguiendo una metodología similar a la descrita en el Capítulo I (*primers* nFR27 y nFR28). Los productos se digirieron con las enzimas de restricción PstI y XbaI (Thermo Fisher), y luego se ligaron en el vector pJN105. La construcción (pFR15) fue verificada por secuenciación de ADN (Macrogen Inc, Korea), y luego digerida con las enzimas EcoRI y XbaI (Thermo Fisher) para subclonar el gen *cheR2* en el vector pBBR1MCS-2 (construcción denominada pFR17). Los plásmidos resultantes se introdujeron en cepas de *E. coli* mediante transformación convencional con cloruro de calcio.

Transferencia de plásmidos a *Halomonas*

En el caso de *Halomonas*, los plásmidos se transfirieron por conjugación utilizando *E. coli* S17-1 λ pir⁺ como cepa dadora, ya que ésta tiene incorporado en su genoma los genes necesarios para realizar conjugación bacteriana (Simon et al., 1983). Se realizaron estrías con palillos estériles, una de la cepa

dadora y, por encima, una de la aceptora, sobre placas de selección H1-2-Cit suplementadas con antibiótico, y se incubaron a 32 °C por 2-3 días. Las conjugantes se repicaron varias veces en el mismo medio, luego en LB-2 con antibiótico, y finalmente se confirmó la identidad de *Halomonas* por amplificación de un gen ausente en *E. coli* (*primers* nFR3 y nFR8).

Construcción de mutantes

La mutante de inserción *H. titanicae* SF17 (Ω *htc10*) se construyó clonando un fragmento interno de 815 pb (560-1374) del gen *htc10* del plásmido pFR7 digerido con SalI en el vector suicida pSEVA311. El plásmido resultante (pFR12) se transfirió a *H. titanicae* KHS3 de tipo salvaje mediante conjugación. Se aislaron colonias resistentes a Cm, y la interrupción de *htc10* se confirmó por PCR.

En cambio, para la eliminación limpia de *cheB2* (cepa SF28, Δ *cheB2*) se siguió un protocolo adaptado de (Fu et al., 2014). Básicamente, dos fragmentos de al menos 500 pb flanqueantes a *cheB2* se clonaron secuencialmente (primero 530 pb río abajo, obtenido por digestión del producto de PCR amplificado con *primers* nFR9 y nFR10 con XbaI y HindIII, y después 940 pb río arriba, obtenido por digestión de pFR7 con SacI y BamHI) en el vector suicida pSEVA212S (Km^R, que contiene en su secuencia dos sitios de restricción I-SceI) para obtener la secuencia de delección final, pFR5, y luego transferirla por conjugación a *H. titanicae* KHS3. Los fragmentos se eligieron de modo que *cheB2* resulte reemplazado por una versión minigénica, manteniendo los cinco primeros codones y tres adicionales, incluyendo el de finalización (siete residuos totales: MSVIRIL). La inserción del plásmido suicida por recombinación homóloga en colonias resistentes a Km fue confirmada por PCR. Un segundo plásmido (pBBR1MCS1-I-SceI), que expresa la enzima de restricción I-SceI, se transfirió por conjugación a la cepa mutante previamente obtenida. Después de varios repiques, las colonias sensibles a Km se seleccionaron para determinar la presencia de la delección mediante PCR, y finalmente se curaron del plásmido pBBR1MCS1-I-SceI.

Inmunodetección con Htc10

Los extractos de proteínas totales de las cepas de *Halomonas* se obtuvieron cosechando 2 mL de cultivos líquidos con densidad óptica (DO) 0,5, medida a 600 nm, lavando con *buffer* KPE (K₃PO₄ - Merck- 10 mM pH 7, ácido etilendiaminotetraacético -EDTA, SigmaAldrich- 0,1 mM), y finalmente resuspendiendo en 50 μ L de *buffer* de siembra (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, glicerol 10% V/V, dodecilsulfato sódico -SDS, Merck- 2% m/V, Bromophenol Blue BPB -Fluka- 0,1% m/V). Las muestras se hirvieron por aproximadamente 15 min, y luego se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, por *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) tal como se expone en el Capítulo I. Una vez finalizada la corrida electroforética, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF), y tratadas con anticuerpo policlonal primario de conejo dirigido contra el dominio de unión a ligando de Htc10 de *H. titanicae* KHS3 (ICIVET, Esperanza, Argentina). Luego se expuso a anticuerpo secundario anti-IgG de conejo

acoplados a fosfatasa alcalina, y finalmente las proteínas se detectaron por reacción entre cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT, Genbiotech) 0,33 mg/mL y fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP, Applichem) 0,17 mg/mL, en Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgSO₄ 5 mM. Las membranas reveladas fueron fotografiadas con cámara Canon PowerShot SX540 HS.

Ensayos de *biofilm* por tinción con cristal violeta

El ensayo fue adaptado de (O'Toole & Kolter, 1998). 800 µL de cultivos bacterianos crecidos en H1-2-YE con DO 0,3 se incubaron a 28 °C sin agitación en tubos Eppendorf de 1,5 mL (en los experimentos con ligandos, estos cultivos contenían hipoxantina -SigmaAldrich- o guanina -SigmaAldrich- 1mM). Después de 24 h, se retiraron las células planctónicas, los tubos se lavaron tres veces con agua y las células adheridas se tiñeron con una solución de cristal violeta (CV) al 0,1% m/V durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se desechó la solución de tinción, los tubos se lavaron tres veces con agua y luego se dejaron secar a temperatura ambiente. Después de fotografiar con cámara Canon PowerShot SX540 HS, se le añadieron 900 µL de ácido acético (Cicarelli) 30% V/V, y después de 10 min se midió la absorbancia de la solución a 595 nm. Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism versión 7.0.

En el experimento para evaluar el efecto de la expresión de la fosfodiesterasa, los cultivos de una noche que crecieron en presencia de 100 µg/mL de Amp se diluyeron hasta una DO 0,1 en medio que contenía Amp y las concentraciones apropiadas de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, PB-L Productos Bio-lógicos), y se incubaron a 28 °C hasta una DO 0,3. Luego, 800 µL de cultivo se colocaron en tubos Eppendorf, y se continuó una metodología como la recién descrita.

Ensayos de movilidad

Análisis de *swimming* en placas de agar blando

El comportamiento quimiotáctico se evaluó en placas de agar blando (agar 0,25% m/V) de H1-2-YE suplementadas con antibiótico en caso necesario. La metodología seguida fue similar a la explicada en el Capítulo II.

***Twitching* en placas de agar duro**

El movimiento mediado por pili tipo IV se analizó en placas de agar duro (agar 1% m/V) de H1-2-YE suplementadas o no con antibiótico. Se inocularon con colonias frescas por punción hasta el fondo de la placa y luego se incubaron en estufa a 32°C por alrededor de 2 días. Para el registro fotográfico se extrajo la colonia superficial por remoción física, posterior a 30 min de incubación con la solución reveladora metanol -Merck- 50% V/V, ácido acético 10% V/V.

Inspección directa al microscopio

Para los ensayos de movilidad, se inocularon colonias frescas de cada cepa en H1-2-YE y se incubaron durante toda la noche a 28°C en un agitador a 200 rpm. Estos cultivos con DO aproximadamente 1,5 se diluyeron hasta DO 0,4 con medio fresco, y se observaron gotas de 6 µL de cada cultivo bajo un microscopio óptico Nikon Ti, con un objetivo de contraste de fase de 40X. Se grabaron videos de 10 s con una cámara Nikon DS-Qi2 a 25 cuadros/s. Posteriormente, los videos se analizaron con el software TaxisPy (Valderrama-Gómez et al., 2020), y los datos de las velocidades promedio de las células se evaluaron para cada cepa y se compararon con los de la cepa de tipo salvaje.

El análisis estadístico se realizó utilizando RStudio versión 4.1.0. Los resultados se analizaron mediante una prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de significación de 0,05.

Ensayos de adherencia en placa de poliestireno

El ensayo de adherencia al sustrato se llevó a cabo como se describe en (Suchanek et al., 2020). Se introdujeron cultivos bacterianos crecidos hasta una DO 0,3 (200 µL) en pocillos individuales de una placa de poliestireno de 96 pocillos, y se centrifugaron inmediatamente a 500 x g durante 2 min. Las células planctónicas se desecharon, los pocillos se lavaron tres veces con agua y luego se tiñeron con CV 0,1 % m/V durante 10 min. Después de lavar de nuevo tres veces con agua, se añadió ácido acético al 30%. Se leyó la absorbancia a 595 nm después de 10 min.

Morfología de colonias y macrocolonias

Para la visualización de la morfología de las colonias se incluyó Rojo Congo (RC, Biopack) 40 µg/mL en placas LB-2. Para macrocolonias, se colocaron 5 µL de cultivos saturado en placas LB-2 con o sin RC 40 µg/mL. Ambos tipos se incubaron a 32 °C durante 3 días. Finalmente se observaron y fotografiaron con estereomicroscopio (Leica).

Resultados

Sobreexpresión de CheR2 en *Halomonas titanicae* KHS3 y una mutante Ω *htc10*

Los genes del *cluster che2* de *Halomonas titanicae* KHS3 comparten cierto grado de homología y organización con los del *cluster wsp* presente en especies del género *Pseudomonas*. En el sistema Wsp de *P. aeruginosa*, un desequilibrio en el aparato de metilación que genere sobremetilación del quimiorreceptor WspA produce aumentos en los niveles intracelulares de diguanilato cíclico (di-GMPc), que se traducen en cambios fenotípicos como aumento de adherencia celular o pérdida de movilidad (Matilla et al., 2021). Basándonos en las observaciones hechas en ese organismo y lo que se conoce del funcionamiento de este tipo de sistemas de transducción de señales, nos propusimos hacer mutantes de *H. titanicae* en las que se inactive la vía Che2 y en las que la vía esté constitutivamente activa, para poner a prueba si este sistema de señalización tiene un comportamiento similar a Wsp, y así evaluar su rol funcional.

Como primer enfoque, se generó una mutante por interrupción del gen *htc10* (RO22_21155), utilizando un método basado en recombinación homóloga (ver Figura 36 A). En principio, la anulación del receptor debería causar una inactivación de la vía, dado que en todos los sistemas de transducción de señales de este tipo la activación de la quinasa es totalmente dependiente de la interacción con el receptor. Además, el análisis de la secuencia completa del *cluster che2* en el servidor FGENESB de Softberry (www.softberry.com) sugiere que éste forma un operón (datos no mostrados), por lo que es natural pensar que la interrupción de *htc10*, el primer gen del *cluster*, podría generar un efecto polar afectando además la transcripción de los otros siete genes, y por tanto inactivando esta ruta de señalización.

En primer lugar, un fragmento interno del gen *htc10* se clonó en el plásmido suicida pSEVA311. La construcción resultante se denominó pFR12, y fue introducida por conjugación en la cepa de tipo salvaje (WT) *H. titanicae* KHS3 usando *Escherichia coli* S17-1 λ pir como cepa dadora (Simon et al., 1983).

La mutante por interrupción en *htc10* (Ω *htc10*), que se denominó SF17, fue seleccionada por resistencia a cloranfenicol (Cm), y luego confirmada por PCR como se describe en la Figura 36 B. Los pares de oligonucleótidos nFR3 y nFR8 (que hibridan con una región de *htc10 upstream* a la de recombinación) amplificaron un fragmento de alrededor de 850 pb, tanto en WT como en SF17. Como este producto no se obtiene con la bacteria dadora (datos no mostrados), podemos afirmar que la cepa aislada se trata de *Halomonas* y no de *E. coli*. Por otra parte, el amplicón generado por M13R (hibrida con un fragmento del plásmido) y nFR2 (hibrida con la porción 3' de *htc10*) sólo apareció cuando se usó el genoma de SF17 como molde, y, al revés, el gen *htc10* completo (par nFR1/nFR2) amplificó sólo en WT. Estos resultados confirman que en SF17 el gen de Htc10 quedó dividido en dos partes debido a la inserción del plásmido.

Un segundo enfoque para dilucidar la función de Che2 consistió en obtener una situación en la cual la vía estuviera sobreactivada. Los ensayos realizados en *E. coli* y presentados en el capítulo anterior muestran que efectivamente CheR2 es capaz de metilar al quimiorreceptor Htc10. Se decidió entonces sobreexpresar esta metiltransferasa en *H. titanicae* KHS3 WT y en la mutante $\Omega htc10$, y así afectar positivamente la metilación de Htc10 generando condiciones de mayor activación de la quinasa y observar los fenotipos generados.

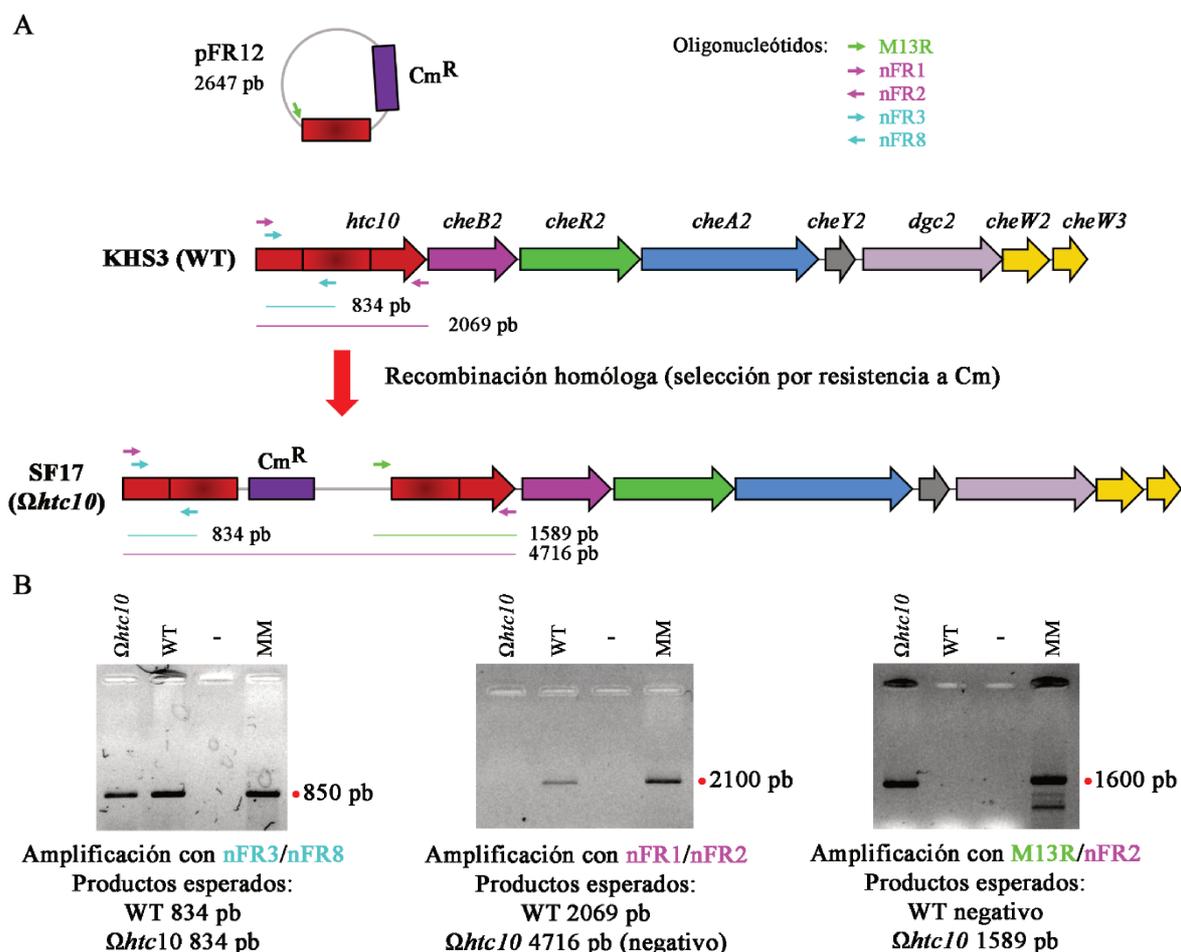


Figura 36. Obtención y confirmación de la mutante SF17 ($\Omega htc10$). **A.** Esquema del proceso de obtención de la mutante SF17 ($\Omega htc10$). Arriba se representa la cepa KHS3 *wild type* (WT) transformada con el plásmido suicida pFR12 (suicida porque es incapaz de replicarse en *Halomonas*), que contiene, además del gen de resistencia a Cm (color violeta), un fragmento interno de *htc10* (rojo sombreado). Con flechas de distintos colores se marcan los genes del *cluster che2* de KHS3, y con una flecha vertical roja se indica el resultado del evento de recombinación homóloga en la zona sombreada. La mutante obtenida, que contiene el plásmido pFR5 inserto en su genoma (interrumpiendo el gen *htc10*) fue seleccionada por resistencia a Cm. Los oligonucleótidos utilizados en las PCRs de confirmación se marcan como flechas en las posiciones relativas de los genes, y sus nombres y códigos de colores están en el margen superior derecho. Además, entre cada par de *primers* se marca con una delgada línea horizontal (del color de los *primers*) el tamaño del amplicón resultante (y su tamaño exacto se menciona a la derecha de cada línea). **B.** Fotos de los geles de agarosa de los productos de PCR utilizando los cebadores mencionados. Con un punto rojo a la derecha se muestra el tamaño del marcador de masa molecular (MM).

La estrategia fue clonar el gen completo *cheR2* (RO22_21165, 1443 pb) en el plásmido de expresión constitutiva pBBR1MCS-2 (pFR17) y transferirlo por conjugación tanto a la cepa WT como a la mutante $\Omega htc10$. Con estas cepas conjugadas se evaluaron características que han sido relacionadas con

aumentos de di-GMPc en otras especies, como formación de *biofilm* y cambios en la movilidad, y los resultados se muestra en la Figura 37.

El ensayo de *biofilm* por tinción con cristal violeta (CV) se utilizó para evaluar la formación de biopelículas. Los cultivos en crecimiento exponencial se fraccionaron en microtubos de plástico y se incubaron sin agitación durante 24 h a 28 °C. Después, se eliminaron las células planctónicas, se tiñeron las adheridas con CV 0,1% m/V, y se fotografiaron los tubos (Figura 37 A). La sobreexpresión de CheR2 en la cepa salvaje generó un notable aumento de biomasa adherida, sugiriendo que efectivamente un mayor nivel de metilación del receptor se traduce en una activación de la vía, conduciendo a mayores niveles de di-GMPc. La ausencia de este efecto de incremento de *biofilm* por sobreexpresión de CheR2 en la cepa que tiene el receptor interrumpido confirmaría que el efecto es dependiente de la presencia de ese receptor. Asimismo, en la cepa $\Omega htc10$ transformada con el vector vacío también se observa una leve disminución en la capacidad de formar *biofilm* comparada con la cepa salvaje, sugiriendo que aun en niveles basales la presencia de este sistema de señalización afecta este fenotipo. Estas observaciones fueron confirmadas por la cuantificación del colorante retenido por medición de la absorbancia (A) a 595 nm, previa disolución con ácido acético (Figura 37 B).

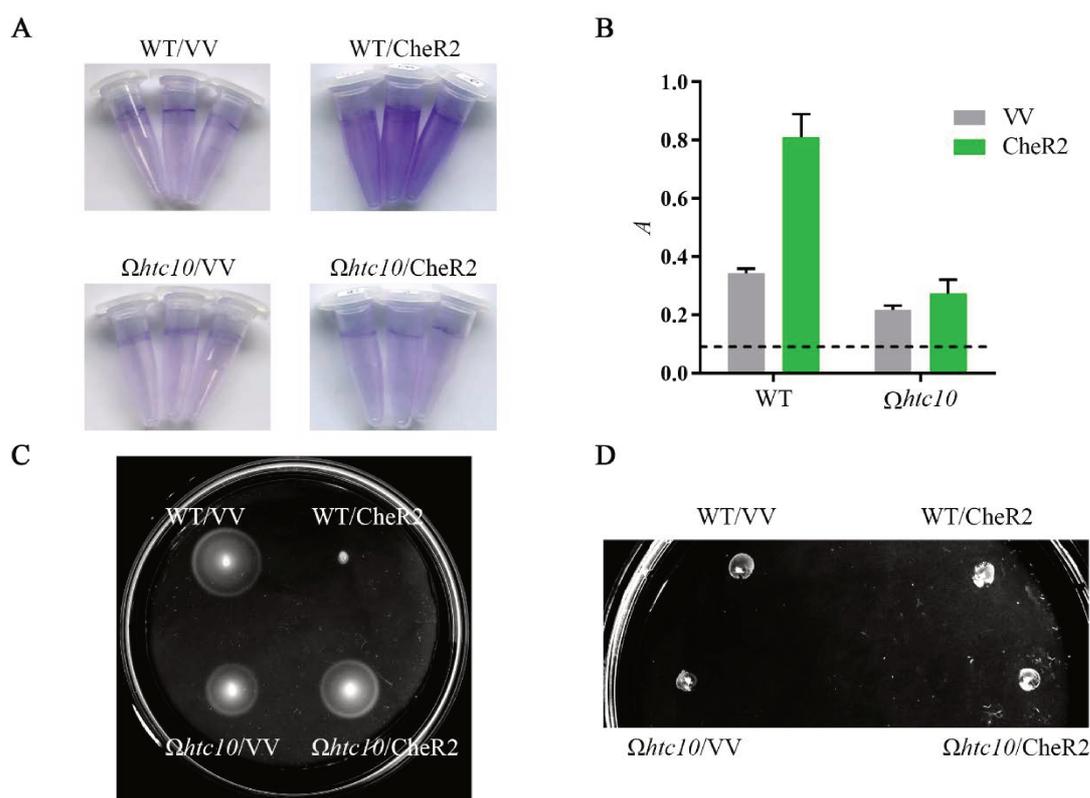


Figura 37. Análisis del fenotipo de *H. titanicae* KHS3 (WT) y de la mutante SF17 ($\Omega htc10$). **A.** Microtubos con células adheridas, después de 24 h de incubación a 28 °C, y teñidas con cristal violeta (CV) de las dos cepas analizadas transformadas con pBBR1MCS-2 (VV) o pFR17 (CheR2). **B.** Cuantificación del ensayo de *biofilm* mostrado en A. El CV fue disuelto con ácido acético 30% V/V y luego su absorbancia (A) fue medida a 595 nm. La línea de puntos indica la absorbancia del blanco (tubo sin células). **C.** Quimiotaxis y movilidad de las cepas en placa de agar blando (agar 0,25% m/V). Las células, provenientes de colonias frescas, se inocularon con escarbadietes y se incubaron a 32 °C durante 17 h. **D.** Análisis de *twitching* en placa de agar duro (1% m/V). Las células se inocularon con escarbadietes a partir de colonias frescas y se incubaron a 32 °C durante 2 días. Para la

fotografía se eliminaron las colonias superficiales, y lo que se observa alrededor del punto de inoculación son halos de *twitching* formados en el fondo de la placa de Petri.

A continuación, se evaluó el efecto de sobreexpresar CheR2 sobre la respuesta quimiotáctica (*swimming*) en placas de agar blando con agar 0,25% m/V (ver Capítulo II), y una fotografía representativa puede observarse en la Figura 37 C. La expresión de CheR2 encima de los niveles normales en WT disminuyó notablemente la formación del anillo de quimiotaxis, indicando que una sobreactivación de Che2 podría afectar el comportamiento quimiotáctico y/o la movilidad de la cepa. La inspección directa al microscopio de cultivos líquidos mostró que la movilidad de la cepa WT transformada con el plásmido que codifica *cheR2* se vio fuertemente afectada (datos no mostrados), denotando que el defecto en placas de *swimming* podría deberse a una deficiencia en la movilidad mediada por flagelos. Al igual que lo que sucedió con la formación de biopelículas, el efecto observado fue dependiente de la presencia de Htc10 y/o de la vía completa, ya que la sobreexpresión de CheR2 no causó ningún efecto sobre los anillos de quimiotaxis en Ω *htc10*.

También se evaluó la movilidad sobre superficies sólidas en placas duras (agar 1% m/V). Se realizaron experimentos de punción en las que se observó una colonia superficial, alrededor del punto de inoculación, y un grupo de bacterias que se desplazaron entre el fondo del agar y el plástico de la placa de Petri formando halos traslúcidos típicos de un tipo de movimiento sobre superficies conocido como *twitching*. Éste fenómeno es consecuencia de ciclos de extensión, fijación al sustrato y retracción de unas estructuras extracelulares filamentosas y normalmente polares, que se denominan pili tipo IV (Burrows, 2012; Kearns, 2010). Los resultados, mostrados en la Figura 37 D, evidenciaron que todas las cepas analizadas fueron capaces de formar halos de *twitching*, y a pesar de presentar considerable variabilidad, ni la mutación ni sobreexpresión de CheR2 generaron diferencias evidentes.

Para descartar posibles efectos de la velocidad de crecimiento sobre los fenotipos observados, se hicieron curvas de crecimiento de las cepas WT y Ω *htc10*, tanto en presencia como en ausencia del plásmido que codifica *cheR2*, y no se observaron diferencias significativas en los tiempos de duplicación (datos no mostrados).

Construcción y fenotipo de mutante Δ *cheB2*

Con el fin de obtener una mutante con la vía de señalización constitutivamente activa, confirmar la hipótesis sobre el rol de CheB2, y pulir un método que permita obtener mutantes en esta especie de *Halomonas*, se obtuvo la cepa Δ *cheB2* derivada de KHS3, utilizando un método proveniente de (Fu et al., 2014), tal como se esquematiza en la Figura 38.

Primeramente, se construyó un plásmido suicida en el que se clonaron en forma contigua fragmentos flanqueantes al gen a delecionar, que conducirían a la expresión de un minigen de siete residuos en lugar de la proteína CheB2 completa. Esta construcción (pFR5) se introdujo por conjugación en la cepa WT, y aquellas células en las que el vector recombinó y se insertó en el genoma fueron seleccionadas por resistencia a kanamicina, Km (Figura 38 A). La amplificación por PCR con el par de

oligonucleótidos nFR13/M13R permitió no sólo confirmar la inserción, sino también distinguir la orientación de la misma (Figura 38 B); la mutante fue llamada SF2. Un segundo evento de recombinación fue responsable de generar la mutación buscada (Figura 38 C). Si bien esta recombinación puede ocurrir de forma espontánea, para estimularla la cepa fue transformada con el plásmido pBBR1MCS1-I-SceI que en *Halomonas* expresa constitutivamente la enzima de restricción I-SceI (Fu et al., 2014). Esta enzima corta selectivamente el plásmido que se ha insertado en el cromosoma y de esta manera lo linealiza. En este con texto, la recombinación intragenómica da como resultado la pérdida del plásmido inserto, y consecuentemente la pérdida de resistencia a Km, y asegura la supervivencia de la bacteria. Tras varios repiques, las seis colonias sensibles al antibiótico obtenidas se inspeccionaron por PCR (*primers* nFR13/nFR14), y de esta manera se identificaron dos candidatas $\Delta cheB2$, una de las cuales fue seleccionada y denominada SF28 (Figura 38 D).

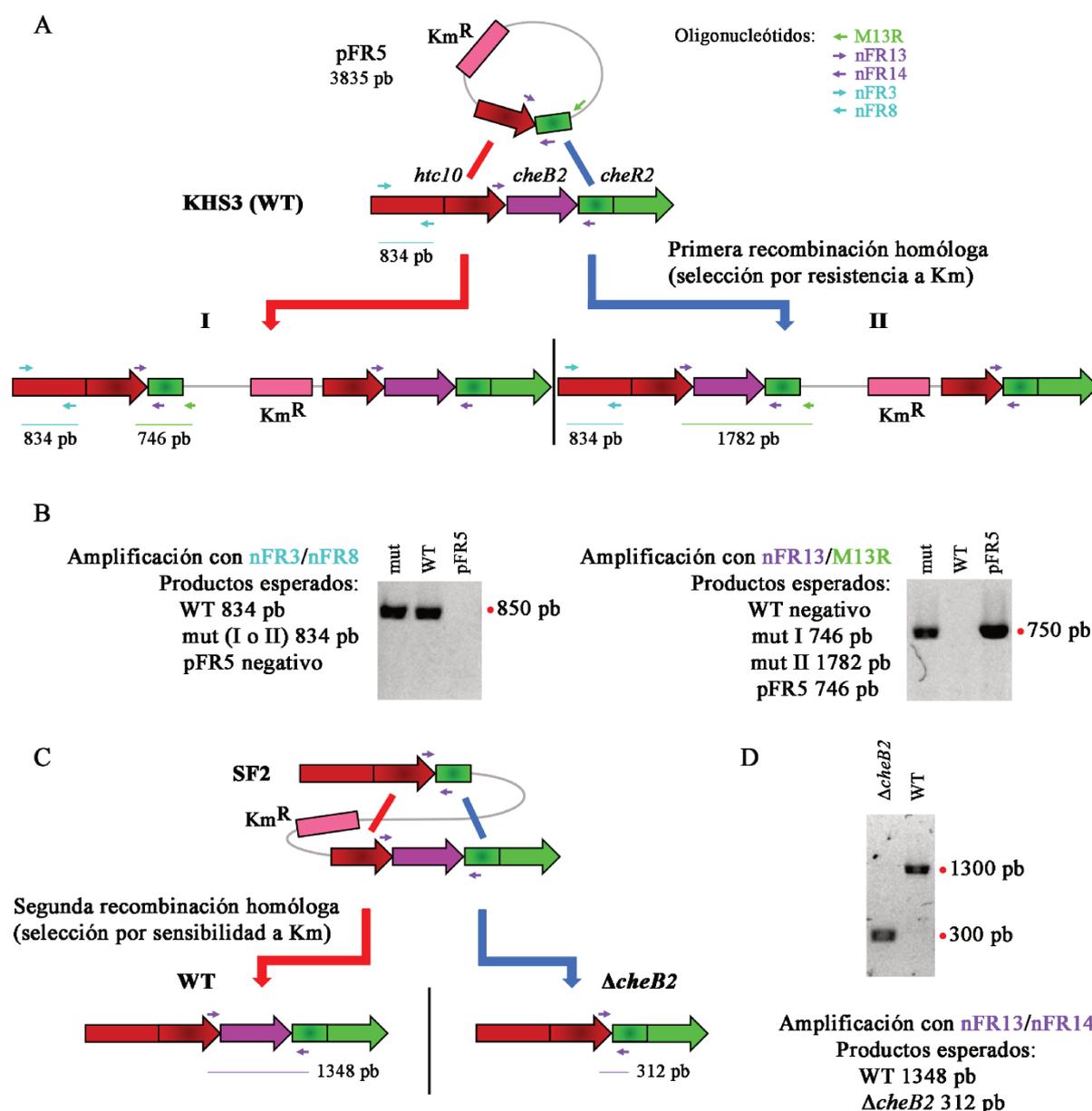


Figura 38. Obtención y confirmación de la mutante SF28 ($\Delta cheB2$). A. Esquemización del método utilizado (Fu et al., 2014). Este método incluye la transformación de la cepa WT con el vector suicida pFR5, que contiene

fragmentos flanqueantes al gen a deletionar clonados en forma contigua. La porción del genoma próxima a la edición se muestra con flechas de colores que representan a los genes, y además se sombrearon los fragmentos que están presentes en pFR5. Si la recombinación ocurre en el extremo 3' de *htc10* (línea roja) se genera la mutante I, pero si este fenómeno ocurre en el extremo 5' de *cheR2* (línea azul) se genera la mutante II. La selección se realizó por resistencia a Km. Nuevamente, en este esquema se marcan los oligonucleótidos utilizados en las posteriores PCRs como flechas de colores y sus nombres están en el margen superior. **B.** Geles de agarosa de las PCRs realizadas para la identificación de la mutante obtenida. Según éstos, la mutante se trata de I y fue denominada SF2. **C.** Esquema del segundo evento de recombinación homóloga (intragenómico). La cepa fue transformada con el plásmido pBBR1MCS1-I-SceI que codifica la enzima de restricción I-SceI capaz de escindir el plásmido pFR5 y consecuentemente linealizar el genoma. Si la recombinación ocurre en el fragmento de *htc10* (línea roja) se genera nuevamente la cepa WT, si en cambio ocurre en *cheR2* (línea azul) se obtiene la mutante buscada ($\Delta cheB2$). La pérdida del plásmido se evaluó por sensibilidad a Km. **D.** Las candidatas sensibles a Km se sometieron a amplificación por PCR con un par de oligonucleótidos (nFR13 y nFR14) que en caso de ser WT genera un amplicón de 1348 pb y en caso de ser mutante un producto de 312 pb. De las 6 candidatas, sólo 2 generaron producto de alrededor de 300 pb, y una fue seleccionada como la cepa $\Delta cheB2$, y se denominó SF28. El gel que se muestra contiene una de cada posibilidad.

El análisis de extractos de proteínas totales utilizando anticuerpo anti-Htc10 por ensayo de inmunoblot confirmó la presencia de bandas inmunorreactivas con una mayor movilidad electroforética en la mutante $\Delta cheB2$ en comparación con la cepa WT (Figura 39 A), lo que indica un nivel de metilación más alto en ausencia de metilesterasa.

En cuanto al análisis fenotípico, se realizaron ensayos de *biofilm* y quimiotaxis similares a los descritos anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 39 B y C, y evidencian que la cepa $\Delta cheB2$ presentó un marcado incremento de la biomasa adherida y una clara disminución del anillo de quimiotaxis, lo que indicaría que el efecto de expresar CheR2 en WT por encima de los niveles normales es semejante al de deletionar la metilesterasa CheB2. Respecto a la mutante $\Omega htc10$, los resultados obtenidos en estos ensayos fueron similares a los informados en la sección anterior.

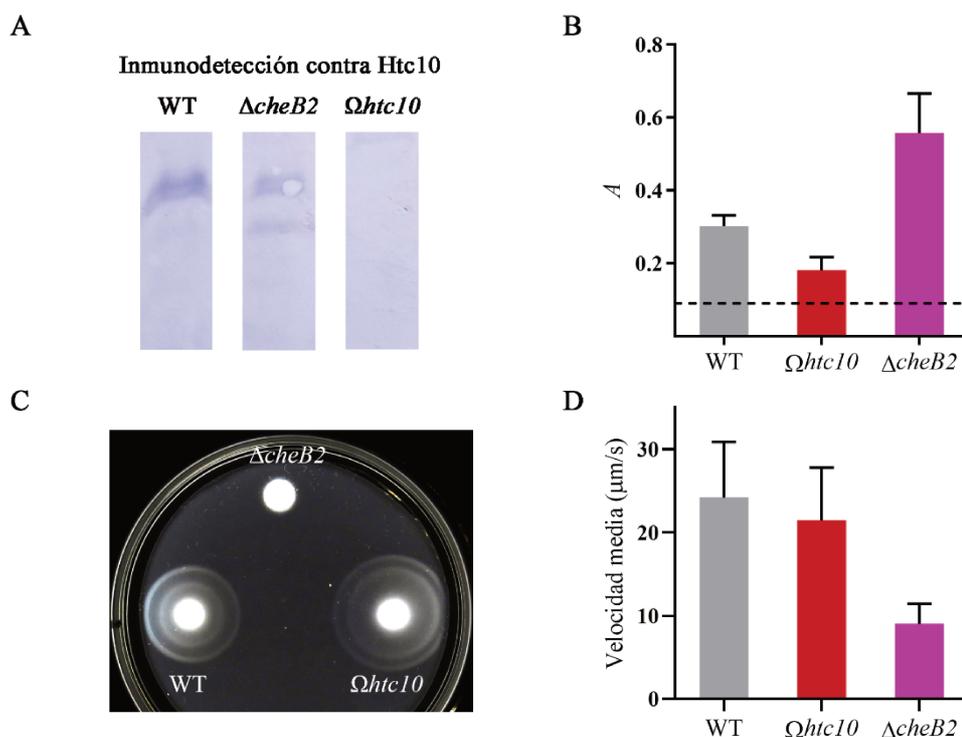


Figura 39. Fenotipo de *H. titanicae* KHS3 y sus mutantes $\Omega htc10$ y $\Delta cheB2$. A. Inmunotransferencia anti-Htc10 contra extractos de proteínas totales de *H. titanicae* KHS3 WT y sus mutantes. B. Ensayo de *biofilm* por

tinción con CV de la biomasa adherida luego de 24 h de incubación a 28 °C. La absorbancia a 595 nm (A) del tubo sin células se marca con línea de puntos. **C.** Análisis de quimiotaxis en placas de agar blando (0,25% m/V) luego de 17 h de incubación a 32 °C. **D.** Valores de velocidad media calculado con el software TaxysPy a partir de videos obtenidos por inspección directa al microscopio de cultivos líquidos de cada cepa.

Nuevamente, se observaron cultivos líquidos de estas cepas bajo el microscopio para investigar el efecto en la movilidad, y en este caso se registró lo observado con videos que luego se analizaron con el software TaxisPy (Valderrama-Gómez et al., 2020). Según este análisis, las células de tipo salvaje nadaron con una velocidad promedio de 25 $\mu\text{m/s}$, y dicha velocidad no se vio afectada significativamente en Ωhtc10 (Figura 39 D). Por el contrario, la movilidad de la mutante ΔcheB2 se redujo considerablemente hasta un valor medio de 9 $\mu\text{m/s}$, lo que proporciona una explicación al comportamiento anómalo en las placas de agar blando.

Teniendo en cuenta que se pudo determinar la naturaleza química de ligandos específicos del quimiorreceptor Htc10 (Capítulo I), se decidió investigar si la presencia de estos compuestos en el medio de cultivo tenía algún efecto sobre el desarrollo de biopelículas. Para ello se realizaron ensayos de *biofilm* por tinción con CV en presencia o ausencia de hipoxantina o guanina 1 mM, concentración entre 100 y 400 veces superior a los valores de Kd determinada por ITC (Capítulo I),

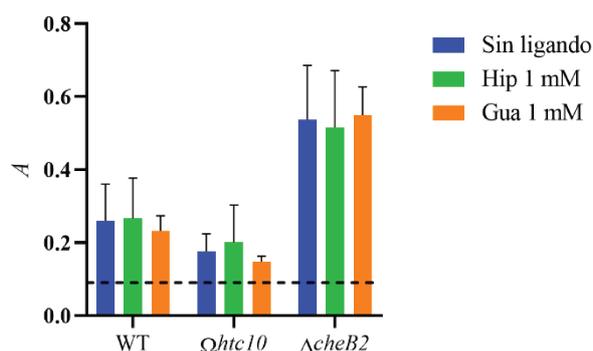


Figura 40. Efecto de la adición de ligandos de Htc10 en la formación de biopelículas por *H. titanicae* KHS3 (WT) y sus mutantes. Ensayo de *biofilm* por tinción con CV de la biomasa adherida luego de 24 h de incubación a 28 °C, en ausencia de ligando o en presencia de hipoxantina (Hip) o guanina (Gua) 1 mM. La absorbancia a 595 nm (A) del tubo sin células se marca con línea de puntos.

Como se observa en la Figura 40, no se encontraron diferencias significativas en la biomasa adherida de ninguna de las tres cepas en las condiciones probadas, lo que sugiere que estos compuestos no son relevantes en este fenotipo en las situaciones ensayadas.

Caracterización de la capacidad de adherencia

Es un hecho bien conocido que la maduración de *biofilm* en varias especies requiere de cambios en el exterior celular que permitan aumentar la adherencia a superficies (Petrova & Sauer, 2012). Con el objetivo de correlacionar la formación de *biofilm* de KHS3 y sus mutantes derivadas con la capacidad para adherirse a sustratos, se cuantificaron las células adheridas en placas de poliestireno después de una breve centrifugación mediante tinción con CV (Figura 41 A). Efectivamente, la cepa defectuosa en la ruta Che2 (Ωhtc10) mostró una capacidad levemente reducida para adherirse a la placa en comparación

con WT y, por el contrario, cuando la vía estaba presumiblemente sobreactivada ($\Delta cheB2$) las células mostraron capacidad de unión significativamente mayor.

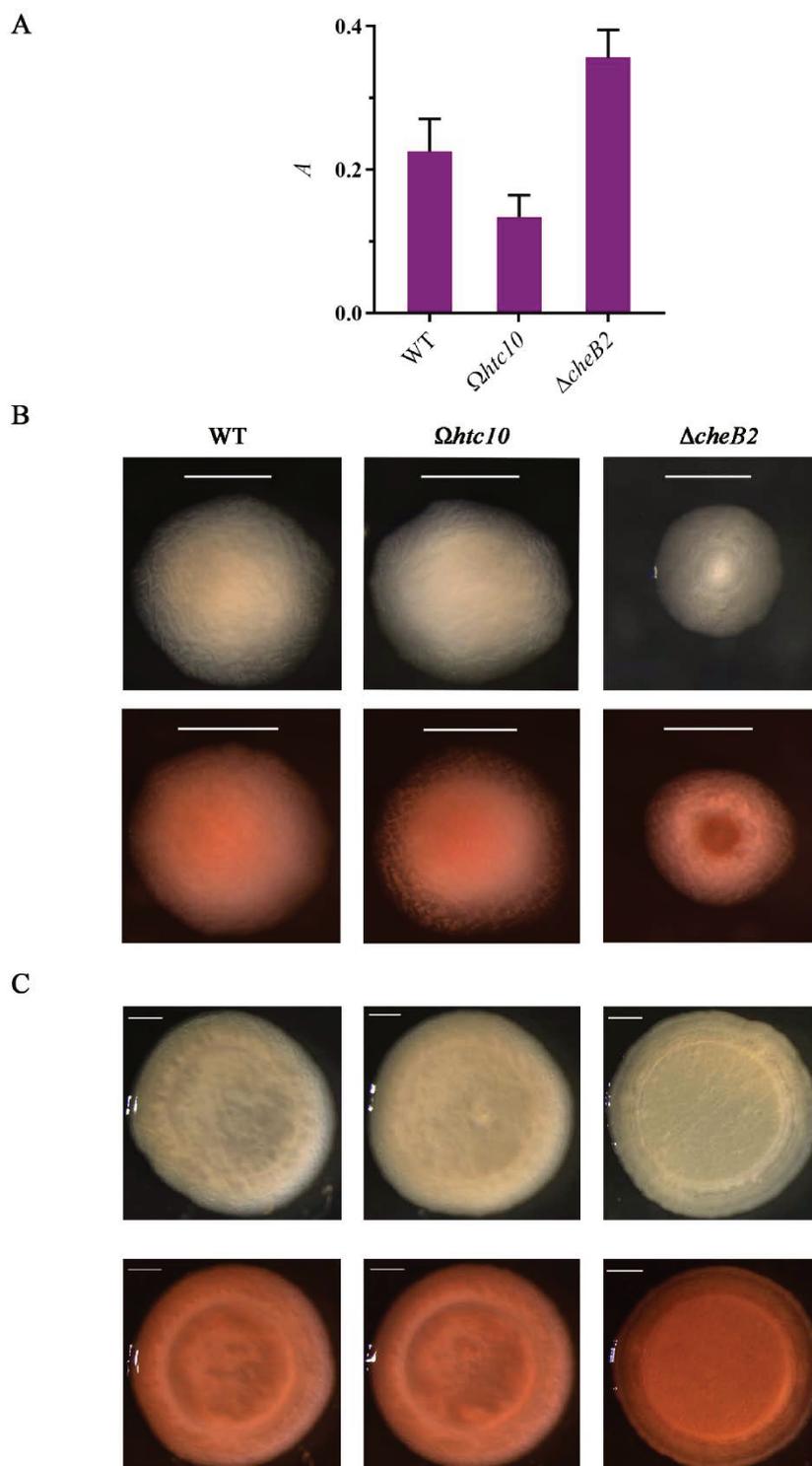


Figura 41. Adherencia al sustrato y morfología de colonias y macrocolonias de *H. titanicae* y las mutantes $\Omega ht c 1 0$ y $\Delta che B 2$. **A.** Ensayo de adherencia. Suspensiones celulares en pocillos de placas de poliestireno fueron sometidas a centrifugación durante 2 min y las células adheridas se tiñeron con CV. Se determinó luego la absorbancia (A) a 595nm del colorante disuelto en ácido acético. **B.** Morfología de colonias aisladas de las tres cepas crecidas en LB-2 sin (superior) o con (inferior) Rojo Congo 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, luego de 3 días de incubación a 32 $^{\circ}\text{C}$. **C.** Fotografías de macrocolonias desarrolladas en placas duras (agar 1,2% m/V) a partir de 5 μL de cultivos

líquidos saturados, crecidas por 3 días a 32 °C en medio con (inferior) o sin (superior) Rojo Congo 40 µg/mL. La barra blanca presente en el margen superior de cada foto corresponde a una longitud de 1 mm.

También se analizó la apariencia macroscópica de colonias y macrocolonias de las cepas bacterianas en estudio. A diferencia de las colonias clásicas, las macrocolonias se forman inoculando una suspensión celular en el medio sólido, y representan una importante herramienta de estudio de biopelículas debido a su alto nivel de organización (Serra & Hengge, 2014). Para este análisis, se usaron placas suplementadas o no con Rojo Congo, que, como se ha informado previamente, resalta las diferencias en la producción de exopolisacáridos entre las cepas (Jones & Wozniak, 2017), e imágenes representativas se muestran en la Figura 41 B y C.

La cepa $\Delta cheB2$ mostró un fenotipo semejante al equivalente *wspF* de *P. aeruginosa* (Hickman et al., 2005). Las macrocolonias tenían un aspecto seco y rugoso (Figura 41 C), mientras que las colonias aisladas mostraron irregularidades en la superficie y una tinción roja más intensa en el centro (Figura 41 B). Por otro lado, no hubo diferencias evidentes entre el aspecto de la cepa WT y las colonias o macrocolonias de $\Omega htc10$, lo que sugiere que la actividad basal de Che2 no es relevante para el aspecto macroscópico en estas condiciones.

Estos resultados sugieren que la adherencia a sustratos en la mutante $\Delta cheB2$ podría estar afectada por producción de exopolisacáridos.

Participación de di-GMPc en la formación de biofilm

Con el fin de investigar la participación de di-GMPc en el desarrollo de biopelículas de esta especie, se expresó en *H. titanicae* WT y sus mutantes una proteína con actividad fosfodiesterasa (PDE), inducible por IPTG, de *Pseudomonas putida*. Esta enzima es una hidrolasa específica que cataliza la ruptura de di-GMPc, por lo que su expresión en la célula disminuye la concentración de este mensajero celular.

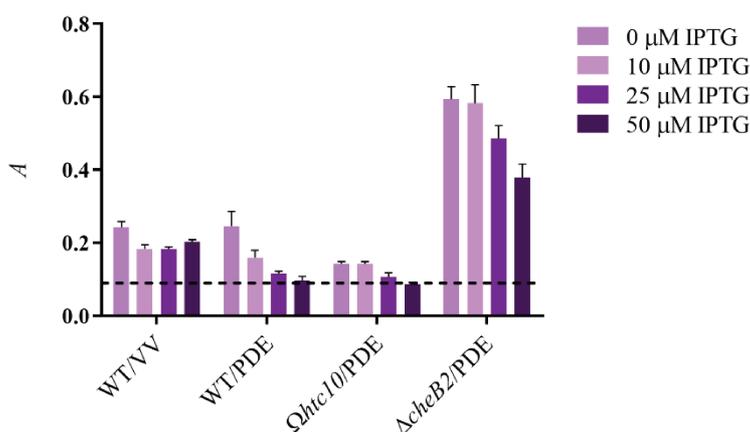


Figura 42. Efecto de la expresión de una proteína con actividad fosfodiesterasa sobre la producción de biofilm. *H. titanicae* KHS3 (WT) transformada con vector vacío VV (pVI520) y WT o mutantes transformadas con un plásmido (pVI1061) que codifica la fosfodiesterasa (PDE) PP2258 de *P. putida* (Laboratorio de V. Shingler), se sometieron a un ensayo de formación de biofilm con distintas cantidades de inductor (IPTG) durante 24 h. Los valores representan las medias de la absorbancia a 595 nm (A) de tres repeticiones, con su respectiva desviación estándar. Las líneas discontinuas representan A de los controles sin cultivo.

La adherencia en tubos se evaluó mediante el método de tinción con CV, como se describió anteriormente, y los resultados de la cuantificación se muestran en la Figura 42. La formación de biopelículas se inhibió en la cepa de tipo salvaje a medida que se indujo la expresión de la proteína, siendo eliminada casi por completo a 25 μM IPTG; lo que respalda el papel de di-GMPc en este fenotipo. Concentraciones mayores a 50 μM de inductor no fueron ensayadas dado que se comprobó que éstas afectaban el crecimiento de forma significativa; sólo se probaron concentraciones de IPTG que no afectaron el crecimiento.

La expresión de PDE también afectó a las mutantes examinadas. La cepa con *biofilm* exacerbado mostró una disminución en la capacidad para formar biopelícula a altos niveles de inducción, alcanzando una pérdida de aproximadamente el 35% a IPTG 50 μM . Esta disminución dependiente de la inducción de PDE es indicio de que di-GMPc sería responsable del fenotipo observado. Incluso la mutante que carece de *cluster* activo, $\Omega htc10$, se vio afectada por la expresión de esta enzima hidrolítica, lo que sugiere la presencia de alguna vía adicional que genera di-GMPc con consecuencias para la formación de biopelículas.

En resumen, los resultados obtenidos en este capítulo muestran que mutaciones en el *cluster che2* de *H. titanicae* KHS3 efectivamente afectan la formación de *biofilm* y la movilidad, fenotipos relacionados con los niveles de di-GMPc.

Discusión

El trabajo presentado en este capítulo es un estudio del rol fisiológico del sistema Che2 de *Halomonas titanicae* KHS3 a través de la generación de mutantes que presenten esta vía inactivada o constitutivamente activa, y su posterior evaluación fenotípica. Para inactivar la vía, se interrumpió el gen del receptor Htc10 por inserción de un plásmido suicida (mutante $\Omega htc10$). La ausencia del receptor debería ser suficiente para inactivar la vía teniendo en cuenta que en los sistemas relacionados con quimiotaxis la actividad de la quinasa es absolutamente dependiente de la asociación a su receptor específico. Además, el análisis de la secuencia del *cluster* predice que *che2* forma un operón con *htc10* como primer gen, por lo que la inserción del plásmido posiblemente cause también la interrupción de la transcripción de los genes que se encuentran río abajo. Esta última presunción deberá ser confirmada experimentalmente. Por otro lado, la sobreactivación de la vía se generó por sobremetilación del receptor Htc10, tanto por sobreexpresión de la metiltransferasa CheR2 a partir de un plásmido como por delección del gen que codifica a la metilesterasa CheB2 (mutante $\Delta cheB2$). En todos los casos, las mutantes obtenidas se chequearon por PCR. Es necesario mencionar que la eficiencia de estos métodos fue extremadamente baja, posiblemente por una baja tasa de recombinación, lo que obligó a extender los procedimientos de *screening* para obtener las mutantes deseadas. Actuales estudios en nuestro laboratorio están destinados a perfeccionar nuevos métodos que permitan editar el genoma de esta especie bacteriana con mayor facilidad.

El análisis de extractos proteicos por *western blot* mostró que $\Omega htc10$ carecía de bandas inmunorreactivas al anticuerpo anti-Htc10, verificando la falta del receptor en esta cepa, y que la mutante $\Delta cheB2$ presentó bandas con mayor movilidad electroforética en comparación con la cepa salvaje (WT), indicando un nivel de metilación más alto en ausencia de CheB2 y confirmando la actividad metilesterasa de esta proteína.

Una vez obtenidas las mutantes, se evaluaron características que han sido relacionadas con aumentos de di-GMPc en otras especies. En primer lugar, se analizó la formación de biopelículas luego de 24 h de incubación mediante el método de tinción con cristal violeta (CV). En la cepa WT se observaron células adheridas al tubo mayormente alrededor de la superficie en contacto con el aire. La expresión de una proteína con actividad de fosfodiesterasa (PDE) redujo los valores de absorbancia del colorante retenido hasta los correspondientes al control sin células, lo que refuerza el papel de di-GMPc en este fenotipo, siendo el primer reporte de implicancia de di-GMPc en la formación de biopelículas en especies de *Halomonas*.

En cuanto a las cepas con la vía Che2 afectada, $\Omega htc10$ mostró una sutil disminución de la biomasa adherida luego de 24 h de incubación. En este caso, la expresión de la PDE exógena también anuló completamente el *biofilm* formado, lo que insinúa la presencia de alguna vía adicional que produzca di-GMPc con consecuencias en este fenotipo.

Por otra parte, tanto la sobreexpresión de CheR2 en la cepa salvaje como la delección del gen *cheB2* generaron una notable exacerbación del *biofilm* en los ensayos de tinción con CV, exhibiendo biomasa adherida en toda la superficie del tubo y no restringida a la interfase líquido-aire. Estos resultados sugieren que efectivamente un mayor nivel de metilación de Htc10 se traduce en una activación de la vía.

Cuando la sobreexpresión de CheR2 se llevó a cabo en la cepa que tiene el receptor interrumpido, no se observaron cambios en el nivel de *biofilm* obtenido con respecto a la cepa salvaje. Estos resultados apoyan la idea de que efectivamente el aumento de biofilm observado por sobremetilación del receptor es dependiente de la presencia del receptor Htc10 y de las proteínas de señalización que se encuentran corriente abajo.

Asimismo, la inducción del gen que codifica la hidrolasa PDE en $\Delta cheB2$ originó una disminución de casi un 40% de la biomasa adherida. Incrementos en la concentración del inductor por encima del valor más alto mostrado tuvieron un marcado efecto sobre el crecimiento de la cepa, por lo cual no se pudieron llevar a cabo los experimentos de *biofilm* en esas condiciones para no correr el riesgo de tratar de interpretar variaciones complejas multicausales. El efecto parcial observado a la mayor inducción ensayada solo permite decir entonces que el di-GMPc está efectivamente involucrado en la respuesta.

La correlación entre la producción de di-GMPc y la formación de biopelículas involucra varios factores, uno de los más relevantes es la síntesis y secreción de grandes polímeros que componen la matriz extracelular (Römling, 2012). Entre los componentes más abundantes de estas estructuras bacterianas se encuentran los exopolisacáridos, cuya composición puede variar según la especie, factores ambientales, o la etapa del ciclo de maduración (Limoli et al., 2015). Por ejemplo, en *P. aeruginosa* PAO1 se han identificado dos polisacáridos que componen sus *biofilms*, Psl y Pel, que difieren en su estructura química, y los genes de su biosíntesis se encuentran en dos operones denominados *psl* y *pel*, respectivamente (Franklin et al., 2011; Ha & O'Toole, 2015). Se ha demostrado que la delección del gen de la metiltransferasa WspF en esta cepa produce elevadas cantidades de estos polímeros como consecuencia del aumento de di-GMPc por parte de la vía Wsp, a través de la activación de esos dos operones (Hickman & Harwood, 2008). Sin embargo, es necesario considerar que la concentración de di-GMPc puede afectar la formación de polímeros relacionados con la adherencia o la formación de matriz extracelular de maneras muy diversas, aunque el fenotipo resultante sea similar. Por ejemplo, en la especie *Pseudomonas fluorescens*, que posee una vía Wsp muy similar a la de *P. aeruginosa*, se ha demostrado que el principal mecanismo que aumenta la formación de biofilm en mutantes con sobreactivación de esta vía de señalización es la activación alostérica de la celulosa sintasa por parte del di-GMPc generado (Goymer et al., 2006).

El análisis de la secuencia genómica de *H. titanicae* KHS3 reveló que ésta contiene genes homólogos a los que componen el operón *psl*, pero no se encontraron genes claramente homólogos a los del operón *pel*. Se puede especular entonces, que el di-GMPc que sería producido por la vía Che2 de *H. titanicae* también podría controlar la producción de exopolisacáridos similares a Psl, por lo que, como

enfoque preliminar, se inspeccionó el aspecto de colonias y macrocolonias de la cepa WT y sus mutantes derivadas crecidas en presencia de Rojo Congo. Debido a que varios polisacáridos interactúan con este compuesto azoico y forman complejos estables (Wood & Fulcher, 1978), la adición del colorante a medios sólidos puede utilizarse como una medida indirecta de la producción elevada de estos polímeros (Jones & Wozniak, 2017). Tanto las colonias como las macrocolonias de la cepa $\Delta cheB2$ mostraron mayor retención del colorante rojizo, sugiriendo que contenían mayor proporción de exopolisacáridos en comparación con WT. Incluso el aspecto rugoso de las colonias de $\Delta cheB2$, morfología similar a su equivalente $\Delta wspF$ de *P. aeruginosa*, denota la alta producción de este tipo de polímeros. Además, esta mutante mostró mayor capacidad de adherencia a placas de poliestireno luego de una breve centrifugación de cultivos líquidos, lo que sería indicio de que en esta cepa los polisacáridos extracelulares podrían aumentar la adherencia a sustratos y ser, al menos en parte, responsables del aumento de *biofilm*.

El di-GMPc es capaz de aumentar la producción de exopolisacáridos por varios mecanismos, de los cuales uno bastante estudiado involucra al factor de transcripción FleQ. Se ha corroborado que esta proteína se une a los promotores de los operones *pel* y *psl*, reprimiendo su transcripción, y que sufre cambios conformacionales cuando se une a di-GMPc que lo transforman en un activador génico (Baraquet et al., 2012; Colvin et al., 2012). Particularmente, en *P. aeruginosa* PAO1 se registraron incrementos en la transcripción de estos operones cuando se delecionó la metilesterasa WspF (Hickman et al., 2005; Hickman & Harwood, 2008). La búsqueda de genes homólogos a *fleQ* en el genoma de *H. titanicae* KHS3, que brinde pistas sobre el mecanismo de acción río debajo de Che2, arrojó varios candidatos posibles, uno de los cuales (RO22_06180) muestra una elevada conservación de los residuos que serían indispensables para el funcionamiento de este factor de transcripción.

Otro fenotipo evaluado en este trabajo fue el nado libre mediado por flagelos. A partir del análisis de videos registrados por inspección al microscopio óptico de cultivos líquidos se pudo determinar una velocidad promedio de 25 $\mu\text{m/s}$ para las células de tipo salvaje. Este valor es congruente con los obtenidos en estudios anteriores para otras cepas marinas pertenecientes al género *Halomonas*, que oscila entre 26 y 39 $\mu\text{m/s}$ (Kita-Tsukamoto et al., 2004). En cambio, en la mutante $\Delta cheB2$ la mayoría de las células fueron inmóviles o con muy poca movilidad y la velocidad promedio se redujo considerablemente hasta un valor medio de aproximadamente 9 $\mu\text{m/s}$, lo que ayuda a explicar su incapacidad de generar anillos de quimiotaxis en placas de agar blando. Nuevamente, la proteína homóloga a FleQ podría estar involucrada en este fenómeno. En *Pseudomonas*, además de regular la expresión de *pel* y *psl*, este factor de transcripción induce la expresión de genes involucrados en la exportación y ensamblaje de flagelos (Dasgupta et al., 2003; Dasgupta & Ramphal, 2001), pero cuando se une a di-GMPc se inducen cambios en la estructura que ocasionan el decaimiento de la transcripción de dichos genes (opuesto a lo que ocurre con los operones *pel* y *psl*) (Baraquet & Harwood, 2013).

Por otro lado, la ausencia de la vía Che2 activa en la mutante $\Omega htc10$ no afectó significativamente la movilidad ni el comportamiento en placas de agar blando, lo que apoya la hipótesis de que este *cluster*

no tiene un rol activo en quimiotaxis. Cabe mencionar que recientemente en nuestro laboratorio se ha obtenido una mutante de *H. titanicae* KHS3 con delección de la quinasa del *cluster che1* ($\Delta cheA1$) que tiene la función quimiotáctica deteriorada [Tesis doctoral (Balmaceda, 2023)], a pesar de contener todos los genes de *che2* intactos, lo cual también sustenta que la respuesta de quimiotaxis no depende de su presencia.

En cuanto a los ensayos de movilidad sobre superficies sólidas, los experimentos en placas duras mostraron que todas las cepas testeadas, incluyendo la $\Delta cheB2$ [Tesina de grado (Maldonado, 2022)] fueron capaces de formar halos de *twitching*, y no se manifestaron diferencias evidentes en ningún caso, indicando que el *cluster che2* de *H. titanicae* KHS3 no tiene implicancias en este tipo de movilidad mediada por extensión y retracción del pili tipo IV.

En conjunto, los resultados obtenidos en este capítulo muestran que el sistema de señalización codificado en el *cluster che2* de *H. titanicae* KHS3 pareciera tener un comportamiento similar al sistema Wsp de *Pseudomonas*, y mutantes en esta vía también afectan fenotipos relacionados con la producción de di-GMPc, lo que permitiría utilizar a esta especie del género *Halomonas* como modelo de estudio del sistema Wsp, cuya caracterización tiene gran relevancia principalmente en el ámbito médico.

No obstante, a pesar de las semejanzas, también existen ciertas diferencias entre ambos sistemas, por ejemplo, la familia estructural a la que pertenecen los dominios de unión a ligando (LBD) de sus receptores. Mientras que el LBD de WspA se predice tiene topología 4HB (Á. Ortega et al., 2017), en el Capítulo I de esta tesis se demostró que el LBD de Htc10 tiene una estructura doble Cache y que une hipoxantina y guanina con afinidad del orden micromolar. Como hasta el momento no hay registros de ligandos específicos de WspA, nos pareció interesante evaluar el efecto de estos compuestos nitrogenados en un fenotipo representativo de *H. titanicae* KHS3 como la formación de *biofilm*. Es necesario destacar que si bien hay reportes que indican que la vía Wsp se activa al estar en contacto con superficies (Güvener & Harwood, 2007; O'Connor et al., 2012), en presencia de etanol 1% V/V (Chen et al., 2014) o en mutantes en rutas que determinan la longitud de ácidos grasos (Blanka et al., 2015) (estos dos últimos fenómenos podrían generar alteraciones en membrana, consistente con la hipótesis de activación por perturbaciones), no hay ninguna evidencia acerca del mecanismo por el cual WspA participa en este fenómeno.

Los ensayos de tinción con CV revelaron que la presencia de los derivados purínicos en el medio de cultivo no generó diferencias significativas en la biomasa adherida de la cepa salvaje ni sus mutantes derivadas en las condiciones probadas.

A diferencia de los sistemas de quimiotaxis clásicos, este tipo de rutas de señalización estimulan la actividad enzimática para la síntesis de un segundo mensajero que induce una cascada de señalización intracelular. Es sabido que muchas bacterias poseen múltiples proteínas con dominios DGC (diguanilato ciclasa) y/o PDE (Galperin et al., 2001), por ejemplo, *P. aeruginosa* codifica 38 de estas proteínas (Kulesekara et al., 2006) y *H. titanicae* KHS3 al menos 40 predichas. Esta abundancia sugiere que estos microorganismos poseen un conjunto de rutas que alimentan un *pool* global de di-GMPc o,

alternativamente, una serie de vías no vinculadas que producen concentraciones localizadas y altamente específicas de este dinucleótido cíclico (Römling et al., 2005; Weber et al., 2006). Si fuese lo segundo, la estrategia de sobreactivación de la vía podría aumentar la concentración global de di-GMPc de manera grosera impactando en efectores que no estén directamente relacionadas con el sistema en estudio. En este contexto, el hecho que los fenotipos evaluados sean bastante similares en las cepas WT y $\Omega htc10$ podría indicar que la disminución de movilidad y exacerbación de biomasa adherida de la mutante $\Delta cheB2$ sería un artificio debido al exceso de di-GMPc. Si Che2 generase efectos locales por algún fenómeno de compartimentalización, y su rol fisiológico no estuviese involucrado en la formación de biopelículas, es natural que los ligandos de Htc10 no generen un efecto evidente en los ensayos de *biofilm*.

Sin embargo, este dilema permanece vigente y se necesitarán nuevos experimentos, facilitados por las herramientas construidas y las pistas obtenidas en este trabajo, que permitan reevaluar la función celular la vía Che2 en la cepa salvaje, y el impacto que los ligandos de Htc10 tienen en la misma.

CONCLUSIONES

El proyecto en el que se enmarca este trabajo pretende caracterizar los sistemas quimiosensoriales del aislamiento halotolerante *Halomonas titanicae* KHS3, que en su genoma contiene dos grupos de genes tipo quimiotaxis llamados *che1* y *che2*. En particular, esta tesis aporta al conocimiento de la vía Che2, codificada en el en el *cluster* no canónico *che2*, en el que interviene una diguanilato ciclasa.

Los resultados recopilados en los experimentos de complementación en mutantes de *Escherichia coli* muestran evidencia de que ciertas proteínas del sistema Che2 son incapaces de interactuar con la maquinaria quimiotáctica de un sistema canónico, particularmente la proteína acopladora CheW2, el quimiorreceptor Htc10 y la metiltransferasa CheR2. Además, las dos metiltransferasas codificadas en los *clusters* de *H. titanicae* mostraron especificidad por el receptor que metilan cuando se expresaron de manera heteróloga. El análisis por espectrometría de masas de estos extractos celulares permitió determinar que los residuos E434 y E441 de Htc10 son sitios susceptibles a ser metilados por CheR2, y no por CheR1, que según la comparación de las secuencias corresponden a posiciones conservadas.

Estos resultados, junto al análisis de los residuos que están involucrados en las superficies de contacto, sugieren que las proteínas de las vías Che1 y Che2 de *H. titanicae* ensamblan en complejos independientes y no interactúan directamente de forma cruzada, de modo que cada uno puede llevar a cabo una función celular diferente.

Se generaron mutaciones, por interrupción o por delección, en *H. titanicae* con el fin estudiar el rol del *cluster che2*, y luego se evaluó su fenotipo. Los ensayos de movilidad en placas de agar de la cepa mutante por interrupción del gen *htc10*, permite afirmar que Che2 no tiene un rol activo ni en la quimiotaxis mediada por flagelos ni en la movilidad sobre superficie, apoyando su participación en alguna función alternativa.

Por otro lado, la sobremetilación de Htc10 en *H. titanicae*, causado por la expresión de CheR2 por encima de los niveles normales o por la delección limpia del gen *cheB2* de la metilesterasa, generó

aumento de la biomasa adherida a microtubos plásticos luego de 24 h de crecimiento. Este efecto fue parcialmente revertido al expresar una hidrolasa específica de diguanilato cíclico, lo cual es consistente con la hipótesis de que un alto estado de metilación del receptor se traduce en aumento de la concentración de este segundo mensajero, con consecuencias fenotípicas.

En la cepa en la que la vía Che2 está constitutivamente activa, también se observó disminución de la velocidad promedio de nado celular en medio líquido, aumento de adherencia a sustrato y cambios en el aspecto de sus colonias y macrocolonias que son efectos consistentes con un estilo de vida sésil. Estos resultados sugieren que el sistema Che2 podría estar implicado en la formación de biopelículas mediante un mecanismo similar al descrito para la vía Wsp de *Pseudomonas*.

Es necesario mencionar que la cantidad de vías diferentes que pueden ser afectadas por la concentración de diguanilato cíclico obliga a tomar con cautela las observaciones realizadas en situaciones en las cuales el nivel de este dinucleótido cíclico es aumentado artificialmente, y hace difícil extraer conclusiones certeras acerca del rol que esta vía en particular tiene en condiciones salvajes.

Finalmente, también se estudió el estímulo del sistema por expresión recombinante del dominio sensor extracelular del quimiorreceptor Htc10. Se confirmó mediante cristalografía de proteínas por difracción de rayos X que este dominio presenta una topología característica de la familia estructural doble Cache. Los resultados obtenidos por medio de ensayos *in vitro* demuestran que hipoxantina y guanina se unen específicamente mediante una reacción exotérmica de gran afinidad, con valores de constante de disociación del orden micromolar (2-7 μM). Asimismo, pudieron identificarse siete residuos presentes en el subdominio Cache distal, cuyas cadenas laterales están suficientemente próximas al ligando como para establecer interacciones con éste. Tres de estos residuos, F114, W147 y Y175, podrían conformar un entorno hidrofóbico en el que se ubica el ligando, mientras que los otros cuatro, Y125, N161, D163 y N177, forman uniones por puente de H.

Éste es el primer reporte de la identificación de ligandos químicos de un receptor perteneciente a una vía de tipo quimiotaxis no canónica. Sin embargo, la presencia de estos derivados purínicos no generó ningún efecto evidente en las condiciones probadas; ni en el patrón de metilación de Htc10, ni en la capacidad de formación de biopelículas de *H. titanicae* y sus mutantes derivadas. En un futuro cercano se planea analizar etapas más cercanas al estímulo, tal como la activación de la quinasa o de la diguanilato ciclasa, para obtener lecturas menos complejas que permitan evaluar más directamente la funcionalidad de estos compuestos en la actividad del complejo de señalización.

La presente Tesis es un sustancial aporte al conocimiento de las vías tipo quimiotaxis de la especie ambiental *H. titanicae* KHS3, y, modestamente, contribuye al entendimiento global de los sistemas bacterianos de quimioseñalización.

BIBLIOGRAFÍA

- Adler, J. (1966). Chemotaxis in bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 153(3737), 708-716. <https://doi.org/10.1126/science.153.3737.708>
- Alexander, R. P., & Zhulin, I. B. (2007). Evolutionary genomics reveals conserved structural determinants of signaling and adaptation in microbial chemoreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(8), 2885-2890. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609359104>
- Alexandre, G., Greer-Phillips, S., & Zhulin, I. B. (2004). Ecological role of energy taxis in microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(1), 113-126. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.10.003>
- Ames, P., Studdert, C. A., Reiser, R. H., & Parkinson, J. S. (2002). Collaborative signaling by mixed chemoreceptor teams in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10), 7060-7065. <https://doi.org/10.1073/pnas.092071899>
- Anantharaman, V., & Aravind, L. (2000). Cache - a signaling domain common to animal Ca²⁺-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. *Trends in biochemical sciences*, 25(11), 535-537. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01672-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01672-8)
- Aravind, L., & Ponting, C. P. (1999). The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS microbiology letters*, 76(1), 111-116. <http://coot.emb-hei->
- Baker, M. D., Wolanin, P. M., & Stock, J. B. (2006). Signal transduction in bacterial chemotaxis. *BioEssays*, 28(1), 9-22. <https://doi.org/10.1002/bies.20343>
- Balmaceda, R. S. (2023). Caracterización de los genes responsables de la quimiotaxis en la cepa ambiental *Halomonas titanicae* KHS3 y su rol fisiológico. [Tesis doctoral]. En *Universidad Nacional del Litoral - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Instituto de Agrobiotecnología del Litoral*.
- Bansal, T., Jesudhasan, P., Pillai, S., Wood, T. K., & Jayaraman, A. (2008). Temporal regulation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence mediated by autoinducer-2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(5), 811-819. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1359-8>
- Baraquet, C., & Harwood, C. S. (2013). Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker a motif of the enhancer-binding protein FleQ.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(46), 18478-18483. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318972110>
- Baraquet, C., Murakami, K., Parsek, M. R., & Harwood, C. S. (2012). The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the Pel operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Research*, 40(15), 7207-7218. <https://doi.org/10.1093/nar/gks384>
- Barnakov, A. N., Barnakova, L. A., & Hazelbauer, G. L. (1999). Efficient adaptational demethylation of chemoreceptors requires the same enzyme-docking site as efficient methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(19), 10667-10672. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.19.10667>
- Beatson, S. A., Whitchurch, C. B., Semmler, A. B., & Mattick, J. S. (2002). Quorum sensing is not required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 184(13), 3598-3604. <https://doi.org/10.1128/JB.184.13.3598-3604.2002>
- Berg, H. C. (2003). The rotary motor of bacterial flagella. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 19-54. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161737>
- Berry, A., Han, K., Trouillon, J., Robert-Genthon, M., Ragno, M., Lory, S., Attrée, I., & Elsen, S. (2018). cAMP and Vfr control exolysin expression and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* taxonomic outliers. *Journal of Bacteriology*, 200(12), e00135-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00135-18>
- Bertrand, J. J., West, J. T., & Engel, J. N. (2010). Genetic analysis of the regulation of type IV pilus function by the Chp chemosensory system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 192(4), 994-1010. <https://doi.org/10.1128/JB.01390-09>
- Bhayani, J. A., & Ballicora, M. A. (2022). Determination of dissociation constants of protein ligands by thermal shift assay. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 590, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.12.041>
- Bi, S., Jin, F., & Sourjik, V. (2018). Inverted signaling by bacterial chemotaxis receptors. *Nature Communications*, 9(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05335-w>
- Bibikov, S. I., Biran, R., Rudd, K. E., & Parkinson, J. S. (1997). A Signal Transducer for Aerotaxis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179(12), 4075-4079. <https://doi.org/10.1128/jb.179.12.4075-4079.1997>
- Bilwes, A. M., Alex, L. A., Crane, B. R., & Simon, M. I. (1999). Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell*, 96(1), 131-141. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80966-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80966-6)
- Blanka, A., Düvel, J., Dötsch, A., Klinkert, B., Abraham, W.-R., Kaefer, V., Ritter, C., Narberhaus, F., & Häussler, S. (2015). Constitutive production of c-di-GMP is associated with mutations in a variant of *Pseudomonas aeruginosa* with altered membrane composition. *Science signaling*, 8(372), ra36. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005943>
- Borkovich, K. A., Alex, L. A., & Simon, M. I. (1992). Attenuation of sensory receptor signaling by covalent modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(15), 6756-6760. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.15.6756>
- Boukhvalova, M. S., Dahlquist, F. W., & Stewart, R. C. (2002). CheW binding interactions with CheA and Tar. Importance for chemotaxis signaling in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 22251-22259. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110908200>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Briegleb, A., Li, X., Bilwes, A. M., Hughes, K. T., Jensen, G. J., & Crane, B. R. (2012). Bacterial chemoreceptor arrays are hexagonally packed trimers of receptor dimers networked by rings of

- kinase and coupling proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(10), 3766-3771. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115719109>
- Burón-Barral, M. D. C., Gosink, K. K., & Parkinson, J. S. (2006). Loss- and gain-of-function mutations in the F1-HAMP region of the Escherichia coli aerotaxis transducer Aer. *Journal of Bacteriology*, 188(10), 3477-3486. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3477-3486.2006>
- Burrows, L. L. (2012). Pseudomonas aeruginosa Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *Annual Review of Microbiology*, 66(1), 493-520. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150055>
- Bustamante, V. H., Martínez-Flores, I., Vlamakis, H. C., & Zusman, D. R. (2004). Analysis of the Frz signal transduction system of Myxococcus xanthus shows the importance of the conserved C-terminal region of the cytoplasmic chemoreceptor FrzCD in sensing signals. *Molecular Microbiology*, 53(5), 1501-1513. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04221.x>
- Cai, Q., Li, Z., Ouyang, Q., Luo, C., & Gordon, V. D. (2016). Singly flagellated Pseudomonas aeruginosa chemotaxes efficiently by unbiased motor regulation. *mBio*, 7(2), e00013-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00013-16>
- Calladine, C. R. (1978). Change of Waveform in Bacterial Flagella: The Role of Mechanics at the Molecular Level. *J. Mol. Biol.*, 118, 457-479.
- Cardozo, M. J., Massazza, D. A., Parkinson, J. S., & Studdert, C. A. (2010). Disruption of chemoreceptor signalling arrays by high levels of CheW, the receptor-kinase coupling protein. *Molecular Microbiology*, 75(5), 1171-1181. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07032.x>
- Cassidy, C. K., Himes, B. A., Sun, D., Ma, J., Zhao, G., Parkinson, J. S., Stansfeld, P. J., Luthey-Schulten, Z., & Zhang, P. (2020). Structure and dynamics of the E. coli chemotaxis core signaling complex by cryo-electron tomography and molecular simulations. *Communications Biology*, 3(1), 24. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0748-0>
- Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N. C., Giese, B., Jenal, U., & Schirmer, T. (2004). Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49), 17084-17089. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406134101>
- Chen, A. I., Dolben, E. F., Okegbe, C., Harty, C. E., Golub, Y., Thao, S., Ha, D. G., Willger, S. D., O'Toole, G. A., Harwood, C. S., Dietrich, L. E. P., & Hogan, D. A. (2014). Candida albicans Ethanol Stimulates Pseudomonas aeruginosa WspR-Controlled Biofilm Formation as Part of a Cyclic Relationship Involving Phenazines. *PLoS Pathogens*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004480>
- Chen, G. Q., & Jiang, X. R. (2018). Engineering microorganisms for improving polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 53, 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.10.008>
- Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2010). MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(1), 12-21. <https://doi.org/10.1107/S09074444909042073>
- Chervitz, S. A., & Falke, J. J. (1996). Molecular mechanism of transmembrane signaling by the aspartate receptor: A model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(6), 2545-2550. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.6.2545>
- Colvin, K. M., Irie, Y., Tart, C. S., Urbano, R., Whitney, J. C., Ryder, C., Howell, P. L., Wozniak, D. J., & Parsek, M. R. (2012). The Pel and Psl polysaccharides provide Pseudomonas aeruginosa structural redundancy within the biofilm matrix. *Environmental Microbiology*, 14(8), 1913-1928. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x>

- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- D'Argenio, D. A., Calfee, M. W., Rainey, P. B., & Pesci, E. C. (2002). Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *Journal of Bacteriology*, 184(23), 6481-6489. <https://doi.org/10.1128/JB.184.23.6481-6489.2002>
- Darzins, A. (1994). Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene cluster involved in pilus biosynthesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis proteins of enterics and the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 11(1), 137-153. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00296.x>
- Dasgupta, N., & Ramphal, R. (2001). Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 183(22), 6636-6644. <https://doi.org/10.1128/JB.183.22.6636-6644.2001>
- Dasgupta, N., Wolfgang, M. C., Goodman, A. L., Arora, S. K., Jyot, J., Lory, S., & Ramphal, R. (2003). A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 50(3), 809-824. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03740.x>
- De, N., Pirruccello, M., Krasteva, P. V., Bae, N., & Raghavan, R. V. (2008). Phosphorylation-Independent Regulation of the Diguanylate Cyclase WspR. *PLoS biology*, 6(3), e67. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060067>
- DeFranco, A. L., & Koshland, D. E. (1980). Multiple methylation in processing of sensory signals during bacterial chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(5), 2429-2433. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.5.2429>
- DePamphilis, M. L., & Adler, J. (1971a). Attachment of Flagellar Basal Bodies to the Cell Envelope: Specific Attachment to the Outer, Lipopolysaccharide Membrane and the Cytoplasmic Membrane. *Journal of Bacteriology*, 105(1), 396-407. <https://doi.org/10.1128/jb.105.1.396-407.1971>
- DePamphilis, M. L., & Adler, J. (1971b). Fine Structure and Isolation of the Hook-Basal Body Complex of Flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 105(1), 384-395. <https://doi.org/10.1128/jb.105.1.384-395.1971>
- D'Ippólito, S., de Castro, R. E., & Herrera Seitz, K. (2011). Chemotactic responses to gas oil of *Halomonas* spp. strains isolated from saline environments in Argentina. *Revista Argentina de microbiologia*, 43, 107-110. <https://doi.org/10.1590/S0325-75412011000200007>
- Djordjevic, S., Goudreau, P. N., Xu, Q., Stock, A. M., & West, A. H. (1998). Structural basis for methyltransferase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(4), 1381-1386. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1381>
- Djordjevic, S., & Stock, A. M. (1998). Chemotaxis receptor recognition by protein methyltransferase CheR. *Nature structural biology*, 5(6), 446-450. <https://doi.org/10.1038/nsb0698-446>
- Djordjevic, S., & Stock, A. M. (1997). Crystal structure of the chemotaxis receptor methyltransferase CheR suggests a conserved structural motif for binding S-adenosylmethionine. *Structure (London, England: 1993)*, 5(4), 545-558. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00210-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00210-4)
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(4), 486-501. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
- Evans, P. R., & Murshudov, G. N. (2013). How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(7), 1204-1214. <https://doi.org/10.1107/S0907444913000061>

- Falke, J. J., & Hazelbauer, G. L. (2001). Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(4), 257-265. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01770-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01770-9)
- Fernández, M., Morel, B., Corral-Lugo, A., & Krell, T. (2016). Identification of a chemoreceptor that specifically mediates chemotaxis toward metabolizable purine derivatives. *Molecular Microbiology*, 99(1), 34-42. <https://doi.org/10.1111/mmi.13215>
- Ferrández, A., Hawkins, A. C., Summerfield, D. T., & Harwood, C. S. (2002). Cluster II che genes from *Pseudomonas aeruginosa* are required for an optimal chemotactic response. *Journal of Bacteriology*, 184(16), 4374-4383. <https://doi.org/10.1128/JB.184.16.4374-4383.2002>
- Ferris, H. U., Zeth, K., Hulko, M., Dunin-Horkawicz, S., & Lupas, A. N. (2014). Axial helix rotation as a mechanism for signal regulation inferred from the crystallographic analysis of the *E. coli* serine chemoreceptor. *Journal of Structural Biology*, 186(3), 349-356. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.03.015>
- Francis, N. R., Sosinsky, G. E., Thomas, D., & DeRosier, D. J. (1994). Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *Journal of Molecular Biology*, 235(4), 1261-1270. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1079>
- Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T., & Lynne Howell, P. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in Microbiology*, 2(AUG), 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00167>
- Fu, X. Z., Tan, D., Aibaidula, G., Wu, Q., Chen, J. C., & Chen, G. Q. (2014). Development of *Halomonas* TD01 as a host for open production of chemicals. *Metabolic Engineering*, 23, 78-91. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.02.006>
- Fulcher, N. B., Holliday, P. M., Klem, E., Cann, M. J., & Wolfgang, M. C. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* Chp chemosensory system regulates intracellular cAMP levels by modulating adenylate cyclase activity. *Molecular Microbiology*, 76(4), 889-904. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07135.x>
- Galperin, M. Y., Nikolskaya, A. N., & Koonin, E. V. (2001). Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS microbiology letters*, 203(1), 11-21. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10814.x>
- Gao, Q., Cheng, A., & Parkinso, J. S. (2019). Conformational shifts in a chemoreceptor helical hairpin control kinase signaling in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(31), 15651-15660. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902521116>
- García-Fontana, C., Corral Lugo, A., & Krell, T. (2014). Specificity of the CheR2 methyltransferase in *Pseudomonas aeruginosa* is directed by a C-terminal pentapeptide in the McpB chemoreceptor. *Science signaling*, 7(320), ra34. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004849>
- Gardina, P., Conway, C., Kossman, M., & Manson, M. (1992). Aspartate and Maltose-Binding Protein Interact with Adjacent Sites in the Tar Chemotactic Signal Transducer of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174(5), 1528-1536. <https://doi.org/10.1128/jb.174.5.1528-1536.1992>
- Garvis, S., Munder, A., Ball, G., De Bentzmann, S., Wiehlmann, L., Ewbank, J. J., Tümmeler, B., & Filloux, A. (2009). *Caenorhabditis elegans* semi-automated liquid screen reveals a specialized role for the chemotaxis gene *cheB2* in *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *PLoS Pathogens*, 5(8), e1000540. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000540>
- Gasperotti, A. F. (2018). Comportamiento quimiotáctico de microorganismos ambientales y su significado biológico. [Tesis doctoral]. En *Universidad Nacional de Mar del Plata - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Instituto de Investigaciones Biológicas*.
- Gasperotti, A. F., Herrera Seitz, M. K., Balmaceda, R. S., Prosa, L. M., Jung, K., & Studdert, C. A. (2021). Direct binding of benzoate derivatives to two chemoreceptors with Cache sensor domains in *Halomonas titanicae* KHS3. *Molecular Microbiology*, 115(4), 672-683. <https://doi.org/10.1111/mmi.14630>

- Gasperotti, A. F., Revuelta, M. V., Studdert, C. A., & Herrera Seitz, M. K. (2018). Identification of two different chemosensory pathways in representatives of the genus *Halomonas*. *BMC Genomics*, *19*(1), 266. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4655-4>
- Gasperotti, A. F., Studdert, C. A., Revale, S., & Herrera Seitz, M. K. (2015). Draft Genome Sequence of *Halomonas* sp. KHS3, a Polyaromatic Hydrocarbon-Chemotactic Strain. *Genome Announcements*, *3*(2), e00020-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00020-15>
- Gavira, J. A., Gumerov, V. M., Rico-Jiménez, M., Petukh, M., Upadhyay, A. A., Ortega, A., Matilla, M. A., Zhulin, I. B., & Krell, T. (2020). How bacterial chemoreceptors evolve novel ligand specificities. *mBio*, *11*(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.03066-19>
- Gavira, J. A., Ortega, Á., Martín-Mora, D., Conejero-Muriel, M. T., Corral-Lugo, A., Morel, B., Matilla, M. A., & Krell, T. (2018). Structural Basis for Polyamine Binding at the dCACHE Domain of the McpU Chemoreceptor from *Pseudomonas putida*. *Journal of Molecular Biology*, *430*(13), 1950-1963. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.05.008>
- Glekas, G. D., Mulhern, B. J., Kroc, A., Duelfer, K. A., Lei, V., Rao, C. V., & Ordal, G. W. (2012). The *Bacillus subtilis* chemoreceptor McpC senses multiple ligands using two discrete mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(47), 39412-39418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.413518>
- Goymer, P., Kahn, S. G., Malone, J. G., Gehrig, S. M., Spiers, A. J., & Rainey, P. B. (2006). Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. II. Role of the GGDEF regulator WspR in evolution and development of the wrinkly spreader phenotype. *Genetics*, *173*(2), 515-526. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.055863>
- Guiseppi, A., Vicente, J. J., Herrou, J., Byrne, D., Barneoud, A., Moine, A., Espinosa, L., Basse, M. J., Molle, V., Mignot, T., Roche, P., & Mauriello, E. M. F. (2019). A divergent CheW confers plasticity to nucleoid-associated chemosensory arrays. *PLoS Genetics*, *15*(12), 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008533>
- Güvener, Z. T., & Harwood, C. S. (2007). Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Molecular Microbiology*, *66*(6), 1459-1473. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06008.x>
- Güvener, Z. T., Tifrea, D. F., & Harwood, C. S. (2006). Two different *Pseudomonas aeruginosa* chemosensory signal transduction complexes localize to cell poles and form and remould in stationary phase. *Molecular Microbiology*, *61*(1), 106-118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05218.x>
- Ha, D.-G., & O'Toole, G. A. (2015). c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a *Pseudomonas Aeruginosa* Review. *Microbiology Spectrum*, *3*(2), 1-12. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0003-2014>
- Hall, J. (2019). A simple model for determining affinity from irreversible thermal shifts. *Protein Science*, *28*(10), 1880-1887. <https://doi.org/10.1002/pro.3701>
- Hallgren, J., Tsigirgos, K. D., Damgaard Pedersen, M., Juan, J., Armenteros, A., Marcatili, P., Nielsen, H., Krogh, A., & Winther, O. (2022). DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. *BMC Bioinformatics*, *23*, 326. <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>
- Harayama, S., Tapio Palva, E., & Hazelbauer, G. L. (1979). Transposon-Insertion Mutants of *Escherichia coli* K12 Defective in a Component Common to Galactose and Ribose Chemotaxis. *Molecular & general genetics : MGG*, *171*(2), 193-203. <https://doi.org/10.1007/BF00270005>
- Hazelbauer, G. L. (1975). Maltose Chemoreceptor of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, *122*(1), 206-214. <https://doi.org/10.1128/jb.122.1.206-214.1975>

- Hazelbauer, G. L., Falke, J. J., & Parkinson, J. S. (2008). Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(1), 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.09.014>
- Hazelbauer, G. L., & Lai, W. C. (2010). Bacterial chemoreceptors: providing enhanced features to two-component signaling. *Current Opinion in Microbiology*, 13(2), 124-132. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.12.014>
- Hazelbauer, G. L., Mesibov, R. E., & Adler, J. (1969). Escherichia coli mutants defective in chemotaxis toward specific chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 64(4), 1300-1307.
- Hegde, M., Englert, D. L., Schrock, S., Cohn, W. B., Vogt, C., Wood, T. K., Manson, M. D., & Jayaraman, A. (2011). Chemotaxis to the quorum-sensing signal AI-2 requires the Tsr chemoreceptor and the periplasmic LsrB AI-2-binding protein. *Journal of Bacteriology*, 193(3), 768-773. <https://doi.org/10.1128/JB.01196-10>
- Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, 7(4), 263-273. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2109>
- Herrera Seitz, M. K., Frank, V., Massazza, D. A., Vaknin, A., & Studdert, C. A. (2014). Bacterial chemoreceptors of different length classes signal independently. *Molecular Microbiology*, 93(4), 814-822. <https://doi.org/10.1111/mmi.12700>
- Hickman, J. W., & Harwood, C. S. (2008). Identification of FleQ from Pseudomonas aeruginosa as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular Microbiology*, 69(2), 376-389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06281.x>
- Hickman, J. W., Tifrea, D. F., & Harwood, C. S. (2005). A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), 14422-14427. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507170102>
- Hong, C. S., Shitashiro, M., Kuroda, A., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., & Kato, J. (2004). Chemotaxis proteins and transducers for aerotaxis in Pseudomonas aeruginosa. *FEMS Microbiology Letters*, 231(2), 247-252. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(04\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(04)00009-6)
- Huang, Z., Pan, X., Xu, N., & Guo, M. (2019). Bacterial chemotaxis coupling protein: Structure, function and diversity. *Microbiological Research*, 219, 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.11.001>
- Huangyutham, V., Güvener, Z. T., & Harwood, C. S. (2013). Subcellular clustering of the phosphorylated WspR response regulator protein stimulates its diguanylate cyclase activity. *mBio*, 4(3), e00242-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00242-13>
- Hueso-Gil, Á., Calles, B., & de Lorenzo, V. (2020). The Wsp intermembrane complex mediates metabolic control of the swim-attach decision of Pseudomonas putida. *Environmental Microbiology*, 22(8), 3535-3547. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15126>
- Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J. U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J. E., Lupas, A. N., & Coles, M. (2006). The HAMP Domain Structure Implies Helix Rotation in Transmembrane Signaling. *Cell*, 126(5), 929-940. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.058>
- Inclan, Y. F., Persat, A., Greninger, A., Von Dollen, J., Johnson, J., Krogan, N., Gitai, Z., & Engel, J. N. (2016). A scaffold protein connects type IV pili with the Chp chemosensory system to mediate activation of virulence signaling in Pseudomonas aeruginosa. *Molecular Microbiology*, 101(4), 590-605. <https://doi.org/10.1111/mmi.13410>
- Jenal, U. (2004). Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: A novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? *Current Opinion in Microbiology*, 7(2), 185-191. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.02.007>

- Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2017). Congo red stain identifies matrix overproduction and is an indirect measurement for c-di-GMP in many species of bacteria. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1657, pp. 147-156). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7240-1_12
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, *66*(2), 125-132. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
- Karpenahalli, M. R., Lupas, A. N., & Söding, J. (2007). TPRpred: A tool for prediction of TPR-, PPR- and SEL1-like repeats from protein sequences. *BMC Bioinformatics*, *8*(2). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-2>
- Kato, J., Nakamura, T., Kuroda, A., & Ohtake, H. (1999). Cloning and characterization of chemotaxis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *63*(1), 155-161. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.155>
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature reviews. Microbiology*, *8*(9), 634-644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- Kehry, M. R., Doak, T. G., & Dahlquist, F. W. (1984). Stimulus-induced changes in methylesterase activity during chemotaxis in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, *259*(19), 11828-11835. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)71286-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)71286-x)
- Khan, I. H., Reeset, T. S., & Khan, S. (1992). The cytoplasmic component of the bacterial flagellar motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(13), 5956-5960. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.13.5956>
- Kim, K. K., Yokota, H., & Kim, S. H. (1999). Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor. *Nature*, *400*(6746), 787-792. <https://doi.org/10.1038/23512>
- Kinosita, Y., Ishida, T., Yoshida, M., Ito, R., Morimoto, Y. V., Goto, K., Berry, R. M., Nishizaka, T., & Sowa, Y. (2020). Distinct chemotactic behavior in the original *Escherichia coli* K-12 depending on forward-and-backward swimming, not on run-tumble movements. *Scientific Reports*, *10*(1), 15887. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72429-1>
- Kita-Tsukamoto, K., Wada, M., Yao, K., Nishino, T., & Kogure, K. (2004). Flagellar motors of marine bacteria *Halomonas* are driven by both protons and sodium ions. *Canadian journal of microbiology*, *50*(5), 369-374. <https://doi.org/10.1139/w04-021>
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, *166*(1), 175-176. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00584-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00584-1)
- Kulesekara, H., Lee, V., Brencic, A., Liberati, N., Urbach, J., Miyata, S., Lee, D. G., Neely, A. N., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Ausubel, F. M., & Lory, S. (2006). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(8), 2839-2844. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511090103>
- Li, X., Fleetwood, A. D., Bayas, C., Bilwes, A. M., Ortega, D. R., Falke, J. J., Zhulin, I. B., & Crane, B. R. (2013). The 3.2 Å Resolution Structure of a Receptor:CheA:CheW Signaling Complex Defines Overlapping Binding Sites and Key Residue Interactions within Bacterial Chemosensory Arrays. *Biochemistry*, *52*(22), 3852-3865. <https://doi.org/10.1021/bi400385c>

- Li, Y., Hu, Y., Fu, W., Xia, B., & Jin, C. (2007). Solution structure of the bacterial chemotaxis adaptor protein CheW from *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360(4), 863-867. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.146>
- Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2015). Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiology Spectrum*, 3(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0011-2014>
- Lin, N., Li, J., Brandts, J. F., & Weis, R. M. (1994). The serine receptor of bacterial chemotaxis exhibits half-site saturation for serine binding. *Biochemistry*, 33(21), 6564-6570.
- Liu, J., Hu, B., Morado, D. R., Jani, S., Manson, M. D., & Margolin, W. (2012). Molecular architecture of chemoreceptor arrays revealed by cryoelectron tomography of *Escherichia coli* minicells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(23). <https://doi.org/10.1073/pnas.1200781109>
- Liu, J., & Parkinson, J. S. (1989). Role of CheW protein in coupling membrane receptors to the intracellular signaling system of bacterial chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(22), 8703-8707. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.22.8703>
- Liu, X., Cao, B., Yang, L., & Gu, J. D. (2022). Biofilm control by interfering with c-di-GMP metabolism and signaling. *Biotechnology Advances*, 56(107915). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107915>
- Liu, X., & Parales, R. E. (2008). Chemotaxis of *Escherichia coli* to pyrimidines: A new role for the signal transducer tap. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 972-979. <https://doi.org/10.1128/JB.01590-07>
- Liu, Y. C., Machuca, M. A., Beckham, S. A., Gunzburg, M. J., & Roujeinikova, A. (2015). Structural basis for amino-acid recognition and transmembrane signalling by tandem Per-Arnt-Sim (tandem PAS) chemoreceptor sensory domains. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 71, 2127-2136. <https://doi.org/10.1107/S139900471501384X>
- Lukat, G. S., Mcclary, W. R., Stockt, A. M., & Stock, J. B. (1992). Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(2), 718-722. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.2.718>
- Lupas, A., & Stock, J. (1989). Phosphorylation of an N-terminal regulatory domain activates the CheB methylesterase in bacterial chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, 264(29), 17337-17342. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)71497-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)71497-x)
- Machuca, M. A., Johnson, K. S., Liu, Y. C., Steer, D. L., Ottemann, K. M., & Roujeinikova, A. (2017). *Helicobacter pylori* chemoreceptor TlpC mediates chemotaxis to lactate. *Scientific Reports*, 7(1), 14089. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14372-2>
- Macnab, R. M. (2003). How Bacteria Assemble Flagella. *Annual Review of Microbiology*, 57(1), 77-100. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090832>
- Maddock, J. R., & Shapiro, L. (1993). Polar Location of the Chemoreceptor Complex in the *Escherichia coli* Cell. *Science*, 259(5102), 1717-1723. <https://doi.org/10.1126/science.8456299>
- Maldonado, P. N. (2022). Distintos tipos de movilidad en *Halomonas titanicae* KHS3 y su relación con los sistemas de quimioseñalización. [Tesis de grado]. En *Universidad Nacional del Litoral - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Instituto de Agrobiotecnología del Litoral*.
- Manson, M. D., Blank, V., Brade, G., & Higgins, C. F. (1986). Peptide chemotaxis in *E. coli* involves the Tap signal transducer and the dipeptide permease. *Nature*, 321(6067), 253-256. <https://doi.org/10.1038/321253a0>

- Matilla, M. A., Martín-Mora, D., Gavira, J. A., & Krell, T. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* as a Model To Study Chemosensory Pathway Signaling. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(1), e00151-20. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00151-20>
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., & Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, 40(4), 658-674. <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>
- McEvoy, M. M., Ranjith, D., Kay, L. E., & Dahlquist, F. W. (1996). Structure and Dynamics of a CheY-Binding Domain of the Chemotaxis Kinase CheA Determined by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biochemistry*, 35(18), 5633-5640. <https://doi.org/10.1021/bi952707h>
- Mckellar, J. L. O., Minnell, J. J., & Gerth, M. L. (2015). A high-throughput screen for ligand binding reveals the specificities of three amino acid chemoreceptors from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Molecular Microbiology*, 96(4), 694-707. <https://doi.org/10.1111/mmi.12964>
- Merz, A. J., So, M., & Sheetz, M. P. (2000). Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature*, 407(6800), 98-102. <https://doi.org/10.1038/35024105>
- Mesibov, R., & Adler, J. (1972). Chemotaxis Toward Amino Acids in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 112(1), 315-326. <https://doi.org/10.1128/jb.112.1.315-326.1972>
- Milburn, M. V., Privé, G. G., Milligan, D. L., Scott, W. G., Yeh, J., Jancarik, J., Koshland, D. E., & Kim, S. (1991). Three-dimensional structures of the ligand-binding domain of the bacterial aspartate receptor with and without a ligand. *Science*, 254(5036), 1342-1347. <https://doi.org/10.1126/science.1660187>
- Muñoz-Martínez, F., García-Fontana, C., Rico-Jiménez, M., Alfonso, C., & Krell, T. (2012). Genes Encoding Cher-TPR Fusion Proteins Are Predominantly Found in Gene Clusters Encoding Chemosensory Pathways with Alternative Cellular Functions. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045810>
- Muok, A. R., Briegel, A., & Crane, B. R. (2020). Regulation of the chemotaxis histidine kinase CheA: A structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1862(1), 183030. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183030>
- Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F., & Vagin, A. A. (2011). REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 67(4), 355-367. <https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>
- Nedeljković, M., Sastre, D. E., & Sundberg, E. J. (2021). Bacterial flagellar filament: A supramolecular multifunctional nanostructure. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 1-33. <https://doi.org/10.3390/ijms22147521>
- Newman, J. R., & Fuqua, C. (1999). Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* araBAD promoter and the araC regulator. *Gene*, 227(2), 197-203. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00601-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00601-5)
- Nixon, B. T., Ronson, C. W., & Ausubel, F. M. (1986). Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes ntrB and ntrC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(20), 7850-7854. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.20.7850>
- O'Brien, E. J., & Bennett, P. M. (1972). Structure of straight flagella from a mutant *Salmonella*. *Journal of Molecular Biology*, 70(1), 133-152. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(72\)90168-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(72)90168-4)
- O'Connor, J. R., Kuwada, N. J., Huangyutham, V., Wiggins, P. A., & Harwood, C. S. (2012). Surface sensing and lateral subcellular localization of WspA, the receptor in a chemosensory-like system leading to c-di-GMP production. *Molecular Microbiology*, 86(3), 720-729. <https://doi.org/10.1111/mmi.12013>

- O'Neill, E., Ng, L. C., Sze, C. C., & Shingler, V. (1998). Aromatic ligand binding and intramolecular signalling of the phenol-responsive σ 54-dependent regulator DmpR. *Molecular Microbiology*, 28(1), 131-141. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00780.x>
- Ortega, Á., Zhulin, I. B., & Krell, T. (2017). Sensory Repertoire of Bacterial Chemoreceptors. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 89(4), e00033-17. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00033-17>
- Ortega, D. R., Fleetwood, A. D., Krell, T., Harwood, C. S., Jensen, G. J., & Zhulin, I. B. (2017). Assigning chemoreceptors to chemosensory pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(48), 12809-12814. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708842114>
- Ortega, D. R., Yang, W., Subramanian, P., Mann, P., Kjær, A., Chen, S., Watts, K. J., Pirbadian, S., Collins, D. A., Kooger, R., Kalyuzhnaya, M. G., Ringgaard, S., Briegel, A., & Jensen, G. J. (2020). Repurposing a chemosensory macromolecular machine. *Nature Communications*, 11(1), 2041. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15736-5>
- Österberg, S., Åberg, A., Herrera Seitz, M. K., Wolf-Watz, M., & Shingler, V. (2013). Genetic dissection of a motility-associated c-di-GMP signalling protein of *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology Reports*, 5(4), 556-565. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12045>
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), 295-304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>
- Pantoliano, M. W., Petrella, E. C., Kwasnoski, J. D., Lobanov, V. S., Myslik, J., Graf, E., Carver, T., Asel, E., Springer, B. A., Lane, P., & Salemme, F. R. (2001). High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *Journal of biomolecular screening*, 6(6), 429-440. <https://doi.org/10.1177/108705710100600609>
- Papon, N., & Stock, A. M. (2019). Two-component systems. En *Current Biology* (Vol. 29, Número 15, pp. R724-R725). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.06.010>
- Park, S., Borbat, P. P., Gonzalez-bonet, G., Bhatnagar, J., Pollard, A. M., Freed, J. H., Bilwes, A. M., & Crane, B. R. (2006). Reconstruction of the chemotaxis receptor-kinase assembly. *Nature structural & molecular biology*, 13(5), 400-407. <https://doi.org/10.1038/nsmb1085>
- Park, S.-Y., Beel, B. D., Simon, M. I., Bilwes, A. M., & Crane, B. R. (2004). In different organisms, the mode of interaction between two signaling proteins is not necessarily conserved. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(32), 11646-11651. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401038101>
- Parkinson, J. S. (1975). Genetics of Chemotactic Behavior in Bacteria. *Cell*, 4, 183-188.
- Parkinson, J. S. (1976). cheA, cheB, and cheC genes of *Escherichia coli* and their role in chemotaxis. *Journal of bacteriology*, 126(2), 758-770. <https://doi.org/10.1128/jb.126.2.758-770.1976>
- Parkinson, J. S., Hazelbauer, G. L., & Falke, J. J. (2015). Signaling and sensory adaptation in *Escherichia coli* chemoreceptors: 2015 update. *Trends in Microbiology*, 23(5), 257-266. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.03.003>
- Parkinson, J. S., & Houts, S. E. (1982). Isolation and behavior of *Escherichia coli* deletion mutants lacking chemotaxis functions. *Journal of bacteriology*, 151(1), 106-113. <https://doi.org/10.1128/jb.151.1.106-113.1982>
- Perez-Riba, A., & Itzhaki, L. S. (2019). The tetratricopeptide-repeat motif is a versatile platform that enables diverse modes of molecular recognition. *Current Opinion in Structural Biology*, 54, 43-49. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.12.004>
- Persat, A., Inclan, Y. F., Engel, J. N., Stone, H. A., & Gitai, Z. (2015). Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America*, 112(24), 7563-7568. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502025112>
- Petrova, O. E., & Sauer, K. (2012). Sticky situations: Key components that control bacterial surface attachment. *Journal of Bacteriology*, 194(10), 2413-2425. <https://doi.org/10.1128/JB.00003-12>
- Pierce, M. M., Raman, C. S., & Nall, B. T. (1999). Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods (San Diego, Calif.)*, 19(2), 213-221. <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0852>
- Piñas, G. E., Frank, V., Vaknin, A., & Parkinson, J. S. (2016). The source of high signal cooperativity in bacterial chemosensory arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(12), 3335-3340. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600216113>
- Qian, C., Ching Wong, C., Swarup, S., & Chiama, K. H. (2013). Bacterial tethering analysis reveals a «run-reverse-turn» mechanism for pseudomonas species motility. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(15), 4734-4743. <https://doi.org/10.1128/AEM.01027-13>
- Quezada, C. M., Grădinaru, C., Simon, M. I., Bilwes, A. M., & Crane, B. R. (2004). Helical shifts generate two distinct conformers in the atomic resolution structure of the CheA phosphotransferase domain from *Thermotoga maritima*. *Journal of Molecular Biology*, 341(5), 1283-1294. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.06.061>
- Rice, M. S., & Dahlquist, F. W. (1991). Sites of deamidation and methylation in Tsr, a bacterial chemotaxis sensory transducer. *Journal of Biological Chemistry*, 266(15), 9746-9753. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)92884-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)92884-x)
- Römling, U. (2012). Cyclic di-GMP, an established secondary messenger still speeding up. *Environmental Microbiology*, 14(8), 1817-1829. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02617.x>
- Römling, U., Gomelsky, M., & Galperin, M. Y. (2005). C-di-GMP: The dawning of a novel bacterial signalling system. *Molecular Microbiology*, 57(3), 629-639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04697.x>
- Sánchez-Porro, C., Kaur, B., Mann, H., & Ventosa, A. (2010). *Halomonas titanicae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the RMS Titanic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(12), 2768-2774. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.020628-0>
- Sanders, D. A., Gillece-Castro, B. L., Stock, A. M., Burlingame, A. L., & Koshland, D. E. (1989). Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. *Journal of Biological Chemistry*, 264(36), 21770-21778. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)88250-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)88250-7)
- Sarkar, M. K., Paul, K., & Blair, D. (2010). Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20), 9370-9375. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000935107>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis HHS Public Access. *Nat Methods*, 9(7), 671-675.
- Schröder, H., Langer, T., Hartl, F.-U., & Bukau, B. (1993). DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *The EMBO Journal*, 12(11), 4137-4144. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06097.x>
- Schuster, M., Hawkins, A. C., Harwood, C. S., & Greenberg, E. P. (2004). The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Molecular Microbiology*, 51(4), 973-985. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03886.x>
- Schuster, S. C., & Khan, S. (1994). The Bacterial Flagellar Motor. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 23, 509-548. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.23.060194.002453>

- Scott, A. E., Simon, E., Park, S. K., Andrews, P., & Zusman, D. R. (2008). Site-specific receptor methylation of FrzCD in *Myxococcus xanthus* is controlled by a tetra-trico peptide repeat (TPR) containing regulatory domain of the FrzF methyltransferase. *Molecular Microbiology*, 69(3), 724-735. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06323.x>
- Serra, D. O., & Hengge, R. (2014). Stress responses go three dimensional - The spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. *Environmental Microbiology*, 16(6), 1455-1471. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12483>
- Shapiro, M. J., Chakrabarti, I., & Koshland, D. E. (1995). Contributions made by individual methylation sites of the *Escherichia coli* aspartate receptor to chemotactic behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(4), 1053-1056. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.1053>
- Shapiro, M. J., & Koshland, D. E. (1994). Mutagenic studies of the interaction between the aspartate receptor and methyltransferase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(15), 11054-11059. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)78090-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)78090-9)
- Shiomi, D., Zhulin, I. B., Homma, M., & Kawagishi, I. (2002). Dual recognition of the bacterial chemoreceptor by chemotaxis-specific domains of the CheR methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 42325-42333. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202001200>
- Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., De Las Heras, A., Páez-Espino, A. D., Durante-Rodríguez, G., Kim, J., Nickel, P. I., Platero, R., & De Lorenzo, V. (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): A coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Research*, 41(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks1119>
- Simon, R., Prierer, U., & Pühler, A. (1983). A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nature biotechnology*, 1, 784-791. <https://doi.org/10.1038/nbt1183-784>
- Skerker, J. M., & Berg, H. C. (2001). Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), 6901-6904. <https://doi.org/10.1073/pnas.121171698>
- Skubák, P., & Pannu, N. S. (2013). Automatic protein structure solution from weak X-ray data. *Nature Communications*, 4(2777). <https://doi.org/10.1038/ncomms3777>
- Slocum, M. K., & Parkinson, J. S. (1985). Genetics of methyl-accepting chemotaxis proteins in *Escherichia coli*: null phenotypes of the tar and tap genes. *Journal of bacteriology*, 163(2), 586-594. <https://doi.org/10.1128/jb.163.2.586-594.1985>
- Sourjik, V., & Armitage, J. P. (2010). Spatial organization in bacterial chemotaxis. *EMBO Journal*, 29(16), 2724-2733. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.178>
- Spiers, A. J., Kahn, S. G., Bohannon, J., Travisano, M., & Rainey, P. B. (2002). Adaptive Divergence in Experimental Populations of *Pseudomonas fluorescens*. I. Genetic and Phenotypic Bases of Wrinkly Spreader Fitness. *Genetics*, 161(1), 33-46. <https://doi.org/10.1093/genetics/161.1.33>
- Springer, M. S., Goyt, M. F., & Adler, J. (1977). Sensory transduction in *Escherichia coli*: Two complementary pathways of information processing that involve methylated proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(8), 3312-3316. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.8.3312>
- Springer, M. S., Zanolari, B., & Pierzchala, P. A. (1982). Ordered methylation of the methyl-accepting chemotaxis proteins of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 257(12), 6861-6866. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)34509-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)34509-5)
- Springer, W. R., & Koshland, D. E. (1977). Identification of a protein methyltransferase as the cheR gene product in the bacterial sensing system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(2), 53-537. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.533>

- Stewart, R. C. (1993). Activating and inhibitory mutations in the regulatory domain of CheB, the methyltransferase in bacterial chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, 268(3), 1921-1930. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)53942-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)53942-9)
- Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual review of biochemistry*, 69, 183-215. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>
- Stock, J. B., & Koshland, D. E. (1978). A protein methyltransferase involved in bacterial sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(8), 3659-3663. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.8.3659>
- Stock, J. B., & Koshland, D. E. (1981). Changing reactivity of receptor carboxyl groups during bacterial sensing. *Journal of Biological Chemistry*, 256(21), 10826-10833. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)68517-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)68517-0)
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., ... Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959-964. <https://doi.org/10.1038/35023079>
- Studdert, C. A., & Parkinson, J. S. (2004). Crosslinking snapshots of bacterial chemoreceptor squads. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 2117-2122. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308622100>
- Studdert, C. A., & Parkinson, J. S. (2005). Insights into the organization and dynamics of bacterial chemoreceptor clusters through in vivo crosslinking studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), 15623-15628. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506040102>
- Suchanek, V. M., Esteban-López, M., Colin, R., Besharova, O., Fritz, K., & Sourjik, V. (2020). Chemotaxis and cyclic-di-GMP signalling control surface attachment of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 113(4), 728-739. <https://doi.org/10.1111/mmi.14438>
- Swanson, R. V., Bourret, R. B., & Simon, M. I. (1993). Intermolecular complementation of the kinase activity of CheA. *Molecular Microbiology*, 8(3), 435-441. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01588.x>
- Tajima, H., Imada, K., Sakuma, M., Hattori, F., Nara, T., Kamo, N., Homma, M., & Kawagishi, I. (2011). Ligand specificity determined by differentially arranged common ligand-binding residues in bacterial amino acid chemoreceptors Tsr and Tar. *Journal of Biological Chemistry*, 286(49), 42200-42210. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.221887>
- Terwilliger, T. C., Bogonez, E., Wang, E. A., & Koshland, D. E. (1983). Sites of methyl esterification on the aspartate receptor involved in bacterial chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, 258(16), 9608-9611. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)44537-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44537-6)
- Terwilliger, T. C., & Koshland, D. E. (1984). Sites of methyl esterification and deamination on the aspartate receptor involved in chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, 259(12), 7719-7725. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)42852-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)42852-3)
- Terwilliger, T. C., Wang, J. Y., & Koshland, D. E. (1986). Kinetics of receptor modification. The multiply methylated aspartate receptors involved in bacterial chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, 261(23), 10814-10820. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)67460-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)67460-5)
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 1-25. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Tso, W.-W., & Adler, J. (1974). Negative Chemotaxis in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 118(2), 560-576. <https://doi.org/10.1128/jb.118.2.560-576.1974>
- Ud-Din, A. I. M. S., Khan, M. F., & Roujeinikova, A. (2020). Broad specificity of amino acid chemoreceptor CtaA of *Pseudomonas fluorescens* Is afforded by plasticity of its amphipathic

- ligand-binding pocket. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(4), 612-623. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-19-0277-R>
- Ud-Din, A. I. M. S., & Roujeinikova, A. (2017). Methyl-accepting chemotaxis proteins: a core sensing element in prokaryotes and archaea. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(18), 3293-3303. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2514-0>
- Ueno, T., Oosawa, K., & Aizawa, S.-I. (1992). M Ring, S Ring and Proximal Rod of the Flagellar Basal Body of Salmonella typhimurium are Composed of Subunits of a Single Protein, FliF. *Journal of Molecular Biology*, 227(3), 672-677. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90216-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90216-7)
- Valderrama-Gómez, M., Schomer, R. A., Savageau, M. A., & Parales, R. E. (2020). TaxisPy: A Python-based software for the quantitative analysis of bacterial chemotaxis. *Journal of Microbiological Methods*, 175. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105918>
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Zidek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., ... Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D439-D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Walz, D., & Caplan, S. R. (2002). Bacterial flagellar motor and H⁺/ATP synthase: Two proton-driven rotary molecular devices with different functions. *Bioelectrochemistry*, 55(1-2), 89-92. [https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(01\)00162-1](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(01)00162-1)
- Watts, K. J., Taylor, B. L., & Johnson, M. S. (2011). PAS/poly-HAMP signalling in Aer-2, a soluble haem-based sensor. *Molecular Microbiology*, 79(3), 686-699. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07477.x>
- Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G., & Hengge, R. (2006). Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the σ S network of Escherichia coli. *Molecular Microbiology*, 62(4), 1014-1034. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05440.x>
- West, A. H., Martinez-Hackert, E., & Stock, A. M. (1995). Crystal Structure of the Catalytic Domain of the Chemotaxis Receptor Methyltransferase, CheB. *Journal of Molecular Biology*, 250(2), 276-290. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0376>
- Whitchurch, C. B., Leech, A. J., Young, M. D., Kennedy, D., Sargent, J. L., Bertrand, J. J., Semmler, A. B. T., Mellick, A. S., Martin, P. R., Alm, R. A., Hobbs, M., Beatson, S. A., Huang, B., Nguyen, L., Commolli, J. C., Engel, J. N., Darzins, A., & Mattick, J. S. (2004). Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in Pseudomonas aeruginosa. *Molecular Microbiology*, 52(3), 873-893. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04026.x>
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G. W., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., & Wilson, K. S. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 67(4), 235-242. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>
- Wolfe, A. J., & Visick, K. L. (2008). Get the message out: Cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *Journal of Bacteriology*, 190(2), 463-475. <https://doi.org/10.1128/JB.01418-07>
- Wood, P. J., & Fulcher, R. G. (1978). Interaction of some dyes with cereal beta-glucans. *Cereal Chemistry*, 55, 952-966.
- Wu, J., Li, J., Li, G., Long, D. G., & Weis, R. M. (1996). The Receptor Binding Site for the Methyltransferase of Bacterial Chemotaxis Is Distinct from the Sites of Methylation. *Biochemistry*, 35(15), 4984-4993. <https://doi.org/10.1021/bi9530189>

- Wuichet, K., Alexander, R. P., & Zhulin, I. B. (2007). Comparative genomic and protein sequence analyses of a complex system controlling bacterial chemotaxis. En *Methods in Enzymology* (Vol. 422, pp. 1-31). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)22001-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)22001-9)
- Wuichet, K., Cantwell, B. J., & Zhulin, I. B. (2010). Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Current Opinion in Microbiology*, 13(2), 219-225. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.12.011>
- Wuichet, K., & Zhulin, I. B. (2010). Origins and diversification of a complex signal transduction system in prokaryotes. *Science Signaling*, 3(128), 1-13. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000724>
- Xu, A., Wang, D., Wang, Y., Zhang, L., Xie, Z., Cui, Y., Bhamse, P., Yu, H., Zhang, X. X., Li, D., & Ma, L. Z. (2022). Mutations in surface-sensing receptor WspA lock the Wsp signal transduction system into a constitutively active state. *Environmental Microbiology*, 24(3), 1150-1165. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15763>
- Yang, J., Anishchenko, I., Park, H., Peng, Z., Ovchinnikov, S., & Baker, D. (2020). Improved protein structure prediction using predicted interresidue orientations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(3), 1496-1503. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914677117>
- Yeh, J. I., Biemann, H. P., Pandit, J., Koshland, D. E., & Kim, S. H. (1993). The three-dimensional structure of the ligand-binding domain of a wild-type bacterial chemotaxis receptor. Structural comparison to the cross-linked mutant forms and conformational changes upon ligand binding. *Journal of Biological Chemistry*, 268(13), 9787-9792. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)98416-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)98416-4)
- Yin, J., Fu, X. Z., Wu, Q., Chen, J. C., & Chen, G. Q. (2014). Development of an enhanced chromosomal expression system based on porin synthesis operon for halophile Halomonas sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(21), 8987-8997. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5959-1>
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S., & Namba, K. (2003). Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*, 424(6949), 643-650. <https://doi.org/10.1038/nature01830>
- Zhang, P., Khursigara, C. M., Hartnell, L. M., & Subramaniam, S. (2007). Direct visualization of Escherichia coli chemotaxis receptor arrays using cryo-electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(10), 3777-3781. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610106104>
- Zhang, Z., & Hendrickson, W. A. (2010). Structural Characterization of the Predominant Family of Histidine Kinase Sensor Domains. *Journal of Molecular Biology*, 400(3), 335-353. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.049>
- Zhou, H., Lowry, D. F., Swanson, R. V., Simon, M. I., & Dahlquist, F. W. (1995). NMR studies of the phosphotransfer domain of the histidine kinase CheA from Escherichia coli: assignments, secondary structure, general fold, and backbone dynamics. *Biochemistry*, 34(42), 13858-13870. <https://doi.org/10.1021/bi00042a018>
- Zhou, Q., Ames, P., & Parkinson, J. S. (2011). Biphasic control logic of HAMP domain signalling in the Escherichia coli serine chemoreceptor. *Molecular Microbiology*, 80(3), 596-611. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07577.x>
- Zschiedrich, C. P., Keidel, V., & Szurmant, H. (2016). Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *Journal of Molecular Biology*, 428(19), 3752-3775. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.003>
- Zusman, D. R., Scott, A. E., Yang, Z., & Kirby, J. R. (2007). Chemosensory pathways, motility and development in Myxococcus xanthus. *Nature Reviews Microbiology*, 5(11), 862-872. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1770>

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Anexo I:

Secuencia completa del *cluster che2* de *Halomonas titanicae* KHS3



Se muestra la secuencia completa del *cluster che2* siguiendo el mismo código de colores del esquema de arriba (tomado de la Figura 11): **quimiorreceptor Htc10**, **metilesterasa CheB2**, **metiltransferasa CheR2**, **histidín quinasa CheA2**, regulador de respuesta de dominio único CheY2, **diguanilato ciclasa DGC2**, **proteína acopladora CheW2**, **proteína acopladora CheW3**.

Las regiones donde se superpone el final de un gen y el principio de otro están sombreadas con gris, y las letras en esa región tienen el color del primer gen. Todos los codones de inicio están subrayados.

>*che2*

```
AAAAAAGCTGAAATCGTTGCCACTACCCTAAGTAGAGTGGTAAGTATCACTCTACTTCTAACCCCTGAGCGCTAT
TGAGCAGCGCCGTTAGGGCCACCGTTTACTTTGGAGCAACGGCGAACATGATGGCGCGCTGGAAATCCCTACCTT
TACGGCTTCGTCTATTTCTCTCTTTTGGGACAGTCTTAGCATTTCGCGATGCTTTTGGCGCTCTATCTTCAAGCAC
GTTACACAGCCAAGCGCGGCTGGATAACCTGCTTAATCAAGAGCTACCGGCACAGGTCAAAGGGCTGGCAGCGC
ATATAAACCTCAGCCTTAGCCAGGATCTTGCCATTTCCGAAAGCTTGCCAATAGCTACTTTATTGAGCAGTGGG
TTCGCGAAGGCCTACCGGAAGAGCGACAAAACGACATTGCGGCGTATCTAGCGCGTCTTATGGAGCAGTTAGACA
CCGAGCTGCTGTTTATCGCCGCTCAACACCAGGGTCGGGGCTACTATTTCCAAGTGGCGAACGGTGAATTTCTGC
AGCGCATTATCCAGCCCCCGGCGAGCGAAGATGACTGGTACTACCCTTACTGACAGCGACAACGCTTACGAGC
TAAATTTAGATAGCGACACCTTCTCACCCGACGATGCCTTTGTGTACGTCAATTATCGCAGCACGGTAAATGCCG
CCAACGGTCGACCGCTGGTTCGTGGCCGGTGCGGGGCTTGATCTCTCCCAAATGGCCAGTTTGATTGATGACTTTC
GCTTAGGCGGTAGCGGACACGCTTCGCTGCTCAGCGCCGAGGGTGAGCTGCTTGTTCGACGCGGCGAAGCCAAGC
GTAGTGATGAATCAGCTCCTACTGTGCAACAGCCACCGAGGCCTTACCAGAGCAAGCGTCGCAGCGTTTGCTGC
AAAACGAGCAGCTACAGGTGCATGAAGCGACCCGTGACGGTCAAGAAGTGTGGTCAGCACGATCTGGCTCCCCG
AGCTGCAGCGCTACCTAATGGTGAAGTCGATAAAAAGGCGTACCTGGCGTCCACCACGAGCGCTTCTGGAGT
CCAGCGGTATAGGGCTGCTCATTCTGCTCGTTGGGCTGCTGGTACTCTACCCGCTGACTGGCAGCCTCATCCGCC
```

CGCTGATTGATTTCCAGCGCCAGTTGAAAGACATCACCTACAGCCTGGATCTTTTCGCGGCGGGTCAGCACCGATG
 ACAAAGCCGAACCTGGCGACTTAGCCAACCAAACCAACGAGCTCCTTGAGCGCCTCTCCCGCGCTATTGCGGCAG
 TGGCCAAAACGCTCAGGCACTAACGCAAGTCGCTGACCGGCTGGCGAAAACCGCCGGGCTTTCCGGTGTGCACG
 GTAGCGATATCGATCATGAAGCAAGCCAAACCATGGCCGACGCGGTGAGGAAAATGGCCTCTTCGGTAGCGGAAA
 TAACTTCCACCATGGAAGAACTCTCTACCTCATCAACCCAAATTTGCCGATCACTCTCAGTCGGTGGTCGACGTTG
 CCAATCAGACGCTGGAGCGCAGCCGGAAGGCAGTTCCGGCCATGCAGCTGCTACAGTCAAAAATGCAGGATATCC
 GTAGCGACAGCGAACAGAGCCTGACAGAGATCATGACGCTGGGGGCGAAAATCCAAACAGATCAACAAGGTTATGG
 AGCTGATCAACACCCCTGGCCGCTCAGACCAAGCTGATCGCTTTTAATGCCGCCTTGGAAGCTTCAAGCGCAGGGG
 AATCGGGCCGCGCTTTTCGGTTGTCGCCAGTGAGATACGCCGCTTGGCTGACAGCGTGACCGACTCAACCCAG
 AGATTGAAGCGCATACCGATGATATTAGAGCGGCAGTAAATCGCTTGGTGGTGGCCTTGAAAAAGTGCCTCCT
 CAATCGAGCAGGGCGTTGAGGCAAGCATGAGTACCGCCAGGATCTGGAGGCGCTGCTCAAGGCAGCGAGTCAAAA
 CCAGCAGCGCGGCCAGCAGATATCGCTCTCCACACAGCAGCAAAAAACCGCCAGCAGCCAGGTGGTGATGGCCC
 TACGCGATATCGATACGGCCAGTTCTCGCAACGCACACTCAGTGCAGCAGTATTACCGATATTAGCCAGGACATGA
 TCCATATGTCGGCTGAGCTTAAACGCGCTGGTGCAGGAGTTACCCTAACAAAATAAAAAATCGCTGATAGGATAACC
 GGATGAGTGTAAATTCGGGTAGTCATTGCCGACGACAGCCAAAGTAGCCCGGACGCTGCTACGCGATATCCTCAGCC
 GGGACGATGATATTGAGATCGTGGGGGAAGCCACTAATGGTCGGAAGCGGTGGAAGTGGCCAAAGCGCTTGGCG
 CGCAGCTGATCACCATGGATCTCAACATGCCGGTGTGACGCGCTTGTCCGCGATCGAAGAGATCATGTACAGCA
 AAGGAGTGCCATTCTGGTAGTCAGCGACCGCTCCGATGCGCAAACGGCTTATCAAGCCCTTGAGGTAGGCGCGT
 TGGAGGTCATGCCTAAACCCACTCTGGAAGGAGCCGATGCCGAACGCTTGTGGAGCGTGTACGCCCTGCTTTCCG
 GCGTGGCAGTCATCACTCGTCTACGTCGACGCGGCTTAGCACCTCCCCCACTCCTCCAATAGCGACGTTTACTG
 TAACGCCACGGGGGGTGGCCGTAACCTCCAGCACGTGGTTCGCGATCGCCTGCTCAACCGGTGGCCCGCAAGCCT
 TAGTGGCGGTGCTGCGGAGGCTACCCAGCGGGTTTCCAGCCCCATTGTGATCGCCAGCACATCAGTCATGGAT
 TTATTGATGGCATGGCGCAATGGCTGGCATCCCTTTGACTATGCCGGTAGCGTGGGCCAAGAGGGCGAAGCGC
 TACGCCCTGGGCATATTTACCTATCACCTTCCGAGCGTGATTTATGCGTATCCTCCCGCCACCGCTTCCAGCTTC
 AACCCAGTCTGAATGCTCCCTGTACCACCCAGTTGCGATGTGCTGCTGCAAAGTGTGCGGGCGGTCTACGGCA
 GCGATGCGATTGGTATTTATTTGACCGGCATGGCCGCGATGGAGTGAATGGCATGCGAGCGATACATCGCGCAG
 CGGAACCACTTTCCGCGAAGATGAAGCCAGCTCGGTGATTTATGGCATGAATCAGGAAGCCGCTCAAAGCGGCG
 TCATACAGTATGAATTACCGCTCGATAGCCTTCCGGATCGACTGCTACGCGATGTCCATGGCTGCATGGATAGCC
 GACCGGAGCCTCTGGCATGAGTGGCGTTTTGCTCCCTTCAAAGCTCTGGTGCATCAACGCTGCGGTTTTACACCTAGA
 TGGCTTGGCCGAAGCCCGCTATTCCGAGCAGTAGCCAGCTTACAGGCCTCCACGGGGCTAACCGACATCACTCA
 GCTCCTCAAGCAATTAAGCTGTGACACGGCGCTATTTCGATCAATTTGTCAGCCAGTTAACGGTCAACGAAACCTA
 TTTTTTTCGGAACCTGACGCCCTGGACTGGCTGGTCAACACCTATTTACCGCAACGCCTAACGACAGAGCAGCC
 GCCGCTCTCTATCTTACGCGCGGGCTGCTCTTCCGGTGAAGGACCCATAGCGTAGCGATGATGCTGTTTTGAGCG
 CTTTGGCGAGCGGGCCAAAGCGCTGTTTACTCTTACCGCGGCGACCTGGATCACCAGTTTCTCGCAAGGCACG
 CCAGGCCGTTTATGGCGGTATGGCGTTTTCGCGCCCTCTCCCCCGCTTCAAAAAGCGTTACTTACGCCCCACAA
 GGGGCGTTACAAGCTTACGAACCGCTGCGCCAATGGGTAACTTTTCGGCCGTTTAACTGTTAAACGCCAACGA
 AGACAGCCCCGTGCGCCCTTTGATGTAATTTCTGTTTCGCAATGTCTCGATCTACTTTGACCAGCAGACGCGGCG
 CCATATCCATCAGCAACTTAGCCAGTTGCTGGCCCCAATGGCATTTTACTCTGCGGCGTACCCGAAACCTGGG
 TAACGATCTCGGCGTGTGTTGAATTGACCGAAGCTCAGGGCGTATTTTACTTTTCGCCATGCAGAGCAACCCGCGAT
 AGTGCCAGAGACGCCCTTACGCCCTCATTACTTGCAGTGGACAACATGGCTGAAGACAGTATTACTGAAGACAG
 TCTTAGCGTTGCTGAGAGCGCAAATAAACAGCTAGCGTTAGACAACACTGCACTGACGTGGCACCACAGGCGCCACG
 TCAGCATGCAACGAAAAAGAGCCAACGGACAGCATTAGCCACCAACTGCACACCGCCATCGGTTGCTCAACCA
 AAATGCGTTTACGACGCGCTACGCTGCTTGGCGGCTGCTTGGAGCAACAGCCGTTGGTGCATCGATGCGCTGGT
 CTGGCGGGTTGGTGCGCCGCTGGCAGCAGCGCCAGCTCGCTTACGAGCATTTTAAAGCGGGCAATTTACGT
 CGCCCCGAGTGTGGCCGCGCCATTTCTACTTAGCTGAACTTTATCGCCAAGGCGAAGCTGGCCGATAAGCCATT
 ACAGCGCAAGCAGCGCTATGCTGCGGTGGTTTCGTTTGTGACCACTGCGCCACCTCTGATGGAGGGCTAGACAC
 CATACCCACCCTACCAGGCGATGCGCGCTTTCTAGCCGAACGTTATTTAGACGCGGTTAACCTAACACT
 GGCATCAACAGTACCACCCAGGGAGTGGGTTAAATATGGCGCTGGATATTCGCCGCTTTATACAACGATTTGTG
 GAAGAGGCGAGCCGACCACCTGCCCCGCTTACGAGAAGGAATTAGCGCACTGGAGCAGGGCCATGCTGATCGCGAA
 CAGATCAACGACCTGTTCCGCGCAGCGCATAACGCTGAAAGGCTCGTTCGGAATGCTTAAACTGGTGCCGATCAG
 GCGCTGGCACATAGCACTGAAGAACTGCTCAGCGCTCTGCGGACGGCACCCCTAACCGCAACGCCGAAGGTGACC
 AGCCTACTCAGCCAGGCGGTGGACGGTCTTTCTGACTTAGTCAGTCGACTCGCCGAAGGAGCGACAGGTAACGAC
 CTACCCGCGGCTGATGAGGCGCTATGTAGCGCCCTGGAAGCGGCTGCCCTCGGTGAGGCCACCCCGCCATT
 ACTCCCGCTGAGGCGGCGCCATCCTCTGTGCTGCGCTACCGTCCCTCAACACCGCCTTCTCCGCTGCGCTG
 GTGGCGGAGAGCGAACTGCGGCTCAGCGATACTGTGCGGGTTCGCTTGGATCGACTGGACGATGTTATTGTTTTG
 ATGGGCGAAGTACTTTCCGGCCATCATCATTTACATAACCTGGTTGACCAAGCCGTGAGCTAAGCATCACACCT
 CCTGCCGAACAGCAGGGGCTTTTTCACGCTTTACCGTGAGCTGAAAAGATAGCGTGTAAAGCCACGATTCGCTG
 ATGAGCGACCTACACGACCGCGCACTGCAAATGCGCATGCTGCCGCTAAGCGTGGTGTGTTGATCCACTCGCGCAT
 ATGTCCCGGAATTGGCCAGTCACTCGGCAACAGGTCGACTGCCGGGTGCGAGGCAGCGAAAATCGAACTTGAT
 CGCCAGATGATTGATCGCCTGTGCGATCCGCTTATTACCTGCTGCGCAATGCCTTGGATCACGGCTTAGAGCTG
 CCTGCCGAGCGCCAGGTAGCGGGTAAACCTCCCCGTGGCAGTTGATTATCGAAGCCTGGCAGGATGCTGGCTGG

GTGGTGGTAGAGATGCGTGACGACGGCGCGGGTATTTTCGCTTGAAGCGGTACGTCAAAAAGCGCTCGCCAAGCAG
TTGGTGAGCGAAGAGCAGCTCCATGCACTGAGCGAACAGGAAACGCTAGAGCTTATATTCCTGCCGGGCTTCTCT
ACCAAGAGCATGATTACCGACTTTTTCTGGCCGCGGTGTGGGCATGGATGTGGTCAAGCGCACCGTGGTGGATGAG
CTTAACGGCGACCTGCAGCTTGCCAGCGAACCGGTAACGGCACCCGCTTTACTCTGCGCCTGCCACTCTCGTTG
GCGATGATGCGGGTACTGCTGGTCAGCGTGGCGGGCTCAACCTAGGGGTAACGGCGCCTTACGTATCAGAGTTG
GTAGAGTGCTCATCACAATCATTTTATTGATGCTGCGGGTACGCGCACGCTGATTTTACGCAATGAATTTGTGCCG
GTGGTATCGCTAGCCCAACTGCTTGAGCTACCAGAGACGGAGTCCGGTACTGATACCACCTACTGCTGGTCGTC
CACCAGCGGCACCGAAGCTTGCTCTGATTATTGACTCCCTGATTGATGAACGCGATATGATCATCAAGCCACTG
CCCGTACATCTGCGTTATTTACCCTGGTCTCGGGCATGGTTTCCATGGGACGCAATGCGCTGGTAAGCCTACTC
CACGTACCCGCTTTACTGGAAGTACCCGACACAGTGCCAACGCTAACGAAGAGCGTGCATCCTCCGCTCTC
GCGAAACGCATTTTGGTGGTCGACGACTCACTGAATACCCGCGAAAATAGAGAAAAGATGTACTCGAAGCGTGGGGC
TACCACGTTACCCTGGCCGAAAATGGTCGCGACGGATTAGCCAAAGCACTGGCAGAGCCGTTTGATGCCGTACTT
ACCGATGTTGAAATGCCGGTAATGGATGGCTTTGCGCTGACTGCCCGACTGCGCGAAAATGAGGTTTATCGTTAT
CGGCCAATTATTATTATCACCTCGCGGGAAAAGGAGGCTGATCGCGACGCGGTATTGAAAGTGGTGTGACGCT
TATATCGTCAAAGGTAGCTTTGACCAAAAACAATTTAGTTGAGACACTCCAGGCCCTACTGGGTTAAATCACGAGTG
ATACTGACACGACGGTTAATGACATAGCCATTAAAGACACAACCTACCATGAGGTCATGGAATGCCTATCCTGGTC
GTAGACGACGATCCGCTTGCCGGGGAAAATGACGGCGGCACTGCTTGAGCATCAGGGCCATGAGACGCTGCTGGCC
ATTGACGCGATGGAAGCCGTTGAGCAGCTAGATAATCGCAGCGATATCAAGCTGATTATCAGCGATATGCACATG
CCCCTCATCAGTGGGGTAGCACTGCTGGCGATGCTGCGCGAGCAGGCTAATCACCTACCGTTTATTTTACTCACC
GGAGACACGCCGGACATAACGCTTCAGCAAACACCAGGCTGGATGCCTGTTTTCGTAAGATGCCGAGCTGGCA
TCCAACCTGGAAGCCGCGAGTAAAACAGGCGCTTGATGAGTAAACCATCGCTAGAGGGAATGGATCACTGATGGAAT
GGATCGCCGCTTTTCGTTCACTTACGTAGGTAGTTGATGCTAAAGCCCGCCCTTCGCTGCACGATAAGCTGAAC
CAGCTGCGTGAGCGTTTTATTGAGCAGCTTCCGTCCCGCTTAGCGCAAACCGCCGAGCTGTGGCAGCAGAGTCGC
ACGACGAGCGAAGAACAGGCGCGACTCGCGCCAGAGCTGCACCGTTTTCTTCATAGTTTGAAGGAACCGGGAGG
TCGCTGGGATTTGAGCGGCTTGCCAGCTGGCGGATCAGGCGCAGGAGGCGCTCACTACCTCTCCCGCCCGCC
GATATCGATACGTTTTATCAGTCAATTGCTTCTCTGATGGTACGAGCAGCAGCACCTGCGCTCCACAGGTT
CAACAGCAAGCGCTGGCGCCGTAACAGCTTCGAGCTTCCAGCTTCCAGCGGTTGAGCCATCGCAATAAGCGCCAG
CGGTTAATTTATCTGTGCGACGATGAGCCCGAGCAGGTGATCAATTAATCCATCACCTACGCTGCTTTGGTAC
GAAGTCGTTTCACTTTATCGATACAGACACATTTCTTTAACGCTGTGCTCACTCGTCCGCTGACGCGGTATCATG
GATGTGCAGTTCCCCAAGGCCAGACGGCAGGCACTGAAAACCTGACCAGCTTGAACAAGCTGACAGGCCAACCG
CTTCTGCCATCGTTTTTGTGGCCACAGCGACTTTTATTGCGCCTGAGTGCCGTTTCGTGCAGGCTGCGGCGGC
TACTTTACCAAACCGGTAAAACCGCTGGATCTGATGCTGGCAGTGGATGAACTGACCCTCCGGCGGCAGAAAG
CCACTCAAGGTGCTAGTGGTGGATGATGAGCCGAAGCAGCCGCTTACCACGCTCTGTTGCTTGAAGAGAGCGGA
ATGCTGACTCATCAGGTTACCATCCCGCCGATGCGCTCACGGTAATGGAGCGCTTTAGCCCGATTTACTGTTG
GTCGATGTGTATATGCCGGTGTGTTCTGGGGAAGAGCTGGCATCGATTATTCGCCAGCAGCCGGAACACCTGGGT
CTACCGATTATCTATCTCTCCAGTGAAACCGACAGCCAAAAGCAGATATCCGCTATGCTGCGGGGGTTGAAGCC
TTTCTACCAAACCCGTTAGCCCGAAGAGCTGGTCTCTGCCGTGCAACTGCGCGCCGAACGCTGCGTCTGCTG
CGCTCATTAATGACCCGCGACAGCATGACCGGGCTGTATAACCACAGCACCACCCTGAACTGATCAATAAAAAC
CTCGCTCAGGCGCACCGTGATAATAGCCAGCAGCCATGGCGATGATCGACATTGATCACTTCAAGCACGTCAAC
GACACCCACGGTCATTTGGCGGGTGACCAGGTCATTATCACCTGGCAAGACTATTAAGAGTGCCTGCGTCTC
TCCGATATTATCGGCCGCTACGGCGGAGAAGAGTTTGTGTGCTGCTAAAGGGCATTAAATGCCGAGAAAGCCGCC
ACATTGATCGATAGCCTGCGCGAGGATTTTGCCTGATTGATTTTACACCGGTGAGGTTGCTTTTCGCTGCACC
TTCAGTGAGGATAGCAGCTTCCCGCACAACTTCTACCGAGCCGCTGCGTTTAAAGCGCCACCAAGCGCTC
TACCAGCGCAAACACCAAGTTCGCAATCAGGTAGTGATATCCCGGAGCTGGCCGATGACCGCTGAATTTCCCGG
CAACGGCGAGGCAAATGACCAGCCCGCCGCTACCCAAACCCCTTGACGAGGCATTAGCAGCACACGGCGATGCTGA
GGCGGTGGTAGATATTGATGAGCCTACCCAAACAGCTAGTGCTCTTCCGGCTCAACGGCCAGCCTTTTGCCTACC
CGGCAGCGCGGTGAGTGAAATTTCTATCCAGCGACCAACCCGCTTATTACGTGCCGGGACTGCCTTCCCTTACCGA
AGGTGTGCTGCACCTGCGGGGCACAATCGAGTCCGTCATTAGCCTGCATCGACTACTCGGTTTACCTGCACCGGA
AGGTAACAGTAAGGGGATGATTCTGTTAGTGAGCGCGGAGGATTACTAGCGGTGTGCGTATTGAACAGCTTGA
TGATGTGTGCGAGGTCCTCAAAGTATGCTGCAAGCGCCGAGAGACGCTTTCCGGCACGTTGCGCCCTTATGT
CAGCGCGCTATGGCAGATAGATGAGCAAGAAGCGCTTGCCTGCTTGACCCAGAGGCGCTCTTCGACGCCTACCA
GCAGGGGCTCGGTTAAAGTGCCTTGCATCGCGGCCATCATGAACAGGCCAGGTTGCCTTGGTGTGTTTTGCG
TAGGGCCTTACCCTACCGCTTGGAAAGCGCGCCATGTGCTGGCCATGACCATCACCCACGGCACCGCGCACTG
CCAATGCTCAAACGTTGCTTTATGAAGGTGGTGACCATGGCTCCCCACCTAACCGCTGGCTCACCTACGCGACG
CTCAAGCAGCCAGCGACAACAACAGCACTTGGCAACTGGGCGTGAGCGGTGACATAACGCTTCAGCAACTGCCTG
CCAACACCCCTTACCCGCTGCCTAAACTGCTGCTTTCCCGCCGATTTTCCACGGCGCTATGCGGGTTAACCTTCG
TCCAGCAACAGCTAGTACTGCTACTGGATGCCCGCAAGCTTAATCCTTAGCTTTCTCAGCCCTGCTCTTAGCCA
GCCAACCACAAACAGCTAATGGCATCGCCCTCGGCTATGTGCTATTGGCCGGAATCA

Anexo II

Secuencia de las proteínas de la vía Che2 codificada en el *cluster che2* de *Halomonas titanicae* KHS3

Se presenta la secuencia de cada proteína codificada en *che2* siguiendo el mismo código de colores del Anexo I. Se marcan además los dominios predichos, y su referencia se menciona luego de cada secuencia.

>Htc10

MMARWKSPLRLRLFLSFGTVLAFAMLLALYLQARSHSQARLDNLLNQELPAQVKGLAAHINLSLSQDLAISEL
ANSYFIEQWVREGLPEERQNDIAAYLARLMEQLDTELLFIAAQHQGRGYFQLRNGEFLQRIIQPPGSEDDWYYH
FTSDNAYELNLDSDTFSPDDAFVYVNYRSTVNAANGRPVVAGAGLDLSQMASLIDDFRLGSGHASLLSAEGL
LLVRSGEAKRSDSAPTATATEALPEQASQRLQLQVHEATRDLGQEVLVSTIWLPELQRYLMVEVDKAYL
ASTHERFLESSGIGLLILLVGLLVLYPLTASLIRPLIDFQRTKDTYSLSLSREYVSTDRAPLSDLANQTRRL
EPLSEALAVAKNAQALTQVADRLAKTAGLSGVHGSIDHFEASQTMAAAVEEMASSVAEITSTMEELSTSSTQTA
DHSQSVVDVANQTLERSRKGSSAMQLLQSKMQDIRSDSEQSLTEIMTLGAKSKQINKVMELINTLAAQTKLIAFN
AALEASSAGESGRRFVSVASEIRRLADSVTDSTQEI EAHTDDIQTAINRLVVASEKGASSIEQGVEASMSTAQDL
EALLKAASQTSSAAQIISLSTQOQKTASSQVVMALRDI TASSRNAHSVRSITDISQDMIHMSAELNALVQEF TL
TNKNR

Dominios:

Gris: segmentos TM (predicho con DeepTMHMM).

Azul: HAMP (predicho con ScanProsite).

Verde: horquilla citoplasmática (predicho con ScanProsite).

>CheB2

MSVI R VVIADDSQVARDVLRDILSRDDDI EIVGEATNGREAVELAKRLAPQLITMDLNMFPVMDGLSAIEEIMYSK
GVPILVVSDRSDAQTAQALEVGALEVMFPKPTLEGADAERLLERVRLLSGVAVITRLRRRGLAPPPTPPIATFTV
TPRGVPRNFQHVVAIACSTGGPQALVRVLRRLPSGFPAPIVIAQHSI SHGFIDGMAQWLASLCTMPVSVGQEGERL
RPGHTYLSPSERDLCVSSRHRFQLQPSPECSLYHPSCDVLQSVAAVYGSDAIGIILTMGRDGVNGMRAIHRAG
GTTFAQDEASSVIYGMNQEA VKAGVIQYELPLDSLDPDRLLRDVHGCMDSRPEPLA

Dominios (predichos con ScanProsite):

Amarillo: regulador de respuesta.

Fucsia: metilesterasa tipo CheB.

>CheR2

MSAFAPFKALVHQRCGLHLDGLAEARLFRAVASLQASTGLTDITQLLKQLSCDTALFDQFVSQTLVNETYFFREP
DALDWLVTNYLPQRLTTEQPPLSIFSAGCSSGEEPYSVAMMLFERFERGERAKALFTLTGGDLHDHQLAKARQAVYG
GMAFRALSPAFKKRYFSPHKGRYKLHEPLRQWVTFRPFNLLNANEDSPVGFDFVILFRNVSIFYDQQTRRHIIHQ
LSQLLAPNGILLCGVTETLGNDLGVFELTEAQGVYFRHAEQPAIVPETPLQPSLLAMDNMAEDSITEDSLVAE
SANKQLALDNCTDVAPQAPRQHATEKEPTDSISHQLHTAHRLLNQNAFDDAATLLEALLEQQPWSIDALVLAGLV
ARWQQRPLAYEHFKRAIYVAPECWPAHFYLAELYRQEGELADKPLQRKQRYAAVVRLLTAP TSDGGLDITTPPL
PPGDARFLAERYLDAVNLT LASTSTTQGVG

Dominios:

Cian: metiltransferasa tipo CheR (predicho con ScanProsite).

Gris: región TPR (predicho con TPRpred).

>CheA2

MALDIRRFIQRFVEEAADHLPRRLREGISALEQGHADREQINDLFRAAHTLKGSSRMLKLVPIITALAHSTEELLSA
LRDGTLTATPKVTSLLSQAVDGLSDLVSRILAEGATGNDLPAADEALCSALEAAAALGQAPPPPITPAEAAPSSVPA
LPSSSTPPSSAALVAESELRLSDTVRVRLDRLDDVIRLMGEVLSGHHHLHTLVDQARELSITPPAEQQGPFHAFH
RELKDSVLSHDSLMSDLHDRALQMRMLPLSVVFDPLAHMSRELAQSLGKQVDCRVRGSEIELDRQIMIDRLSDPLI
HLLRNALDHGLELPAERQVAGKPPRGQLITEAWQDAGWVVMRDDGAGISLEAVRQKALAKQLVSEEQLHALSE
QETLELIFLPGFSTKSMITDFSGRGVGMVVKRTVVDELNGDIQLASERGNTRFTLRPLSLAMRVLLVSVGG
VNLGVTAPYVSELVECSSQSFIDAAGQRTILRNEFVPPVSLAQLLELPETESGTDITLLLVVHORHOKLALIID
SLIDERDMIKPLPVHLRYLPLVSGMVMGRNALVSLHVPALLEVTRHSAQRANEERASSALAKRILVVDDSLN
TREIEKDVLEAWGYHVTLAENGRDGLAKALAEFFDAVLTDVEMPVMDGFALTARLRENEVYRYP IIIITSREKE
ADRRRGIEVGADAYIVKGSFDQNNLVETLQAILG

Dominios (predichos con ScanProsite):

Gris: HPt (P1).

Rojo: histidín quinasa (P4).

Violeta: tipo CheW (P5).

Amarillo: regulador de respuesta.

>CheY2

MFILVDDDFLAGENTAALLHOGHETLLAIDAMEAVEQLDNRSDYKLYISDMRMPILSGVALLAMDRQANHLR
YLLLTGDTPTDITLQOTFGLDAQLRKAELASNLAAVKAALDE

Dominios (predicho con ScanProsite):

Amarillo: regulador de respuesta.

>DGC2

MSKPAPSLHDKLNQLRERFIEQLPSRLAQTAEWQQSRTTSEEQARLAPELHRFFHSLKGTGRSLGFERLAQLAD
QAQEALTTSPARADIDTFISQLLLLMGHEQQHLRSHQGOQQAALAVNSFELSSQVEPLRNKRQRLIYLCDDDEPEQ
VDQLIHHLRCFGHEVVQFIDTDTFFNAVLTRRPDAVIMDVQFPQGGTAGTETLTSLNKLGTQPLPAIVLSAHSDF
HSRLSAVRAGCGGYFTKPVKPLDMLAVDELTAAPAAEPELKVLVVDDEPEAAAYHALLLEESGMLTHQVHHPADA
LTVMERFSPDLLLVVYMPVCSGEEELASITRQOPEHLGLPIIYLSSETDSOKQISAMSAGVEAFLTKPVQPEELV
SAVQLRAERLRLRLRSLMTRDSMTGLYNHSTTTELINKNLAQAHRDN SQHAMAMIDIDHFKHVNDTHGHLAGDQVI
ITLARLLKSRLRLSDITGRYGGEEFVLLKGINAEKAATLIDSLREDFALIDFHTGEVRFRCFTFSAGISSFPAQ
STEPLRLSADQALYRAKHQGRNQVVISPELADDR

Dominios (predichos con ScanProsite):

Gris: HPt (tipo P1).

Amarillo: reguladores de respuesta.

Verde: GGDEF.

>CheW2

MTAEFPRNGEANDQPPATQTLDEALAAHGDAEAVVDIDEP TQQLVLFRLNGQPFALPGSAVSEILSSDQPVYVVP
GLPSSTEGVLHLRGTIESVISLHRLGLPAPEGNSKGMILLVSAAGITSGVRIEQLDDVCEVTQSMQLQAPPETLS
GTLRPYVSALWQIDEQEALALLDPEALFDAYQQGLG

Dominios (predicho con ScanProsite):

Violeta: tipo CheW.

>CheW3

VPLHRGHHEQAQVALVLFVCGPYRTALEARHVLAMTDHPTAPRTANAQTLLYEAGDHGSPPNRWLTLRDAQAASD
NNSTWQLGVS GDITLQQLPANTLYPLPKLLSRRFSTALCGLTFVQQQLVLLLDARKLNP

Anexo III

Datos de difracción de rayos X

Datos obtenidos a partir de cristales del dominio de unión a ligando de Htc10 (LBDHtc10) en presencia de guanina (Gua), y de cristales de LBDHtc10 marcado con selenometionina (Se-Met-LBDHtc10) junto a Gua o hipoxantina (Hip).

	Se-Met-LBDHtc10-Gua	Se-Met-LBDHtc10-Hip	LBDHtc10-Gua
Data collection			
Space group	H32	H32	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	178.54 178.54 89.38	176.21 176.21 88.71	89.35 104.50 145.61
α β γ (°)	90 90 120	90 90 120	90 90 90
Resolution range (Å)	77.38 - 3.6	88.11 - 3.5	89.35 – 2.1
<i>R</i> _{merge} (within I+/I-)	0.081 (0.532)	0.097 (0.654)	0.066 (0.892)
<i>R</i> _{merge} (all I+ and I-)	0.124 (0.836)	0.151 (0.995)	0.093 (1.310)
<i>R</i> _{pim} (within I+/I-)	0.043 (0.282)	0.054 (0.362)	0.033 (0.434)
<i>R</i> _{pim} (all I+ and I-)	0.046 (0.307)	0.059 (0.381)	0.032 (0.441)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	8.2 (1.6)	7.4 (1.4)	10.2 (1.1)
Completeness (%)	100 (100)	100 (100)	100 (100)
Multiplicity	8.1 (8.4)	7.6 (7.9)	9.4 (9.7)
Refinement			
Resolution (Å)	77.38-3.6 (3.694 - 3.6)	40.0 - 3.5 (3.59 - 3.50)	84.9 – 2.1 (2.155 – 2.1)
No. reflections	6,161 (466)	6,472 (470)	76,121 (5545)
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.23/0.25	0.27/0.31	0.20/0.25
Ligand molecules	1	1	6
Water	0	0	469
Ramachandran			
Favored (%)	97.6	97.6	97.8
Allowed (%)	2.4	1.9	2.1
Outliers (%)	0	0.5	0.1