

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA
MOL·LECULAR

SISTEMAS DE DOS COMPONENTES: BÚSQUEDA DE
INHIBIDORES, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y
NUEVOS MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN.

M^a LUISA LÓPEZ REDONDO

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 7 de juny de 2011 davant un tribunal format per:

- Dr. Emilio Fernández Reyes
- Dr. José Luis Neira Faleiro
- Dra. María Gràcia Solá i Villarrubias
- Dr. Ismael Mingarro Muñoz
- Dr. Jerónimo Bravo Sicilia

Va ser dirigida per:
Dr. Alberto Marina Moreno

©Copyright: Servei de Publicacions
M^a Luisa López Redondo

Dipòsit legal: V-483-2012
I.S.B.N.: 978-84-370-8208-0

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Arts Gràfiques, 13 baix
46010 València
Spain
Telèfon:(0034)963864115



**SISTEMAS DE DOS COMPONENTES: BÚSQUEDA DE
INHIBIDORES, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y
NUEVOS MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN**

Memoria presentada por
M^aLuisa López Redondo
Para optar al grado de doctora

Director:

Dr. Alberto Marina Moreno

Laboratorio de Cristalografía de Macromoléculas

Departamento de Genómica y Proteómica

Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC)

Valencia, 21 de Enero de 2011

A

Dr. Alberto Marina Moreno, Doctor en Biología y Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Certifica que:

Marisa López Redondo, licenciada en Bioquímica por la Universidad de Córdoba, ha realizado, bajo su dirección, el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título ***“Sistemas de dos componentes: búsqueda de inhibidores, caracterización estructural y nuevos mecanismos de señalización”***.

Revisado el trabajo, expresa su conformidad para que este sea sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, ya que considera que la presentación del mismo reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctora.

En Valencia, 21 de Enero de 2011

Fdo: Alberto Marina Moreno

Para la realización de esta Tesis, Marisa López Redondo ha disfrutado de una Beca de la Fundación Médica Mutua Madrileña Automovilística y de un contrato de Técnico Medio financiado con ayudas Prometeo de la Generalitat Valenciana.

El trabajo se ha enmarcado dentro de los proyectos “Determinación de la estructura tridimensional de complejos histidina quinasa-inhibidores como base del diseño racional de antibacterianos, antifúngicos y herbicidas”, financiado por la Fundación Médica Mutua Madrileña Automovilística y “Bases estructurales del reconocimiento en los sistemas de transducción de señal de dos componentes: mecanismo de transferencia y modulación de la señal” (BIO2005-00153) financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis, Alberto Marina Moreno, por haberme dado la oportunidad, hace ya casi 7 años, de trabajar en su laboratorio, y por encima de todo, gracias por su infinita paciencia (aunque ocasiones fuera mutua).

También agradecer a toda la gente de mi laboratorio, a los que se fueron y a los que aun siguen en él, por ayudarme, en los momentos difíciles y hacerme amenas las largas horas de trabajo. Sin todos y cada uno de ellos esta tesis no hubiera sido posible.

A toda la gente del IBV, que de una manera u otra me han ayudado para la realización de esta tesis.

A todas aquellas personas (I, M, M), las cuales siempre ocuparán un lugar especial, por haber contado con una paciencia ilimitada y por no dejarme tirar la toalla en los peores momentos.

Por último quiero dedicar esta Tesis a mi familia, en especial a mis padres y hermana, ya que sin ellos todo esto no hubiera sido posible. Gracias por su apoyo incondicional, por creer en mí desde el principio y por el gran amor que cada día me han demostrado y demuestran, os quiero un montón. Para terminar una última dedicatoria a unas personitas (C, Z, M, R, M, H, F, R) por las que tuve y/o tengo un amor incondicional.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. SISTEMAS DE DOS COMPONENTES.....	3
1.1.1. Características generales de la señalización en bacterias	3
1.1.2. Sistemas reguladores de dos componentes.....	6
1.1.2.1. Histidina quinasa.....	7
1.1.2.2.-Reguladores de la respuesta.....	13
1.1.3. Algo más que dos componentes	16
1.1.4. Mecanismo enzimático de los sistemas de dos componentes	17
1.1.5. Distribución de los Sistemas de dos componentes.....	18
1.2. SISTEMAS DE DOS COMPONENTES EN CIANOBACTERIAS.....	19
1.2.1. TCS y fotosíntesis en cianobacterias.....	20
1.2.1.1. NblS: la HK clave en la respuesta a estrés en cianobacterias.....	22
1.2.1.2. SipA una proteína conectora en el proceso de aclimatación al estrés en cianobacterias.....	23
1.2.1.3. ¿Quién es el RR pareja de NblS?	24
1.3. HISTIDINAS KINASAS COMO DIANAS PARA NUEVOS AGENTES ANTIMICROBIANOS	25
1.3.1. Factores de virulencia en los procesos de patogenicidad	25
1.3.2. Sistemas de dos componentes: nuevas dianas terapéuticas	27
1.3.3. Diseño dirigido de inhibidores para TCS	30
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	39
3.1.1. Clonado de genes.....	39

ÍNDICE GENERAL

3.2. MÉTODOS GENERALES PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS.....	41
3.2.1. Técnicas cromatográficas para la purificación de proteínas..	41
3.2.2. Técnicas Electroforéticas	41
3.2.3. Métodos para la cuantificación de proteínas	43
3.3. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	43
3.3.1. Expresión de proteínas	43
3.3.1.1. Expresión de SrrB ^{CP} , CheA ³⁵⁴⁻⁵⁴⁰ y SipA ^{FL}	43
3.3.1.2. Expresión de NblS.....	44
3.3.1.3. Expresión de NblR, RpaB, RpaA y SrrA	44
3.3.2- Purificación de proteínas.....	45
3.3.2.1. Lisado celular	45
3.3.2.2. 1 ^a Columna de afinidad.....	45
3.3.2.3. 2 ^a Columna de afinidad.....	46
3.3.2.4. Columna de Exclusión Molecular.....	46
3.3.2.5. Cambio de buffer y conservación	46
3.3.2.6. Purificación de NblS	47
3.4. BUSQUEDA <i>IN SILICO</i> DE INHIBIDORES DE HKs	47
3.4.1. Preparación de los modelos estructurales de las proteínas para el cálculo.....	48
3.4.2. Preparación de los sustratos para los cálculos.....	48
3.4.3. Análisis por acoplamiento	50
3.5. ENSAYOS DE FOSFORILACION Y FOSFOTRANSFERENCIA UTILIZANDO (γ-³²P) ATP	50
3.5.1. Cálculo del IC ₅₀	51
3.5.2. Ensayos de autofosforilación de NblS	51

3.5.3. Ensayos de fosfotransferencia para la identificación del RR que actúa con NblS.....	52
3.6. FOSFORILACION CON ACETIL-FOSFATO	52
3.6.1. Ensayos no radiactivos.....	52
3.6.1.1. Geles nativos.....	53
3.6.1.2. Geles bidimensionales.....	53
3.6.1.3. Cromatografía de exclusión molecular	54
3.6.2. Ensayos radiactivos.....	54
3.6.2.1 Síntesis de acetil-fosfato marcado radiactivamente:	54
3.6.2.2. Estabilidad de la fosforilación en los RR RpaB y SrrA...	55
3.6.2.3. Actividad fosfatasa.....	55
3.7. ENSAYOS DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA	56
3.8. MODELADO Y ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL	56
3.8.1. Modelado de la estructura tridimensional de NblR	56
3.8.2. Modelado de la estructura tridimensional de SipA.....	57
3.8.3. Superposición de estructuras y alineamientos estructurales	57
3.9. ENSAYOS DE CRISTALIZACION	57
3.10. RECOGIDA DE DATOS DE DIFRACCION, PROCESADO Y TRAZADO DE ESTRUCTURAS	58
3.10.1. Criopreservación de cristales.....	58
3.10.2. Recogida de datos de difracción	58
3.10.3. Procesado de datos y trazado de estructuras	59
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
4.1. ESTRUCTURA DE LA PORCIÓN CITOPLASMÁTICA DE LA HISTIDINA QUINASA SrrB.....	63
4.1.1. Clonación, expresión y purificación.....	65

ÍNDICE GENERAL

4.1.2. Ensayos de cristalización.....	66
4.1.3. Difracción de cristales de SrrB ^{CP}	67
4.1.4. Cálculo de fases y trazado de la estructura.....	71
4.1.5. Descripción de la estructura	73
4.1.6. Asociación dimérica de los dominios	76
4.1.7. Unión del nucleótido en el dominio CA	78
4.1.8. Análisis estructural de las porciones catalíticas de HKs	81
4.1.8.1. Comparación de las estructuras de SrrB ^{CP} y HK853 ^{CP} ..	83
4.1.8.2. Diferentes interacciones entre el dominio CA y DHp en las HKs	87
4.1.8.3. Cambios en la orientación del DHp en las HKs	91
4.1.8.4. Modelo del Mecanismo de transducción de la señal	92
4.2. TCS EN CIANOBACTERIAS	94
4.2.1. Clonación y purificación de NblS de <i>S. elongatus</i>	95
4.2.2. SipA un nuevo conector en los TCS de cianobacterias, que proporciona un vínculo entre las vías NblS-NblR.....	102
4.2.2.1. “The regulatory factor SipA provides a link between NblS and NblR signal transduction pathways in the cyanobacterium <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942”	107
4.2.3. NblR, un RR atípico en cianobacterias.....	121
4.2.3.1. “Phosphorylation-independent activation of the atypical response regulator NblR”	126
4.2.4. La proteína conectora SipA presenta un plegamiento SH3. 141	
4.2.4.1. “The regulatory factor SipA is a highly stable b-II class protein with a SH3 fold”	145

4.2.5. Nuevos TCS en la regulación de la respuesta al estrés en cianobacterias.	151
4.2.5.1. “Environmental control of phosphorylation pathways in a branched two-component system”	157
4.2.6. Papel de SipA en en las reacciones catalizadas por NblS	194
4.2.6.1. Actividad de autofosforilación de NblS.....	194
4.2.6.2. SipA no afecta a la actividad de fosfotransferencia de NblS	197
4.2.6.3. Evaluación de la defosforilación de RpaB y SrrA en presencia de SipA	199
4.2.6.4. SipA no influye en la preferencia de NblS por fosfotransferir a sus RRs diana.	201
4.3. BUSQUEDA DE INHIBIDORES DE HISTIDINA QUINASAS	206
4.3.1. Acoplamiento de compuestos pequeños	206
4.3.2. Análisis <i>in vitro</i> de los compuestos candidatos	214
4.3.3. Cristalización, difracción y resolución	220
5. CONCLUSIONES.....	229
6. BIBLIOGRAFÍA	233

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquematación del mecanismo de transducción de señal por TCS en bacterias.....	4
Figura 2. Esquema básico de la transducción de señal en los sistemas reguladores de dos componentes.	7
Figura 3. Estructura del dominio DHp de las HKs EnvZ y HK853.	8
Figura 4. Estructura tridimensional del dominio CA de la HK PhoQ y características estructurales del dominio de unión a ATP (CA) en una HK ortodoxa.	10
Figura 5. Estructura tridimensional de los dominios PAS y HAMP.....	12
Figura 6-. Características estructurales del dominio REC de los RR ejemplarizado por la estructura tridimensional de CheY.....	15
Figura 7. Esquema de interacción entre los principales actores del proceso de clorosis.....	21
Figura 8. Estructura de los dominios de unión del nucleótido de representantes de la familia GHL.	29
Figura 9. Alineamiento estructural del dominio DHp de la HK SrrB y HK853.	64
Figura 10. Esquema de la organización de dominios en la HK SrrB.....	64
Figura 11-. Cristales de SrrB ^{CP}	67
Figura 12.Estructura de la porción catalítica de SrrB.	75
Figura 13. Detalle del centro activo de SrrB ^{CP}	76
Figura 14. Interacciones entre los dominios DHp involucrados en la dimerización.....	77
Figura 15. Detalle de los lazos conectores entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$	78
Figura 16. Colocación del nucleótido de ADP en el centro activo de SrrB por superposición con la estructura de CheA-ADP.....	79
Figura 17. Distancia del AMPPCP a la Histidina fosforilable.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 18. Superposición de SrrB ^{CP} , DesK y HK853.....	82
Figura 19. Movimiento de cierre analizado mediante el programa Dyndom.....	84
Figura 20. Representación de los movimientos de rotación del dominio CA respecto al dominio DHp.....	86
Figura 21. Alineamiento estructural del dominio catalítico de SrrB ^{CP} y HK853 ^{CP}	88
Figura 22. Interacciones entre el dominio DHp y el dominio CA.....	89
Figura 23. Formación de nuevos contactos.....	91
Figura 24. Comparación de los movimientos de las hélices, representadas como cilindros, que componen los dominios DHp de las tres estructuras superpuestas.	92
Figura 25. Esquema propuesto del mecanismo de transducción de la señal en sistemas de dos componentes.	93
Figura 26-. Esquema de los dominios de NblS y construcciones utilizadas en los estudios.	96
Figura 27. Purificación de diferentes formas de NblS recombinante.	97
Figura 28. Purificación de SipA en pPROEx.....	99
Figura 29. Purificación del complejo formado por NblS ²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ y SipA. .	100
Figura 30. Cristalización de NblS ²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ +SipA.	101
Figura 31. Autofosforilación de NblS en complejo con SipA.....	195
Figura 32. Efecto de SipA en las reacciones de fosfotransferencia de NblS hacia sus RR diana.	198
Figura 33. Efecto de SipA en la actividad fosfatasa de NblS.....	200

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 34. Efecto de SipA en la preferencia de NblS hacia SrrA frente a RpaB.	202
Figura 35. Actividad fosfatasa de NblS.	204
Figura 36. Estructuras del dominio aceptor de las HKs sometidas a estudio.	209
Figura 37. Estructura química de los compuestos seleccionados por acoplamiento.	211
Figura 38. Ejemplo de las mejores soluciones de acoplamiento	213
Figura 39. Estructuras de los mejores compuestos de docking.	214
Figura 40. Ensayo representativo del efecto del DMSO en la actividad de diferentes HKs.	215
Figura 41. Valores de IC ₅₀	216
Figura 42-. Compuestos elegidos a partir de los resultados derivados del acoplamiento.	218
Figura 43. Fotografía de los cristales de CheA y HK853 ^{CP}	221
Figura 44. Tabla que muestra los cristales obtenidos por las diferentes técnicas así como las proteínas donde se obtuvieron.	222
Figura 45. Detalle del mapa de densidad obtenido por ArpWarp para CheA.	223
Figura 46. Detalle del centro activo de la HK CheA.	224
Figura 47. Detalle del bolsillo hidrofóbico de la histidina quinasa CheA en complejo con el ligando NCS_53339 y con la molécula de ADP.	226
Figura 48. A) Estructura del compuesto 6-amino-9-(tetrahydro-2-furil)-9H-purina, B) estructura de la molécula de ATP.	227

Tabla 1. Tabla de cebadores y plásmidos utilizados.....	40
Tabla 2. Tampones utilizados.....	42
Tabla 3. Parámetros de Autodock para el acoplamiento	49
Tabla 4. Datos correspondientes a la difracción anómala MAD y nativa.....	70
Tabla 5. Datos cristalográficos y del refinamiento de SrrB ^{CP}	72
Tabla 6. Constantes cinéticas de NblS en presencia y ausencia de SipA.....	196
Tabla 7. Resultado del Autodock 3.0	212
Tabla 8. Datos de difracción, cristalográficos y del refinamiento del complejo CheA_53339.....	225

CA:	Dominio de unión a ATP (<i>Catalitic <u>A</u>tp-binding</i>)
CP:	Porción catalítica
DHp:	Dominio de dimerización (<i>Dimerization <u>H</u>istsidine <u>p</u>hosphotransfer</i>)
FL:	Completa (<i>F<u>u</u>ll <u>L</u>ength</i>)
HAMP:	<i>H<u>i</u>stidine kinases, <u>A</u>denylyl cyclases, <u>M</u>ethyl-accepting chemotaxis proteins, and <u>P</u>hosphatases</i>
HK:	Histidina quinasa (<i>H<u>i</u>stidine <u>K</u>inase</i>)
RR:	Regulador de la Respuesta (<i>R<u>e</u>sponse <u>R</u>egulator</i>)
RD:	Dominio aceptor del RR (<i>R<u>e</u>civer <u>D</u>omain</i>)
Nativo-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas
ORF:	Pauta abierta de lectura (<i>O<u>p</u>en <u>R</u>ead<u>ing</u> <u>F</u>rame</i>)
PAS:	<i>P<u>e</u>r-<u>A</u>RN<u>T</u>-<u>S</u>im</i>
PDB:	Banco de datos de proteínas (<i>P<u>r</u>otein <u>D</u>ata <u>B</u>ank</i>)
TCS:	Sistema de dos componentes (<i>T<u>w</u>o <u>C</u>omponents <u>S</u>ystem</i>)
TM:	Regiones transmembrana
HPt:	<i>H<u>i</u>s-containing <u>P</u>hospho<u>t</u>ransfer</i>
PBS:	Ficobilisomas
<i>nbl</i> :	<i>n<u>o</u>n-<u>b</u>leaching</i>
GHL:	<i>G<u>y</u>rB, <u>H</u>sp90, <u>M</u>ut<u>L</u></i>
FPLC:	<i>F<u>a</u>st <u>P</u>erformance <u>L</u>iquid <u>C</u>hromatography</i>
SDS-PAGE:	Electroforesis desnaturalizante
IPTG:	Isopropil-β-tiogalactopiranosido
SeMet:	Selenio <u>M</u> etiotina
AcP:	Acetil fosfato
[³² P]-AcP:	Acetil fosfato cuyo átomo de fosfato presenta el isótopo ³²
RMSD	Desviación cuadrática media (<i>R<u>o</u>ot <u>M</u>ean <u>S</u>quare <u>D</u>eviation</i>)

ABREVIATURAS

dCTP	Deoxicitidina trifosfato
dGTP	Deoxiguanosina trifosfato
PCR	<i><u>P</u>olymerase <u>C</u>hain <u>R</u>eaction</i>
ATP	Adenosina trifosfato
MAD	<i><u>M</u>ulti-wavelength <u>A</u>nomalous <u>D</u>ispersion</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SISTEMAS DE DOS COMPONENTES

1.1.1. Características generales de la señalización en bacterias

Las bacterias, como todos los seres vivos, se enfrentan a cambios notables en las condiciones de vida existentes en el entorno que les rodea. Por ello, disponen de numerosos sistemas de señalización esenciales para ser capaces de generar diversas respuestas adaptativas frente a estímulos ambientales específicos. La abundancia de estos sistemas de señalización en procariontes ha sido subestimada durante mucho tiempo debido a que las bacterias disponen de un conjunto distintivo de componentes de señalización diferente del empleado por los eucariotes (Gao *et al.*, 2007).

El análisis de los genomas microbianos indica que los microorganismos sometidos a condiciones variables en su entorno, presentan sistemas de señalización mucho más diversos y complejos que aquellos cuyo entorno es estable. Igualmente, los microorganismos que poseen formas de vida adaptativas a diferentes ambientes tienen un número considerable de rutas sensoras, como ocurre en muchas bacterias patógenas facultativas. Sin embargo, aquellos que viven adaptados a un nicho estable, como les sucede a los microorganismos patógenos intracelulares obligados, con frecuencia contienen sistemas de señalización escasos y bastante primitivos (Konstantinidis & Tiedje, 2004, Galperin, 2006). Por todo ello, el recuento del número total de componentes de señalización en una especie bacteriana respecto al tamaño de su genoma, permite valorar el potencial adaptativo de este organismo al ambiente (Galperin, 2006). Las bacterias con un índice de

INTRODUCCIÓN

adaptación más elevada corresponden, en todos los casos, a bacterias propias de medios edáficos o acuáticos, con formas de vida muy versátiles capaces de emplear sustratos muy diversos y con una movilidad muy activa. En ocasiones, la complejidad de las redes de señalización varía ampliamente entre organismos muy próximos evolutivamente, debido a la adquisición o pérdida de genes a lo largo de la evolución durante la adaptación de la bacteria a un nicho ecológico específico.

Los mecanismos de transducción de señales en bacterias son muy diversos, oscilando desde sistemas reguladores formados por una única proteína, hasta cascadas de señalización integradas por múltiples proteínas. Sin embargo, las rutas más comunes en procariotas son los sistemas reguladores de dos componentes (TCS), que constan de dos proteínas de señalización conservadas, una histidina quinasa (HK) y su correspondiente regulador de la respuesta (RR), relacionados entre sí mediante fosfotransferencia (Figura 1) (Hoch, 2000, Stock *et al.*, 2000, Kim & Forst, 2001, West & Stock, 2001, Gao & Stock, 2009).

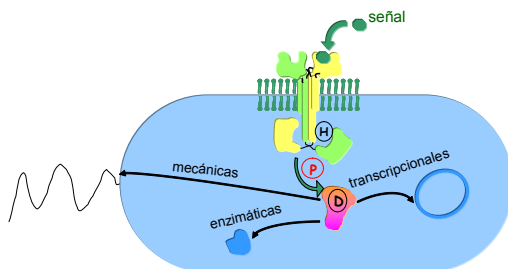


Figura 1. Esquemización del mecanismo de transducción de señal por TCS en bacterias. La llegada de una señal al dominio sensor provoca la autofosforilación de la HK y la posterior transferencia del fosforilo al RR, el cual controla diversos procesos que pueden variar desde la activación o represión de la transcripción de genes hasta diversas actividades enzimáticas.

Para distinguir estos sistemas, en los que la función sensora y la efectora reside en dos polipéptidos diferentes, de aquellos en los que ambas funciones residían en la misma proteína, se uso la expresión “dos componentes” en el título del primer artículo que describía estos sistemas (Nixon *et al.*, 1986). El hecho de situar la región sensora y efectora en proteínas diferentes implica la necesidad de transmitir la señal entre ambas, que en estos sistemas se realiza mediante fosfotransferencia. Las proteínas de señalización propias de estas rutas de transducción de señales son modulares, combinando motivos de fosfotransferencia, altamente conservados que aseguran la transducción de la señal, con una amplia variedad de dominios sensores y efectores que aseguran la respuesta a múltiples estímulos mediante diferentes procesos (Hellingwerf, 2005).

A través de estas rutas de señalización las bacterias detectan las condiciones del medio que les rodea pero, además, también son capaces de sentir las condiciones existentes en el interior celular (Galperin, 2004). De hecho, una porción considerable de las proteínas de señalización situadas en el citoplasma junto con algunas ancladas a la membrana, corresponden a sensores intracelulares (Mascher *et al.*, 2006). Aunque, la mayoría de los componentes de señalización identificados en bacterias (en torno al 60%) corresponden a proteínas receptoras integradas en la membrana, que actúan predominantemente como sensores frente al ambiente externo (Galperin, 2005).

1.1.2. Sistemas reguladores de dos componentes

Las rutas de señalización, formadas por una HK junto con su correspondiente RR, generan respuestas adaptativas de forma rápida y sencilla mediante un proceso que normalmente implica un único evento de fosfotransferencia entre ambas proteínas. Estas rutas se emplean para la regulación de una amplia variedad de funciones celulares que incluyen, entre otras, el metabolismo, la movilidad por quimiotaxis, el transporte de nutrientes, la adaptación a agentes de estrés, la virulencia, la diferenciación y el desarrollo (Bekker *et al.*, 2006).

Como se aprecia en la Figura 2, la transducción de señales en un TCS típico tiene lugar una vez que el sensor, la HK homodimérica situada en la membrana, se activa en respuesta a un estímulo extracelular adecuado y se autofosforila, utilizando una molécula de ATP, en un residuo de histidina conservado. En un segundo evento, el grupo fosforilo es transferido desde la HK hasta un residuo de aspártico conservado en el RR, en la denominada reacción de fosfotransferencia. El estado de fosforilación del RR controla la actividad de esta proteína y por tanto, determina la respuesta frente al estímulo inductor. El cese de esta señal se realiza por la pérdida del grupo fosforilo del RR, un proceso que puede ser controlado por el propio RR o inducido por la HK en la reacción llamada de defosforilación (Stock *et al.*, 2000, Hoch, 2000, Kim & Forst, 2001, West & Stock, 2001).

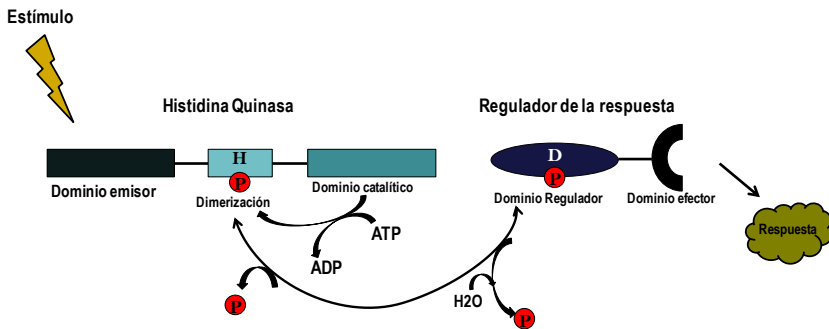


Figura 2. Esquema básico de la transducción de señal en los sistemas reguladores de dos componentes. Las flechas negras indican las reacciones de autofosforilación, fosfotransferencia y defosforilación de la HK y el RR).

1.1.2.1. Histidina quinasas

Las HKs son proteínas homodiméricas, en su mayoría de membrana, que constan de una región N-terminal sensora expuesta hacia el periplasma, junto con una región C-terminal catalítica orientada hacia el citoplasma. En las HKs, el dominio sensor presenta una secuencia variable capaz de detectar estímulos ambientales muy diversos (Mascher et al., 2006), mientras que el núcleo catalítico citoplasmático de la quinasa, esencial para la actividad de la enzima, se mantiene altamente conservado dentro de los diferentes miembros de esta familia de proteínas y está compuesto por dos dominios diferenciados denominados DHp y CA.

El dominio DHp (clasificación Pfam; PF00512) media la dimerización de la HK (Figura 3) y contiene la histidina conservada que es fosforilada. Estas dos características le han dado nombre al dominio, ya que DHp proviene de las siglas inglesas *Dimerization and Histidine*

INTRODUCCIÓN

phosphotransfer. En estos momentos solo conocemos las estructuras tridimensionales de este dominio en las HKs EnvZ (*Escherichia coli*), HK853 (*Thermotoga maritima*), DesK (*Bacillus subtilis*) y KinB (*Geobacillus stearothermophilus*) (Marina *et al.*, 2005, Tomomori *et al.*, 1999, Albanesi *et al.*, 2009, Bick *et al.*, 2009) mostrando todas ellas que este dominio se pliega como dos largas hélices antiparalelas, que son utilizadas para dimerizar, formando en el homodímero un haz de cuatro hélices. La histidina conservada se dispone en el centro de la primera de estas hélices y se proyecta hacia el exterior.

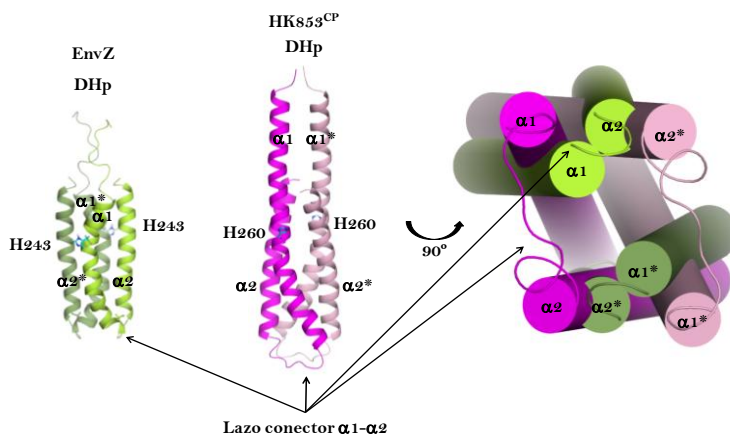


Figura 3. Estructura del dominio DHp de las HKs EnvZ y HK853.

Representación en *cartoon* y en la misma orientación de las estructuras tridimensionales del dominio DHp, de EnvZ (izquierda; PDB:1JOY) y HK0853 (centro; PDB:2C2A) formado por dos subunidades conteniendo cada una de ellas las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Para EnvZ las subunidades se muestran en dos tonalidades de verde y para de HK853 de morado. Las His fosforilables, que se proyectan desde el centro de las hélices $\alpha 1$, se representan en modelo de palos coloreadas en cian. A la derecha se muestra la superposición de ambos dominios DHp representados como cilindros y visto desde el ápice del dominio. Obsérvese la diferente conectividad entre las hélices $\alpha 1$ - $\alpha 2$.

El dominio CA (clasificación Pfam; PF02518), del inglés *Catalytic and ATP binding*, (Figura 4) como su nombre indica, es capaz de unir la molécula de ATP y transferir el grupo fosforilo a la histidina del dominio DHp. Este dominio se comporta como un monómero en solución, cuando se expresa en solitario, indicando que no interviene en la dimerización de la HK. Hay un amplio conocimiento estructural de este dominio derivado de las múltiples estructuras de él en más de 6 HKs diferentes. En todas estas estructuras, el dominio presenta un plegamiento en forma de *sandwich* α/β , con 5 cadenas β mixtas y 3 α hélices, siendo totalmente diferente al dominio de unión a ATP de las Ser/Thr/Tyr-quinasas. Por el contrario el dominio CA es muy similar al dominio de unión de ATP de la superfamilia de ATPasas GHL, entre cuyos miembros se incluyen GyrB, Hsp90, y MutL (Dutta & Inouye, 2000). La homología estructural se refleja en la conservación, en todos ellos, de una serie de residuos implicados en la unión de la molécula de ATP, designados como cajas N, G1, F y G2 que son su seña de identidad y que son utilizados para su localización por secuencia.

El dominio DHp y Ca son necesarios y suficientes para catalizar la autofosforilación de la HK en una reacción que se había postulado como mecanismo general y ocurría en *trans* dentro del homodímero, de forma que la molécula de ATP unida al dominio CA de una subunidad es utilizada para fosforilar la histidina localizada en el dominio DHp de la segunda subunidad (Wolanin *et al.*, 2002, Khorchid & Ikura, 2006). No obstante, estudios recientes llevados a cabo por nuestro laboratorio (Casino *et al.*, 2009), y corroborados posteriormente por otros (Albanesi *et al.*, 2009), han puesto de manifiesto que diferentes HKs se

INTRODUCCIÓN

autofosforilan en *cis*, es decir cada dominio CA autofosforila la histidina de su propio dominio DHp. Nuestro laboratorio ha propuesto, en base a las estructuras de los dominios DHps descritos anteriormente, que las conexiones entre las dos hélices antiparalelas del dominio DHp, que se ha observado como variable en diferentes HKs, pueden ser la base estructural de la diferencia en la direccionalidad de la reacción de autofosforilación (Casino *et al.*, 2009).

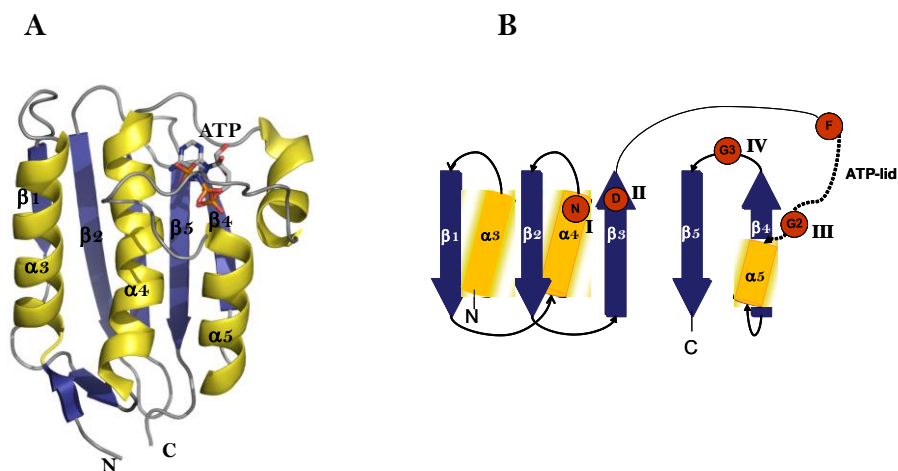


Figura 4. Estructura tridimensional del dominio CA de la HK PhoQ y características estructurales del dominio de unión a ATP (CA) en una HK ortodoxa. En A se muestra la estructura tridimensional del dominio CA de PhoQ (PDB:1IDO) en presencia de AMPPNP. El dominio CA está formado por cinco láminas β y tres hélices α . En B se muestra el esquema de la estructura secundaria del dominio CA. Las hélices α se muestran como cilindros y las láminas β como flechas nombrándose del mismo modo que en la estructura de PhoQ. En el esquema se señalan los motivos estructurales del Bergerat fold (cajas N, D, G y F).

Además de los dos dominios catalíticos conservados existen otros dos dominios reguladores altamente representados en esta porción citoplasmática de las HKs. El dominio HAMP (del inglés: *Histidina kinases*, *Adenylyl cyclases*, *Metil-binding proteins and Phosphatases domain*) (Figura 5) se identificó en HKs al utilizar programas de predicción de motivos hélice enrollada como NEWCOILS, PAIRCOIL o LEARNCOIL (Singh *et al.*, 1998), y permitió predecir que este dominio, de unos 50 residuos, se plegaba en forma de dos hélices anfipáticas conectadas por un lazo flexible. Estos dominios se encuentran presentes en el 31% de las HKs, normalmente situados inmediatamente después de las regiones transmembrana (TM) antecediendo a la primera hélice del dominio DHp, y su función está relacionada con la modulación de la señal entre el dominio sensor extracelular y el dominio citoplasmático (Inouye, 2006). Recientemente se ha resuelto la estructura tridimensional por RMN de uno de estos dominios confirmando esta predicción y mostrando que los dominios HAMP de los dos monómeros del dímero se unen para formar un haz de cuatro hélices que corren paralelas (Hulko *et al.*, 2006). La geometría que presenta el dominio HAMP, resuelto por RMN, muestra un empaquetamiento de hélice enrollada diferente al canónico de botón en ojal, que se ha denominado botón en botón o complementario x-da. La alternancia entre este empaquetamiento y el canónico estaría relacionado con el proceso de transducción de la señal (Hulko *et al.*, 200) El segundo de los dominios es el dominio llamado PAS (clasificación Pfam; PF07310) (*PER-Drosophila period clock protein*-, *ARNT-Vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*, *SIM-Drosophila single-minded protein*) (Figura 5). Casi el 33% de las HKs

INTRODUCCIÓN

cuentan como mínimo con un dominio PAS. Estos dominios son importantes módulos señalizadores que monitorizan los cambios de luz, el potencial redox, oxígeno, pequeños ligandos y niveles de energía de la célula (Taylor & Zhulin, 1999). A diferencia de la mayoría de los módulos sensores, los dominios PAS se encuentran localizados en el citosol de la célula y se organizan como 3 hélices α (1-3) cubiertas por una hoja β compuesta por 5 cadenas β (1-5), en el interior encontramos una cavidad hidrofóbica donde una de las hélices α cubre su entrada. Como en el caso anterior este dominio precede al dominio DHP y puede ser receptor o modulador de la señal.

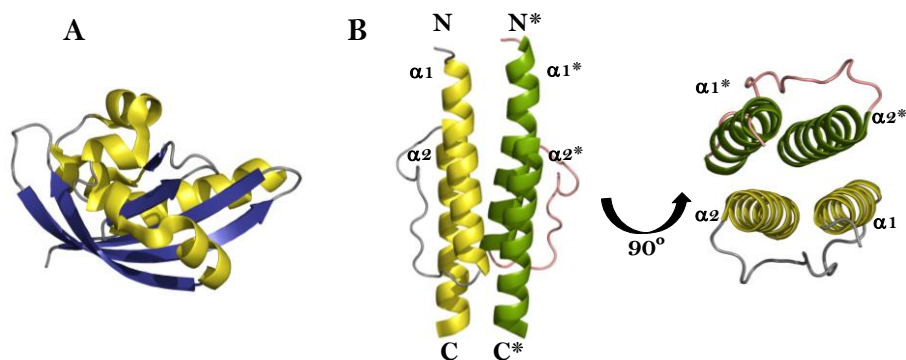


Figura 5. Estructura tridimensional de los dominios PAS y HAMP.

A) representación en *cartoon* de la estructura del dominio PAS de la proteína sensora de oxígeno FixL (PDB). B) estructura del dominio HAMP de Af1503 en su forma dimérica (un monómero en amarillo y otro en verde). Se presentan dos visiones perpendiculares entre sí.

Las HKs que contienen todos los dominios anteriormente descritos se denominan ortodoxas (Dutta *et al.*, 1999).

1.1.2.2.-Reguladores de la respuesta

Un RR paradigmático contiene un dominio regulador receptor, N-terminal conservado, que incluye el aspartato que acepta el fosfato de su HK pareja, asociado a un dominio efector ,C-terminal, mucho más variable y que suele estar implicado en unión al ADN (Stock et al., 2000)(Figura 2).

El domino receptor (REC, clasificación Pfam; PF00072) tiene un tamaño aproximado de 100 residuos y presenta un plegamiento característico (α/β) con un núcleo central de 5 cadenas β paralelas rodeadas por 5 hélices α (Figura 6), colocándose 3 hélices α en una cara de la hoja β y las dos hélices α restantes en la otra. El centro catalítico está formado por un bolsillo ácido muy conservado que es rodeado por los 5 lazos que conectan los extremos C-terminales de las cadenas β con las subsiguientes hélices α . Este bolsillo incluye el aspártico fosforilable, que se encuentra expuesto al solvente, y otros dos residuos ácidos (habitualmente Asp) que están implicados en la coordinación del catión divalente (Mg^{2+} en la mayor parte de los casos) requerido para la transferencia y estabilidad del grupo fosforilo. El grupo de residuos altamente conservados que rodea al centro activo se completa con una Lys y una Thr/Ser, estando la primera implicada en la transferencia del grupo fosforilo entre la HK y el RR, y la segunda en los cambios conformacionales inducidos por la fosforilación (Djordjevic & Stock, 1998). Finalmente, un residuo hidrofóbico (Tyr o Phe habitualmente) es el último de los residuos conservados en los RR. Este residuo se localiza en la cadena $\alpha 4$ y junto con la Thr/Ser conservada son residuos clave en

INTRODUCCIÓN

los cambios conformacionales que median la activación por fosforilación. El RR más estudiado y cuya estructura ha servido como modelo representativo de los dominios receptores, es la proteína CheY (Usher *et al.*, 1998) (Figura 6). Este RR es atípico, ya que carece de dominio efector y modula el movimiento del flagelo en la regulación por quimiotaxis mediante la interacción directa del dominio receptor.

Aunque los RRs realizan su efecto señalizador mediante diferentes actividades, en la mayor parte de los casos actúan como factores transcripcionales que controlan la expresión génica mediante dominios efectores de unión al ADN de tipo hélice-vuelta-hélice (HTH) o HTH alada (wHTH), que activan o reprimen la transcripción de uno o varios genes diana. En otros casos, el dominio efector es un dominio efector tiene una actividad enzimática, como por ejemplo en el RR CheB, donde este dominio es una metilesterasa clásica (Bunn & Ordal, 2004). La gran diversidad existente de RRs plantea la cuestión de cómo un dominio aceptor conservado controla la actividad de dominios efectores tan variables en estructura y función. Una respuesta podría ser que los dominios aceptores existen en las dos formas, activa e inactiva, generando en cada caso superficies moleculares diferentes que son utilizadas para regular, mediante interacciones proteína-proteína, el dominio efector al que se encuentra fusionado (Gao *et al.*, 2007, Galperin, 2006).

Se han identificado y clasificado en base a la organización de sus dominios 4610 RRs codificados en el genoma de 200 especies de bacterias y arqueas (Galperin, 2006). Las familias de reguladores transcripcionales OmpR, NarL y NtrC comprenden casi el 60% de los

RRs, mientras que los reguladores transcripcionales con otros dominios de unión a ADN tales como LytTR, AraC, Spo0A, Fis, YcbB, RpoE y MerR, conforman un 6% del total. El resto está representado por dominios enzimáticos (GGDEF o EAL), de unión a ARN (ANTAR y CsrA), de unión a ligandos o proteínas (PAS, GAF, TPR, CAP_ED y HPt) u otros dominios de función desconocida (Galperin, 2006). Finalmente, el 14% de los RR carecen de dominio efector, llevando a cabo la función, habitualmente mediante procesos de interacción proteína-proteína, el propio dominio REC.

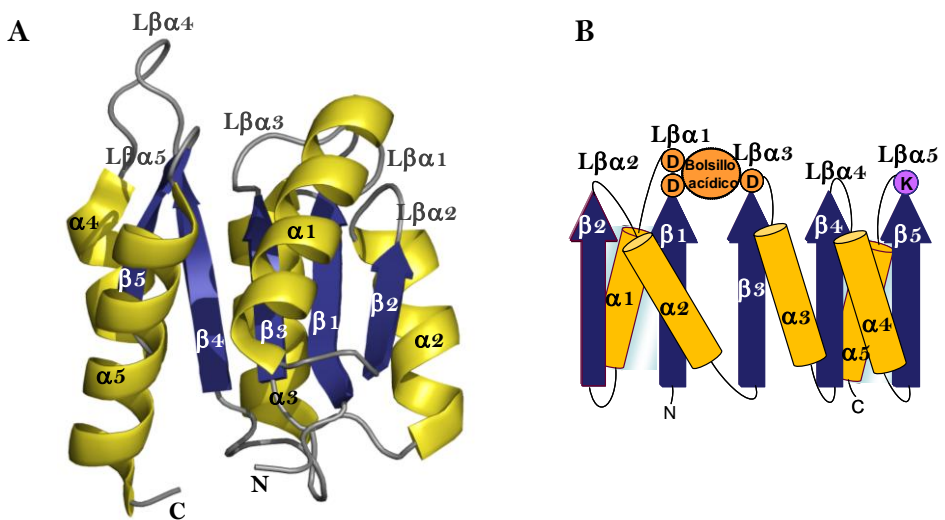


Figura 6-. Características estructurales del dominio REC de los RR ejemplarizado por la estructura tridimensional de CheY. (A) estructura tridimensional de CheY (PDB: 1CHN) en caricatura donde se nombran los elementos estructurales característicos de este. **(B)** Esquema del dominio REC prototípico donde se muestran las láminas β como flechas azules y las hélices α como cilindros naranjas. Se muestra el bolsillo ácido formado por tres residuos de aspártico, dos de ellos implicados en quelar el catión divalente y el tercero correspondiente al Asp fosforilable. También se indica el residuo de Lys que juega un papel importante en la catálisis.

INTRODUCCIÓN

Una lista muy completa de RR analizados se encuentra disponible en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/RRcensus.html. La combinación entre la abundancia y la diversidad estructural de los dominios efectores sugiere que las fusiones entre el dominio conservado REC y diferentes dominios de salida de la señal, permiten a las bacterias, utilizando un mismo mecanismo, regular procesos tan dispares como la transcripción, actividades enzimáticas o asociación de proteínas en respuesta a cambios ambientales.

1.1.3. Algo más que dos componentes

Los TCS simples son de naturaleza modular, es decir, que los dominios que presentan tanto la HK como el RR se pueden combinar de forma diferente manteniendo el mecanismo de fosforilación/defosforilación. Así, existen sistemas más complejos denominados de fosfotransferencia His-Asp-His-Asp (Appleby *et al.*, 1996, Perraud *et al.*, 1999) que incluyen múltiples pasos de transferencia del grupo fosforilo entre residuos de His y Asp, requiriendo en algunos casos proteínas adicionales. Los sistemas de fosfotransferencia son típicos de organismos eucariotas y se encuentran en menor medida en procariotas. Utilizan en general HKs híbridas, es decir, que fusionan dominios REC en su extremo C-terminal a una HK ortodoxa. En este caso, la transferencia del grupo fosforilo desde el dominio REC de la HK híbrida a su correspondiente RR final está mediada por una proteína intermedia llamada HPt (*His-containing phosphotransfer*). La mayoría de las HKs en organismos eucariotas son híbridas, con el dominio HPt

independiente, y sólo un tercio de HKs, de bacterias y algunas de arqueobacterias, son híbridas con HPt fusionados (Zhang & Shi, 2005).

1.1.4. Mecanismo enzimático de los sistemas de dos componentes

Los sistemas de dos componentes traducen la señal por medio de un mecanismo de fosforilación/defosforilación (Kleerebezem *et al.*, 1997, Laub, 2007). Como se ha comentado anteriormente este proceso implica al menos tres reacciones (Stock *et al.*, 2000), siendo dos de ellas reversibles, como se muestra a continuación (Figura 2):

1. Reacción de autofosforilación: $\text{HK-H} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{HK-H}\sim\text{P} + \text{ADP}$.
2. Reacción de fosfotransferencia: $\text{HK-H}\sim\text{P} + \text{RR-D} \rightleftharpoons \text{HK-H} + \text{RR-D}\sim\text{P}$.
3. Reacción de defosforilación: $\text{RR-D}\sim\text{P} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RR-D} + \text{Pi}$.

El proceso se inicia con la reacción de **autofosforilación** donde el fosfato γ , de la molécula de ATP, unido al dominio CA de la HK, es transferido al ϵN ($\text{N}3$ en el anillo de imidazol de la histidina) de la His conservada en el dominio DHp. Como se ha indicado, esta reacción puede llevarse a cabo en *cis* o *trans* dentro del homodímero de la HK, pero hasta la fecha no se ha descrito ninguna HK que pueda catalizar la reacción en ambas direcciones.

En la segunda reacción, este mismo grupo fosforilo es transferido a un residuo de Asp conservado, del RR, en una reacción catalizada por esta segunda proteína y denominada de **fosfotransferencia**. Finalmente la señal se extingue por la pérdida del grupo fosforilo del RR. En esta

INTRODUCCIÓN

reacción, denominada de **defosforilación**, una molécula de agua ataca al fosfo-aspartico generando una molécula de fosfato inorgánico. La reacción puede ser activada o inhibida por el propio RR, habiéndose medido vidas medias para los P~RR que son variables y van desde segundos a varios días (Zapf *et al.*, 2000, Casino *et al.*, 2007). Además, muchas HKs poseen una alta actividad fosfatasa sobre su RR pareja, lo que les permite llevar a cabo la reacción de defosforilación. En este caso, la His aceptora de la HK juega un papel principal en la reacción, ya que ha sido propuesto que es la encargada de orientar y polarizar la molécula de agua que ataca al grupo fosforilo (Zhu *et al.*, 2000).

1.1.5. Distribución de los Sistemas de dos componentes

Los TCS son sistemas de señalización altamente fieles, ya que cada HK tan solo transduce la señal via un RR. Esta fidelidad se ve reflejada en muchos casos en la localización genómica de las secuencias codificantes para estas proteínas. Aunque éstas se encuentran repartidas por todo el genoma, en la mayoría de los casos el ORF de la HK y del RR que forman un TCS se encuentra en la misma unidad transcripcional u operón. En otros casos, los ORFs codificantes de la HK y RR que forman un TCS no se encuentran ni en el mismo operón ni tan siquiera cercas entre sí, denominándose por ello HKs o RRs huérfanos (Mizuno, 1997). Por ejemplo, *M.xanthus* contiene un gran número de genes para TCS (146 HKs y 130 RRs) de los que aproximadamente el 50% de los genes que codifican para HKs y el 40% que codifican para RRs son huérfanos.

La incidencia de ORF huérfanos impide asignar pares sensor/regulador. El grupo del Dr. Michael T. Laub ha demostrado bioquímicamente que es posible identificar pares sensor/regulador a partir de ORF huérfanos mediante una técnica denominada “*phosphotransfer profiling*” (Skerker *et al.*, 2005), utilizando como organismo modelo *Caulobacter crescentus*, que contiene 62 HKs y 44 RRs. Esta técnica se basa en la preferencia cinética que muestran las HKs *in vitro*, por su correspondiente RR *in vivo*.

1.2. SISTEMAS DE DOS COMPONENTES EN CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias constituyen un grupo de procariontas muy diverso pero bien establecido y filogenéticamente coherente. Tienen una gran importancia ecológica ya que realizan procesos imprescindibles para el mantenimiento del equilibrio en la biosfera como son, la producción de oxígeno o la fijación de carbono y de nitrógeno. Su distribución en el planeta es tan amplia que están presentes en prácticamente todos los ambientes naturales. Para adaptarse a esta multiplicidad de ambientes, las cianobacterias, como la mayoría de las bacterias, usan proteínas sensoras y reguladoras para controlar su funcionamiento celular y la expresión de genes en respuesta a cambios en su entorno (Tu *et al.*, 2004, Cadoret *et al.*, 2005, Alves & Savageau, 2003, Hoch, 2000, Hsiao *et al.*, 2004, Marin *et al.*, 2003, Stock *et al.*, 2000, Suzuki *et al.*, 2004). Los genomas secuenciados de cianobacterias han revelado que probablemente hagan amplio uso los TCSs para llevar a cabo estos procesos (Rocap *et al.*, 2003, Ohmori *et al.*, 2001, Dufresne *et al.*, 2003, Mizuno *et al.*, 1996).

INTRODUCCIÓN

De hecho las cianobacterias son los organismos que presentan más número de TCSs en relación al tamaño de su genoma (Lopez-Redondo *et al.*, 2010).

1.2.1. TCS y fotosíntesis en cianobacterias

Los organismos fotosintéticos poseen pigmentos que permiten la absorción de luz requerida para la síntesis de ATP y poder reductor. La mayor parte de esta energía en cianobacterias se recolecta en unas estructuras llamadas ficobilisomas (PBS), complejos macromoleculares citoplasmáticos que están anclados a las membranas fotosintéticas o tilacoides (Glazer *et al.*, 1985, Grossman *et al.*, 1993, MacColl, 1998). Un exceso en la absorción de luz puede producir daños en el aparato fotosintético al igual que en otros componentes celulares (Foyer *et al.*, 1994). Por lo tanto, los organismos fotosintéticos deberían adaptar su capacidad de acumular luz, a una amplia variedad de condiciones lumínicas y ambientales. Las cianobacterias han desarrollado varios mecanismos para este propósito, como por ejemplo, y en un caso extremo, mediante la degradación de los PBS durante la exposición a estrés lumínico o la privación de nutrientes tales como nitrógeno o sulfuro (Collier & Grossman, 1994, Collier & Grossman, 1992). En periodos de “carencia de nutrientes”, la degradación de estos PBS proporciona algunos de los nutrientes limitantes y reduce el tamaño de los aparatos fotosintéticos. La pérdida de PBS y la reducción en los niveles de clorofila produce cambios en la apariencia de las células desde un fenotipo verdeazulado, característico de las cianobacterias, hasta un

fenotipo amarillento en un proceso que denominado por ello “bleaching” o clorosis.

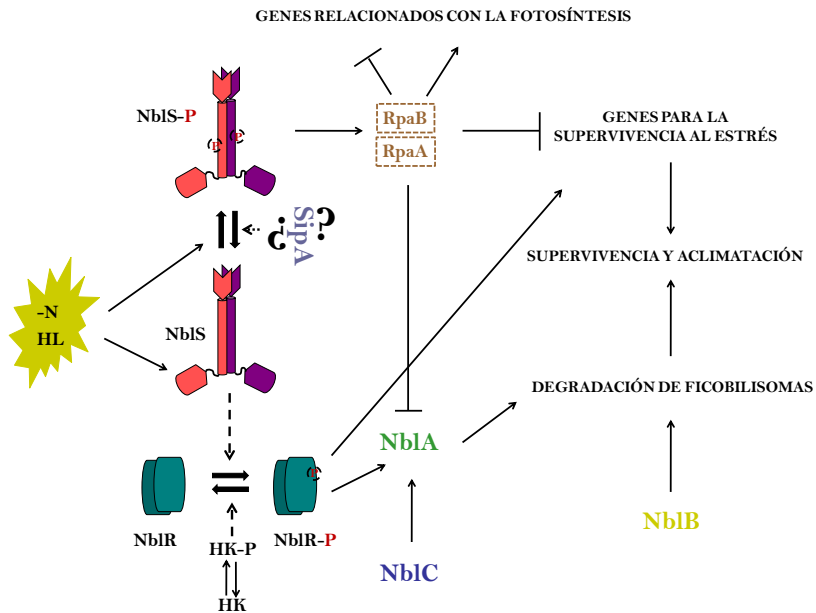


Figura 7. Esquema de interacción entre los principales actores del proceso de clorosis.

Desde hace dos décadas se han buscado los actores implicados en este importantísimo proceso, habitualmente por la aproximación de generar cepas incapaces de llevarlo cabo. Estas cepas se llamaron *non-bleaching* y por ello los genes cuya mutación producía este efecto se denominaron *nbl*. El primer gen encontrado por esta vía se denominó *nblA*, demostrándose que la proteína para la que codifica NblA es esencial para este proceso de clorosis (Baier *et al.*, 2004, Collier & Grossman, 1994). Se sabe que NblA se une a los PBS e induce su degradación,

INTRODUCCIÓN

aunque no posee ninguna actividad proteolítica detectable, por ello se propone que NblA podría ser una etiqueta para su degradación (Bienert *et al.*, 2006, Jesu' s A. G. Ochoa de Alda & Houmard, 2004). La expresión del gen *nblA*, en *S. elongatus*, se encuentra regulada al menos por dos proteínas, una HK sensora llamada NblS (van Waasbergen *et al.*, 2002), y un RR llamado NblR (Schwarz & Grossman, 1998), bajo condiciones de ausencia de nutrientes y alta luz. Por ello, ha sido postulado durante mucho tiempo que NblS y NblR podrían estar formando parte de un TCS (Figura 7).

1.2.1.1. NblS: la HK clave en la respuesta a estrés en cianobacterias

NblS es la única HK conservada en todos los genomas de cianobacterias secuenciados hasta la actualidad, y está presente en el genoma de algunas plantas. En *Synechococcus elongatus*, NblS es esencial, jugando un papel clave en respuesta al estrés (van Waasbergen *et al.*, 2002). NblS es una HK ortodoxa con un tamaño aproximado de 660 residuos, que se compone de una porción extracelular no conservada y una intracelular que presenta los dominios catalíticos conservados DHP y CA precedidos por dos dominios moduladores, HAMP y PAS, que son habituales en muchas HKs.

NblS controla la expresión de los genes relacionados con la fotosíntesis, durante periodos de alta luz y privación de nutrientes, tales como *nblA*, que como se ha descrito anteriormente es el principal actor en la clorosis, y el gen *hliA*, que es esencial bajo condiciones de alta luz) (van Waasbergen *et al.*, 2002). Se ha postulado que la capacidad de NblS

para captar diferentes tipos de estrés, principalmente el redox, se podría llevar a cabo por la unión de un ligando o ligandos al dominio PAS (Salem & van Waasbergen, 2004, van Waasbergen et al., 2002). Del mismo modo, se ha demostrado que el homólogo de NblS en *Synechocystis* (DspA/Hik33) regula a un variado número de genes durante períodos de alta luz, choques térmicos, ósmosis, presencia de peróxido de hidrógeno y estrés salino (Hsiao et al., 2004, Kanesaki *et al.*, 2007, Suzuki *et al.*, 2001, Tu et al., 2004). Estos datos apuntan a NblS como el sensor clave en la aclimatación a estrés en cianobacterias (Sakayori *et al.*, 2009).

1.2.1.2. SipA una proteína conectora en el proceso de aclimatación al estrés en cianobacterias

Ensayos de doble híbrido en *Synechococcus elongatus* utilizando NblS como cebo y encaminados a la búsqueda del RR pareja de NblS, no rindieron ninguna proteína de este tipo pero si la identificación de una proteína (Synpcc 7942-1196) que interactuaba fuertemente con ella y que recibió por ello el nombre de SipA (*NblS interacting protein A*) (Espinosa *et al.*, 2006). Análisis en mayor detalle mostro que SipA se unía específicamente al dominio CA de NblS. SipA se caracteriza por su pequeño tamaño, 8KDa. Análisis de la secuencia de SipA utilizando herramientas informáticas no adscribió a ésta a ninguna familia conocida.

Resultados similares fueron obtenidos en *Synechocystis* (Sato *et al.*, 2007); donde Ssl3451, un homólogo de SipA, se asociaba también a la porción C-terminal de Hik33 (el homólogo de NblS). Más aun, NblS/Hik33 y SipA/Ssl3451 se encuentran conservados en todas las cianobacterias, cuyo genoma ha sido secuenciado, sugiriendo que

INTRODUCCIÓN

SipA/Ssl3451 puede regular la transducción de la señal a través de NblS/Hik33 en todas las especies. Sin embargo los mecanismos por los cuales SipA modula la actividad de NblS no han sido clarificados hasta la fecha.

1.2.1.3. ¿Quién es el RR pareja de NblS?

NblS, la proteína traductora de señales más conservada en cianobacterias, es una HK huérfana, ya que no se conoce la identidad de su RR socio, por ello encontrar este RR ha sido durante mucho tiempo el objetivo principal de diferentes laboratorios.

La inactivación de un gen conocido como *nblR*, que codifica para un RR (NblR), en *S.elongatus*, mostró un fenotipo de decoloración bajo condiciones de estrés de nutrientes (Schwarz & Grossman, 1998), similar al observado en el caso de *nblS*. Además, NblR, al igual que NblS, es necesario para que se incremente de manera significativa la expresión génica de *nblA* en condiciones de estrés de nutrientes en *Synechococcus* (Luque *et al.*, 2001, Salinas *et al.*, 2007, Schwarz & Grossman, 1998, Sendersky *et al.*, 2005). Por todo ello se proponía que NblR era el RR socio, sin embargo, hasta la fecha no existe ninguna prueba directa de interacción entre ambos.

Recientemente, pruebas indirectas han sugerido que RpaB es el RR de NblS. Ensayos fallidos para inactivar *nblS* en *S.elongatus* (Kappell *et al.*, 2006, van Waasbergen *et al.*, 2002) y *rpaB* (Rre26 en *Synechocystis*) (Ashby & Mullineaux, 1999) sugirieron que ambas proteínas podrían formar parte de un TCS esencial para la viabilidad de la célula, aunque no existían pruebas de interacción entre ambas. Además, RpaB se une a

los promotores que contienen secuencias HLR1 (*High Light Regulatory 1*) y genes que cuentan con estas secuencias mostraron ser controlados por NblS en *Synechocystis* (Kappell *et al.*, 2006). Más recientemente, análisis de genes inducibles por estrés, sugirieron que dos RR diferentes, Rre26/RpaB y Rre31/RpaA, estaban implicados en la transducción de señales en *Synechocystis* (Murata, 2006). Sin embargo RpaA no se unía a secuencias HLR1 (Kappell & van Waasbergen, 2007), y resultó ser el RR socio de la HK SasA, la cual está involucrada en la regulación del ritmo circadiano (Takai *et al.*, 2006). En suma, con anterioridad al comienzo de los estudios de la presente tesis se desconocía el RR socio de NblS, aunque su identificación es fundamental para entender las respuestas globales de las cianobacterias a distintos tipos de estrés.

1.3. HISTIDINAS KINASAS COMO DIANAS PARA NUEVOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

1.3.1. Factores de virulencia en los procesos de patogenicidad

La producción de enfermedades, debido a infecciones bacterianas, requiere una expresión temporal y coordinada de una serie de genes que codifican productos normalmente denominados “factores de virulencia”, que permiten al patógeno adaptarse al entorno hostil de su hospedador.

Los factores que contribuyen a la virulencia y los mecanismos de regulación de la virulencia, hoy en día, no están del todo claros. Sin embargo, durante los últimos 15 años se han alcanzado progresos significativos en el mundo de la genética, bioquímica y biología

INTRODUCCIÓN

molecular relacionados con la virulencia. (Patti & Hook, 1994, Hacker *et al.*, 1997). Los factores que codifican para regular la resistencia antibacteriana, o antibiótica, pueden también contribuir a un movimiento bacteriano hacia un estado patogénico. Los factores de virulencia contribuyen a la viabilidad del microorganismo para su supervivencia y crecimiento en el sitio de la infección, por lo tanto a su patogenicidad, y en buena medida, a la propagación del microorganismo en su hospedador. Debido a esto, la definición de factores de virulencia debería ampliarse para incluir los productos de los genes, que no necesariamente contribuyen a la producción de cuadros clínicos y/o lesiones, pero sí contribuyen a la formación de productos requeridos para poder hacer frente a los sustratos metabólicos producidos en el huésped.

Una infección exitosa implica una cadena de eventos y una serie de genes reguladores funcionando en un orden temporal, gracias a los cuales, un patógeno consigue evadir las respuestas inmunes y fagocíticas de defensas del hospedador, creciendo bajo condiciones adversas, como la limitación de determinados nutrientes y por lo tanto, combatiendo el ambiente hostil que le rodea. Así, en patógenos como *Salmonella typhimurium* que sobrevive dentro de compartimentos celulares particulares (fagosomas), la inducción de genes metabólicos determinados, llegan a ser esenciales para su supervivencia dentro del hospedador (Alpuche Aranda *et al.*, 1992, Fields *et al.*, 1989).

Por tanto, los genes reguladores que controlan la expresión de factores de virulencia esenciales para la supervivencia del patógeno también pueden ser considerados como “factores de virulencia”.

1.3.2. Sistemas de dos componentes: nuevas dianas terapéuticas

Los patógenos bacterianos son muy eficientes para resolver interacciones entre el hospedador-entorno-patógeno por medio de factores de virulencia y sistemas de regulación, que les permiten sobrevivir en muchos ambientes hostiles. El deterioro de uno o más de estos factores de virulencia por mutación, neutralización por anticuerpos, o inhibición química, puede ser el factor determinante en el éxito o fracaso de la infección. Como consecuencia de esto, en los últimos años ha crecido el interés por la utilidad de estos factores de virulencia bacteriana como nuevas dianas para el diseño de compuestos contra los patógenos. Los TCSs controlan muchos de estos factores de virulencia requeridos para que la bacteria pueda sobrevivir en el hospedador y en algunas de ellas genes esenciales (Hecht *et al.*, 1995, Quon *et al.*, 1996). Por ello, el estudio de estos TCS despierta mucho interés desde el punto de vista médico, ya que al menos seis características hacen que estos sistemas sean unos de los mejores candidatos para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos:

1. Son quasi-universales entre las bacterias (tan solo el género *Mycoplasma* no los presenta).
2. Algunos de estos sistemas son esenciales para la supervivencia de la célula.
3. Muchas bacterias tienen varios de estos sistemas y además cada uno de ellos controla diferentes procesos.
4. Estos sistemas no se encuentran en invertebrados o vertebrados, pero si en plantas y hongos.

INTRODUCCIÓN

5. Las proteínas que constituyen los sistemas tienen módulos altamente conservados en sus centros activos.

6. Muchos de estos sistemas controlan la virulencia, patogenicidad y resistencia a otros antibióticos.

La identificación de pequeñas moléculas inhibitoras, así como de inhibidores peptídicos de las HKs y de los RRs, podría ser una buena estrategia a seguir (Barrett & Hoch, 1998), ya que al interferir en el sistema de señalización de un microorganismo patógeno, éste se expone a su destrucción por el sistema inmune del hospedador. Este tipo de actuación indirecta dificultaría la adquisición de resistencias por parte del patógeno (Brodsky & Gunn, 2005).

En los últimos años, las mejoras en la automatización de los ensayos y la computerización del procesamiento de los datos, han permitido un incremento significativo en el rendimiento de los ensayos biológicos. Estos avances han tenido un impacto potencial en todas las áreas dedicadas a la búsqueda de nuevas drogas.

Estudios estructurales recientes, entre los que se encuentran los realizados por nuestro grupo, han mostrado la arquitectura de diferentes dominios conservados de las HKs (Casino et al., 2009, Albanesi *et al.*, 2009). Estos datos estructurales pueden servir como punto de partida para el rediseño, ahora dirigido, de nuevos y más específicos inhibidores de estas proteínas. Sin embargo, estos mismos datos estructurales han dado las primeras notas de atención al comprobarse que el dominio de unión al nucleótido de las HKs (uno de los principales sitios de unión de un posible inhibidor) es estructuralmente homólogo al de la girasa GyrB, la carabina molecular Hsp90 y la proteína de reparación del DNA MutL,

conformando todos ellos la familia estructural GHL (Roe *et al.*, 1999) (Figura 8), por tanto una droga que reconozca inespecíficamente el lugar de unión de ATP de las HKs podría, indirectamente, inhibir nuestra maquinaria de reparación del DNA, entre otros procesos.

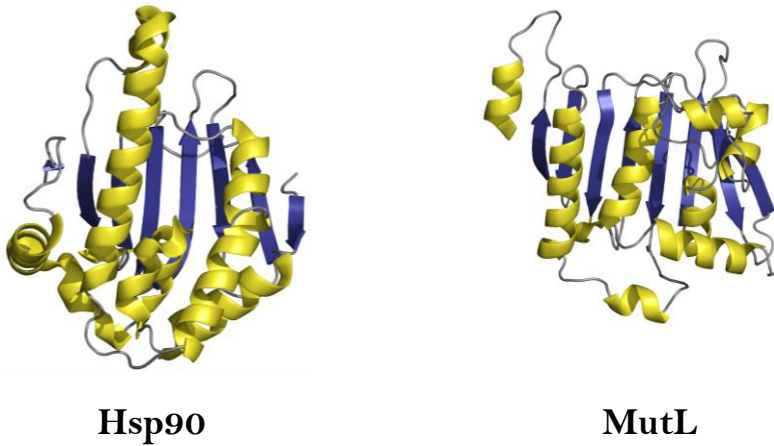


Figura 8. Estructura de los dominios de unión del nucleótido de representantes de la familia GHL. Se muestra en caricatura la estructura tridimensional del dominio de unión a ATP de la chaperona Hsp90 y la proteína del complejo de reparación de ADN MutL. En ambas estructuras la α hélices y las cadenas β se colorean en amarillo y azul respectivamente.

Por el contrario, un punto favorable de esta homología estructural es la disponibilidad de una gran batería de compuestos con actividad inhibitoria sobre los miembros de la familia GHL, de los que en algunos casos se dispone de la estructura tridimensional del complejo proteína-inhibidor (Roe *et al.*, 1999, Lafitte *et al.*, 2002), siendo además, alguno de ellos, activo sobre HK (Besant *et al.*, 2002), pudiendo ser estos compuestos punto de partida para el desarrollo de inhibidores específicos para las HKs. Así, por ejemplo, el radicicol, uno de los inhibidores de la Hsp90, miembro de esta superfamilia, también puede unirse, con baja

afinidad, al dominio CA de la HK PhoQ, inhibiendo su actividad autoquinasa (Guarnieri *et al.*, 2008), representando un modelo potencial para el desarrollo de inhibidores de las HK.

1.3.3. Diseño dirigido de inhibidores para TCS

El incremento en el fracaso en la búsqueda de inhibidores mediante técnicas clásicas de cribado masivo de compuestos ha forzado a replantearse las estrategias a seguir. El contar hoy con una mayor información funcional y estructural de estas proteínas, puede ayudar en este proceso, ya que puede permitir el diseño orientado. Para ello se pueden seguir diferentes aproximaciones: obtención de nuevas entidades químicas con poder inhibitorio, mejora de los inhibidores de la familia GHL para que sean específicos de los TCS, o por el contrario se puede comenzar el diseño racional *in silico* de nuevos inhibidores. El diseño racional “*in silico*” de nuevos productos, está basado en el cálculo computacional de la interacción entre moléculas diseñadas y los centros activos de enzimas, receptores u otras dianas terapéuticas de interés, de modo que se puedan hacer a medida, moléculas que inhiban o bloqueen el centro activo de esta diana terapéutica.

En el caso de los TCS, la mayor parte de los estudios se han centrado en la HK, sin embargo, hasta el momento la mayoría de las moléculas identificadas no han dado los resultados esperados, sobre todo debido a su baja solubilidad (Gotoh *et al.*). Recientemente, la HK YycG, se ha convertido en un objetivo de interés, ya que en muchos organismos Gram-positivos, incluidos un gran número de patógenos, es esencial. Utilizando técnicas *in silico* sobre modelos estructurales de esta HK se

han descrito recientemente nuevas clases de inhibidores que presentan actividad sobre cultivos bacterianos, de estos patógenos, que parece específica de la inhibición de YycG (Qin *et al.*, 2006, Kitayama *et al.*, 2007, Fukushima *et al.*). Por lo tanto, estos son esperanzadores e indican que esta vía es factible, apoyando su continuidad ya que posiblemente en los próximos años, aparezcan nuevos y mejores resultados en este campo.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es avanzar en el conocimiento de los sistemas de transducción de señal más importantes en microorganismos, los denominados “sistemas de dos componentes”, aportando nuevos datos funcionales y estructurales sobre componentes y mecanismos implicados en el proceso de señalización, así como los pasos iniciales en la búsqueda y diseño, basado en estructura, de inhibidores de estos sistemas. Para todo ello se abordaron los siguientes objetivos parciales:

1. Cristalización y resolución de la estructura tridimensional, por difracción de rayos X, de la porción catalítica de la proteína SrrB, una HK de *Staphylococcus aureus*.

2. Estudio de la respuesta a estrés, mediada por TCS, en la cianobacteria *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942:

2.1. Estudio de NblR, un RR atípico.

2.2. Estudio del conector SipA y su implicación en la respuesta a estrés mediada por NblS y NblR.

2.3. Búsqueda del RR socio de NblS y análisis del TCS formado por ellos.

3. Búsqueda de nuevos inhibidores de HK mediante técnicas “*in silico*”, “*in vitro*” y cristalográficas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.1.1. Clonado de genes

El gen correspondiente a la porción catalítica de la HK de membrana SrrB de *Staphylococcus aureus*, y los genes pertenecientes a las proteínas de *S.elongatus*, fueron amplificados a partir de sus respectivos ADNs genómicos, utilizando cebadores específicos para cada construcción que se encuentran enumerados en la Tabla 1. Posteriormente fueron clonados en el vector pPROEx-HTb (Invitrogen) tras la digestión de este vector y de los correspondientes fragmentos con los enzimas de restricción HindII y NcoI.

En el caso de NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ y SrrA^{FL} la clonación se realizó en el vector pLIC-SGC1 (Gileadi et al., 2008, Stols *et al.*, 2002) utilizando un técnica de clonado independiente de ligación (Stols *et al.*, 2002). Para ello el vector fue hidrolizado con BseRI y tratado posteriormente con T4 DNA ligasa en presencia de dCTP. Por último el vector fue diluido a 50µg/ml y guardado a -20°C. Los productos de PCR que codifica las secuencias para ambas proteínas, fueron tratados con T4 DNA ligasa en presencia de 2,5 mM de dGTP, generando así extremos complementarios a los extremos del vector. Por último mediante una recombinación homóloga de los extremos, tanto del vector como del fragmento que contenía la proteína, se consiguió la completa clonación de los fragmentos de interés.

MATERIALES Y MÉTODOS

Acrónimo	Cebador	Proteína	Plásmido
SrrBCP	5'TGGTGCCATGGTGACAGTTCGTGATATG 3' 5'AGCCAAGCTTATTCTGGTTTTGGTAG 3'	Parte citoplasmática de SrrB	pSrrBCP
CheA ³⁵⁴⁻⁵⁴⁰	5'TTTCAGGGCGCCATCTCCTTTGTTTTCAAC 3' 5'GCATGCCTCGAGTTACAGAGTGAGCGGTAG 3'	Dominio aceptor de CheA	pCheA ³⁵⁴⁻⁵⁴⁰
NblS ²¹⁹⁻⁶⁶⁴	5'TACTTCCAATCCATGATTCGCGAGTTGGTGGAG 3' 5'TATCCACCTTTACTGCTAGCCGGTGTGACGC 3'	Parte citoplasmática de NblS	pUAGC270
NblR RD	5'GGCGCCATGGTCGCGCCAGCCTCGCC 3' 5'GCAGAAGCTTATCGTTGTAAATAGAG 3'	Dominio aceptor de NblR	pNblR-RD
RpaB RD	5'GGCGCCATGGAAAATCG CAAGGAAAAAATCC 3' 5'CGAAAAAGCTTACCAGCGCAGCACCGAGCG 3'	Dominio aceptor de RpaB	pUAGC271
RpaA RD	5'GGCGCCATGGAACCCGCATCCTCGTG 3' 5'AATGGAAGCTTAGCGGTGCAGCAAGGC 3'	Dominio aceptor de RpaA	pUAGC274
SrrA RD	5'GGCGCCATGGGATCGCTTAAAGCTGTC 3' 5'TCAAAGCTTACCGGCGCAG AATTGTGGCG 3'	Dominio aceptor de SrrA	pUAGC272
SrrA ^{FL}	5'TACTTCCAATCCATGCGATCGCTTAAAGCTG 3' 5'TATCCACCTTTACTGCTAGGCTCCAGCCGCTTC 3'	Proteína completa SrrA	pUAGC273

Tabla 1. Tabla de cebadores y plásmidos utilizados.

La inserción y correcta orientación de cada uno de los genes en los vectores se verificó mediante secuenciación. Los plásmidos que contenían las secuencias de las proteínas NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴, SipA^{FL}, NblR^{FL}, RpaB^{FL}, RpaA^{FL}, NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ y NblS⁴⁶⁶⁻⁶⁶⁴, fueron suministrados por el grupo de la Dra. Asunción Contreras.

3.2. MÉTODOS GENERALES PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS

3.2.1. Técnicas cromatográficas para la purificación de proteínas

Para la purificación de las proteínas se utilizaron técnicas cromatográficas de afinidad y exclusión molecular utilizando un sistema cromatográfico líquido de media presión FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*) AKTA. En la tabla 2 se muestran los tampones utilizados para las distintas cromatografías.

3.2.2. Técnicas Electroforéticas

Electroforesis desnaturalizante (SDS) en acrilamida (SDS-PAGE). Esta electroforesis se realizó siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970) utilizando los sistemas electroforéticos Mini-protean (Bio-Rad) a un voltaje constante de 200 V durante 35-50 min a temperatura ambiente. Los tampones utilizados se describen en la tabla 2.

Electroforesis nativa en acrilamida (Nativo-PAGE). Esta electroforesis se realizó con los SDS-PAGE pero en este caso ninguno de los tampones contenía SDS. Las proteínas se sometieron a una migración en un campo eléctrico de 100V durante 3h a 4°C.

Electroforesis de ADN en geles de agarosa. Para los geles de agarosa se usaron concentraciones de agarosa entre 0,8-2% en solución TAE 1X añadiéndose bromuro de etidio al tampón de la cámara de electroforesis a una concentración de 2µg/µl.

Tampones	Composición
Tampón de afinidad A	50mM Tris pH8; 150mM ClNa; 5% Glicerol
Tampón de afinidad B	50mM Tris pH8; 150mM ClNa; 5% Glicerol; 500mM Imidizadol.
Tampón de exclusión	50mM Tris pH7,5; 150mM ClNa
Tampón de dilución	20mM Tris pH8
Tampón de sonicación	50mM Tris pH8; 150mM ClNa; 5% Glicerol; 1mM PMSF
Tampón de fosforilación	25mM Tris pH8; 50mM KCl; 5mM MgCl ₂ ; 0,1mM EDTA; 2mM DTT
Tampón de fosforilación AcP	50mM Tris pH 8.0, 100mM KCl, 10mM MgCl ₂
Tampón TKM	25mM Tris pH7,6; 6mM AcK; 1mM MgCl ₂
Tampón de lisis	8M Urea; 2% CHAPS
Tampón de unión	20mM Hepes pH8; 50mM ClNa; 5mM MgCl ₂ ; 0,1mM EDTA; 5% Glicerol; 1mM DTT
Tampón de carga Nativo-PAGE	62,5 mM Tris pH6,8; 30% Glicerol; 0,01% azul bromofenol
Tampón de carga SDS-PAGE	62,5mM Tris pH6,8; 30% Glicerol; 1% SDS; 0,01% azul bromofenol; 0,74M b-mercaptoetanol
Solución de teñir	0.01% Coomassie; 10% Etanol, 10% Acido acetic
Solución de desteñir	10% Etanol; 10% Acido acetic

Tabla 2. Tampones utilizados

Visualización de geles. Los geles SDS-PAGE y Nativo-PAGE se tiñeron con Coomassie Blue durante 20-30 min y posteriormente fueron lavados con solución de desteñir (Tabla 2). Para visualizar las bandas de ADN en los geles de agarosa se añadió 1-5 μ l de bromuro de etidio (2 mg/ml) a la agarosa antes de su solidificación, y los geles se expusieron a un transiluminador con luz UV.

3.2.3. Métodos para la cuantificación de proteínas

Método de Bradford. Para cuantificar la concentración de proteínas mediante este método utilizamos el reactivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratorios, Hercules, CA) y seguimos las instrucciones del fabricante. Se utilizó seroalbumina bovina como proteína de referencia.

Absorbancia a 280 nm: A partir de la secuencia de la proteína y el servidor ExPASy Proteomics Server (<http://expasy.org/>) se obtuvo el coeficiente de extinción molar (ϵ) a 280nm, que fue utilizado para el cálculo de la concentración de proteína utilizando un espectrofotómetro y cubetas de cuarzo o un sistema nanodrop.

3.3. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

3.3.1. Expresión de proteínas

3.3.1.1. Expresión de SrrB^{CP}, CheA³⁵⁴⁻⁵⁴⁰ y SipA^{FL}

Las proteínas SrrB^{CP}, CheA³⁵⁴⁻⁵⁴⁰ y SipA^{FL}, se expresaron en la cepa de *E.coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene). Clones de esta cepa cargando el correspondiente plásmido fueron cultivados en medio LB complementados con ampicilina y cloranfenicol a 37°C en un agitador orbital a una velocidad de 250 rpm. La expresión de la proteína fue inducida en fase exponencial ($Abs^{600} = 0,4-0,6$) con 1mM isopropil- β -

tiogalactopiranosido (IPTG), y el cultivo se mantuvo en las mismas condiciones durante 3 horas. La proteína SrrB^{CP}, conteniendo seleniometionina (SeMet), se expresó mediante el protocolo no auxotrófico de Doublie (Doublie, 1997).

3.3.1.2. *Expresión de NblS*

Todas las construcciones de NblS, así como los complejos con SipA, se expresaron en la cepa de *E.coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene) en medio autoinductivo ZYP-5052, complementado con ampicilina (100mg ml⁻¹) y cloranfenicol (33mg ml⁻¹), y su expresión se realizó siguiendo un método de autoinducción (Studier, 2005), que consistió en cultivar las células a 37°C hasta que alcanzaron una Abs⁶⁰⁰ de 1-2. En este punto se bajó de temperatura a 20°C y se mantuvieron en estas condiciones durante 12 horas. Son sistemas de expresión inducibles en los cuales la polimerasa T7 RNA transcribe las secuencias codificantes bajo el control de un promotor T7lac para producir, de manera eficiente, una extensa variedad de proteínas en *E.coli*.

3.3.1.3. *Expresión de NblR, RpaB, RpaA y SrrA*

Todos estos RR de *S. elongatus* se expresaron en la cepa *E.coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene) en medio LB a 37°C hasta que las células alcanzaron una Abs⁶⁰⁰ de 0,2. En este punto la temperatura fue disminuida hasta 25°C y mantenida hasta el final de la expresión. Las células fueron inducidas en fase exponencial (Abs⁶⁰⁰ 0,4-0,6) por la adición de 1mM de isopropil-β-tiogalactopiranosido (IPTG) y se mantuvieron en estas condiciones durante 4 horas.

3.3.2- Purificación de proteínas

A continuación se explica el protocolo general de purificación que se aplicó por defecto a todas las proteínas, seguido de modificaciones que se realizaron en casos particulares para proteínas específicas.

3.3.2.1. *Lisado celular*

Una vez las proteínas fueron expresadas, los cultivos celulares fueron recogidos por centrifugación (10000 g durante 30 minutos) y resuspendidos a 1/20 del volumen de cultivo inicial en tampón de sonicación. Las células se lisaron por sonicación durante 3-10 min en series de 15 seg de sonicación y 60 seg de descanso utilizando un sonicador **SONIPREP 150**, manteniendo siempre la muestra en un baño de hielo-agua. Posteriormente, el extracto se centrifugó a 18,000g durante 30 minutos para separar el desecho celular del sobrenadante.

3.3.2.2. *1^aColumna de afinidad*

El sobrenadante de cada proteína se purificó por cromatografía de afinidad en una columna Ni²⁺-HiTrap (GE Healthcare). La columna se equilibró con 5 volúmenes de tampón afinidad A, se inyectó la muestra y se lavó extensivamente con dicho tampón. La muestra se eluyó en un solo paso con un 40% de tampón afinidad B. Las fracciones obtenidas fueron sometidas a SDS-PAGE, escogiéndose aquellas que contenían la proteína de interés con una menor cantidad de proteínas contaminantes. La unión de estas fracciones se dializó frente a 100 volúmenes, de tampón afinidad A, durante 12 horas a 4 °C, con el fin de eliminar el imidazol. Durante este proceso de diálisis se procedió a la digestión de la cola de histidinas por la adición a la bolsa de diálisis de proteasa del virus del mosaico del tabaco (TEV-proteasa) en una relación peso/peso de 25:1 (proteína: TEV).

3.3.2.3. 2^aColumna de afinidad

Pasadas 12 horas se recogió el dializado y se centrifugó (10000 g durante 30 minutos) con el fin de eliminar aquellas proteínas que hubieran precipitado. El sobrenadante se sometió de nuevo al mismo paso cromatográfico de afinidad descrito en el apartado anterior, aunque ahora recogiendo la fracción no retenida, que correspondía a la proteína sin la cola de histidinas. Chequeamos, por SDS-PAGE, que nuestra proteína se encontraba en dicha fracción y se concentró con el sistema Amicon-Ultra 4 o 15 (Millipore, Billerica, MA) hasta un volumen de 5ml o inferior.

3.3.2.4. Columna de Exclusión Molecular

La muestra concentrada se inyectó en una columna de exclusión molecular Superdex 75 o 200 tamaño (16/60) (GE Healthcare) equilibrada con tampón afinidad A. Nuevamente las fracciones eluidas fueron chequeadas en un gel SDS-PAGE y aquellas que contenían la proteína de interés, en más alta pureza, se unieron y concentraron como se ha descrito anteriormente.

3.3.2.5. Cambio de buffer y conservación

Aprovechamos el paso de concentración para cambiar el tampón donde se encontraba la proteína mediante un proceso de concentración y dilución (10 veces en cada paso) utilizando tampón de dilución. Este paso se realizó 3 veces. La concentración de cada proteína fue determinada por Bradford y por coeficiente de extinción molar a 280nm. Finalmente, las muestras se filtraron con un filtro Vivaspin de 0,2 micras de corte (Vivascience AG, Hannover, Alemania), se alicuotaron y almacenaron a -80°C.

3.3.2.6. Purificación de NblS

La expresión de todas las construcciones de NblS, excepto la construcción NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴, producía proteínas insolubles independientemente de las condiciones de expresión que se utilizaran.

Por ello, tras la sonicación de los cultivos y su centrifugación, la proteína se encontraba en el precipitado. Este precipitado fue lavado 3 veces con la solución B-PER (PIERCE) diluida 1/20 en agua destilada siguiendo las indicaciones del fabricante. El precipitado limpio se resuspendió en tampón afinidad A complementado con 2M Urea y se incubó durante 1h a 4°C con agitación rotatoria para la solubilización de la proteína precipitada. Después de centrifugar a máxima velocidad (10000g durante 30 minutos), el sobrenadante se purificó por cromatografía de afinidad siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior, con la diferencia que los tampones fueron complementados con 2M urea. La urea fue eliminada durante el paso de cromatografía de exclusión molecular al realizarse esta en las mismas condiciones que las descritas en el apartado anterior.

3.4. BUSQUEDA *IN SILICO* DE INHIBIDORES DE HKs

Elegimos el programa AutoDock 3.0. (Morris GM & RK, 1998) (<http://autodock.scripps.edu/>) para realizar nuestros cálculos de acoplamiento *in silico* de pequeños ligandos. Este programa trata como moléculas flexibles a los ligandos pero como moléculas rígidas a las proteínas donde se acoplan éstos. Para reducir el tiempo de cálculo total, empleamos una colección de pequeñas moléculas conocidas como el conjunto de la base de datos “Diversity” del National Cancer Institute. Como control de este análisis computacional se usó el sustrato natural de

las HKs, la molécula de ATP, y su energía de acoplamiento se utilizó como referencia.

3.4.1. Preparación de los modelos estructurales de las proteínas para el cálculo.

Los modelos estructurales de las HKs a analizar se obtuvieron del PDB (Protein Data Bank) o fueron generados por mi u otros miembros del laboratorio. De estos PDBs se tomó un solo monómero representativo, si contenía varios, y se eliminaron todas aquellas partes del modelo que no correspondiese al dominio CA.

Estos modelos fueron preparados con el programa Autodock Tool para el cálculo, siguiendo el manual del programa. Este proceso requirió la agregación de átomos de hidrógeno, si no estaban presentes, agregación de cargas parciales y de parámetros de solvatación. A continuación se calcularon las cargas parciales de Kollman, se determinaron los átomos de hidrógeno polares, es decir, aquellos unidos a átomos electronegativos que pueden participar en interacciones por puente de hidrógeno. Los átomos de hidrógeno no polares se trataron de manera implícita, es decir, fueron eliminados de la estructura y su efecto fue sumado a los átomos a los que estaban unidos.

3.4.2. Preparación de los sustratos para los cálculos.

Se adicionaron hidrógenos polares y cargas parciales de Gasteiger a la totalidad de los PDBs de los ligandos presentes en la base “Diversity”, mediante el programa AutoDock Tools, al igual que se definieron las porciones rígidas de la molécula (*grids*) y los enlaces que presentaban libre rotación.

Parámetros del algoritmo Genético y Lamarckiano		
Ga_pop_size	Número de individuos en la población	50
Ga_num_evals	Número máximo de energías evaluadas	250,000
Ga_num_generations	Número máximo de generaciones	27,000
Ga_elitism	Número de individuos que sobreviven automáticamente	1
Ga_mutation_rate	Ratio de mutación	0,02
Ga_crossover_rate	Ratio de cruce	0,80
Ga_window_size	Número de generaciones para los peores individuos	10
Ga_cauchy_alpha	Media de la distribución	0
Ga_cauchy_beta	Varianza de la distribución	1
Parámetros de búsqueda local		
Sw_max_its	Número de interacciones de la búsqueda local	300
Sw_max_succ	Número de sucesos consecutivos	4
Sw_max_fail	Número de sucesos fallidos consecutivos	4
Sw_rho	Talla del espacio de búsqueda de local para la muestra	1,0
Sw_lb_rho	Menor unión en rho	0,01
Ls_search_freq	Probabilidad de realizar la búsqueda local en un individuo	0,06

Tabla 3. Parámetros de Autodock para el acoplamiento

Los *grids* fueron aproximadamente centrados en las coordenadas del bolsillo hidrofóbico donde se ubica la molécula del ATP de cada

estructura cristalina, donde la talla de estos *grids* tenía un valor promedio de: 100 x 80 x 100 (\AA^3).

3.4.3. Análisis por acoplamiento

Una vez preparados los ficheros correspondientes a las HKs y los sustratos, se definieron los *grids* o áreas de acoplamiento, que delimitan el área de búsqueda o donde el sustrato puede ser acoplado dentro de la molécula. Estos *grids* fueron centrados aproximadamente en las coordenadas del bolsillo hidrofóbico donde se ubica la molécula del ATP de cada estructura cristalina, con un tamaño aproximado de 100 x 80 x 100 (\AA^3), que en la práctica ocupaba casi la totalidad de la molécula. Tras definir los *grids* se realizó el acoplamiento de todos los ligandos en cada una de las proteínas utilizando el programa AutoDock 3.0 con los parámetros definidos en la tabla 3 y un algoritmo de búsqueda Genético-Lamarckiano. AutoDock generó un archivo de resultados donde se encontraban las 11 estructuras acopladas por ligando con energías de unión más favorables. Los complejos tridimensionales enzima-ligando, con energías de acoplamiento más favorables, fueron visualizados con el programa COOT para comprobar su lugar de unión y si este correspondía al centro catalítico de las HKs.

3.5. ENSAYOS DE FOSFORILACION Y FOSFOTRANSFERENCIA UTILIZANDO (γ - ^{32}P) ATP

De forma general los ensayos de fosforilación se realizaron en tampón de fosforilación (tabla 2) iniciando la reacción al añadir ATP y γ - ^{32}P ATP (3000 Ci/mmol Perkin Elmer, Wellsley, MA) a diferentes actividades específicas y concentraciones de ATP dependiendo del

ensayo. Durante el transcurso de la reacción, las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente y se cogieron alícuotas a diferentes tiempos. Las reacciones de fosforilación se pararon al añadir a las muestras un cuarto de volumen de tampón de carga SDS-PAGE para posteriormente ser cargadas en un gel SDS-PAGE. Para visualizar las bandas fosforiladas en los geles de electroforesis, éstos se secaron y después se revelaron mediante autorradiografía electrónica utilizando un Fluoro Image Analyzer FLA-5000 (Fuji, FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf, Alemania). La intensidad de las bandas se cuantificó con el programa MultiGauge Fujifilm (Fuji).

3.5.1. Cálculo del IC₅₀

Para el cálculo de los IC₅₀ de los diferentes compuestos propuestos por los resultados del programa AutoDock, se utilizó la proteína HK853^{CP} (concentración final 9,4µM). Los ensayos de fosforilación se realizaron como se indican en el aparato anterior, complementando el cocktail de reacción con diferentes concentraciones de inhibidor (10mM, 1mM, 0,1mM, 0,01mM, 1µM, 0,1µM y 0µM) e iniciando la reacción tras la adición de 50µM de ATP y 0,1 mCi/ml de γ-[³²P] ATP (concentración final). Las reacciones fueron paradas a un tiempo de 15 segundos.

3.5.2. Ensayos de autofosforilación de NblS

Los ensayos de autofosforilación se realizaron siguiendo en protocolo general indicado al inicio de esta sección. En resumen, las diferentes construcciones de NblS, a una concentración final de 3.4µM, se autofosforilaron en tampón de fosforilación (tabla 2) a 25°C, iniciando la reacción por la adición de γ-[³²P] ATP a concentraciones de 1µM a

1mM. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, hasta un máximo de 30 minutos, y la reacción fue detenida al añadir tampón de carga SDS-PAGE. Las muestras se cargaron en un gel SDS-PAGE y se visualizaron los resultados.

3.5.3. Ensayos de fosfotransferencia para la identificación del RR que actúa con NblS

Las proteínas NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ y NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ (3,4μM concentración final) se autofosforilaron durante 1 hora, a 25°C, en tampón de fosforilación, en presencia de 0,3mM ATP y 0,3mCi/ml γ-ATP. Para eliminar el exceso de ATP, tras la autofosforilación, cada muestra fue sometida a exclusión molecular utilizando una columna PD SpinTrapTM (resina G-25 Medium SephadexTM; GE healthcare) equilibradas con tampón de fosforilación. Para iniciar la reacción de fosfotransferencia, las diferentes fosfo-HKs se incubaron con los RRs (RpaBRD, RpaARD y SrrARD) en cantidades equimoleculares en tampón de fosforilación. Las reacciones fueron paradas a diferentes tiempos con la adición de tampón de carga SDS-PAGE. Las muestras fueron resueltas mediante SDS-PAGE y visualizadas.

3.6. FOSFORILACION CON ACETIL-FOSFATO

3.6.1. Ensayos no radiactivos

Para estos ensayos las diferentes proteínas fueron fosforiladas en presencia de tampón fosfato AcP complementado con acetil-fosfato (AcP) a una concentración final de 12,5mM durante 3 horas a 4°C. Para poder

medir el estado de fosforilación de las muestras por este método se realizaron diferentes ensayos:

3.6.1.1. Geles nativos

Pasadas 3 horas de incubación con AcP, se adicionó $\frac{1}{4}$ de volumen de tampón de carga Nativo-PAGE y las muestras fueron sometidas a electroforesis Nativo-PAGE, en geles al 10% durante 2 horas a 4°C. En este tipo de electroforesis, algunas proteínas fosforiladas migran más lentas que sus formas sin fosforilar.

Todos los geles fueron teñidos con Coomassie-Blue y fueron explorados utilizando un procesador de imagen Fujifilm LAS-3000 Imager (Fuji, FUJIFILM Europe GMBH, Düsseldorf, Alemania). Posteriormente se realizó la cuantificación de la intensidad de las bandas de proteína en los geles con el programa MultiGauge Fujifilm.

3.6.1.2. Geles bidimensionales

Para evaluar la fosforilación mediante electroforesis en geles bidimensionales, las proteínas se fosforilaron durante 3 horas en un volumen final de 10 μ l. Las reacciones se pararon tras la adición de tampón de lisis, DTT y electrolitos pH 4-7. Como control se usaron las mismas muestras sin fosforilar.

Las diferentes muestras fueron sometidas a isoelectroenfoque, en la primera dimensión, en una Immobiline Drystrip de 7cm (pH 4.0-7.0; GE Healthcare) en un Ettan IPGphor (Amershan Biosciences) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras fueron sometidas a 500V para 0,25 kWh, 1000V para 0,5 kWh y 6000V para 7,5 kWh a una temperatura de 20°C. Para la segunda dimensión las muestras fueron sometidas a geles SDS-PAGE de acrilamida al 15%.

Los geles fueron teñidos con Coomasie-Blue y las imágenes fueron analizadas usando un sistema de imagen Fuji LAS-3000 y el programa MultiGauge Fujifilm para su cuantificación.

3.6.1.3. Cromatografía de exclusión molecular

Para la cromatografía de gel exclusión molecular se usó una columna Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare) equilibrada con tampón de exclusión y calibrada con una mezcla de estándares de masa molecular que contenían: Blue Dextran 2000(2000kDa), β -amilasa (200kDa), alcohol deshidrogenasa (150kDa), BSA (66kDa), anhidrasa carbónica (29kDa), citocromo C (12,4kDa) y ATP (0,57kDa).

Para medir el efecto del AcP, las muestras fueron pre-incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con AcP, a una concentración final de 12,5mM, y en presencia de 5 mM $MgCl_2$ antes de inyectarlas en la columna. Las muestras fueron inyectadas individualmente y eluidas con tampón de exclusión y su elución fue monitorizada a una longitud de onda de 280nm. Los tiempos de retención fueron medidos en el programa Unicorm y las diferentes fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE para corroborar que el pico de absorción correspondía a la proteína inyectada.

3.6.2. Ensayos radiactivos

3.6.2.1 Síntesis de acetil-fosfato marcado radiactivamente:

El acetil-fosfato radiactivo ($[^{32}P]$ -AcP) se sintetizó de forma enzimática utilizando acetato quinasa y siguiendo el protocolo descrito por (Jagadeesan *et al.*, 2009). Básicamente, el $[^{32}P]$ - AcP se obtuvo por la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente de 1.5 U acetato

quinasa (Sigma) con 10 μl [γ - ^{32}P]-ATP (111 TBq mmol^{-1} ; Perkin Elmer) en tampón TKM, que contiene 6,6 mM de acetato potásico, en un volumen final de 200 μl . Para eliminar el acetato quinasa, la mezcla fue sometida a centrifugación en un Microcon YM-10 (Millipore) durante 30 minutos a máxima velocidad. El filtrado fue guardado a -20°C y utilizado en un plazo máximo de 48 horas.

3.6.2.2. Estabilidad de la fosforilación en los RR RpaB y SrrA

Para determinar la vida media de la fosforilación de los RRs, 2,8 μM de cada uno de ellos fue fosforilado con [^{32}P]-AcP en tampón de fosforilación AcP durante 60 min. Las reacciones fueron paradas a diferentes tiempos tras la adición de tampón de carga SDS-PAGE, a temperatura ambiente, hasta un total de 19 horas. Las muestras se cargaron en un gel SDS-PAGE y se visualizaron los resultados.

3.6.2.3. Actividad fosfatasa

Para evaluar la actividad fosfatasa primero se fosforilaron los RRs (2,8 μM) con [^{32}P]-AcP durante 1 hora a 25°C , como se indica en los apartados anteriores. El exceso de [^{32}P]-AcP no utilizado fue eliminado mediante exclusión molecular utilizando columnas PD SpinTrapTM (resina G-25 Medium SephadexTM; GE healthcare). A continuación, a los [^{32}P]-RR resultantes se les añadió 2,8 μM de HK en tampón de fosforilación AcP para iniciar la reacción. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y las reacciones fueron paradas por la adición de tampón de carga SDS-PAGE. Las muestras fueron resueltas por SDS-PAGE y se visualizaron los resultados.

3.7. ENSAYOS DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

Las sondas que contaban con las secuencias de los promotores *srrA* y *hliA* de *S. elongatus* (nucleótidos -52 al -30 y -61 al -31 relativo al sitio de inicio de la transcripción, respectivamente) fueron preparadas mediante la hibridación de cantidades equimoleculares de oligonucleótidos complementarios marcados con fluoresceína en el extremo 5': SrrA-probe-Flc (+): SrrA-probe-Flc (-) y HliA-probe-Flc (+): HliA-probe-Flc (-). Las reacciones de unión comenzaron con la mezcla de la proteína recombinante RpaB^{FL} (desde 13,3 hasta 166,6 pmoles) con 50 fmoles de sonda marcada con fluoresceína y 1 µg de poly(dI-dC) en un volumen final de 20 µl en tampón de unión durante 30 minutos a 4°C. Para los ensayos de competición, RpaB^{FL} en tampón de unión fue preincubado con un exceso (x25 ó x250) de un fragmento de ADN competidor no marcado, durante 30 minutos. Los complejos de ADN-proteína fueron resueltos en un gel nativo al 6% de poliacrilamida en tampón 0,5X TBE durante 1 hora a 100V y 4°C. Los geles fueron visualizados en el Fuji-Film FLA3000 (Ex 473nm; filtro Y520).

3.8. MODELADO Y ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL

3.8.1. Modelado de la estructura tridimensional de NblR

El modelo de la estructura tridimensional del dominio receptor de NblR fue producido por una combinación de modelos estructurales superpuestos por el Swiss-Model (Kopp & Schwede, 2004) y MOBASE (Pieper et al., 2004). Este modelo inicial fue posteriormente sujeto a

minimizaciones de energía usando el programa CNS (Brunger et al., 1998). La calidad del modelo final fue evaluada usando el programa PROCHECK (Morris et al., 1992).

3.8.2. Modelado de la estructura tridimensional de SipA

Los modelos de la estructura tridimensional de SipA se construyeron introduciendo la secuencia de la proteína SipA de *Synechococcus sp. PCC7942* (secuencia de referencia NCBI: YP_400213.1) en los servidores MODWED (Eswar *et al.*, 2003) y SAM-T08 (Karplus, 2009). Los modelos resultantes se compararon, analizaron y validaron utilizando programas del paquete CCP4 (1994b) y Vadar (Willard *et al.*, 2003).

3.8.3. Superposición de estructuras y alineamientos estructurales

La comparación de estructuras tridimensionales se realizó por la superposición de estas utilizando el programa LSQKAB dentro del paquete CCP4 (1994a) y los PDBs indicados en cada caso. En todos los casos se superpusieron los carbonos alfa de cada estructura. Los alineamientos estructurales se generaron a partir de las superposiciones indicando que residuos se superponían en las estructuras.

3.9. ENSAYOS DE CRISTALIZACION

La búsqueda de las condiciones iniciales de cristalización de las diferentes proteínas se abordó a 21°C utilizando el método de difusión de vapor de la gota sentada en placas Greiner CrystalQuick 96 pocillos y los kits comerciales: The JCSG+ Suite (Quiagen), Research Crystal Screen

HT (Hampton Research, Aliso Viejo, CA), Custom I y II (Axygen Biosciences), Index (Hampton Research), Nextal PEG (Quiagen) y Protein complex suite (Quiagen). Las diferentes gotas de cristalización se prepararon mezclando a partes iguales la proteína y la mezcla de cristalización en un rango que podía oscilar entre 0.3-1 μL . Las condiciones de cristalización que rendían cristales o pseudo-cristales fueron optimizadas mediante el método de difusión de vapor de la gota colgante en placas VDX de 24 pocillos, utilizando matrices diseñadas específicamente a partir de las condiciones iniciales.

3.10. RECOGIDA DE DATOS DE DIFRACCION, PROCESADO Y TRAZADO DE ESTRUCTURAS

3.10.1. Criopreservación de cristales

Para la recogida de los datos de difracción los cristales fueron preservados en nitrógeno líquido. En caso necesario, para evitar la formación de hielo en el interior de cristal, estos fueron transferidos previamente en una solución crioprotectora, que de forma habitual, incluía las condiciones de cristalización suplementada con moléculas crioprotectoras (glicerol, sacarosa, etilenglicol,...). Para cada condición de cristalización, las condiciones del crioprotector fueron determinadas con anterioridad en base a que la solución no se congelara a temperaturas de 100 K y que los cristales fueran estables en ellas.

3.10.2. Recogida de datos de difracción

La capacidad de difracción de los cristales fue probada en el difractómetro de ánodo rotatorio Bruker instalado en el IBV o

directamente en el sincrotrón ESRF de Grenoble (Francia). En este sincrotrón se utilizaron diferentes líneas (ID14, ID23, ID29, BM16, BM14 y BM30) dependiendo de la asignación del tiempo. Todos los juegos de datos completos de difracción fueron recogidos en líneas del sincrotrón. Los cristales producidos con proteínas que contenían seleniometoninas fueron recogidos mediante un experimento de difracción anómala a varias longitudes de onda (MAD) (Hendrickson, 1991) (Hendrickson, 1997) en líneas que permitían variar este parámetro (BM16, ID29, ID23-1, etc...). Para elegir las longitudes de onda adecuadas, para obtener las diferencias anómalas, se realizó un espectro de fluorescencia sobre dicho cristal. Las longitudes de onda escogidas correspondieron al punto máximo del pico de absorción del átomo de Se, al punto de inflexión del pico y a un valor remoto donde la absorción del Se es mínima. Por otro lado, los datos de las proteínas silvestres fueron recogidos a una sola longitud de onda en las diferentes líneas del sincrotrón, dependiendo de la disponibilidad. En todos los casos los cristales se mantuvieron a 100 K durante toda la toma de datos.

3.10.3. Procesado de datos y trazado de estructuras

Para determinar la estructura a partir de los datos de MAD se indexaron e integraron los espectros de difracción a diferentes longitudes de onda con el programa Mosflm (Leslie, 1992) y se escalaron con Scala (1994a) en modo anómalo. Con estos espectros se calcularon unas fases iniciales utilizando el programa SOLVE (Terwilliger and Berendzen, 1999), fases que después se mejoraron con el programa RESOLVE (Terwilliger, 2000).

En el caso de tener datos a mayor resolución, provenientes de otro cristal isomorfo, las fases obtenidas se transfirieron a estos datos y

fueron extendidas a su máxima resolución mediante técnicas de extensión de fase por modificación de la densidad electrónica, utilizando el programa DM del paquete CCP4. Durante la extensión de fase se utilizaron algoritmos de aplanamiento de solvente, simetría no cristalográfica e Histogram matching.

Estas fases modificadas fueron utilizadas para calcular mapas de densidad electrónica. Si la calidad y resolución de estos mapas era suficiente, se utilizaron programas de trazado automático como ARP/wARP para la construcción del modelo inicial. Este modelo fue completado y refinado combinando programas de CNS (Brunger et al., 1998), REFMAC5 (Murshudov et al., 1997) y trazados manuales con COOT (Emsley and Cowtan, 2004). Se realizaron varios ciclos de trazado y refinado automático, con adición de solvente, hasta que se asignó la totalidad de la densidad electrónica, la geometría del modelo era correcta y los valores de refinado eran adecuados y convergían. La geometría final del modelo fue comprobada utilizando el programa PROCHECK del paquete CCP4.

Para determinar las estructuras para las que se disponía de modelos moleculares similares, las fases iniciales se obtuvieron mediante reemplazo molecular con el programa MolRep del paquete CCP4. El refinado del modelo fue realizado del mismo modo descrito anteriormente, y el trazado se realizó con el programa COOT.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESTRUCTURA DE LA PORCIÓN CITOPLASMÁTICA DE LA HISTIDINA QUINASA SrrB

El primer paso en la transducción de la señal mediada por un TCS implica la autofosforilación de la HK sensora. La resolución de la estructura tridimensional de la porción catalítica (CP) de HK853 (HK853^{CP}) (Marina et al., 2005), permitió proponer un modelo de la conformación de autofosforilación de las HKs. Este modelo estaba basado en los datos bioquímicos disponibles de las HKs EnvZ y NtrB, los cuales demostraban que la reacción de autofosforilación se realizaba mediante un mecanismo *trans* dentro del dímero de HK, es decir, una subunidad del dímero fosforilaba a la otra subunidad (Cai & Inouye, 2003, Ninfa *et al.*, 1993). El modelo de autofosforilación se realizó mediante el acoplamiento del dominio CA de una subunidad con el dominio DHp de la subunidad contraria, alineando el fosfato γ de una molécula de ATP, en CA, con la His fosforilable en DHp (Marina et al., 2005). Sin duda, esto era sólo un modelo estructural para comprender cómo se llevaba a cabo la reacción de autofosforilación. Estudios bioquímicos realizados por nuestro laboratorio con HK853^{CP} (Casino et al., 2009), ponían de manifiesto que para esta HK la reacción de autofosforilación ocurría en *cis* (cada subunidad se fosforilaba así misma dentro del dímero) y no en *trans*, como hasta entonces se había propuesto. Tras estos sorprendentes resultados nos preguntamos si la *cis*-autofosforilación era común a otras HKs o HK853 era un caso excepcional. Para responder a esta pregunta buscamos HKs que presentaran alta homología de secuencia con HK853, en concreto con su dominio DHp, ya que partíamos de la idea que la *cis* o *trans* fosforilación venía marcada por la estructura de este dominio

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(Casino et al 2009), en concreto por el tamaño del lazo conector entre las dos hélices α que lo conforman. Una de las proteínas elegidas fue la HK SrrB de *Staphylococcus aureus* (Figura 10A), que como muestra la figura 9 presenta una homología de más del 70 % en su dominio DHp, además de un tamaño similar en el lazo que conecta las dos hélices α .

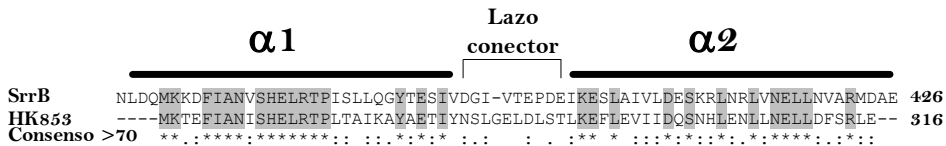


Figura 9. Alineamiento estructural del dominio DHp de la HK SrrB y HK853. En gris se muestran los residuos conservados entre ambas secuencias. También se indica el lazo conector entre ambas hélices teniendo un tamaño similar en las dos HKs.

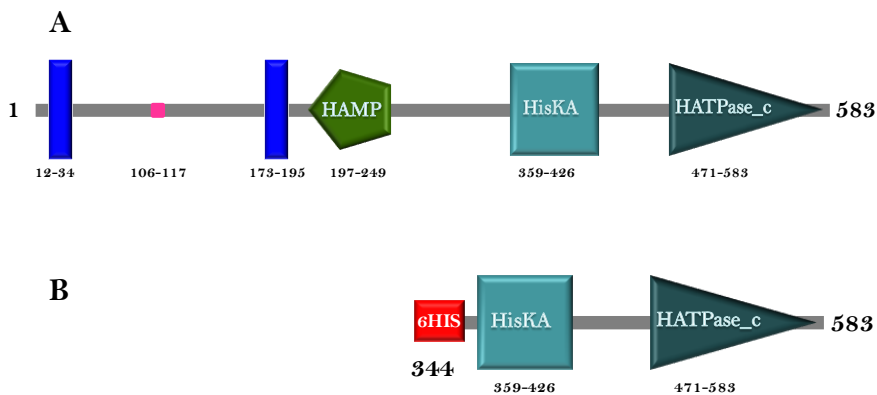


Figura 10. Esquema de la organización de dominios en la HK SrrB. En A) podemos observar todos los dominios de los que consta SrrB nombrados con la nomenclatura de PFAM. Para cada uno de ellos se indican los aminoácidos que los delimitan. En B) se muestran los dominios pertenecientes a la porción catalítica, SrrB^{CP}, que se clonaron para abordar su cristalización. 6His hace referencia a la etiqueta de 6 residuos de His que se añadió para facilitar su purificación.

Nuestro objetivo era determinar la estructura de esta proteína así como su mecanismo de autofosforilación, esperando que estos datos, junto con la comparación de las estructuras de las porciones catalíticas (CP) de otras HKs, nos ayudaran a comprender mejor las bases moleculares de la direccionalidad en la autofosforilación de estas proteínas.

4.1.1. Clonación, expresión y purificación

Decidimos clonar la porción catalítica de SrrB (SrrB^{CP}) (Figura 10B) desde el residuo 344 al 583, que incluía el dominio CA de unión a ATP y el dominio de dimerización DHp. Esta porción correspondía a un fragmento similar al cristalizado en el caso d HK853^{CP}. Se diseñaron cebadores específicos y mediante PCR se amplificó su secuencia desde ADN genómico de *S.aureus*. El inserto amplificado que contenía la secuencia de ADN de SrrB^{CP} se introdujo en el vector pPROEX-HTc en pauta de lectura con una cola de 6 histidinas en posición N-terminal que nos sería muy útil para la posterior purificación de la proteína resultante.

Después de comprobar por secuenciación la correcta clonación de SrrB^{CP}, el plásmido resultante (pSrrB^{CP}) se introdujo en la cepa de expresión de *E.coli* RIL, y se procedió a su expresión mediante un protocolo estándar (1mM IPTG; 37°C por 3 horas).

Como ya hemos dicho, el plásmido pPROEX-HTc introducía una cola de 6 histidinas en posición N-terminal, lo que nos facilitó su purificación completándose en tan solo dos pasos cromatográficos: una columna de afinidad seguida de una columna de exclusión molecular (ver materiales y métodos). Estos pasos de purificación fueron suficientes para obtener la proteína en más de un 95% de pureza (según geles de SDS-

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PAGE teñidos con Coomasie Blue) y con un rendimiento de 10mg de proteína por litro de cultivo, tanto la proteína nativa como la proteína que contaba selenio-metioninas (SrrB^{CP}-SeMet), siendo esta pureza y cantidad suficientes para realizar los diferentes ensayos de cristalización y enzimáticos.

4.1.2. Ensayos de cristalización

Las condiciones iniciales de cristalización de SrrB^{CP} fueron encontradas utilizando la matriz comercial Crystal Screen HT de la casa Hampton. Las gotas de cristalización, tanto en la búsqueda de las condiciones iniciales como en la posterior optimización de dichas condiciones, se prepararon complementando nuestra proteína (10mg/ml) con 5mM de AMP-PNP (adenosín 5'-(β,γ -imido) trifosfato), un análogo no hidrolizable del ATP, y 5mM MgCl₂.

La matriz inicial puso de manifiesto condiciones donde se podía observar la aparición de cristales en tan sólo 24 horas. La condición D4 del cribado, 20% Isopropanol, 0.1M Citrato sódico pH 5.6, 20% Polietilen glicol 4000 (PEG4K), que rindió pseudo-cristales se optimizó por el método de difusión de vapor en gota colgante en placas de VDX de 24 pocillos, variando tanto la cantidad y tipo de precipitantes (Polietilen glicol y alcoholes de pequeño peso molecular) como el rango de pH.

Las condiciones optimizadas que rendían cristales con una capacidad de difractar los rayos X a una mayor resolución fueron: 20% PEG 4K, 15% Metilpentanodiol (MPD), 0,1M Citrato sódico pH 5,6. Los cristales producidos tenían un tamaño máximo 0,4 micras (en gotas de 2

μl) y una forma de paralelepípedo, necesitando tan solo 16 horas para su formación (Figura 11).

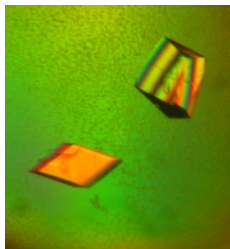


Figura 11. Cristales de SrrB^{CP}. Se muestra una imagen de los cristales característicos de SrrB^{CP} obtenidos en 20% PEG 4K, 15% Metilpentanodiol (MPD), 0,1M NaCitrato pH 5,6.

4.1.3. Difracción de cristales de SrrB^{CP}

Para la difracción de los cristales a alta resolución se utilizó radiación de sincrotrón en la línea BM16 del Sincrotrón ESRF (Grenoble, Francia). Para disminuir los daños producidos por esta intensa fuente de rayos X, los cristales se congelaron en nitrógeno líquido y fueron mantenidos a 100 K durante el proceso de recogida de datos, no siendo necesario sumergir los cristales en una solución crioprotectora, previa a la congelación, para evitar la formación de hielo, ya que la propia solución madre de cristalización era crioprotectora. En estas condiciones y con esa fuente de rayos X se consiguió que los cristales difractaran hasta una resolución máxima de 2 Å.

Una vez obtenidas las primeras imágenes de la difracción se realizó el indexado de las mismas utilizando el programa Mosflm (Leslie, 1992). Los cristales pertenecían al grupo espacial $P2_1$ con unas dimensiones de celda de $a=61,2\text{Å}$ $b=58,9\text{Å}$ $c=70,9\text{Å}$ con $\alpha=\gamma=90^\circ$ y $\beta=102,9^\circ$. De acuerdo con las dimensiones de celda, el grupo espacial y el

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

peso molecular de la proteína (27154Da), en la unidad asimétrica existiría espacio para 1 o 2 moléculas de SrrB^{CP} con valores de solvente de 73,08 y 46,16 % respectivamente, según cálculos realizados con el programa Mattheus_coeff (1994a). Dado el carácter dimérico de la porción catalítica de las HKs, todo indicaba que probablemente existiría un dímero de SrrB^{CP} en la unidad asimétrica que correspondía a la unidad biológica de la molécula.

Una vez recogido un juego completo de datos de difracción realizamos el procesado de los mismos, como primer paso hacia la obtención del mapa de densidad electrónica que permitiera el trazado de la estructura tridimensional de la proteína. Para obtener las fases optamos por la estrategia de la dispersión anómala a diferentes longitudes de onda (MAD) ya que los intentos por resolver la estructura por reemplazo molecular fueron infructuosos. La técnica de MAD se basa en la propiedad que tienen los átomos que se encuentran en las proteínas que forman el cristal, ya sea de forma natural (Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo) o incorporada (Se, Hg, Br, Kr, lantánidos, etc.), de producir una dispersión anómala de los rayos X cuando se irradian a longitudes de onda (λ) donde estos absorben (Hendrickson, 1991, Hendrickson, 1997). Los cambios que se provocan en la intensidad de la difracción al introducir átomos pesados en los cristales de proteína se pueden considerar como modificaciones químicas de la difracción. De modo análogo, se pueden provocar cambios en las intensidades de la difracción modificando las propiedades físicas de los átomos. De este modo, si la radiación X incidente tiene una frecuencia próxima a la frecuencia natural de oscilación de los electrones de un determinado átomo, se

produce la denominada dispersión anómala, que modifica el factor de dispersión atómico, f_j , de tal modo que su expresión se ve modificada con dos términos, f' y f'' , que dan cuenta de las componentes real e imaginaria, respectivamente, de la fracción anómala del factor de dispersión. Este método de MAD implica la medida de los datos de difracción de un cristal de proteína (que contenga un dispersor anómalo fuerte) usando radiaciones de distintas energías: la que maximiza f'' , la que minimiza f' y una energía lejana de estas dos. Combinando estos conjuntos de datos de difracción, y en concreto analizando las diferencias entre ellos, es posible calcular la distribución de amplitudes y fases que generan los dispersores anómalos. El uso posterior de las fases generadas por estos dispersores anómalos, como una primera aproximación a las fases globales, permite calcular la densidad electrónica para toda la proteína.

Decidimos utilizar el Selenio (Se) como átomo anómalo, ya que en las proteínas recombinantes se puede introducir fácilmente sustituyendo las metioninas por seleniometioninas (SeMet), sin que este cambio suela afectar a la capacidad de cristalizar de la proteína modificada. El Se presenta una f'' máxima de $6 e^-$ en el borde de absorción K del selenio. Para que la contribución anómala sea lo suficientemente fuerte para permitir el cálculo de las fases, se necesita alrededor de un átomo de Se, es decir, una metionina por cada 50-100 residuos. SrrB^{CP} contiene 196 residuos con 13 metioninas, de manera que la señal producida por una sustitución total de las Met por SeMet sería suficiente para el cálculo de fases.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	SrrBSe-met			SrrBnativa
λ (Å)	$\lambda_1=0.9797$	$\lambda_2=0.9799$	$\lambda_3=0.9501$	$\lambda=0.95296$
Rango de resolución (Å)	50.767-2.2 (2.28-2.2)	50.767-2.2 (2.27-2.2)	44.992-2.2 (2.27-2.2)	69.01-2 (2.1-2.0)
R_{merge} (%)	7.4(34.8)	7.6(35.8)	9.9(56.3)	5.2 (34.6)
$I/\sigma(I)$	19.3 (5.3)	19.3 (5.3)	15.8 (3.4)	19.9 (3.7)
Nº reflexiones (observadas/únicas)	200291/26831 (28711/3857)	199899/26831 (28719/3857)	200250/26833 (28737/3857)	132910/33780 (19809/4923)
Completitud	100 (100)	100 (100)	100 (100)	99.9 (99.9)
Multiplicidad	7.5 (7.4)	7.5 (7.4)	7.5 (7.5)	3.9 (4)
Completitud anómala	100 (100)	100 (100)	100 (100)	
Multiplicidad anómala	3.8 (3.8)	3.8 (3.8)	3.8 (3.8)	

Tabla 4. Datos correspondientes a la difracción anómala MAD y nativa. Los valores entre paréntesis corresponden a la capa de mayor resolución. ($R_{\text{merge}} = (\sum |I - \langle I \rangle|) / \sum I$)

SrrBCP-SeMet producía cristales en las mismas condiciones que la proteína nativa. La sustitución de las Met por SeMet fue confirmada por espectroscopía de masas realizada por el Dr. Juan José Calvete en el IBV-CSIC. Los datos de difracción para MAD se recogieron a tres λ s (máximo de difracción anómala, máximo de dispersión y alejado de estas longitudes, denominados como λ_{pico} (λ_1), $\lambda_{\text{inflexión}}$ (λ_2) y λ_{remota} (λ_3), respectivamente) (Tabla 4) alrededor de la energía de excitación K del Selenio (12.6578 KeV, 0.9795 Å) e irradiando con baja dosis ya que el cristal no debía deteriorarse durante la recogida de datos de las tres λ s.

Debido a la menor dosis, los cristales que contenían selenio-metionina fueron procesados a una resolución máxima de 2.2 Å. Por su parte los cristales de la proteína nativa, donde pudimos aumentar la dosis

de radiación ya que solo debíamos recoger un juego de datos, difractaron hasta una resolución de 2 Å (Tabla 4).

4.1.4. Cálculo de fases y trazado de la estructura

Las fases iniciales fueron calculadas con los datos de MAD y el programa SOLVE. Se corroboró que el mapa obtenido con estas fases iniciales presentaba continuidad, indicando que dichas fases eran correctas.

Estas fases iniciales fueron mejoradas mediante modificación de la densidad electrónica, proceso que se usó al mismo tiempo para extender dichas fases a una resolución de 2 Å utilizando los datos del cristal nativo. Para la modificación de la densidad electrónica utilizamos *Histogram matching*, aplanamiento de solvente y simetría no cristalográfica, calculada a partir de la posición de los Se y utilizando una máscara automática producida por el programa DM (dentro del paquete CCP4-(1994a), que fue el elegido para este proceso. Estas nuevas fases mejoradas fueron las utilizadas para generar un nuevo mapa de densidad electrónica donde trazar la estructura.

Debido a que teníamos una resolución cercana a atómica (2 Å), y buenas fases experimentales mejoradas por DM que rindieron mapas de muy buena calidad, se pudieron utilizar programas de trazado automático de proteína como ARP/wARP, con el que conseguimos un modelo inicial que cubría casi el 90% del trazado final de la proteína. Combinando ciclos de refinado con el programa Refmac5 y trazado manual con el programa Coot, se terminó de construir el modelo a una resolución de 2 Å.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Datos cristalográficos	
Grupo espacial	P2 ₁
Dimensiones de la celda (Å)	a=61.2 b=58.9 c=70.9
Ángulos (°)	$\alpha=\gamma=90$ $\beta=102.9$
Rango de resolución (Å)	69.0-2.00
Datos de afinamiento	
Rcrys (%)	19.3
Rfree (%)	24.6
N° de átomos de proteína	3268
N° de moléculas de agua	337
RMSD	
Desviación cuadrática media(Å)	0.015
Desviación de ángulos (°)	1.574
Media B-factor (Å ²)	42.7
Mapa Ramachandran	
Más favorables (%)	91.6
Permitidas (%)	7.2
Permitidas generosamente(%)	0.8
No permitidas (%)	0.3

Tabla 5. Datos cristalográficos y del refinamiento de la estructura de SrrB^{CP}.

En la estructura de SrrB^{CP} no pudieron ser trazados los residuos 344 al 355 correspondientes al inicio de la porción citoplasmática, del mismo modo tampoco pudieron ser trazados los residuos correspondientes a la tapadera del ATP (residuos 517-546) ya que la densidad electrónica para ambas zonas no era observable, indicativo de que estaban desordenadas debido a su alta movilidad. En la tabla 5 se muestran los datos del refinamiento de la estructura.

4.1.5. Descripción de la estructura

Como se esperaba, la unidad asimétrica del cristal estaba compuesta por dos monómeros de SrrB^{CP} (residuos 344-583) que se organizaban formando un dímero (figura 12). Cada subunidad estaba formada por, un dominio N-terminal DHp (residuos 344-425) y otro C-terminal CA (residuos 431-540) que estaban conectados por un lazo sin estructura muy corto, de tan solo 5 residuos (residuos 426-430).

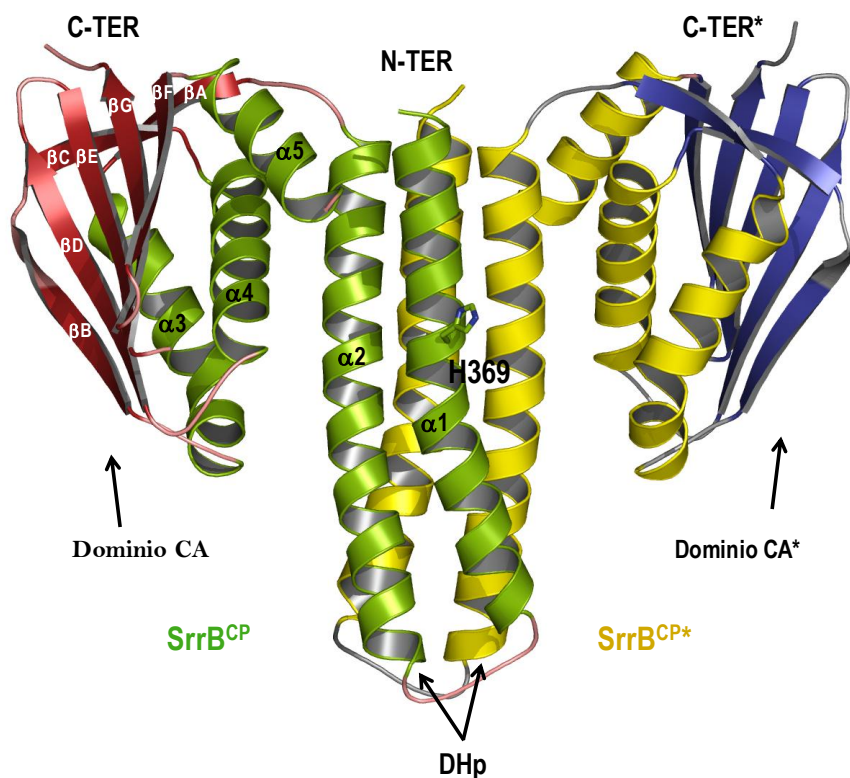
El dominio DHp, estaba formado por dos hélices antiparalelas conectadas por un pequeño lazo poco estructurado de 8 residuos (residuos 387-394). La hélice α_1 (residuos 344-386) y la hélice α_2 (residuos 395-426) se extienden $\sim 50\text{\AA}$ desde su porción N- y C-terminal, respectivamente, hasta el lazo que las conecta. La formación del dímero se produce a través del dominio DHp de cada uno de los monómeros, formándose un “haz o ramillete” de 4 hélices en el dímero. En la hélice α_1 encontramos la His369, residuo totalmente conservado dentro de las HKs en la que se ha establecido que ocurra la autofosforilación. En la estructura se observa que esta cadena lateral se proyecta hacia el exterior desde la hélice α_1 quedando expuesta al solvente.

El dominio CA (residuos 431-583) adquiere una conformación de sándwich α/β : una capa formada por hojas β alternas constituida por 5 cadenas: βB (456-467), βD (495-503), βE (507-515), βF (561-568) y βG (571-580) y otra capa formada por 3 hélices α : α_3 (436-454), α_4 (473-489) y α_5 (547-559). Además este dominio contiene un par de cadenas β antiparalelas, βA (431-435) y βC (467-471), que no forman parte de la hoja principal y que cierran la estructura por uno de sus extremos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es conocido que en este dominio CA se ubica el sitio de unión a ATP. En concreto este es un bolsillo formado por $\alpha 4$ y $\alpha 5$ y cerrado en su parte trasera por la parte C-terminal de la βE , donde se hunde la adenina del nucleótido, y por su parte delantera por una región altamente flexible y variable que interacciona con los grupos fosfato que se denomina tapadera del ATP. En nuestro caso incluimos AMPPNP-Mg en la solución de cristalización, aunque no pudimos observar densidad electrónica atribuible a esta molécula en el centro activo (Figura 13).

A



B

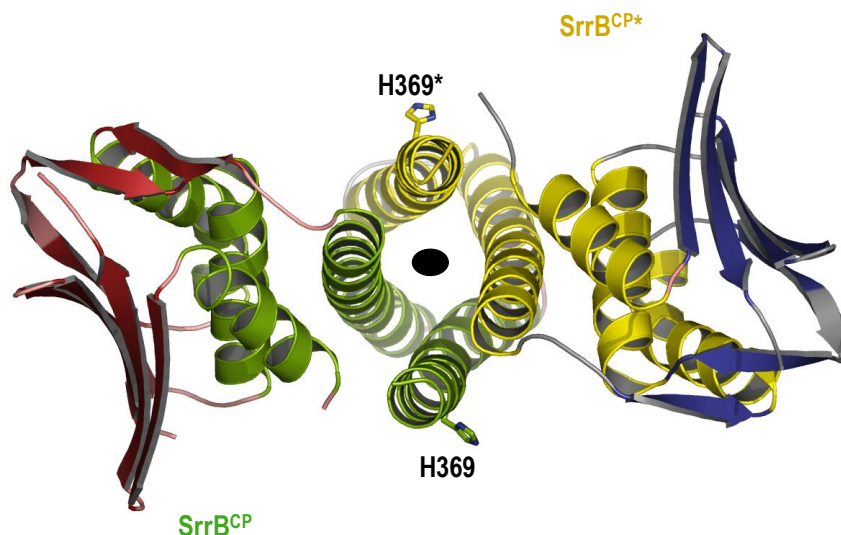


Figura 12. Estructura de la porción catalítica de SrrB. (A) Visión perpendicular a la membrana. (B) Visión de la estructura desde la membrana, girada 90° respecto a A (cada monómero se presenta en un color diferente). En el dominio DHp podemos observar la histidina fosforilable (representada en modelo de bola y palo) y en el dominio CA podemos ver el bolsillo hidrofóbico donde se alojará el nucleótido. Con círculo negro se representa el eje binario.

En nuestro caso la tapadera del ATP de SrrB^{CP} no era visible, lo que indicaría que la presencia del nucleótido, y los contactos con los grupos fosfato de éste, deben de ser necesarios para estabilizar esta estructura. Este hecho ha sido observado con anterioridad en otras estructuras del dominio CA de HK donde la no presencia del nucleótido trifosfato se correlacionaba con la desestructuración de la tapadera del ATP (Marina et al., 2005). Es más, la alta flexibilidad de este lazo hace que aun en presencia de éste en ciertos casos la tapadera no sea parcial o

totalmente visible. (Marina et al., 2005, Bilwes *et al.*, 1999, Song *et al.*, 2004).

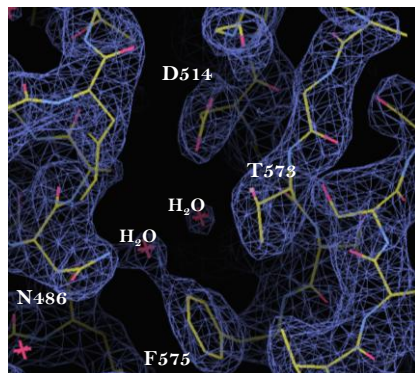
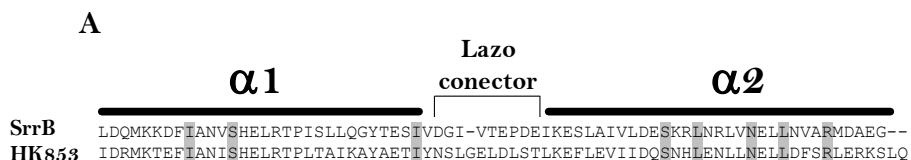


Figura 13. Detalle del centro activo de SrrB^{CP}. En la figura se representa el bolsillo hidrofóbico, del dominio CA de SrrB, donde se puede observar densidad electrónica solo explicable mediante la secuencia de la proteína y moléculas de agua.

4.1.6. Asociación dimérica de los dominios

Como se ha indicado, los dominios DHp de ambos monómeros producen un paquete o haz de 4 hélices al dimerizar. En el haz, las hélices α_1 y las hélices α_2 corren de forma antiparalela, siendo esta manera de interaccionar la que más favorece la creación de un paquete de 4 hélices (Chou *et al.*, 1988). Varios residuos de las hélices α_1 (Val364, Ser368, Ile384 y α_2 (Ser407, Leu410, Asn415, Leu418, Arg422) miran hacia el interior del haz y realizan interacciones entre ellos, estabilizando esta estructura cuaternaria. Estas posiciones se encuentran conservadas entre las HKs (Figura 14), indicando que están involucradas en la dimerización de estas proteínas (Marina et al., 2005). En estas interacciones se alterna el carácter polar e hidrofóbico permitiendo cierto grado de plasticidad,

que no podría darse si imperasen las interacciones hidrofóbicas, al haz de cuatro hélices.



B

Residuos	Distancia (Å)
Val364-Ala425	3,59
Ser368-Arg422	3,52
Ile385-Leu400	3,35
Ser407-Gln379	2,89
Leu410-Leu410	3,58
Asn415-Arg372	3,36
Leu418-Val367	3,55
Arg422-Ser368	3,62

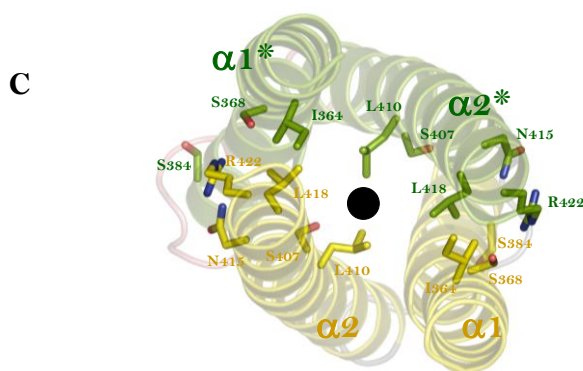


Figura 14. Interacciones entre los dominios DHp involucrados en la dimerización. (A) Alineamiento estructural de los DHp de SrrB y HK853. En gris se resaltan los residuos conservados involucrados en la dimerización. (B) Tabla donde se muestran las distancias de enlace de los residuos conservados involucrados en la dimerización. (C) Representación del haz de cuatro hélices en el dímero de SrrB^{CP} visto desde la membrana y mostrado en palos, las cadenas laterales de los residuos que interactúan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el vértice de este haz, la conexión entre las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$, presenta una conformación extendida y está formada por residuos polares expuestos y residuos hidrofóbicos enterrados (Gly388, Ile389, Val390, Thr391, Pro393) (Figura 15). Este segmento es flexible, mostrado por sus elevados factores de temperatura.

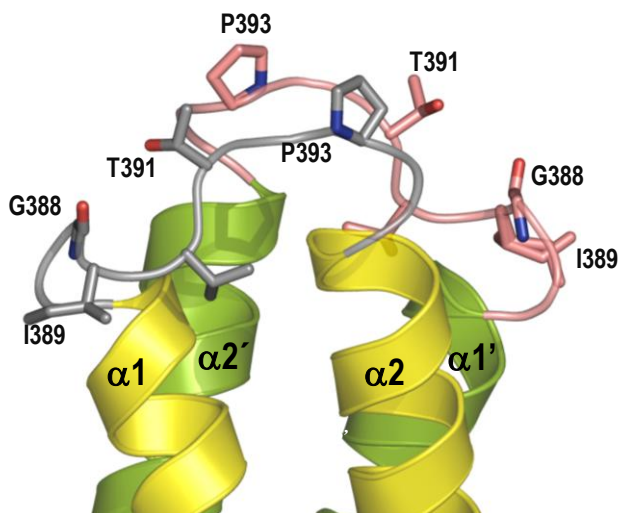


Figura 15. Detalle de los lazos conectores entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$.

4.1.7. Unión del nucleótido en el dominio CA

Los dominios CA de las HKs están altamente conservados en estructura. La estructura del dominio CA de SrrB es muy similar al dominio correspondiente en las restantes HKs que han sido depositadas en el PDB hasta la actualidad, presentando valores de RMSD inferiores a $2,126 \text{ \AA}^2$. En concreto la comparación, mediante la superposición de los C α , con todas ellas muestra valores de RMSD de $1,307 \text{ \AA}^2$ para HK853 (Marina et al., 2005), de $1,745 \text{ \AA}^2$ para PhoQ (Marina *et al.*, 2001), de $1,684 \text{ \AA}^2$ para CheA (Bilwes et al., 2001), de $1,575 \text{ \AA}^2$ para NtrB (Song et

al., 2004) y de $2,126 \text{ \AA}^2$ para DesK (Albanesi et al., 2009). Aunque nuestra estructura tridimensional no presentaba nucleótido en su centro activo, esta similitud estructural nos permitió emplazar una molécula de ADP en dicho lugar. Para ello superpusimos los Carbonos alfa del dominio de unión a nucleótido de la HK CheA, que había sido resuelta en presencia de ADP, con el correspondiente dominio de SrrB. La molécula de nucleótido ocupaba el bolsillo destinado a su unión sin ningún tipo de problema estérico, conservando además los contactos esperados entre el Asp conservado y el N1 del anillo de la adenina del ADP, interacción que da especificidad por este nucleótido (Figura 16). Resultados similares se obtuvieron con la superposición de HK853-ADP o PhoQ-AMPPNP.

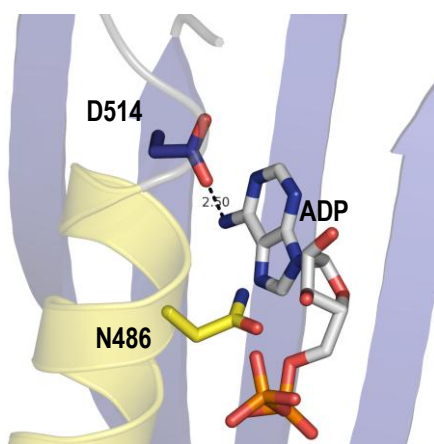


Figura 16. Colocación del nucleótido de ADP en el centro activo de SrrB por superposición con la estructura de CheA-ADP.

Cuando se emplazó la molécula de AMPPNP en el centro catalítico después de SrrB observamos que el Nε de la His369 se encontraba a tan solo 6.0 \AA del fosfato γ del nucleótido, quedando a una distancia muy próxima a la adecuada para su transferencia a la histidina

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

aceptora, como ocurre en la reacción de autofosforilación (Figura 17). Este hecho nos planteó si la conformación que presentaba SrrB^{CP} en el cristal era cercana a la que debe presentar la proteína cuando cataliza esta reacción. Si era así, el nucleótido y la histidina, que distan 6 Å y por tanto sería fosforilada, se hallaban en la misma subunidad, indicando que la autofosforilación se realizaría en *cis*.

Como se ha indicado al comienzo de este capítulo, nuestro grupo ha demostrado recientemente que dos HKs se pueden fosforilar en *cis*, frente a la asunción generalizada que todas las HKs se fosforilaban en *trans*. Por lo tanto, estos datos estructurales apoyarían la autofosforilación en *cis* y serían la visión estructural más cercana que tenemos hasta el momento de la conformación de una HK llevando a cabo esta reacción. Desgraciadamente, aunque lo hemos intentado con ahínco, aún no hemos podido determinar bioquímicamente la direccionalidad de la reacción de autofosforilación de SrrB, aunque los datos estructurales apoyan un mecanismo en *cis*.

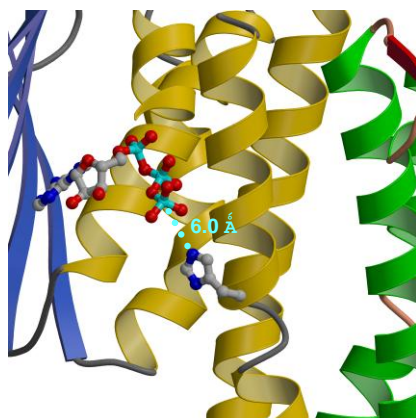


Figura 17. Distancia del AMPPCP a la Histidina fosforilable.

4.1.8. Análisis estructural de las porciones catalíticas de HKs

El estudio de la estructura de SrrB^{CP} junto con las estructuras de otras HKs ya resueltas, nos permite deducir posibles cambios conformacionales en y entre los dominios DHp y CA relacionados con las actividades catalíticas que estas proteínas. Consecuentemente, el conocimiento de los cambios estructurales necesarios para llevar a cabo estas tres reacciones puede informar sobre el mecanismo de traducción de la señal.

Teniendo en mente la idea de que SrrB^{CP} posiblemente presentaba una conformación de autofosforilación, quisimos saber qué cambios conformacionales en los dominios DHp y CA se producían, y que nuevas interacciones entre ambos dominios eran necesarias para adquirir esta nueva orientación, comparando la estructura de SrrB^{CP} con otras estructuras de HKs cristalizadas y cuyas conformaciones habían sido atribuidas a otros estados catalíticos.

Hasta el momento se conocen las estructuras cristalinas de los dominios catalíticos completos de HK853 en solitario (HK853^{CP}_libre; PDB:2c2A) o en complejo con su regulador de la respuesta (HK853^{CP}_complejo; PDB:3DGE) (Casino et al., 2009, Marina et al., 2005), KinB de *Geobacillus sterothrophilus* en complejo con la proteína inhibidora SDA (PDB:3D36) (Bick et al., 2009) y de DesK de *Mycobacterium tuberculosis* en diferentes conformaciones (Albanesi et al., 2009).

Para conocer y analizar estos cambios conformacionales se usó el programa Dyndom (*Protein Domain Motion*), que determina movimientos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de dominios, zonas y las zonas y los residuos que funcionan como bisagra en esos movimientos a partir de la comparación de dos estructuras independientes.

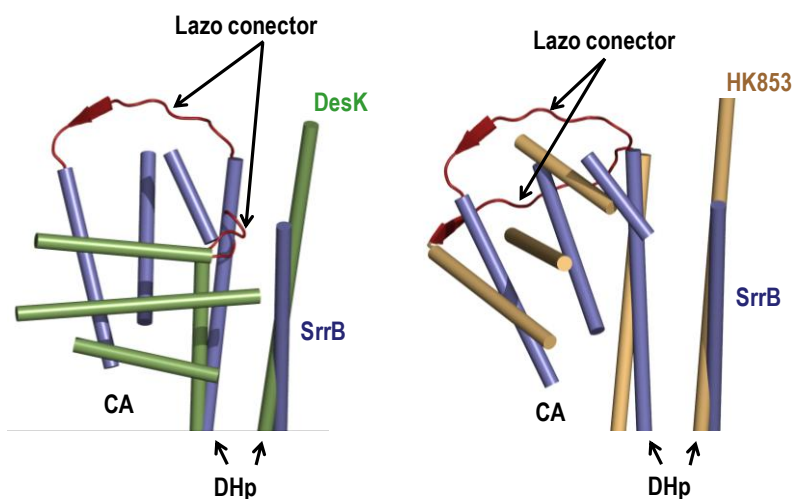


Figura 18. Superposición de SrrB^{CP}, DesK y HK853. La superposición del dominio DHp de SrrB(azul) con DesK (verde) o HK853^{CP}_libre (crema), izquierda y derecha respectivamente, pone de manifiesto distintas orientaciones del dominio CA y consiguientemente del lazo conector (coloreado en rojo) entre el dominio DHp y CA.

La superposición de las diferentes estructuras nos mostró que mientras que los dominios CA eran rígidos y apenas sufrían cambios conformacionales, los dominios DHp sufrían rotaciones y torsiones. También pudimos ver que el lazo conector entre el dominio DHp y el dominio CA no se orientaba de la misma forma en todas las estructuras, mientras que SrrB^{CP} y HK853^{CP} compartían la misma orientación, KinB y DesK presentaban el sentido contrario (Figura 18). Aunque no conocemos para todas estas HKs si su mecanismo de autofosforilación es

en *cis* o *trans*, el hecho que se haya propuesto que DesK se autofosforile en *trans*, y el los datos que indican que HK853 se fosforile en *cis* y posiblemente SrrB también, nos hacen pensar que esta diferencia en la disposición relativa de los dominios DHP y CA pueda estar relacionada con la direccionalidad de la reacción de autofosforilación. Por esta razón restringimos nuestras comparaciones al grupo de estructuras que presentaban una disposición relativa entre dominios similares y comparamos las siguientes estructuras:

1. SrrB^{CP} resuelta en este trabajo y que proponemos presenta una conformación del proceso de autofosforilación

2. HK853^{CP}_libre, cristalizada en solitario. Esta estructura ha sido propuesta como una visión de la HK “fosforilada” esperando al RR para transferirle el grupo fosforilo (Marina et al., 2005).

3. HK853^{CP}_complejo, que corresponde a HK853 cristalizada en presencia de su RR compañero, RR468. Esta estructura ha sido propuesta como una visión de la reacción de defosforilación (Casino et al., 2009).

4.1.8.1. Comparación de las estructuras de SrrB^{CP} y HK853^{CP}

Un primer análisis nos permitió observar que los cambios conformacionales entre las estructuras SrrB^{CP} y HK853^{CP} implicaban principalmente dos tipos de movimientos. El más destacado es una rotación en cuerpo rígido del dominio CA respecto al DHP. De este modo el paso de SrrB^{CP} a HK853^{CP}_libre se produce una rotación de 54,4° y una mínima traslación de 3,1 Å, el paso de SrrB^{CP} a HK853^{CP}_complejo se producía por una rotación pura de 35,8° (traslación de -0.1Å), encontrándose por lo tanto la HK853^{CP}_complejo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

en una posición intermedia con respecto a las otras dos conformaciones (Figura 19A). El segundo tipo de movimiento implica la rotación de las hélices que componen el dominio DHp paralela al mismo eje de estas hélices. Esta rotación implica un cambio en el empaquetamiento del haz de cuatro hélices y consiguientemente pequeños desplazamientos de las hélices.

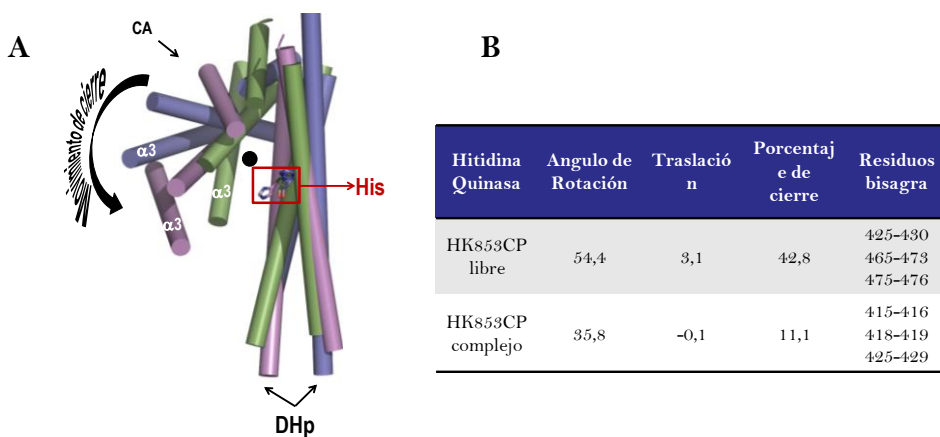


Figura 19. Movimiento de cierre analizado mediante el programa Dyndom. En **A** se muestra el movimiento de los dominios CA tras la superposición de sus dominios DHp de SrrB^{CP} (Verde), HK853^{CP}_libre (azul) y HK853^{CP}_complejo (magenta). En **B** se muestran los residuos que se encuentran en la interfaz DHp-CA y que intervienen en este movimiento bisagra.

En el caso de la estructura HK853^{CP}_libre, vemos una gran separación entre el lugar de unión para el nucleótido en el dominio CA y la His aceptora (dominio DHp). Por esta separación entre los dominios catalíticos denominamos a esta conformación “abierta” (Figura 20A), caracterizándose por una disposición relativa casi perpendicular (cerca a 90°) entre el plano definido por la hoja β del dominio CA y las hélices

del DHp. En el caso de HK853^{CP}_complejo, donde la enzima está realizando la fosfotransferencia, vemos que existe un acercamiento entre el dominio catalítico y la His aceptora. El acercamiento entre los dominios, que produce una conformación “semi-cerrada”, es generado por una rotación 35° del dominio catalítico respecto a las hélices de dimerización.

En la estructura de SrrB^{CP}, la rotación del dominio CA respecto al dominio DHp es mayor, 54,4°, aproximándose mucho el lugar de unión del ATP a la His aceptora. Este movimiento de rotación dispone las hélices de los dos dominios de forma más paralela, hecho que permitiría la suficiente aproximación de estos, para que el nucleótido y la histidina aceptora queden alineados y a distancia suficiente para que la reacción de autofosforilación pudiera tener lugar, denominamos, por lo tanto, a esta conformación “cerrada” (Figura 20C).

Los residuos localizados en la interfase DHp-CA de cada una de las tres estructuras, actuarían como bisagra de dicho movimiento (Figura 19B). Como el eje de rotación-traslación se encuentra cerca de los residuos bisagra situados en la interfase DHp-CA, denominamos por lo tanto a éste como eje bisagra. Si el eje bisagra es paralelo a la línea que une los centros de masas de ambos dominios se denomina eje de giro, y si es perpendicular, eje de cierre, asociándose movimientos de giro o cierre con cada uno de los ejes, respectivamente.

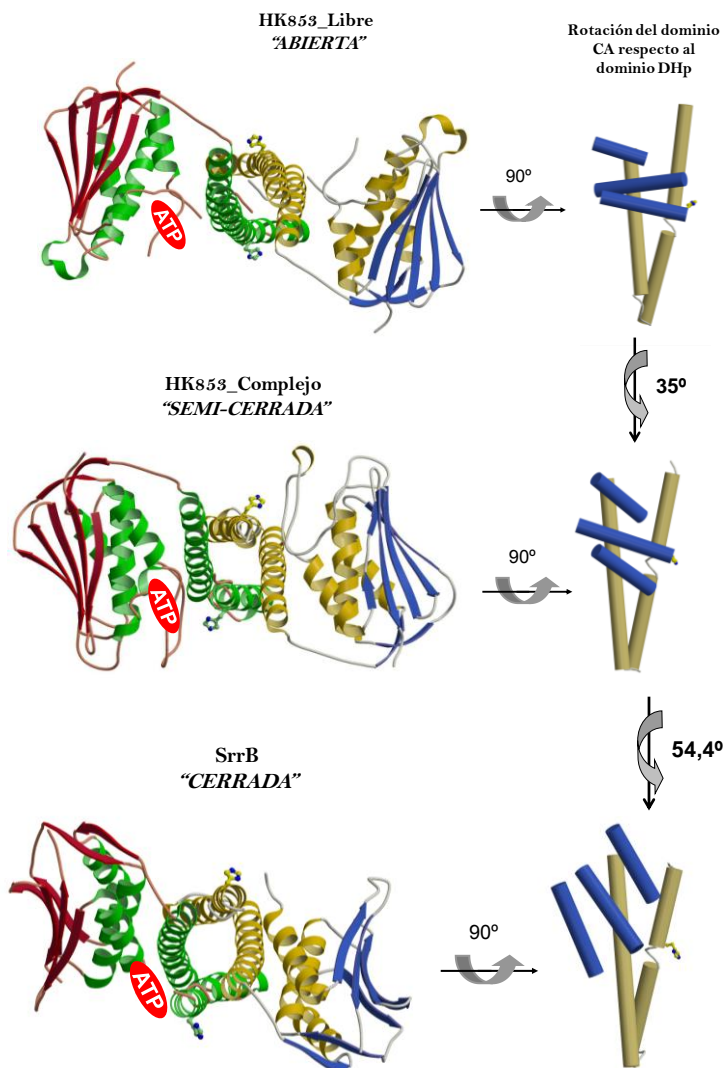


Figura 20. Representación de los movimientos de rotación del dominio CA respecto al dominio DHp. En la parte izquierda se muestran las estructuras en *cartoon* de los dímeros vistas desde la membrana y en la parte derecha se muestra la representación de las hélices para un único monómero (en dorado las del dominio DHp y en azul las del dominio CA) en una visión lateral (rotación de 90° de la estructura de la izquierda).

El movimiento necesario para alcanzar la conformación observada en SrrB desde las conformaciones de HK853^{CP}_libre y HK853^{CP}_complejo implican un porcentaje de cierre del 42,8% y 11,1%, respectivamente, lo que corrobora la las observaciones de que en SrrB^{CP}, los dominios DHp y CA se encuentran más próximos. Este hecho continuó reforzando la idea de que la estructura de SrrB^{CP} resuelta mostraba una conformación diferente, al de las otras dos estructuras de HK853^{CP} resueltas, dentro del mecanismo de traducción de la señal.

4.1.8.2. Diferentes interacciones entre el dominio CA y DHp en las HKs

Es obvio que las diferencias en el ángulo relativo formado por los dominios catalíticos en SrrB^{CP} respecto a las otras dos estructuras de HK853^{CP}, deben estar relacionadas con la existencia de contactos específicos entre ellos en cada una de las estructuras, por lo que quisimos entrar a estudiar más en detalle estos contactos. Como había definido con antelación el grupo en el estudio de la estructura de HK853^{CP} (Casino et al., 2009), los dominios CA y DHp tienen zonas de interacción bien definidas. Una alrededor de la hélice $\alpha 2$ en DHp que contacta con $\alpha 5$ en CA, y una segunda alrededor de $\alpha 1$ que interacciona con la tapadera del ATP y residuos en $\alpha 4$. El alineamiento estructural de SrrB^{CP} y HK853^{CP} nos permitió ver en todos los casos que los contactos entre estos dominios (DHp y CA) implican a las mismas posiciones y que en muchos casos los residuos están formados conservados (Figura 21).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

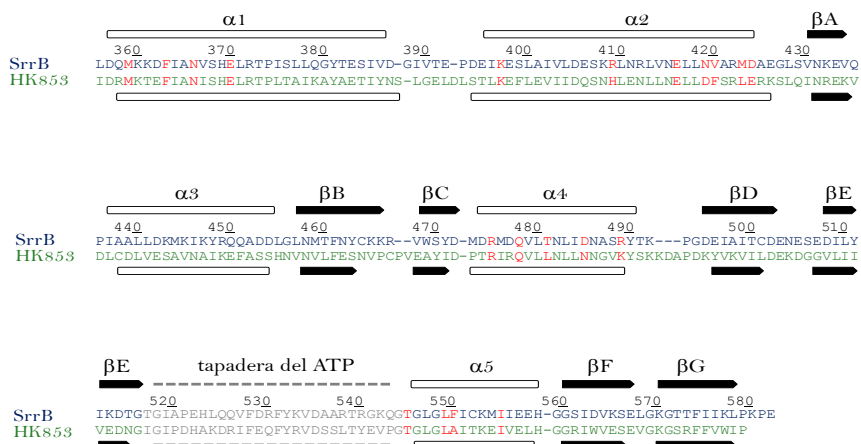


Figura 21. Alineamiento estructural del dominio catalítico de SrrB^{CP} y HK853^{CP}. En rojo se muestran residuos que en ambas estructuras están implicados en contactos, entre el DHp y el CA. Nótese que en la mayoría de los casos estos residuos se encuentran conservados.

En estos contactos destacan las interacciones (numeración según SrrB) de Asn419 con Gln478, Val420 con Leu547 y Phe363 con Leu547 (Figura 21). Sin duda este dato nos indicaba que estas posiciones deben jugar un papel fundamental en mantener las diferentes conformaciones relativas entre los dominios que deben adoptarse para llevar a cabo las reacciones catalizadas por el sistema.

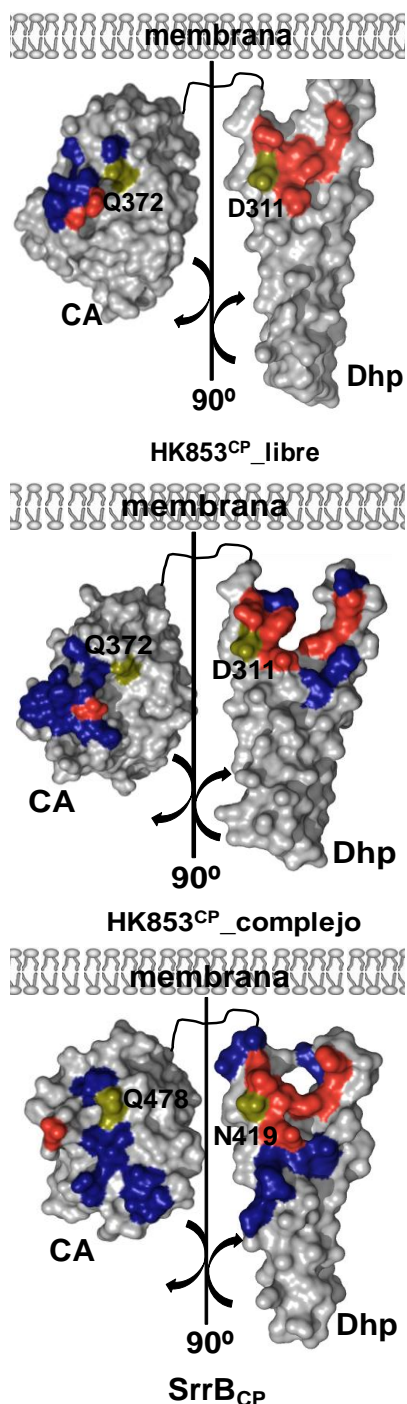


Figura 22. Interacciones entre el dominio DHp y el dominio CA. Representación en superficie de los contactos entre el DHp y CA de SrrB^{CP} y HK853^{CP} en sus dos conformaciones. En amarillo se representan los residuos cuya interacción se conserva de unas estructuras a otras y que sirven como eje de rotación alrededor del cual el dominio CA gira sobre el dominio DHp dando lugar a la formación de nuevos contactos. En rojo se representan residuos conservados que realizan contactos no conservados. En azul se muestran residuos no conservados que realizan contactos no conservados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio de las interacciones entre el DHp y CA de las estructuras HK853^{CP}_libre, HK853^{CP}_complejo y SrrB^{CP}, como ya imaginábamos, mostró que existía un cambio en las interacciones aunque en muchos casos implican a las mismas posiciones. Como puede verse en la figura 22, en la estructura abierta los residuos de $\alpha 5$ interactúan con los $\alpha 2$, pasando en la estructura semi-cerrada, a realizar contactos residuales en $\alpha 5$ tanto con $\alpha 2$ como con $\alpha 1$, siendo los contactos mayoritarios entre elementos de $\alpha 2$ y $\alpha 4$ en la estructura cerrada. Por ejemplo, si nos centramos en la posición correspondiente a Met423 en SrrB^{CP} (Leu315 en HK853), vemos que para pasar de la conformación abierta a la cerrada esta posición haría contactos hidrofóbicos con Leu547, Ile551 y Ile555 (Leu444, Ile448 y Ile452 en HK853) (Figura 23). Este movimiento podría verse como un engranaje de rueda dentada donde el dominio CA gira mediante la interacción de posiciones conservadas en las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$ que funcionarían como dientes. Sin embargo en todos los casos existe en todos los casos una interacción constante (Asn419-Gln478 en SrrB) que funciona como eje de giro común, alrededor del cual se produce la rotación del CA sobre el DHp (Figura 22).

En conclusión, existen un número limitado de residuos que están implicados en el mantenimiento de las diferentes conformaciones, cuya interacción relativa cambia dependiendo que conformación, y por tanto, que reacción se esté produciendo.

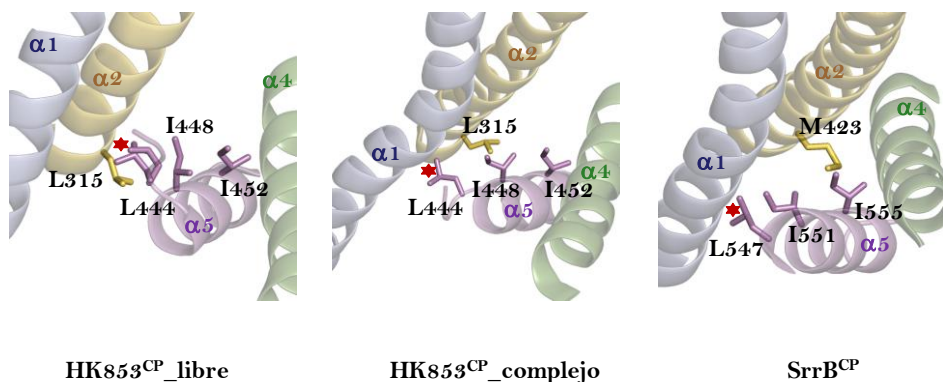


Figura 23. Formación de nuevos contactos. Cambio de interacción de la Met⁴²³ (numeración según SrrB) de $\alpha 2$ con el dominio CA, desde la estructura abierta (interacción con $\alpha 5$) hasta la estructura cerrada pasando por la semi-cerrada.

4.1.8.3. Cambios en la orientación del DHP en las HKs

Una vez observado que se producían cambios en la orientación e interacción entre los dominios DHP y CA de las tres estructuras estudiadas, quisimos comprobar si estos cambios también se producían a nivel del dominio DHP.

Como puede observarse en la figura 21, el paso de la conformación “abierta” a la conformación “cerrada” se correlaciona con un acercamiento relativo entre las hélices $\alpha 1$ que contienen las histidinasceptoras, en el dímero. Este acercamiento impone un alejamiento entre las hélices $\alpha 1$ y las hélices $\alpha 2$ (Figura 24). Como se ha indicado anteriormente el dominio CA descansa sobre las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$, por lo que el cambio en la disposición de estas dos hélices implica que la superficie expuesta al dominio CA cambie y por lo tanto el dominio DHP

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

deba reorientarse o reacomodarse, que como ya hemos visto, se lleva a cabo mediante rotaciones relativas.

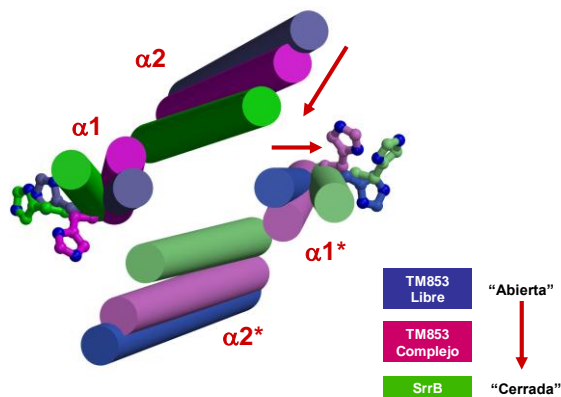


Figura 24. Comparación de los movimientos de las hélices, representadas como cilindros, que componen los dominios DHp de las tres estructuras superpuestas. En color azul se muestra el dominio DHp de HK853^{CP}_libre, en color magenta se muestra el dominio DHp de HK853^{CP}_complejo y en color verde el dominio DHp de SrrB^{CP}.

4.1.8.4. Modelo del Mecanismo de transducción de la señal

El mecanismo por el cual se traduce la señal desde el dominio sensor hasta la maquinaria catalítica es, sin duda, el proceso que más sombras presenta en los sistemas de señalización, no siendo una excepción en los TCS. Cómo es reconocida la señal extracelular, cómo atraviesa la membrana y cómo se inducen los cambios en la actividad intracelular del receptor son cuestiones fundamentales.

El conjunto de los datos estructurales aquí descritos para la proteína SrrB^{CP} y los datos previos del grupo para otros dos estados conformacionales del homólogo estructural HK853^{CP}, nos permite presentar un esquema (Figura 25) que pretende ser un modelo de mecanismo de transducción de la señal por TCS ortodoxos. El modelo

que proponemos debe presentar una direccionalidad en la HK, es decir, una propagación desde el exterior hacia el interior del citoplasma.

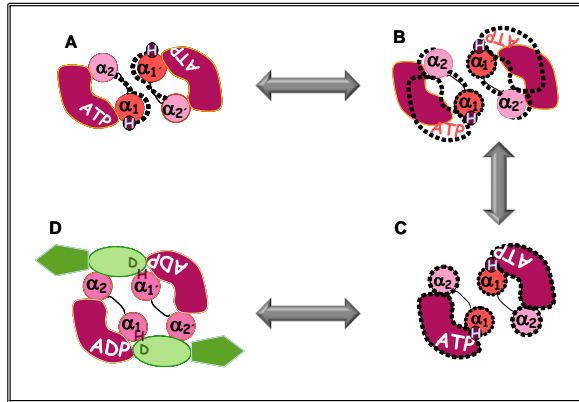


Figura 25. Esquema propuesto del mecanismo de transducción de la señal en sistemas de dos componentes. La H representa la histidina fosforilable del dominio DHp.

Como podemos observar en la figura 25, nosotros proponemos que la estimulación, mediante una señal determinada, del dominio extracelular sensor se traduce intracelularmente mediante un movimiento de las hélices α_1 y α_1' (paso A a B). Este movimiento desplaza a las hélices α_2 y α_2' , provocando un cambio en la superficie de interacción en el dominio CA (B). Dependiendo del cambio anterior, inducido por la señal, el dominio CA puede recolocarse bien acercando el nucleótido a la histidina aceptora para que se produzca la reacción de autofosforilación (C), y/o generando una superficie reconocible por el RR, que una vez unido puede tomar el grupo fosforilo de la histidina en la reacción de fosfotransferencia (D).

4.2. TCS EN CIANOBACTERIAS

NblS es la HK más conservada en cianobacterias, juega un papel importante en la percepción de múltiples parámetros ambientales y en la adaptación de las maquinarias metabólicas y fotosintéticas en respuesta a cambios en las condiciones ambientales (van Waasbergen et al., 2002). Fue identificada por primera vez en *Synechococcus elongatus* PCC7942 (*S. elongatus*) por su implicación en procesos de clorosis o bleaching (van Waasbergen et al., 2002). Para la inducción de este proceso de clorosis, en la supervivencia al estrés, es requerido también el RR NblR, que media el aumento de la expresión del gen *nblA* (observado durante el estrés de nutrientes en *Synechococcus*) (Luque et al., 2001, Salinas et al., 2007, Schwarz & Grossman, 1998, Sendersky et al., 2005). Aunque este RR no se encuentra conservado en todas las cianobacterias (Ashby & Houmard, 2006).

Tanto NblS como NblR parece que se encuentran regulados por señales generales de estrés y comparten algunas dianas comunes ante las cuales juegan papeles antagonistas, como es el caso del gen *nblA*. Sin embargo, los mecanismos y componentes involucrados en la activación de ambas proteínas no se conocen (Kappell et al., 2006, Schwarz & Grossman, 1998).

Estudios de doble híbrido, llevados a cabo por el laboratorio de la Dra. Asunción Contreras para la búsqueda del RR compañero de NblS, dieron como resultado el descubrimiento de una pequeña proteína denominada SipA, que interaccionaba con la HK NblS (Espinosa et al., 2006). SipA es un pequeño factor de regulación (menos de 100 aminoácidos) conservado en cianobacterias que se une al dominio CA de

NblS (Espinosa et al., 2006). Sin embargo, estos trabajos de doble híbrido no revelaron la interacción de NblS con ningún RR. Pruebas indirectas recientes han postulado a la proteína RpaB como el RR socio de NblS. Se demostró que genes que contaban con secuencias HLR1 en sus promotores estaban controlados por la proteína NblS en *Synechococcus* (Kappell et al., 2006). Posteriormente se determinó que RpaB, tanto de *S. elongatus* como de *Synechocystis*, se unía también a estas mismas secuencias HLR1 (Kappell & van Waasbergen, 2007, Hanaoka & Tanaka, 2008, Seki et al., 2007, Seino et al., 2009), concluyendo una posible relación entre la HK NblS y el RR RpaB.

4.2.1. Clonación y purificación de NblS de *S. elongatus*

Para el estudio *in vitro* de NblS abordamos la clonación de fragmentos de este enzima a partir de ADN genómico de *S. elongatus*. Los análisis de secuencia predicen la siguiente organización de dominios en NblS: 2 regiones transmembrana N-terminales que flanquean un dominio extracelular sensor, un dominio enlazador HAMP, un dominio modulador PAS y una porción catalítica conservada compuesta por un dominio DHP (que contiene la His fosforilable) y un dominio de unión a ATP (Figura 26). Para poder trabajar *in vitro*, sin los problemas que conlleva la manipulación de proteínas de membrana, y dado que toda la maquinaria catalítica de las HKs se encuentra en su porción intracelular, decidimos generar diferentes construcciones de esta porción de NblS, desde la forma completa hasta fragmentos menores tras la eliminación de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

algunos dominios (Figura 26), todas las construcciones poseían una fusión en el extremo N-terminal de una cola de seis histidina (6-His).

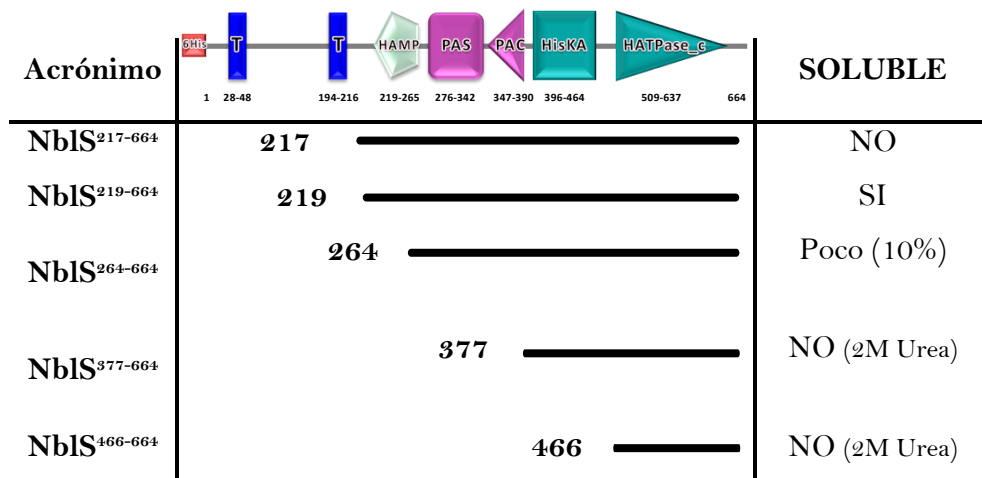


Figura 26. Esquema de los dominios de NblS y construcciones utilizadas en los estudios. En la figura se muestran los dominios predichos por SMART para NblS de *S. elongatus* en base a su secuencia y se describen los diferentes constructos fabricados para los ensayos *in vitro*, así como la solubilidad que presentaron.

Se hicieron pruebas de expresión y solubilidad con todas las construcciones realizadas. Todas, sin excepción, tuvieron que ser expresadas mediante un método autoinductivo, ya que los protocolos habituales de expresión no rendían proteína.

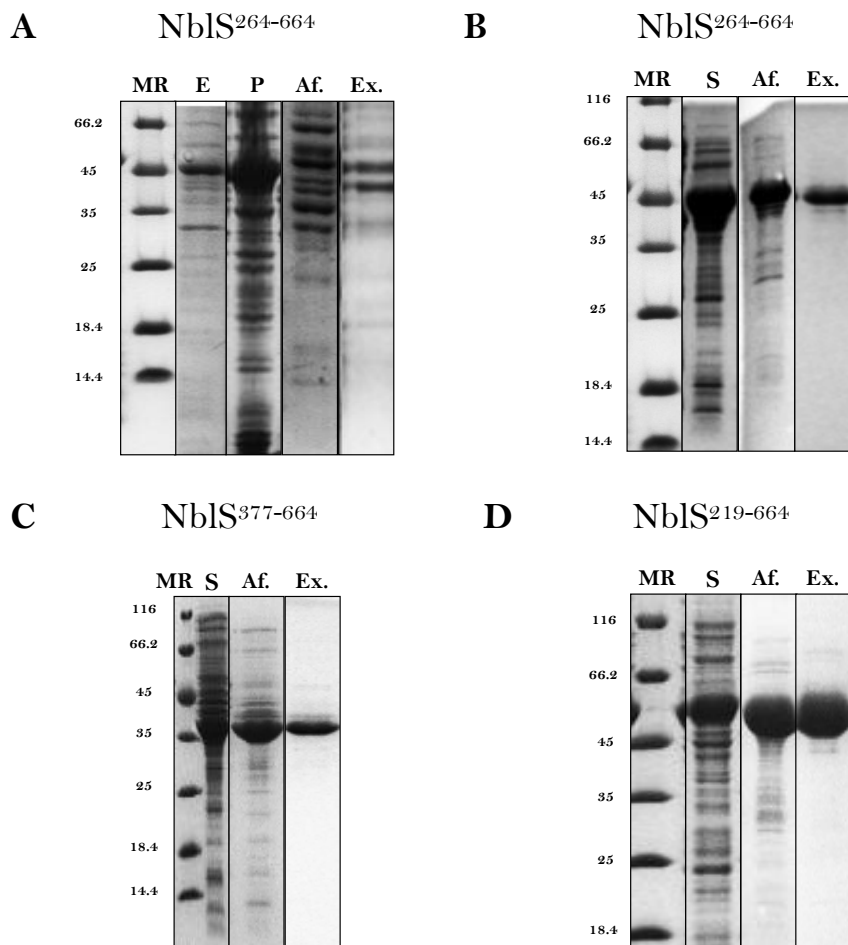


Figura 27. Purificación de diferentes formas de NblS recombinante. A) Purificación de la pequeña fracción soluble de NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴, B y C) Purificación de NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ y NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ tras un tratamiento con 2M de Urea de los cuerpos de inclusión D) Purificación de NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ de forma soluble (Descrito en materiales y métodos). En el caso de NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ (A) pueden observarse dos bandas de igual intensidad, una de ellas producto de degradación. (MR: marcador de peso molecular; E: inducción; P: fracción insoluble; S: fracción soluble; Af.: columna de afinidad; Ex.: columna exclusión molecular).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos preliminares de solubilidad pusieron de manifiesto que todas las construcciones, excepto la construcción NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴, justamente la forma que incluía la porción citoplasmática completa, eran insolubles, quedando toda la proteína sobreexpresada en el desecho celular tras la rotura por sonicación (Figura 27). La construcción NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ por el contrario fue expresada en su mayoría de forma soluble. Para poder obtener el resto de proteínas, se tuvieron que solubilizar todos los precipitados con urea (2M) con el fin de poder resuspender parte de la proteína que quedaba en el desecho. La baja concentración de urea necesaria para poder solubilizar los diferentes precipitados sugirió que las diferentes proteínas formaban agregados débiles en lugar de cuerpos de inclusión (ver materiales y métodos).

En paralelo, y para el estudio del efecto de SipA en la actividad de NblS, se abordó la producción de SipA por sobreexpresión en *E.coli* utilizando el plasmido pUAGC419 (que contenía la proteína completa de SipA) derivado del vector pPROEx, y que añadía en posición N-terminal una cola de 6 histidinas a la proteína. SipA se sobreexpresó siguiendo el protocolo estándar (ver materiales y métodos). Encontramos que SipA era completamente soluble y su purificación se completaba en tan solo 3 pasos cromatográficos obteniendo gran cantidad de proteína (30mg de proteína por litro de cultivo) y de alta pureza (Figura 28).

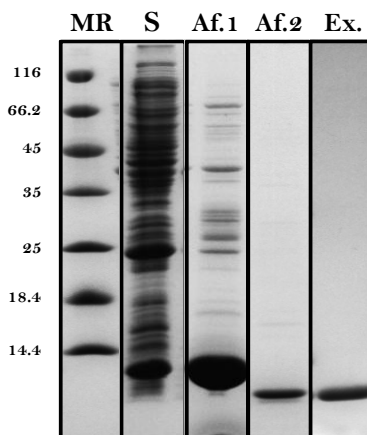


Figura 28. Purificación de SipA en pPROEx. (MR: marcador de peso molecular; S: fracción soluble; Af.1: 1^a columna de afinidad; Af.2: 2^a columna de afinidad tras la eliminación de la cola de His; Ex.: columna de exclusión molecular).

En paralelo a estos ensayos, de expresión y solubilidad, se produjeron cepas que contenían tanto el plásmido pUAGC56 (que contenía el constructo NbIS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴) como el plásmido pUAGC420 (SipA en pET28 sin cola de histidinas), con el fin de coexpresar ambas proteínas, produciendo el complejo formado por ambas en la célula. Al igual que en el caso de las HK en solitario, también se tuvieron que usar métodos autoinductivos de expresión para poder obtener cantidad suficiente de complejo. En este caso el complejo formado por ambas proteínas era soluble frente a la insolubilidad de la NbIS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ en solitario, poniendo de manifiesto un posible papel estabilizador de SipA hacia NbIS (Figura 29). Además, ambas proteínas copurifican durante todos los pasos cromatográficos, indicando que el complejo formado por ellas es altamente estable.

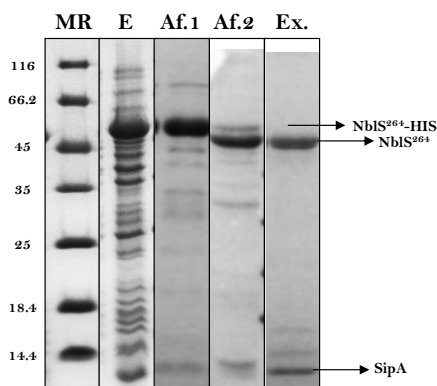


Figura 29. Purificación del complejo formado por NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ y SipA. A diferencia de NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ en solitario el complejo formado con SipA convierte a la HK en proteína soluble. (MR: marcador de peso molecular; E: inducción; Af.1: 1^a columna de afinidad; 2^a columna de afinidad tras eliminación de la cola de His; Ex.: columna de exclusión molecular).

Los intentos por cristalizar los diferentes constructos de NblS producidos, no resultaron demasiado productivos. Después de miles de ensayos de cristalización sólo se consiguió obtener cristales del complejo co-purificado de NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴-SipA en presencia de AMP-PNP en las siguientes condiciones: 0,85M SO₄(NH₄)₂, 1% PEG4K, 0,1M Bis-Tris pH5.5. El complejo cristalizaba en un grupo espacial p6 o p622, y una celda a= 223,8 b= 223,8 c= 206,4 α=β= 90 γ= 120, teniendo cabida en la unidad asimétrica de 3-6 dímeros de NblS en complejo con SipA, dependiendo del grupo espacial. Desgraciadamente estos cristales difractaban a muy baja resolución (>6 Å) aún cuando se uso radiación de sincrotrón de alta intensidad. Los esfuerzos por mejorar estos cristales, y por lo tanto su difracción, hasta el momento han sido infructuosos. El estudio del contenido de los cristales mostró que ambas proteínas están

presentes aunque NblS en dos formas, una intacta y otra truncada, lo que podría explicar la mala difracción de los cristales (Figura 30).

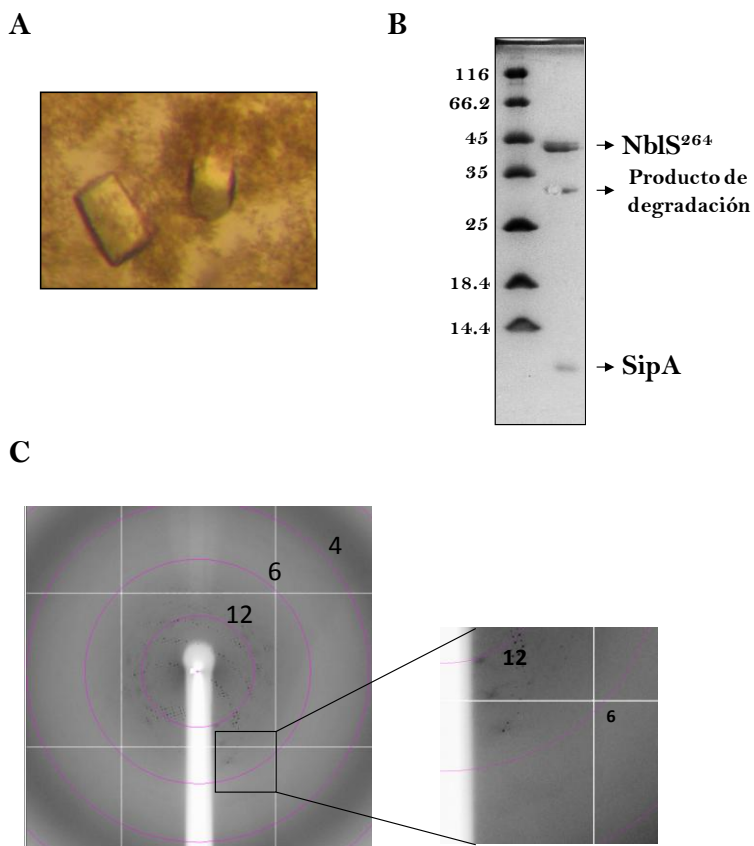


Figura 30. Cristalización de NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴+SipA. **A)** cristales del complejo. **B)** análisis del contenido de los cristales en geles SDS-PAGE. **C)** mapa de difracción de los cristales del complejo mostrando un detalle del límite de difracción de los cristales.

4.2.2. SipA un nuevo conector en los TCS de cianobacterias, que proporciona un vínculo entre las vías NblS-NblR

En este trabajo que a continuación presentamos, añadimos un nuevo componente, SipA, al complejo y poco entendido mecanismo de transducción de la señal, que permite la adaptación de las cianobacterias al estrés. Los resultados presentados aquí nos dan una idea del papel de SipA, del sensor histidina quinasa NblS y del regulador de la respuesta NblR en la aclimatación al estrés y la clorosis.

Estudios previos pusieron de manifiesto que las cianobacterias responden a ciertas condiciones de estrés por nutrientes o luz a través de la degradación de los complejos antena de su aparato fotosintético, un proceso denominado clorosis. La cascada de la señal que media este proceso implica una histidina quinasa altamente conservada llamada NblS en *Synechococcus*. Junto a NblS, el regulador de la respuesta NblR es un actor principal en este proceso de clorosis. La importancia de NblS y NblR en este proceso ha inducido a pensar que ambas proteínas podrían formar un sistema de transducción de la señal de dos componentes.

Búsquedas de doble híbrido utilizando como cebo varias construcciones de NblS, llevadas a cabo por nuestros colaboradores, el laboratorio de la Dra. Asunción Contreras, no permitieron encontrar ningún regulador de la respuesta, pero se consiguió identificar una nueva proteína de función desconocida y con una fuerte interacción con el dominio de unión a ATP de NblS, dicha proteína se llamó SipA. El gen

de SipA se encontraba presente en todos los genomas de cianobacterias donde se encontraba *nblS*, apoyando este dato la relevancia fisiológica de la interacción entre las dos proteínas y sugiriendo un posible papel de SipA en la clorosis.

Para poder obtener pruebas experimentales, se procedió a la realización de ensayos *in vitro*. Se cotransformaron plásmidos que contenían ambas proteínas, donde $NblS^{264-664}$ portaba en posición N-terminal una cola de 6-histidinas mientras que SipA no llevaba ningún tipo de marcaje útil para su purificación. La coexpresión de ambos plásmidos nos dio como resultado el complejo formado por $NblS^{264-664}$ -SipA en forma soluble que podía ser purificado por diferentes pasos cromatográficos, incluido una cromatografía de afinidad que podía unir la cola de 6-histidinas que solo estaba presente en $NblS^{264-664}$. En todos los pasos cromatográficos encontramos ambas proteínas en la misma fracción, confirmando esto la fuerte interacción entre NblS y SipA. La poca cantidad obtenida en forma soluble de $NblS^{264-664}$ en solitario, sirvió para la realización de ensayos en geles nativos que demostraron, de nuevo, la formación del complejo entre NblS y SipA. La aparición en estos geles nativos de una banda bien definida cuando a $NblS^{264-664}$ se le añadía SipA, podía ser interpretada como la estabilización de $NblS^{264-664}$ mediante SipA en una conformación predominante.

Después de comprobar la fuerte interacción entre NblS y SipA, nos preguntamos si esta interacción tenía alguna función en *Synechococcus*. La construcción de estirpes nulas para (SipA⁻) y constitutivas (SipA^c) pusieron de manifiesto que mientras el mutante nulo se comportaba igual que la cepa silvestre, el mutante constitutivo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

afectaba al fenotipo de las cepas (fenotipo *non-bleaching*), concluyendo que SipA no era esencial para la supervivencia de *Synechococcus* ya que las estirpes SipA⁻ crecían normalmente bajo condiciones de laboratorio.

Trabajos previos sugirieron que tanto NblS como SipA mediaban procesos comunes en cianobacterias (Espinosa et al., 2006). Como vimos, bajo condiciones de laboratorio, SipA no resultaba esencial para la supervivencia de *Synechococcus*, pero ¿qué influencia tenía SipA bajo condiciones de estrés?. Estudios previos sugirieron que ciertas cantidades de NblS eran necesarias para la funcionalidad de *Synechococcus* (van Waasbergen et al., 2002, Kappell et al., 2006), los intentos por obtener mutantes estables donde el gen *nblS* hubiese sido inactivado fueron infructuosos. Este hecho nos impidió el uso de mutantes nulos para *nblS* en este estudio. En su lugar, el impacto de mutantes de *sipA* en la supervivencia al estrés fue investigada junto con cepas control silvestres y nulas para NblR (NblR⁻). Bajo condiciones de estrés, SipA⁻ continuó comportándose igual que la cepa silvestre, pero NblR⁻ disminuía el crecimiento de las cepas mientras que el doble mutante NblR⁻/SipA⁻ se comportaba igual que la cepa silvestre, concluyendo que en cepas NblR⁻, SipA contribuye al decrecimiento de las células bajo condiciones de estrés.

Después de comprobar que SipA tenía un efecto, en condiciones de estrés, sobre el crecimiento, nos preguntamos que papel tendría en el proceso de clorosis. Para ello analizamos bajo condiciones de estrés el impacto de la inactivación de SipA en los niveles de pigmentos. De nuevo al mutante SipA⁻ mostró niveles normales de pigmentos y las cepas entraban en clorosis comportándose igual que la estirpe silvestre. Tanto

el doble mutante NblR⁻/SipA⁻ como el mutante SipA^C presentaban elevados niveles de ficocianina y no entraban en clorosis, comportándose igual que el mutante NblR⁻. El comportamiento encontrado bajo condiciones de estrés entre NblR⁻ y NblR⁻/SipA⁻ en cuanto a su contenido en ficocianinas, puso de manifiesto que no todas las características asociadas a la falta de NblR pueden ser compensadas con la falta de SipA.

Otros autores habían descrito que el gen *nblA* era clave para la entrada en clorosis (Schwarz & Forchhammer, 2005), por lo que debido a las diferencias encontradas en los niveles de ficocianinas en los tres mutantes quisimos saber si esto era fruto de una regulación del gen *nblA* por parte de SipA ó NblR. La medida de la inducción de *nblA* mediante la introducción de un reportero (PnblA::luxAB) en los diferentes mutantes puso de manifiesto que bajo condiciones de estrés, en el mutante SipA^C los niveles de *nblA* siempre eran menores que en la cepa silvestre, sugiriendo un posible efecto inhibitor de SipA sobre la expresión de *nblA*.

En resumen, presentamos a la proteína SipA como un nuevo componente del complejo y poco entendido mecanismo de transducción de la señal que permite una adaptación de la cianobacteria a condiciones de estrés.

Contribución individual al trabajo

Mi contribución en este trabajo se centró en la caracterización *in vitro* del complejo NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴-SipA, para ello realicé la transformación de cepas de expresión *E.coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL de los plásmidos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de expresión de NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ y la proteína completa de SipA. Búsqueda y puesta a punto de un protocolo de expresión con el que obtener ambas proteínas recombinantes solubles. Cotransformación y coexpresión de los plásmidos para la expresión del complejo NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴-SipA. Búsqueda y puesta a punto de un protocolo de purificación del complejo así como de ambas proteínas por separado con el que obtener cantidad y pureza suficientes para la realización de los diferentes ensayos. Ensayos en geles nativos para demostrar y apoyar la interacción que existe entre NblS y SipA.

The regulatory factor SipA provides a link between NblS and NblR signal transduction pathways in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942

Paloma Salinas,¹ Diego Ruiz,¹ Raquel Cantos,¹ María Luisa Lopez-Redondo,² Alberto Marina² and Asunción Contreras^{1*}

¹División de Genética, Universidad de Alicante, Apartado 99, E-03080 Alicante, Spain.

²Departamento de Genómica y Proteómica, IBV-CSIC, 46010 Valencia, Spain.

Summary

Cyanobacteria respond to environmental stress conditions by adjusting its photosynthesis machinery. When subjected to nutrient and high light stress, *Synechococcus* sp. PCC 7942 and other non-diazotrophic cyanobacteria degrade their phycobilisome, the light-harvesting complexes for photosynthesis. Phycobilisome degradation requires convergence of multiple signals onto the *nblA* gene. Despite considerable efforts to identify regulatory proteins involved in acclimation responses, the signal transduction mechanisms involved remain largely unknown. However, we show here that SipA, a protein that binds to the ATP-binding domain of the histidine kinase NblS, counteracts the function of the response regulator NblR in acclimation to stress, and is also involved in downregulation of the *nblA* gene. The integrity of the HLR1 element overlapping P_{nblA-1} and P_{nblA-2} promoters is required for downregulation of the *nblA* gene. Induction by NblR is strongly dependent on DNA sequences located at least 44 bp upstream transcription initiation from P_{nblA-2}, and is also hampered by point mutations at HLR1. Genetic evidence of the antagonistic roles of NblR and SipA at regulation of the *nblA* gene, chlorosis and survival from stress is presented.

Introduction

Cyanobacteria are photosynthetic prokaryotes that perform plant-type oxygenic photosynthesis. Survival of free-living microorganisms in a changing environment depends on their ability to modulate cell metabolism according to the external conditions, and cyanobacteria

have developed mechanisms to modify the composition of the photosynthetic machinery in response to environmental changes (Grossman *et al.*, 1993). One dramatic example of this adaptation is the process of chlorosis or bleaching, by which non-diazotrophic cyanobacteria degrade their light-harvesting antennae, the phycobilisomes, when exposed to stress conditions such as nutrient starvation (Collier and Grossman, 1992). The loss of phycobilisomes and a reduction of the chlorophyll content during stress conditions are responsible for the yellow appearance of chlorotic cultures. Degradation of phycobilisomes avoids excessive absorption of excitation energy, and supplies the cell with amino acids for the synthesis of proteins required for acclimation and cell survival (Grossman *et al.*, 2001).

In *Synechococcus* sp. PCC 7942 (hereafter *Synechococcus*), genetic screenings of non-bleaching derivatives allowed the identification of mutants defective in the process of chlorosis. The targeted functions include the small protein NblA (Non-bleaching protein A), a key effector of the process of bleaching, and three other proteins playing regulatory roles: the response regulator of the OmpR/PhoB family NblR (Schwarz and Grossman, 1998), the sensor histidine kinase NblS (van Waasbergen *et al.*, 2002), and most recently the SpoIIAB family factor NblC (Non-bleaching protein C) (Sendersky *et al.*, 2005). In *Synechococcus*, transcription of the *nblA* gene is subjected to a complex regulation. NblR, NblC and the cyanobacterial global nitrogen regulators NtcA and PipX are all involved in positive regulation of *nblA* during nitrogen starvation (Schwarz and Grossman, 1998; Luque *et al.*, 2001; Sendersky *et al.*, 2005; Espinosa *et al.*, 2007).

Two of the positive regulatory factors of the *nblA* gene are DNA-binding transcriptional activators. NblR has been found to bind to the –206 to –1 region from the putative translation start (Luque *et al.*, 2001), but its binding sites remain unidentified. Much more is known of NtcA, the global regulator for nitrogen control in cyanobacteria. NtcA belongs to the CAP/CRP (the catabolite activator protein or cyclic AMP receptor protein) family of transcriptional activators, and activates genes (bearing the consensus sequence GTAN₆TAC) involved in nitrogen assimilation, heterocyst differentiation and acclimation to nitrogen starvation (Herrero *et al.*, 2001). 2-oxoglutarate, the signal of

Accepted 30 October, 2007. *For correspondence. E-mail contera@ua.es; Tel. (+34) 96 590 3957; Fax (+34) 96 590 9569.

© 2007 The Authors
Journal compilation © 2007 Blackwell Publishing Ltd

nitrogen deficiency, stimulates binding of NtcA to target sites (Vazquez-Bermudez *et al.*, 2002), transcription activation *in vitro* (Tanigawa *et al.*, 2002) and complex formation between PipX and NtcA (Espinosa *et al.*, 2006a). The main *nblA* promoter, P_{nblA-2}, is strongly activated by NblR, and is also an atypical NtcA-activated promoter. No *nblA* transcripts are detected under stable conditions of nitrogen sufficiency, neither from P_{nblA-1} nor from P_{nblA-2} (Luque *et al.*, 2001). Recently, negative regulation of the *nblA* gene has also been suggested based on the presence of an 18-bp-long motif made up of two direct repeats (consensus sequence G/TTTACAT/AT/ANNT/GTTACAT/AT/A), which is termed HLR1 (high-light regulatory) and has been found upstream NblS-controlled genes (Kappell *et al.*, 2006). In the case of *nblA*, each half site overlaps the -10 box of one of the tandem promoters P_{nblA-2} (left half site) and P_{nblA-1} (right half site). Therefore, independent lines of evidence suggest that, in addition to activation of the *nblA* gene by NblR, NtcA, PipX and NblC, negative regulation may also affect *nblA* gene expression by a putative NblS-dependent response regulator that binds to the HLR1 motif.

Finding cognate response regulators for cyanobacterial sensor histidine kinases is complicated by the fact that they are usually encoded apart (Ashby and Houmar, 2006). In spite of the fact that NblS and NblR were the only histidine kinases and response regulators identified by genetic screening for non-bleaching mutants, there are no evidence of direct interactions between them, and very little is known of their mechanisms of action. The pleiotropy of the characterized *nblS-1* strain and the lack of viability of null mutants (van Waasbergen *et al.*, 2002; Kappell *et al.*, 2006) add difficulty to the genetic dissection of the process in which they are involved. However, yeast two-hybrid screenings of *Synechococcus* libraries resulted in the identification of a small protein (Synpcc7942-1196) named SipA (NblS interacting protein A) that binds to the C-terminus of NblS. The strong and specific binding between SipA and NblS derivatives retaining an intact ATP-binding domain, the phylogenetic distribution of *sipA* and *nblS* genes and the inference of co-evolution for the NblS-SipA interaction in cyanobacteria led us to suggest a conserved role for SipA in adaptation of the photosynthetic machinery to stress conditions (Espinosa *et al.*, 2006b). Here, we provide insight into the role of SipA in the complex network of interactions governing induction of chlorosis and survival to stress.

Results

Interaction of NblS with SipA *in vitro*

The interaction between NblS and SipA was discovered in yeast two-hybrid screenings of genomic *Synechococcus* libraries with a truncated derivative of NblS as bait. Subsequent yeast two-hybrid screenings of the same libraries

using SipA as bait allowed recovery of multiple clones corresponding to different NblS polypeptides. As all these partially overlapping fragments encoded the C-terminal domain of NblS, the interaction was mapped to the ATP-binding domain of NblS. Importantly, the absence of prey clones corresponding to other histidine kinases provided strong evidence of the specificity of the interaction. An independent bacterial two-hybrid system provided additional evidence of the NblS-SipA interaction (Espinosa *et al.*, 2006b).

To obtain further experimental evidence of the interaction between NblS and SipA, we turned to *in vitro* assays. Expression plasmids for the full-length SipA and the complete cytoplasmic portion of NblS fused to a His-tag (H₆-NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴) were constructed (Table 1) and cotransformed in *Escherichia coli*. Strains coexpressing both proteins (Fig. 1A, lane 3) were selected, and H₆-NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ protein was purified (see *Experimental procedures*). When Ni-affinity chromatography was used to specifically recover H₆-NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴, SipA was found in the same elution fraction (Fig. 1A, lane 4). To exclude non-specific binding of SipA to the His-Trap column, the His-tag from H₆-NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ was removed, and the protease-digested fractions were subjected to a new Ni-affinity chromatography. Both, NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ and SipA proteins co-eluted in the same flow-through fraction (Fig. 1A, lane 5), indicating a specific binding between them and excluding non-specific binding to the column. As a final purification step, flow-through fraction was subjected to size exclusion chromatography. Again, both proteins (SipA and NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴) co-eluted together (Fig. 1A, lane 6), thus confirming that SipA has been bound to the NblS fragment throughout the complete purification process.

We performed an additional verification of complex formation following a native gel electrophoresis approach previously used with interacting proteins belonging to two-component systems (Casino *et al.*, 2007). Interestingly, when NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ and SipA were separately purified, mixed, and then the mixture was subjected to native PAGE, a slower band was visible (Fig. 1B, lane 3). As the appearance of this new band was concomitant with the disappearance of the bands corresponding to the individual proteins (Fig. 1B, lanes 1 and 2), it corresponded to the complex. As NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ migrated as a diffuse band (Fig. 1B, lane 2) and the SipA-NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ complex as a sharp one (Fig. 1B, lane 3), these changes in band profiles could be interpreted as the stabilization of NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ by SipA in a predominating conformation.

Upregulation, but not inactivation, of the *sipA* gene is deleterious

To investigate the function of the NblS-interacting protein SipA, we first attempted construction of *Synechococcus*

Table 1. Strains and plasmids.

Strain or plasmid	Genotype or relevant characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ ϕ 80d/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argFU)169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r ₁₇ m ₁₇) ⁻ <i>deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1</i> λ ⁻	Hanahan (1985)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT [lon] hsdS_B</i> (r ₆ m ₆) ⁻ λ DE3	Studier <i>et al.</i> (1990)
<i>E. coli</i> BL21CodonPlus-Ril cells	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r ₆ m ₆) ⁻ <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r gal λ (DE3) <i>endA Hte [argU ileY leuW Cam]</i>	Stratagene
<i>Synechococcus</i> sp. PCC7942	Wild-type <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	Pasteur culture collection
<i>Synechococcus</i> NblR45	NblR ⁻ , Km ^r	Luque <i>et al.</i> (2001)
<i>Synechococcus</i> WT-C103	P _{nblA} :: <i>luxAB</i> into NSII, Cm ^r	Espinosa <i>et al.</i> (2007)
<i>Synechococcus</i> SipAK	SipA ⁻ , Km ^r	This work
<i>Synechococcus</i> SipAM	SipA ⁻ , Cm ^r	This work
<i>Synechococcus</i> NblR45-SipAM	NblR ⁻ SipA ⁻ , Km ^r Cm ^r	This work
<i>Synechococcus</i> CK1SipAI	SipA ^C , Φ (CK1- <i>sipA</i>) into NSI, Km ^r	This work
<i>Synechococcus</i> CK1SipAll	SipA ^C , Φ (CK1- <i>sipA</i>) into NSII, Km ^r	This work
<i>Synechococcus</i> NblR45-C103	NblR ⁻ , P _{nblA} :: <i>luxAB</i> into NSII, Cm ^r Km ^r	This work
<i>Synechococcus</i> SipAK-C103	SipA ⁻ , P _{nblA} :: <i>luxAB</i> into NSII, Cm ^r Km ^r	This work
<i>Synechococcus</i> CK1SipAI-C103	SipA ^C , P _{nblA} :: <i>luxAB</i> into NSII, Cm ^r Km ^r	This work
<i>Synechococcus</i> WT-C104	P _{nblA} :: <i>luxAB</i> into NSII, Cm ^r	This work
<i>Synechococcus</i> NblR45-C104	NblR ⁻ , P _{nblA} :: <i>luxAB</i> into NSII, Cm ^r Km ^r	This work
<i>Synechococcus</i> SipAK-C104	SipA ⁻ , P _{nblA} :: <i>luxAB</i> into NSII, Cm ^r Km ^r	This work
<i>Synechococcus</i> WT-C110	P _{nblA(TG)} :: <i>luxAB</i> into NSII, Cm ^r	This work
<i>Synechococcus</i> SipAK-C110	SipA ⁻ , P _{nblA(TG)} :: <i>luxAB</i> into NSII, Cm ^r Km ^r	This work
pBluescriptII SK(+)	Cloning vector, Ap ^r	Stratagene
pPROEX-HTa	His-tag cloning vector, Ap ^r	Invitrogen
pAM1580	<i>luxAB</i> into NSII, Ap ^r Cm ^r	Andersson <i>et al.</i> (2000)
pET28(a)+	His-tag cloning vector, Km ^r	Novagen
pENS45	<i>nblR</i> ::CK2, Ap ^r Km ^r	Luque <i>et al.</i> (2001)
pT25	Cm ^r	Karimova <i>et al.</i> (1998)
pRL161	CK1, Ap ^r Km ^r	Elhai and Wolk (1988)
pUAGC103	pAM1580 with P _{nblA} :: <i>luxAB</i> , Ap ^r Cm ^r	Espinosa <i>et al.</i> (2007)
pUAGC104	pAM1580 with P _{nblA} :: <i>luxAB</i> , Ap ^r Cm ^r	This work
pUAGC110	pAM1580 with P _{nblA(TG)} :: <i>luxAB</i> , Ap ^r Cm ^r	This work
pUAGC620	pBluescriptII SK(+) with NSIA, Ap ^r	This work
pUAGC623	pBluescriptII SK(+) with NSIA and NSIB, Ap ^r	This work
pUAGC232	pUAGC623 with Φ (CK1- <i>sipA</i>), Ap ^r Km ^r	This work
pBluescriptII SK(+)/Wnot	pBluescriptII SK(+) without the polylinker NotI site, Ap ^r	This work
pUAGC220	pBluescriptII SK(+)/WNot with <i>sipA</i> sequences, Ap ^r	This work
pUAGC221	pBluescriptII SK(+)/WNot with <i>sipA</i> ::CK1, Ap ^r Km ^r	This work
pUAGC223	pBluescriptII SK(+)/WNot with <i>sipA</i> ::cat, Ap ^r Cm ^r	This work
pAUGC231	pAM1580 with Φ (CK1- <i>sipA</i>), Ap ^r Km ^r	This work
pUAGC56	pPROEX-HTa encoding H6-NblS ²⁶⁴⁻²⁶⁴ , Ap ^r	This work
pUAGC419	pPROEX-HTa encoding H6-SipA, Ap ^r	This work
pUAGC420	pET28(a)+ encoding SipA, Km ^r	This work

derivatives in which *sipA* is either inactivated or ectopically expressed. Two SipA⁻ strains were constructed by allele replacement, each one carrying a different selection marker (strains SipAK and SipAM, Table 1 and Fig. 2). Homozygosis of mutant alleles from kanamycin- or chloramphenicol-resistant transformants was promptly achieved and confirmed by PCR, thus indicating that *sipA* is not an essential gene under laboratory conditions. As both SipA⁻ strains responded essentially in the same manner when subjected to different analyses (Fig. S1 and data not shown), only data for one of these strains (SipAK) are presented hereafter under the SipA⁻ name.

To engineer *Synechococcus* strains in which the *sipA* gene would be constitutively expressed from an ectopic promoter [SipA^C strains, containing the transcriptional fusion named Φ (CK1-*sipA*); see Table 1], the CK1

cassette was cloned upstream the *sipA* gene. To take into account possible location effects, the CK1-*sipA* fragment was independently inserted into two different genomic regions: neutral sites I and II (hereafter NSI and NSII respectively) to generate strains CK1SipAI and CK1SipAll (Table 1 and Fig. 3A). The presence of the CK1-*sipA* fragment in the expected location was confirmed by PCR in the kanamycin-resistant clones (lanes 2 in Fig. 3B and C). However, in spite of the selective pressure exerted, no full segregation could be achieved, and the kanamycin-resistant clones tested retained wild-type copies of the NSI and NSII alleles (lanes 4 in Fig. 3B and C). Overexpression of *sipA* in these clones was also verified by immunoblot analysis with anti-SipA serum. As expected, CK1SipAI and CK1SipAll cultures accumulated significantly higher levels of the SipA protein than wild-type cells

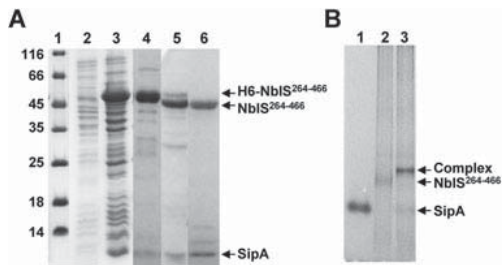


Fig. 1. Interaction of NblS with SipA. **A.** SipA and a His-tagged NblS derivative (H6-NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴) were coexpressed in *E. coli* and proteins purified by chromatography. The relevant proteins are indicated by arrows. Lane 2 and 3: extracts pre- and post-induction. Lane 4: elution of proteins from Ni-affinity column with imidazol 150 mM. Lane 5: flow-through fraction after a second Ni-affinity chromatography of lane 4 fraction treated with TEV protease (1:50 relation protease : protein) to remove the His-tag and dialysed to remove imidazol. Lane 6: size exclusion chromatography of lane 5 fraction. Note that in all chromatographic steps, both proteins co-elute together. Proteins were separated by 15% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Molecular mass markers in kDa are shown in lane 1. **B.** Non-denaturing gel electrophoresis (Native-PAGE) analysis of complex formation between NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ and SipA. Samples containing 2.5 µg of SipA (lane 1), 5 µg of NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ (lane 2) and 1 µg of SipA plus 5 µg of NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ (lane 3) were incubated for 30 min at 25°C. Samples were separated in 8% native gel and stained with Coomassie blue.

(up to five times more), and no protein could be detected in the *sipA*-null mutant used as control (Fig. 3D).

Continuous culturing under selective pressure of different SipA^C clones resulted in stable kanamycin-resistant clones with less severe phenotypes and, in some instances, genomic rearrangements or loss of the higher levels of SipA previously observed (not shown). It was concluded that upregulation from the CK1 promoter of a second copy of the *sipA* gene resulted in a significant increase of the SipA protein that was harmful to the cells.

The intrinsic phenotypic instability of SipA^C derivatives and the inferred occurrence of suppressor mutations prevented appropriated comparisons and rigorous quantitative analysis. However, as the SipA^C derivatives were considered potentially very informative on SipA function(s), they were analysed to look for qualitative phenotypic differences.

Inactivation of *sipA* restores survival to stress of the NblR⁻ mutant

Previous work suggested that NblS and SipA proteins mediate common processes in cyanobacteria (Espinosa *et al.*, 2006b). Therefore, it was important to investigate the involvement of SipA in adaptation and survival of cultures to stress conditions. In close agreement with other studies suggesting that a certain amount of NblS function is essential in *Synechococcus* (van Waasbergen *et al.*, 2002;

Kappell *et al.*, 2006), we could not generate stable mutants in which the *nblS* gene had been inactivated (data not shown). This precluded the use of *nblS*-null mutants in this study. Instead, the impact of *sipA* mutations on survival to stress was investigated alongside wild-type and NblR⁻ control strains. To explore genetic interactions between *nblR* and *sipA*, a NblR⁻SipA⁻ double mutant was also generated by introducing the chloramphenicol-resistant *sipA* allele into strain NblR45 (strain NblR45-SipAM). Homozygosity was promptly achieved (data not shown), indicating that *sipA* inactivation is also viable in an NblR⁻ background.

Survival of the NblR⁻ strain to high-light irradiation or nutrient deprivation is severely impaired, and this can be shown by comparing the optical density of cultures subjected to high-light stress or their ability to efficiently recover from nitrogen or high-light stress (Schwarz and Grossman, 1998). As shown in Fig. 4A, when wild-type and mutant derivatives were subjected to high-light irradiation, only the NblR⁻ mutant ceased growing. The SipA⁻ strain and, remarkably, the NblR⁻SipA⁻ double mutant continued growing essentially as the wild type, thus suggesting that in the absence of NblR, the SipA protein contributed to impair growth under high-light conditions.

To obtain additional experimental evidence of the genetic interaction between *nblR* and *sipA*, cultures from wild-type and mutant derivatives were independently subjected to high-light and nitrogen stress. At different times (up to 4 days), drops of these cultures were plated and incubated on standard conditions to visually determine their ability to resume growth. As shown in Fig. 4B, and in contrast to the single NblR⁻ mutant, the double mutant NblR⁻SipA⁻ efficiently recovered from stress. Therefore, the results confirmed that the lethality of NblR⁻ mutant was essentially suppressed by inactivation of *sipA*. In similar

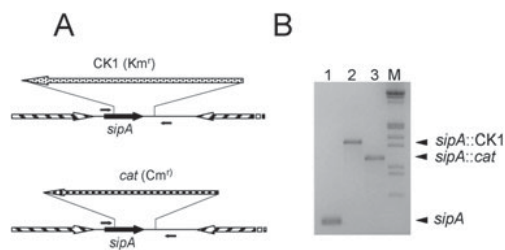


Fig. 2. Genetic inactivation of *sipA*. **A.** Schematic representation of the strategies followed for gene inactivation by cassette insertion into internally deleted *sipA* regions. Positions of PCR primers used to verify allele replacement are indicated as black arrows. **B.** PCR analysis of wild-type (lane 1), SipAK (lane 2) and SipAM (lane 3) strains, using primers SIPA-chek-F and SIPA-chek-R. Wild-type (*sipA*) and mutant (*sipA*::CK1, *sipA*::cat) alleles are indicated to the right. M: size marker λ HindIII + EcoRI.

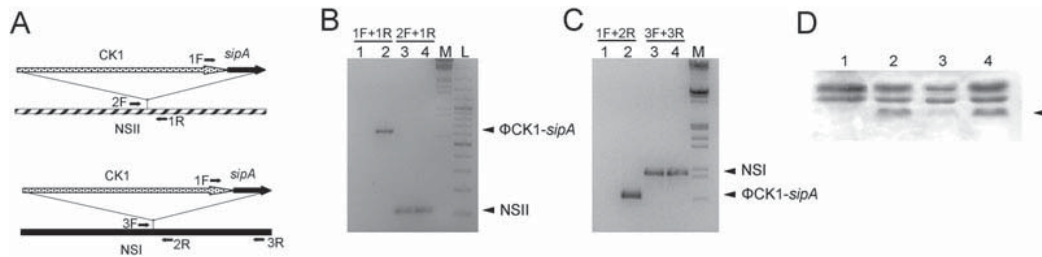


Fig. 3. Ectopic expression of *Synechococcus sipA*.

A. Schematic representation of the strategies followed for insertion of the CK1-*sipA* fragment into NSII (up) and NSI (down). Positions of forward and reverse PCR primers are indicated.

B. PCR analysis of wild type (lanes 1 and 3) and CK1SipAll (lanes 2 and 4) using primers CK1-2F (1F), NSII-F (1R) and NSII-R (2F).

C. PCR analysis of wild type (lanes 1 and 3) and CK1SipAl (lanes 2 and 4) using primers CK1-2F (1F), NSI-F (2R), NSIAF (3R) and NSI-R (3F). As large PCR bands are relatively difficult to amplify, and shorter PCR alleles are preferentially amplified from heterozygous strains, the absence of larger bands in lanes 4 is not surprising. Wild-type (NSII, NSI) and mutant (Φ CK1-*sipA*) alleles are indicated to the right. L: DNA 100 bp ladder (Fermentas). Other details as in Fig. 2.

D. Western analysis with anti-SipA serum. SipAK (lane 1), CK1SipAl (lane 2), wild-type (lane 3) and CK1SipAll (lane 4) strains. Additional bands corresponding to natural fluorescence of phycobiliproteins are included as loading controls.

experiments, SipA⁻ cultures were indistinguishable from the wild type (Fig. S2), while SipA^C cultures were generally (but not always) impaired in survival (data not shown). Note the non-selective conditions used to recover drops of cultures on solid media (see *Experimental procedures*).

Role of sipA in chlorosis

To investigate a possible role of SipA in adaptation of the photosynthetic machinery to stress conditions, we analysed the impact of *sipA* inactivation and upregulation in the absorbance spectra of cultures subjected to nitrogen and high-light stress. This allowed comparisons of the contents of phycocyanin, the major component of the light-harvesting phycobilisomes, and chlorophyll *a* (Fig. S1).

The levels of pigments from SipA⁻ cultures were very similar to those of wild-type cultures. In contrast, the phycocyanin content was higher on NblR⁻SipA⁻ and SipA^C cultures (Fig. 5A) and remained high when subjected to nitrogen or high-light stress, thus closely resembling the behaviour of the NblR⁻ strain (Fig. 5B). We noticed that cultures from these three mutants had also less chlorophyll than the wild-type and SipA⁻ strains, that is, they had higher PC/Chl ratios even under non-stressing conditions, but all cultures compared presented similar rates of chlorophyll loss when subjected to nitrogen starvation or high-light stress (Fig. S1).

The SipA⁻ strains were able to enter chlorosis and degrade their phycobilisome when subjected to nitrogen starvation or high-light stress. In the later conditions, phycocyanin loss seemed a bit faster in the SipA⁻ mutants than in the wild type, but overall, inactivation of the *sipA* gene had a very small impact on the phycocyanin content and the appearance of stressed cultures. However,

upregulation of the *sipA* gene from the CK1 promoter in the SipA^C strains prevented phycobilisome loss, and resulted in a strong non-bleaching phenotype, very similar to that of the NblR⁻ strain. The SipA^C derivatives had high levels of phycocyanin and were not able to reduce them when subjected to high-light or nitrogen stresses. The double mutant NblR⁻SipA⁻ was also non-bleaching, thus indicating that not all features associated with NblR deficiency are suppressed by *sipA* inactivation. Consistent with this non-bleaching and highly viable phenotype, and in contrast to the single mutant NblR⁻, when the double mutant NblR⁻SipA⁻ was subjected to prolonged stress conditions, it retained the characteristic green colour of non-bleaching cultures that are still viable (Fig. 5C).

Positive and negative regulation of the *nblA* gene

To determine whether the observed differences in phycocyanin levels were the result of altered regulation of the *nblA* gene, NblR⁻, SipA⁻ and SipA^C alleles linked to kanamycin-resistant cassettes were introduced into a reporter strain bearing a $P_{nblA}::luxAB$ fusion linked to a compatible *cat* marker. This construct, containing the -206 to -1 region from the putative translation start of the *nblA* gene, has previously been shown to be induced by nitrogen starvation and subjected to positive regulation by NtcA and PipX (Espinosa *et al.*, 2007).

Reporter strains were used to analyse *nblA* induction from wild-type, NblR⁻, SipA⁻ and SipA^C cultures shifted from ammonium-containing to nitrogen-depleted medium. Upon nitrogen deprivation, *nblA* was strongly induced in the wild-type strain, with over a 300-fold increase in bioluminescence levels after 24 h (Figs 6 and 7). As expected, induction was seriously impaired in NblR⁻ cultures, but not

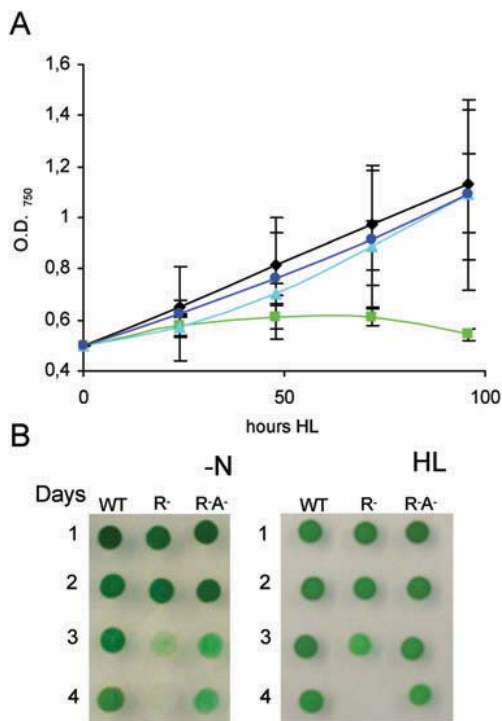


Fig. 4. Survival to stress of *Synechococcus* strains. A. Growth, as measured by OD₇₅₀, of wild type (black), NblR45 (green), SipAK (dark blue) and NblR45-SipAM (light blue) at 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. B. A total of 5 μl drops of wild-type (WT), NblR45 (R⁻), and NblR45-SipAM (R-A⁻) cultures subjected to nitrogen (-N) or high-light (HL) stress for up to 4 days as indicated were spotted onto BG11-NH₄ (left panel) or BG11 (right panel) plates, incubated under standard light conditions and photographed after 10 or 6 days respectively.

abolished. In contrast, the SipA^C cultures were efficiently induced, with values just slightly higher than those obtained for the wild-type cells. The levels of bioluminescence detected from heterozygous SipA^C cultures were always lower than those detected for wild type (Fig. 6 and data not shown), indicating that overexpression of SipA interfered with *nblA* activation.

To further investigate the relative importance of upstream regulatory sequences, we next analysed a shorter reporter derivative ($P_{nblA\Delta}::luxAB$) that retains only the two main promoters P_{nblA-2} and P_{nblA-1} , the NtcA binding site associated with P_{nblA-1} and the HLR1 element. As shown in Fig. 7, the $P_{nblA\Delta}::luxAB$ fusion showed a poor, but still significant, induction by nitrogen depletion in the wild-type strain (threefold at 24 h), indicating that most of the binding sites for activators are missing in this

construct. As this residual nitrogen induction was completely abolished in the NblR⁻ strain, it follows that in spite of the missing upstream sequences, NblR was still able to activate the shorter $P_{nblA\Delta}::luxAB$ reporter fusion.

To determine whether the putative HLR1 sequences upstream the *nblA* gene were involved in negative regulation, we substituted two conserved nucleotides (AC, mutated to TG) within the HLR1 motif present in $P_{nblA}::luxAB$, producing the mutant reporter derivative $P_{nblA(TG)}::luxAB$. It should be noted that these mutations map within the -10 box of P_{nblA-2} (positions -10/-11 in P_{nblA-2} and -20/-21 in P_{nblA-1}). In the wild-type strain, basal bioluminescence levels obtained with the mutant construct $P_{nblA(TG)}::luxAB$ were at least threefold higher in comparison with those from the wild-type construct $P_{nblA}::luxAB$, thus supporting the importance of the HLR1 motif for negative regulation under non-stress conditions. In addition, the mutations had an important impact (10-fold) on the induction levels. Inactivation of the *sipA* gene resulted in small but significant increases in bioluminescence levels in both nitrogen replete and starved cultures, the magnitude of which differed among the three reporter fusions analysed. Taken together, the results presented in Figs 6 and 7 indicate that SipA has an inhibitory effect on the expression of the *nblA* gene.

Discussion

Modulation of the *nblA* gene expression

Transcription of the *nblA* gene, the key effector of bleaching, is subjected to a complex environmental control by general acclimation and nutrient-specific factors (Schwarz and Forchhammer, 2005). The main promoter P_{nblA-2} , which is strongly activated by NblR, is an atypical NtcA-activated promoter, with NtcA boxes located at -68 and -100.5 and, importantly, with -10 and -35 boxes matching the consensus required for activator-independent initiation by RNA polymerase. NblR binds (with low affinity) to a DNA fragment containing the same *nblA* region present in $P_{nblA}::luxAB$ (Luque *et al.*, 2001). As removal of sequences upstream position -44 from P_{nblA-2} (-54 from P_{nblA-1}) had a severe impact on nitrogen induction of *nblA* but did not completely abolish NblR-dependent induction, our results (Fig. 7) suggest that full NblR activation requires sequences upstream and downstream position -44 from P_{nblA-2} .

The strong non-bleaching phenotype and impaired *nblA* induction under stress of SipA^C strains suggest a role of SipA in negative regulation of *nblA*. The increase on *nblA* expression caused by point mutations at the HLR1 motif demonstrates the implication of this *cis*-acting element in negative regulation of the *nblA* gene. Under standard growth conditions, the impact of *sipA* inactivation on *nblA*

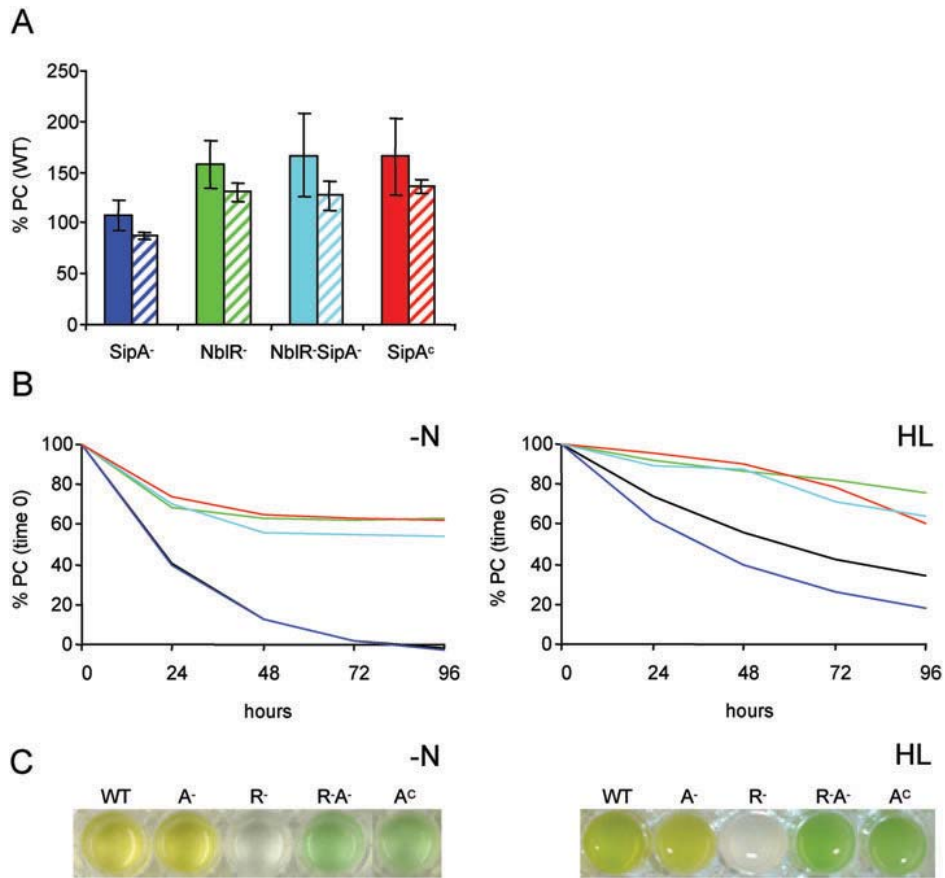


Fig. 5. Bleaching of *Synechococcus* strains.

A. Phycocyanin (PC) content of the indicated mutant strains as a percentage of wild-type levels from cultures in BG11-NH₄ (solid bars) and BG11 (hatched bars).
 B. Relative amount of PC for wild type (black), NblR45 (green), SipAK (blue), NblR45-SipAM (light blue) and CK1SipAll (red) as a function of time in the indicated (-N and HL) conditions. Time 0 corresponds to the PC levels of cultures shown in A. Pigment values are from three to five independent experiments.
 C. Appearance of cultures stressed for 8 (-N) or 4 days (HL). Wild type (WT), SipAK (A⁻), NblR45 (R⁻), NblR45-SipAM (R-A⁻) and CK1SipAll (A^c).

expression was higher from constructs retaining wild-type HLR1 sequences ($P_{nblA\Delta}$::*luxAB* and P_{nblA} ::*luxAB*) in comparison with $P_{nblA(TG)}$::*luxAB*, thus suggesting that the HLR1 motif is the target of SipA-mediated downregulation. The AC to TG change introduced into the P_{nblA} ::*luxAB* reporter cassette affects two conserved positions within the left half site of the HLR1 element and the -10 box at P_{nblA-2} . In addition to affecting repression under nitrogen abundance, the HLR1 mutations also impaired activation under nitrogen starvation. Although it cannot be excluded that the mutations impair initiation by RNA polymerase, the increased basal levels of expression and the

unchanged A+T content of $P_{nblA(TG)}$::*luxAB* are rather consistent with involvement of the targeted nucleotides in activation-specific contacts.

Which *Synechococcus* response regulator is affecting the NblS-SipA-mediated repression at *nblA*? Although the NblR activator could be a bifunctional regulator, genetic inactivation of *nblR* did not increase *nblA* expression under non-stressing conditions at all, arguing against a repressor function for NblR. The recent finding that in *Synechocystis*, the response regulator RpaB binds to the HLR1 element from the high-light-inducible *hliB* promoter (Kappell and van Waasbergen, 2007) suggests that RpaB

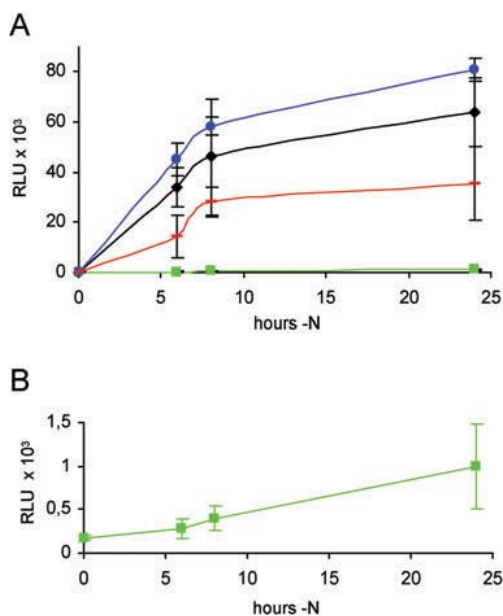


Fig. 6. Time-course of $P_{nblA}::luxAB$ induction in *Synechococcus* strains.

A. Cells were grown in the presence of ammonia, and when they reached mid-exponential phase, they were shifted to combined nitrogen-free medium. After the initiation of nitrogen deprivation at time point 0, bioluminescence from the reporter strains was recorded. The mean values and standard deviations from three to six independent experiments are given.

B. Values for NblR45-C103 represented with an extended vertical axis. Colour code as in Fig. 5.

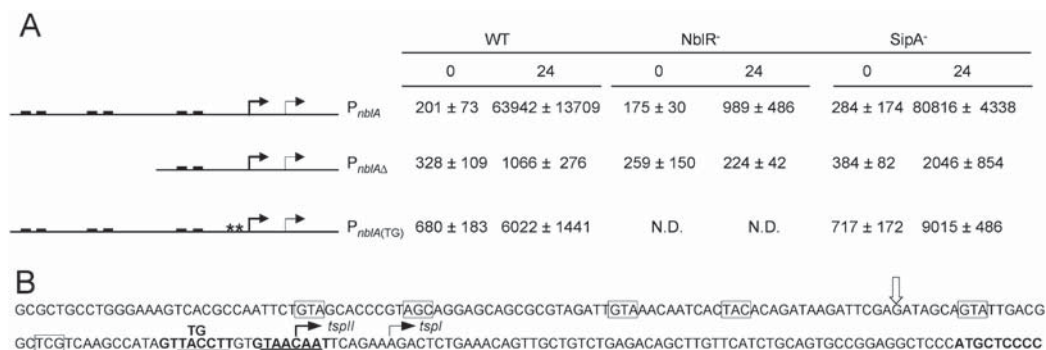


Fig. 7. Effect of *cis*- and *trans*-acting mutations on $P_{nblA}::luxAB$ expression.

A. Bioluminescence values from $P_{nblA}::luxAB$, $P_{nblA\Delta}::luxAB$ and $P_{nblA(TG)}::luxAB$ in the genetic backgrounds indicated at the top. Relevant promoter features of the three reporter fusions are indicated in each case at the left. NtcA binding sites are indicated by black rectangles, point mutations in HLR1 by asterisks and transcription initiation sites by arrows. N.D., not determined.

B. Primary structure and relevant features of the *nblA* regulatory region. The vertical wide arrow indicates the 5' end of the *nblA* region in $P_{nblA\Delta}::luxAB$. The main transcription start points, the direction of transcription and the relative strength of P_{nblA-1} and P_{nblA-2} promoters are indicated by thin and thick arrows respectively. The *nblA* coding sequences and the HLR1 motif are in bold letters. Point mutations in $P_{nblA(TG)}::luxAB$ are indicated above wild-type sequences. Putative NtcA binding sites are boxed. -10 boxes of P_{nblA-1} and P_{nblA-2} are underlined with thin and thick lines respectively. Bioluminescence values from $P_{nblA}::luxAB$ correspond to times 0 and 24 from Fig. 6. Experimental details as in Fig. 6.

can be the NblS cognate response regulator in similarly controlled genes. However, further work is needed to address this issue.

Genetic interactions between SipA and NblR

In the course of this work, we have obtained evidence of antagonistic roles played by members of two apparently distinct two-component systems, one represented by NblS-SipA and the other by NblR. In particular, SipA overproduction and NblR deficiency impair both survival to stress and degradation of the PBS, while inactivation of *sipA* restores fitness of the *nblR*-null mutant.

Survival to stress was impaired in the mutants with a high SipA/NblR ratio, that is, in SipA^o and NblR⁻ strains, but not in strains devoid of SipA or of both NblR and SipA. A simple interpretation of these data is that NblS-SipA and NblR play antagonistic regulatory functions at unknown survival genes. As the NblR⁻ mutant is more impaired in acclimation to stress than the non-bleaching strains NblA⁻ (Schwarz and Grossman, 1998) and NblR-SipA⁻ (Figs 4 and 5), NblR must be involved in the control of genes important for survival other than *nblA*. In this context, there are indications of a role of NblR in downregulation of photosynthetic electron transport under stress conditions (Schwarz and Grossman, 1998), although the putative gene targets remain unknown. If that was the case, SipA could stimulate photosynthetic activity by counteracting NblR at the same target genes. In the absence of a functional *nblR* gene, or when SipA is overproduced, this stimulatory effect would result in failure to recover from chlorosis.

At the *nblA* gene, the only NblR target identified so far, constitutive expression of *sipA* interferes with NblR-mediated activation, and the same 2 bp from the HLR1 element shown to be important for repression are also involved in nitrogen induction (presumably by NblR). NblS–SipA could thus interfere with NblR recognition and/or binding at *nblA*. The finding that the non-bleaching phenotype of the *nblR*-null mutant was not suppressed by *sipA* inactivation probably reflects the fact that NblR is a remarkable strong activator of the *nblA* gene, while in the conditions used here, SipA seems to exert just a weak negative effect.

Role of SipA in signal transduction mediated by NblS

NblS, an essential regulatory protein in *Synechococcus*, is the most conserved sensor histidine kinase in cyanobacteria, being present in all cyanobacterial genomes available to date. In *Synechocystis*, the NblS homologue (called Hik33 or DspA) has been shown to regulate a large number of genes under a variety of stress conditions, including high light, chilling, osmotic, salt and oxidative stress (Bartsevich and Shestakov, 1995; Mikami *et al.*, 2002; Marin *et al.*, 2003; Hsiao *et al.*, 2004; Tu *et al.*, 2004). The accepted view is that these different incoming signals would reduce anabolism and increase hyper-reduction of the photosynthetic electron transport, which would produce redox stress. Thus, NblS/Hik33/DspA may act as a sensor of photosynthetic redox stress under a variety of environmental circumstances. It may also respond to signal changes in membrane fluidity under certain stress conditions, such as chilling, osmotic and salt stress (Murata and Los, 2006). Although direct evidence of interaction (either protein–protein or phosphorylation) between NblS/Hik33/DspA and a response regulator has not been reported to date, genome-wide analysis of cold and hyperosmotic stress-inducible genes in *Synechocystis* suggest that at least two different response regulators, Rre26/RpaB and Rre31/RpaA, transduce the stress signal (Murata and Los, 2006).

Sequence analyses predict the following domain organization for NblS: two N-terminal membrane spanning regions, a HAMP linker domain, a PAS domain and a conserved transmitter module, made up of a histidine phosphotransfer and an ATP-binding domain. Thus, multiple modules that could engage in input sensory functions are present in NblS. Interactions of the ATP-binding domain with the regulatory factor SipA provides yet another way (not easily anticipated from the domain organization of NblS) of integrating input signals. The very small impact of *sipA* inactivation on cultures viability suggests that SipA may be an accessory factor required for just some of the NblS-dependent functions. As NblS appears to transmit signals to different response regula-

tors, SipA could also provide a means to alter partner specificity. The prediction is that genes abnormally regulated in the *nblS-1* strain (van Waasbergen *et al.*, 2002) and genes bearing recognizable HLR1 motives (Kappell *et al.*, 2006) would be regulatory targets of the NblS–SipA pair. Given the healthy appearance of the *sipA*-null mutant and the scarce phenotypic differences that we found with the wild-type strain, it seems likely that the NblS–SipA pair is involved in fine tuning rather than in drastic regulation of genes important for acclimation to stress.

It is worth noting that the phenotype of the SipA^C strains is reminiscent of that of the only *nblS* mutant (*nblS-1*), whose characterization has been reported (van Waasbergen *et al.*, 2002). Both are non-bleaching and both are impaired in acclimation to stress. The severe impact on viability caused by overexpression of SipA may be due to impairment of the same essential functions that are defective in the *nblS-1* mutant. The *nblS-1* allele contains two point mutations (G-379 to D and I-620 to V) that are thought to result in NblS locked in an active conformation. As SipA weakly stimulates *in vitro* NblS auto-phosphorylation activity (data not shown), our current hypothesis is that the non-bleaching phenotypes of *nblS-1* and SipA^C strains are both due to increased levels of phosphorylated NblS.

In summary, the SipA protein has added a new component to the complex and poorly understood signal transduction network allowing adaptation of cyanobacteria to stress. The results presented here provide insight into the role of SipA, the sensor histidine kinase NblS and the response regulator NblR in acclimation to stress and chlorosis. Future work on the field should bring light to the molecular details of the following interactions and events: phosphate transfer pathways between putative cognate partners of NblS and NblR, effect of SipA in the activity and interactions of NblS with putative response regulators partners, interactions of NblR with DNA sequences and the transcriptional machinery, and last but not least, the survival genes for which opposite regulation by NblS–SipA and NblR have been inferred in this work.

Experimental procedures

Molecular genetic techniques and growth conditions

Cloning procedures were carried out with *E. coli* DH5 α , using standard techniques. *Synechococcus* strains were routinely grown photoautotrophically at 30°C while shaking under constant illumination (40 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provided by cool white fluorescent lights. Media used were BG11_0 (no added nitrogen), BG11 (BG11_0 plus 17.5 mM NaNO₃ and 10 mM HEPES/NaOH pH 7.8) or BG11-NH₄ (BG11_0 plus 10 mM NH₄Cl and 10 mM HEPES/NaOH pH 7.8). For growth on plates, the medium was solidified by addition of 1% (w/v) agar. Plates were incubated at 30°C under constant illumination. *Synechococcus* strains were transformed as

Table 2. Oligonucleotides.

Name	Sequence
SIPA-PRO-F	5'-CATATTGGCGCCATGGATTTG-3'
SIPA-PRO-R	5'-GATTCTGCAGCTAACCTTCGC-3'
SIPA-INACT-1F	5'-CAGGTACCGAATTCGCTCAGTTC-3'
SIPA-INACT-1R	5'-GTGAATTCGTTGGCATTAAACAAC-3'
NSII-F	5'-AGGTTGTCCTTGGCGCAGCG-3'
NSII-R	5'-AGCGGATTTGCATCACAAGC-3'
NSIA-F	5'-GACGGGTACCTCTGCTGG-3'
NSIA-R	5'-GGACGGTACCTTCTGGAGCAGG-3'
NSIB-F	5'-CATAGAGCTCCTGCTCAGCCTTTC-3'
NSIB-R	5'-CTAAGAGCTCTGCTTCTTG-3'
NSI-F	5'-CGACATCTTCTGCTCCAG-3'
NSI-R	5'-TGCCTGAAAGCGTGACGAGC-3'
CK1-2F	5'-GGGGATCTCATGCTGGAG
SIPA-CHEK-1F	5'-GGATTTGCAATCGGCGATC-3'
SIPA-CHEK-1R	5'-CGGACAGACGCTTCAACAAC-3'
PnbIA-mut-F	5'-GACGGCTCGTCAAGCCATAGTTTGCTT GTGTAACAATTTCAG-3'
PnbIA-mut-R	5'-CTGAATTTTACACAAGCAAATATGGC TTGACGAGCCGTC-3'
nblA7942-D1	5'-GATAGCAGTATTGACGGCTCGTC-3'
nblA7942-E	5'-GGAGCCTCCGGCACTGCAGATG-3'
NBLS-PRO-A264F	5'-CATATTGGCGCCCGCCAGAA-3'
NBLS-PRO-R	5'-CATTCTGCAGCTAGCCGGTG-3'

described (Golden and Sherman, 1984), incubated for 48 h at 30°C under illumination on nitro-cellulose filters (Millipore), and transformants were selected on either kanamycin- or chloramphenicol-containing BG11-NH₄ or BG11 plates. For initiation of nitrogen deprivation, mid-exponential BG11-NH₄ cultures grown with the appropriate antibiotics (OD₇₅₀ of 0.5) were harvested by centrifugation, washed twice with BG11_0 and finally resuspended in BG11_0 without antibiotics. For initiation of high-light stress, BG11 cultures were grown with the appropriate antibiotics to mid-exponential phase (OD₇₅₀ of 0.5) under standard illumination conditions, washed twice with BG11 and finally resuspended in BG11 without antibiotics and then transferred to high-light conditions (500 μmol photons m⁻² s⁻¹). To check the ability to resume growth, drops of the different strains previously subjected to stress were spotted at different times on BG11-NH₄ or BG11 plates without antibiotics. Antibiotics concentrations used for *Synechococcus* were 10 μg ml⁻¹ (kanamycin) and 5 μg ml⁻¹ (chloramphenicol).

Construction of sipA mutants and derivatives

All primers used in this work are listed in Table 2. A pBluescriptII SK (+) was obtained in which the NotI site present in the polylinker was eliminated by cutting with NotI, filling in with Klenow polymerase and self-ligation. The resulting vector was named pBluescriptII SK (+)WNot. A DNA fragment containing *sipA* and its flanking regions was obtained by PCR on genomic DNA using primers SIPA-INACT-F and SIPA-INACT-R. This PCR product was cut with KpnI and EcoRI and cloned into pBluescriptII SK (+)WNotI, giving plasmid pUAGC220. The 1.3 kb kanamycin-resistance cassette CK1 was extracted from pRL161 with HincII and cloned into plasmid pUAGC220 previously cut with NotI and StyI and

Klenow-treated. The resulting plasmid, pUAGC221, carried the CK1 cassette in antisense to *sipA* with an internal deletion. Plasmid pUAGC221 was then transformed into *Synechococcus*, and clones resistant to kanamycin were selected. One of these clones, thereafter strain SipAK, was selected for further analysis. A similar plasmid, pUAGC223, was constructed in which the *sipA* gene was inactivated by insertion of a chloramphenicol-resistance cassette obtained from plasmid pT25 cut with Sau3AI and treated with Klenow before ligation. Transformation of this plasmid into wild-type and NblR45 strains, resulted in strains SipAM and NblR45-SipAM respectively.

A 878-bp-long fragment from NSI (Andersson *et al.*, 2000) was amplified from *Synechococcus* genomic DNA using primers NSIA-F and NSIA-R. The PCR product was cut with KpnI and cloned into the KpnI site of pBluescript II SK(+), giving plasmid pUAGC620. A 884-kb-long fragment from NSI was amplified from *Synechococcus* genomic DNA using primers NSIB-F and NSIB-R. The PCR product was cut with SacI and cloned into the SacI site of pUAGC620, giving the NSI-targeting plasmid pUAGC623.

Plasmid pUAGC220 was cut with Accl, Klenow-treated and cut with XhoI. The resulting 510 bp blunt-XhoI fragment was ligated to HincII CK1 *in vitro*, and the resulting 1.8 kb blunt-XhoI CK1-*sipA* fragment was Klenow-treated and cloned into NSII-targeting pAM1580 vector previously digested with BstEII and Klenow-treated (thus eliminating the 5 kb fragment containing the Cm^r cartridge, MCS and *luxAB* genes), giving plasmid pUAGC231. In this construct, the *sipA* gene would be controlled from the CK1 promoter. This plasmid was used to transform *Synechococcus*, and one of the kanamycin-resistant clones, strain CK1SipAll, was selected for further analysis. Strain CK1SipAI, generated with the same rationale, contains the CK1-*sipA* fragment into NSI. The CK1-*sipA* fragment was cloned into the XhoI-NotI site of pUAGC623, giving plasmid pUAGC232, which was then used to transform *Synechococcus*.

Construction of luxAB reporter strains

Plasmids pUAGC221, pENS45 and pUAGC232 were used to transform strain WT-C103 (Espinosa *et al.*, 2007), giving strains SipAK-C103, NblR45-C103 and CK1SipAI-C103 respectively. A 113 bp fragment was amplified with primers nblA7942-D1 and nblA7942-E from *Synechococcus* genomic DNA and cloned into the NSII-targeting vector pAM1580, giving plasmid pUAGC104 (P_{nblA}::*luxAB*). QuickChange Large Mutagenesis Kit was used to introduce two-point mutations into the HLR1 motif (see Fig. 6 for details). The mutagenic reaction was performed following manufacturer's instructions using mutagenic primers PnbIA-mut-F and PnbIA-mut-R and pUAGC103 as template, giving plasmid pUAGC110 (P_{nblA(TG)}::*luxAB*). Plasmids pUAGC104 and pUAGC110 were used to transform *Synechococcus*, generating strains WT-C104 and WT-C110 respectively. Strains SipAK-C104, NblR45-C104 and SipAK-C110 were generated following the same rationale.

Determination of luciferase activity

To determine bioluminescence, 1 ml of cultures grown to mid-exponential phase was adjusted at an OD₇₅₀ of 0.5, and

supplemented with decanal to a final concentration of 0.25 mM from a 50 mM stock solution made up in 10% dimethyl sulfoxide. Light emission was recorded in a Berthold LB9509 luminometer. Bioluminescence was recorded every 20 s for 10 min. Light emission increased to a maximum and then declined. Maximum luminescence at the peak, presented as RLU (relative light units) by the instrument, is the value used at each selected time point.

Determination of pigments contents spectrophotometrically

Whole-cell absorbance spectra were carried out in order to estimate pigment contents. One millilitre of cultures was taken at indicated times and conditions, diluted with fresh medium to an OD_{750} of 0.5 and absorbance spectra (550–750 nm) were recorded on a UV/Visible Ultraspec 2100 pro (GE Healthcare Life Sciences). Pigment content was calculated based on absorbance maxima at 631 nm for phycocyanin and 684 nm for chlorophyll *a*, essentially as described (Myers *et al.*, 1980).

Coexpression and purification of H6-NbIS^{264–664} and SipA from *E. coli*

To construct plasmid pUAGC56, *nbIS* sequences encoding amino acids 264 to 664 were amplified from *Synechococcus* genomic DNA with NBL5-PRO-A264F and NBL5-PRO-R, cut with Ehel and PstI and cloned into pPROEX-HTa (Invitrogen). To construct plasmid pUAGC420, an Ehel–XhoI fragment from pUAGC419 carrying *sipA* sequences was cloned into pET28(a)+, cut with NcoI, Klenow-treated and cut again with XhoI. For expression, *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL cells (Stratagene) were cotransformed with pUAGC56 and pUAGC420. Cells were grown in the autoinductive ZYP-5052 medium supplemented with ampicillin (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$), kanamycin (33 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and chloramphenicol (33 $\mu\text{g ml}^{-1}$), and the expression of proteins was carried out following an autoinduction method (Studier, 2005). Cells were harvested, disrupted by sonication, and the soluble fraction was purified by Ni-affinity chromatography using 5 ml HisTrap FF (GE Healthcare). Elution of the protein was carried out using 150 mM of imidazol. Fractions containing NbIS^{264–664} were digested with TEV protease (1:50 relation protease: protein) and dialysed to eliminate the imidazol. A second Ni-affinity chromatography was carried out to separate undigested and digested proteins. The digested fractions were concentrated using Amicon (Millipore), and finally submitted to a size-exclusion chromatography using a Superdex G100 16/60 column (GE Healthcare).

Overexpression of SipA and production of antibodies

To construct plasmid pUAGC419, *sipA* sequences were amplified from genomic DNA with SIPA-PRO-F and SIPA-PRO-R, cut with Ehel and PstI and cloned into pPROEX-HTa (Invitrogen). *E. coli* BL21 (DE3) carrying plasmid pUAGC419 was grown to log phase ($OD_{600} = 0.5–0.7$) at 37°C, and protein overexpression was induced with 1 mM isopropyl- β -

d-thiogalactopyranoside. After incubation for 3 h at 16°C, cells were harvested by centrifugation, washed with 50 mM of Tris-HCl pH 7.4, 0.25 M NaCl and resuspended in lysis buffer [25 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF)]. Cells were disrupted by sonication and unbroken cells and cell debris removed by ultracentrifugation (30 min at 30 000 *g*) at 4°C. The protein was purified by Ni-affinity chromatography using 5 ml of HiTrap™ chelating columns (Pharmacia) equilibrated in A buffer (25 mM Tris pH 8.0, 0.2 M NaCl), and elution was carried out with a linear gradient of buffers A to B (B = 25 mM Tris pH 8.0, 0.2 M NaCl, 0.5 M imidazol). The elution was collected in 2 ml fractions, and the purest fractions (as determined by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining) were pooled and dialysed overnight against buffer. The 6His-tag was removed by digestion with TEV protease, followed by and additional Ni-affinity chromatography to separate undigested and digested proteins. The untagged SipA fractions were pooled, concentrated using Amicon Ultra (Millipore) and stored at –80°C until use. A total of 4 mg of SipA purified in this way was sent to Genosphere for the production of polyclonal anti-SipA antibodies.

Native PAGE analysis

The electrophoretic analysis of the complex formation was similar to that described by Casino *et al.* (2007). H6-NbIS^{264–664}, SipA or a mixture of both proteins in buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.0 and 100 mM NaCl) were incubated for 30 min at 25°C, after which glycerol was added to 10% (v/v) to facilitate gel loading. Afterwards, samples were subjected to Native PAGE in 8% native gels at 4°C for 3 h at 100 V. The bands corresponding to the proteins were visualized by Coomassie brilliant blue staining.

Preparation of protein extracts from *Synechococcus*

Cells from a 15 ml sample of *Synechococcus* cultures at OD_{750} of 0.5 were harvested by centrifugation at 7300 *g* for 5 min. The pellet was resuspended in 100 μl of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 4 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM Benzamidine, 1 mM DTT), and 50 μl of 100 μm glass beads was added. The mixture was homogenized with four cycles of 10 s in a Minibeatbeater. The cell lysate was centrifuged at 13 800 *g* for 10 min at 4°C, and the supernatant fraction was transferred to a new tube. Protein concentration was estimated by the Bradford method.

Detection of SipA by western blot

Equivalent amounts of protein extracts (40 μg) from the different strains were electrophoresed by SDS-PAGE on a 5–20% gradient gel at 100 V and 4°C, and blotted onto a Hybond-LFP membrane (Amersham Biosciences). Membranes were probed with polyclonal anti-SipA (1/1000 dilution) antibodies from Genosphere. Primary antibodies were detected with anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody (Amersham Biosciences) at 1/2000 dilution. Membranes were incubated with the ECL plus Western blotting detection reagents (Amersham Biosciences) following the

manufacturer's specification, and the bands were detected using the image analyser Typhoon™ 9410 in fluorescence mode with filter 520 BP 40 (Amersham Biosciences). Quantification of SipA protein was performed using the ImageQuant TV program (Amersham Biosciences).

Acknowledgements

We thank I. Luque for constructing plasmid pUAGC104 and K. Forchhammer and J. Espinosa for helpful comments and discussions. This work was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia (Grants BFU2005-02231, BFU2006-12424 and BIO2005-00153) and the Generalitat Valenciana (Grant ACOMP06/083).

References

- Andersson, C.R., Tsinoremas, N.F., Shelton, J., Lebedeva, N.V., Yarrow, J., Min, H., and Golden, S.S. (2000) Application of bioluminescence to the study of circadian rhythms in cyanobacteria. *Methods Enzymol* **305**: 527–542.
- Ashby, M.J., and Houmard, J. (2006) Cyanobacterial two-component proteins: structure, diversity, distribution, and evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 472–509.
- Bartsevich, V.V., and Shestakov, S.V. (1995) The *dspA* gene product of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 influences sensitivity to chemically different growth inhibitors and has amino acid similarity to histidine protein kinases. *Microbiology* **141**: 2915–2920.
- Casino, P., Fernández-Alvarez, A., Alfonso, C., Rivas, G., and Marina, A. (2007) Identification of a novel two component system in *Thermotoga maritima*. Complex stoichiometry and crystallization. *Biochim Biophys Acta* **1774**: 603–609.
- Collier, J.L., and Grossman, A.R. (1992) Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *J Bacteriol* **174**: 4718–4726.
- Elhai, J., and Wolk, C.P. (1988) A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene* **68**: 119–138.
- Espinosa, J., Forchhammer, K., Burillo, S., and Contreras, A. (2006a) Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA. *Mol Microbiol* **61**: 457–469.
- Espinosa, J., Fuentes, I., Burillo, S., Rodríguez-Mateos, F., and Contreras, A. (2006b) SipA, a novel type of protein from *Synechococcus* sp. PCC 7942, binds to the kinase domain of NblS. *FEMS Microbiol Lett* **254**: 41–47.
- Espinosa, J., Forchhammer, K., and Contreras, A. (2007) Role of the *Synechococcus* PCC 7942 nitrogen regulator protein PipX in NtcA-controlled processes. *Microbiology* **153**: 711–718.
- Golden, S.S., and Sherman, L.A. (1984) Optimal conditions for genetic transformation of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *J Bacteriol* **158**: 36–42.
- Grossman, A.R., Schaefer, M.R., Chiang, G.G., and Collier, J.L. (1993) The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Rev* **57**: 725–749.
- Grossman, A.R., Bhaya, D., and He, Q. (2001) Tracking the light environment by cyanobacteria and the dynamic nature of light harvesting. *J Biol Chem* **276**: 11449–11452.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In *DNA Cloning*. Glover, D.M. (ed.). Oxford: IRL Press, pp. 109–135.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A.M., and Flores, E. (2001) Nitrogen control in cyanobacteria. *J Bacteriol* **183**: 411–425.
- Hsiao, H.Y., He, Q., Van Waasbergen, L.G., and Grossman, A.R. (2004) Control of photosynthetic and high-light-responsive genes by the histidine kinase DspA: negative and positive regulation and interactions between signal transduction pathways. *J Bacteriol* **186**: 3882–3888.
- Kappell, A.D., and van Waasbergen, L.G. (2007) The response regulator RpaB binds the high light regulatory 1 sequence upstream of the high-light-inducible *hliB* gene from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Arch Microbiol* **187**: 337–342.
- Kappell, A.D., Bhaya, D., and van Waasbergen, L.G. (2006) Negative control of the high light-inducible *hliA* gene and implications for the activities of the NblS sensor kinase in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *Arch Microbiol* **186**: 403–413.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5752–5756.
- Luque, I., Zabalón, G., Contreras, A., and Houmard, J. (2001) Convergence of two global transcriptional regulators on nitrogen induction of the stress-acclimation gene *nblA* in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol Microbiol* **41**: 937–947.
- Marin, K., Suzuki, I., Yamaguchi, K., Ribbeck, K., Yamamoto, H., Kanesaki, Y., et al. (2003) Identification of histidine kinases that act as sensors in the perception of salt stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 9061–9066.
- Mikami, K., Kanesaki, Y., Suzuki, I., and Murata, N. (2002) The histidine kinase Hik33 perceives osmotic stress and cold stress in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Mol Microbiol* **46**: 905–915.
- Murata, N., and Los, D.A. (2006) Histidine Kinase Hik33 is an important participant in cold-signal transduction in cyanobacteria. *Physiol Plant* **126**: 17–27.
- Myers, J., Graham, J.-R., and Wang, R.J. (1980) Light harvesting in *Anacystis nidulans* studied in pigment mutants. *Plant Physiol* **66**: 1144–1149.
- Schwarz, R., and Forchhammer, K. (2005) Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex network of cellular responses. *Microbiology* **151**: 2503–2514.
- Schwarz, R., and Grossman, A.R. (1998) A response regulator of cyanobacteria integrates diverse environmental signals and is critical for survival under extreme conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11008–11013.
- Sendersky, E., Lahmi, R., Shaltiel, J., Perelman, A., and Schwarz, R. (2005) NblC, a novel component required for pigment degradation during starvation in *Synechococcus* PCC 7942. *Mol Microbiol* **58**: 659–668.

- Studier, F.W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**: 207–234.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**: 60–89.
- Tanigawa, R., Shirokane, M., Maeda Si, S., Omata, T., Tanaka, K., and Takahashi, H. (2002) Transcriptional activation of NtcA-dependent promoters of *Synechococcus* sp. PCC 7942 by 2-oxoglutarate *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 4251–4255.
- Tu, C.J., Shrager, J., Burnap, R.L., Postier, B.L., and Grossman, A.R. (2004) Consequences of a deletion in *dspA* on transcript accumulation in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *J Bacteriol* **186**: 3889–3902.
- Vazquez-Bermudez, M.F., Herrero, A., and Flores, E. (2002) 2-Oxoglutarate increases the binding affinity of the NtcA (nitrogen control) transcription factor for the *Synechococcus glnA* promoter. *FEBS Lett* **512**: 71–74.
- van Waasbergen, L.G., Dolganov, N., and Grossman, A.R. (2002) *nbIS*, a gene involved in controlling photosynthesis-related gene expression during high light and nutrient stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Bacteriol* **184**: 2481–2490.

Supplementary material

This material is available as part of the online article from:
<http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2958.2007.06035.x>
(This link will take you to the article abstract).

Please note: Blackwell Publishing is not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

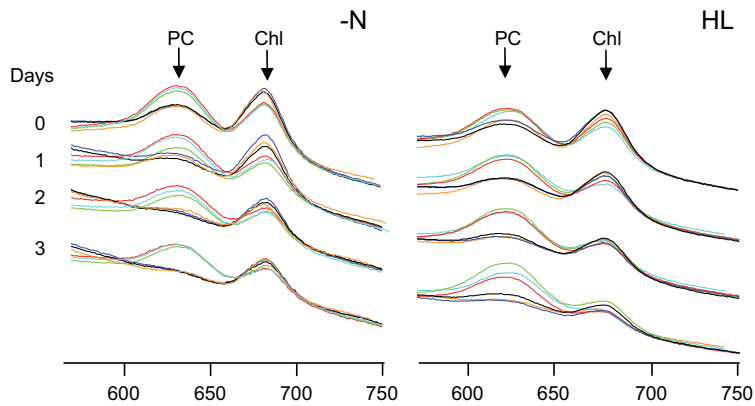


Fig. S1. Pigment degradation by *Synechococcus* strains. Whole-cell absorbance spectra were recorded at the indicated times. *Synechococcus* wild-type (black), SipAK (dark blue), SipAM (orange), NblR (green), SipA^C (red) and NblR-SipA⁻ (light blue) cultures were transferred at mid-exponential phase from BG11-NH₄ to nitrogen-depleted medium (-N) or from standard culture conditions (BG11 and low light) to 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL). The absorbance peak of phycocyanin (PC), and chlorophyll a (Chl) are indicated. Groups of spectra were shifted along the y axis for clarity.

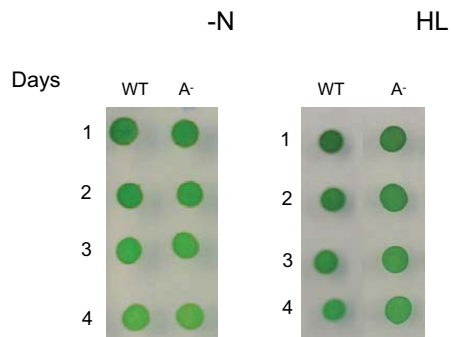


Fig. S2. Survival of wild type (WT) and SipAK (A⁻) to stress conditions. Drops of cultures subjected to nitrogen (-N) or light (HL) stress for up to 4 days as indicated, were spotted onto BG11-NH₄ plates and photographed after 6 (HL) or 10 (-N) days.

4.2.3. NblR, un RR atípico en cianobacterias

Este trabajo es lógica continuación del anterior por la necesidad de encontrar pistas que apoyaran la teoría de que NblR era el regulador de la respuesta socio de NblS y que ambos formaban parte de un TCS. Aquí se ofrecen y se discuten pruebas estructurales y funcionales que indican que la activación de NblR mediante señales de estrés, no implica la fosforilación del residuo de aspártico conservado en su dominio aceptor, y por lo tanto, presentando una contradicción dentro del paradigma de la transducción mediada por TCS. Para confirmar esta hipótesis evaluamos en NblR el papel de residuos clave en la activación por fosforilación de RRs, para así conocer si este RR podía ser activado por un mecanismo análogo. Los diferentes ensayos sugieren un proceso de activación alternativo a la fosforilación del residuo conservado de aspártico y nosotros proponemos el término PIARR (activación de los reguladores de la respuesta independientemente de su fosforilación) para llamar a aquellos RRs que formen parte de esta familia. Además en el artículo descartamos que NblR interaccione con NblS y por lo tanto que ambas proteínas formen un TCS.

Alineamientos de la secuencia de NblR con secuencias de RR canónicos, dieron las primeras pistas de la falta de ciertos residuos que han sido descritos como esenciales para la fosforilación y consiguiente activación de esta familia de proteínas, aunque si presentaba el residuo de aspártico (Asp⁵⁷) en la posición conservada para ser fosforilado por la HK. La realización de un modelo estructural del RD de NblR nos sirvió para mostrar, mediante la superposición de este modelo con las estructuras de diferentes RDs de RR canónicos, que estas discrepancias

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de secuencia correspondían a posiciones claves para el proceso de fosforilación y posterior activación del RR.

Las diferencias encontradas a nivel de estructura primaria con RR canónicos sugerían que la fosforilación del Asp⁵⁷ no era el mecanismo de activación para NblR. Para confirmar esta posibilidad intentamos la fosforilación *in vitro* utilizando el fosfodonor acetilfosfato, como ha sido demostrada para múltiples RRs, tanto del RD como la proteína completa de NblR. Análisis por geles nativos y bidimensionales mostraron que en ninguno de los dos casos NblR se encontraba fosforilada. Ensayos de espectrometría de masas confirmaron este hecho.

Es conocido que el mecanismo de activación por fosforilación de los RRs induce la dimerización de estos. En concreto, NblR pertenece a la familia OmpR/PhoB de RR, los cuales dimerizan para unirse a secuencias de ADN. En esta y otras familias de RR, la dimerización, y por consiguiente su activación, es inducida por cambios conformacionales derivados de la coordinación de una Thr/Ser conservada con un oxígeno del grupo fosforilo tras la fosforilación del RD. Estos cambios conformacionales permiten la inserción en el núcleo de la proteína de un residuo hidrofóbico expuesto, originando un cambio en la superficie del RD que permite su dimerización. El modelo estructural del RD de NblR puso de manifiesto la sustitución de esta Thr por una Metionina (Met⁸⁵) que impediría tanto la activación por fosforilación. El modelo también mostró que los elementos estructurales que contienen la Thr y residuos hidrofóbicos implicados en los cambios conformacionales necesarios para la activación por fosforilación presentaban residuos de cisteína (Cys69 y Cys96) a distancias adecuadas para formar un “puente disulfuro”. Este

hecho nos hizo reflexionar sobre la posibilidad de que la formación y destrucción de un puente disulfuro entre estas cisteínas, posiblemente dependiente del estado redox de cada momento, podía estar implicado en la activación de NblR. Ensayos *in vitro* por cromatografía de exclusión molecular, bajo diferentes condiciones (en presencia de agentes oxidantes, reductores, fosfodonadores,...) nos mostró en todos los casos que NblR siempre se comportaba como un monómero. Ensayos *in vivo* de doble híbrido en levaduras, donde tanto el cebo como la presa eran NblR, confirmaron que no existe interacción entre monómeros de NblR. Tomando tanto los ensayos *in vitro* como los ensayos *in vivo* en su conjunto, indicamos que NblR no se activa por fosforilación, que es un monómero y que debe presentar un mecanismo, aun desconocido, de activación que inuzca su dimerización.

Si NblR era un RR que aún teniendo el aspártico fosforilable (Asp⁵⁷) parecía que no se podía fosforilar, nos preguntamos si dicho Asp jugaba un papel importante en la aclimatación durante procesos de estrés. Se construyeron estirpes mutantes con la sustitución de Asp por una Ala (*nblR^{D57A}*) y se midieron los niveles de ficocianina de la estirpe mutante comparada con la estirpe silvestre en condiciones de estrés de nitrógeno. Tanto *nblR^{D57A}* como la estirpe silvestre portaron altos niveles de ficocianina, indicando que el Asp⁵⁷ no era necesario para la activación del gen *nblA*, el principal implicado en la descomposición de los ficobilisomas y cuya expresión es controlada, entre otros, por NblR.

Los análisis de doble híbrido en levaduras para encontrar pruebas de interacción entre NblS y NblR fueron negativos, concluyendo que NblR no es el regulador de la respuesta socio de NblS y que ambos no

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

forman parte del mismo TCS, sin embargo en su lugar múltiples clones que contenían la nitrato reductasa NarB y la subunidad H del complejo NAD(P)H deshidrogenasa (ndhH), se encontraron como presas. El reto consiste ahora en determinar el significado fisiológico de las interacciones proteína-proteína de estos con NblR detectado por los métodos de doble híbrido en levaduras.

El estudio del RD de NblR y de otros RRs que no se fosforilaban para su activación, como FrzS y HP1043, en comparación con RRs canónicos, pusieron de manifiesto que aunque carecían de residuos involucrados en su fosforilación, todos ellos mantenían la naturaleza esencial de la superficie utilizada para la dimerización, lo que sugería que esta superficie debería estar involucrada en la propagación de la señal. Para reconocer la existencia de mecanismos alternativos de la entrada de la señal en la superfamilia de RRs de los TCS, nosotros proponemos el término PIARR (reguladores de la respuesta cuya activación es independiente de su fosforilación).

Después de nuestros resultados, queda claro que la fosforilación de los RDs canónicos, el paradigma de la entrada de la señal en los RRs, debe coexistir con formas alternativas de comunicación donde se encuentren estas proteínas PIARR. Sin duda la investigación con estos RRs atípicos debería en gran medida aumentar nuestro entendimiento de la transducción de señales en procariotas.

Contribución individual al trabajo

Mi contribución en este trabajo se centró en la caracterización *in vitro* e *in silico* de NblR. Para lo cual realicé la construcción del plásmido

que contenía el RD de NblR y puse a punto los protocolos de expresión de este y de su forma completa. Posteriormente puse a punto un protocolo de solubilidad y purificación para ambas proteínas, y por último produje en cantidad y pureza suficientes ambas proteínas para la realización de los ensayos *in vitro*, que fueron llevados a cabo por mí. En paralelo con los ensayos *in vitro* realicé el modelado estructural del RD de NblR y los posteriores análisis estructurales, que incluyeron los alineamientos estructurales. Para obtener pruebas experimentales de la fosforilación de NblR realice todos los ensayos de fosforilación con acetilfosfato en geles bidimensionales y en geles nativos. Para dilucidar el estado oligomérico de NblR realicé todos los ensayos cromatográficos descritos en el trabajo.

Phosphorylation-independent activation of the atypical response regulator NblR

Diego Ruiz,¹ Paloma Salinas,¹ María Luisa Lopez-Redondo,² María Luisa Cayuela,¹ Alberto Marina² and Asunción Contreras¹

¹División de Genética, Universidad de Alicante, Apartado 99, E-03080 Alicante, Spain

²Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC) and CIBERER, 46010 Valencia, Spain

Correspondence
Asunción Contreras
contrera@ua.es

Received 20 May 2008
Revised 20 June 2008
Accepted 26 June 2008

Cyanobacteria respond to environmental stress conditions by adjusting their photosynthesis machinery. In *Synechococcus* sp. PCC 7942, phycobilisome degradation and other acclimation responses after nutrient or high-light stress require activation by the orphan response regulator NblR, a member of the OmpR/PhoB family. Although NblR contains a putative phosphorylatable residue (Asp57), it lacks other conserved residues required to chelate the Mg²⁺ necessary for aspartic acid phosphorylation or to transduce the phosphorylation signal. In close agreement with these features, NblR was not phosphorylated *in vitro* by the low-molecular-mass phosphate donor acetyl phosphate and mutation of Asp57 to Ala had no impact on previously characterized NblR functions in *Synechococcus*. On the other hand, *in vitro* and *in vivo* assays show that the default state of NblR is monomeric, suggesting that, despite input differences, NblR activation could involve the same general mechanism of activation by dimerization present in known members of the OmpR/PhoB family. Structural and functional data indicate that the receiver domain of NblR shares similarities with other phosphorylation-independent response regulators such as FrzS and HP1043. To acknowledge the peculiarities of these atypical 'two-component' regulators with phosphorylation-independent signal transduction mechanisms, we propose the term PIARR, standing for phosphorylation-independent activation of response regulator.

INTRODUCTION

Cyanobacteria, photosynthetic prokaryotes that perform plant-type oxygenic photosynthesis, have developed mechanisms to modify the composition of their photosynthetic machinery in response to environmental changes (Grossman *et al.*, 1993). One dramatic example of this adaptation is the process of chlorosis or bleaching, by which non-diazotrophic cyanobacteria degrade their light-harvesting antennae, the phycobilisomes, when exposed to stress conditions such as nutrient starvation (Collier & Grossman, 1992). The small protein NblA (non-bleaching protein A) is required for phycobilisome degradation (Collier & Grossman, 1994). The loss of phycobilisomes and a reduction of the chlorophyll content during stress conditions are responsible for the yellow appearance of chlorotic cultures. Degradation of phycobilisomes avoids excessive absorption of excitation energy and supplies the cell with amino acids for the synthesis of proteins required for acclimation and cell survival (Grossman *et al.*, 2001).

Abbreviations: BACTH, bacterial adenylate cyclase two-hybrid; HK, histidine kinase; HL, high light; PIARR, phosphorylation-independent activation of response regulator; RD, receiver domain; RR, response regulator; RLU, relative light units.

A supplementary figure is available with the online version of this paper.

Two-component regulatory systems are widely used in signal transduction and adaptation to environmental changes in bacteria (Gao *et al.*, 2007). In the prototype system a phosphate is transferred from a histidine in the dimerization and histidine phosphotransfer (DHP) domain of a sensor histidine kinase (HK) to an aspartate in the receiver domain (RD) of a cognate response regulator (RR). Phosphorylation of the RD leads to conformational changes of the adjacent output domains. While the latter domain is structurally and functionally diverse, phosphorylation by cognate HKs requires structural conservation of RDs (reviewed in depth by Stock *et al.*, 2000).

Consistent with their role in adaptation to environmental changes, a HK, NblS (van Waasbergen *et al.*, 2002) and NblR (Schwarz & Grossman, 1998), a RR from the OmpR/PhoB subfamily, have been implicated in general adaptation to stress in *Synechococcus* sp. PCC 7942 (hereafter *Synechococcus*). NblS, an essential protein in *Synechococcus*, is the most conserved sensor HK in cyanobacteria, homologues being present in all cyanobacterial genomes available to date. Sequence analysis predicts the following domain organization for NblS: two N-terminal membrane-spanning regions (TM1 and TM2), a HAMP linker, a PAS domain and a conserved transmitter module, made up of a DHP domain and an ATP-binding domain (HATPase_c).

Also conserved in cyanobacteria is SipA, a non-essential small regulatory factor that binds to the NblS HATPase domain and seems to cooperate with NblS in negative regulation of the *nblA* gene (Espinoza *et al.*, 2006; Salinas *et al.*, 2007). NblR is required for the strong increase in *nblA* gene expression observed during nutrient stress in *Synechococcus* (Luque *et al.*, 2001; Salinas *et al.*, 2007; Schwarz & Grossman, 1998; Sendersky *et al.*, 2005). The finding that point mutations in *nblS* also resulted in a non-bleaching phenotype (van Waasbergen *et al.*, 2002) prompted suggestions of NblS being involved in the activation of NblR. However, NblR is required for induction of the chlorosis process, whereas the reported NblS mutant *nblS-1*, probably a gain-of-function mutant (Kappell *et al.*, 2006), prevents chlorosis. NblR is also required for stress survival, and here NblS-SipA and NblR also seem to play opposite roles, as inferred from suppression of the NblR⁻ phenotype by *sipA* inactivation (Salinas *et al.*, 2007). Although the putative gene targets remain unknown, there are indications of a role for NblR in downregulation of photosynthetic electron transport under stress conditions (Schwarz & Grossman, 1998). However, the mechanism and components involved in NblR activation remain to be elucidated.

In this work we provide and discuss structural and functional evidence indicating that activation of the NblR RR by stress signals does not rely on RD phosphorylation and it is therefore at odds with the paradigm for signal transduction by two-component RRs. To recognize the existence of alternative signal transduction mechanisms of atypical proteins whose RDs maintain most of the structural features of canonical RRs, but differ at residues directly involved in RD phosphorylation, we propose the term PIARR (phosphorylation-independent activation of response regulator).

METHODS

Molecular genetic techniques, culture conditions and two-hybrid methods. Strains used in this work are listed in Table 1. Cloning procedures were carried out with *Escherichia coli* DH5 α , using standard techniques.

Synechococcus strains were routinely grown photoautotrophically at 30 °C while shaking under constant illumination (40 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provided by cool white fluorescent lights. Media used were BG11₀ (no added nitrogen), BG11 (BG11₀ plus 17.5 mM NaNO₃ and 10 mM HEPES/NaOH pH 7.8) or BG11-NH₄ (BG11₀ plus 10 mM NH₄Cl and 10 mM HEPES/NaOH pH 7.8). For growth on plates, the medium was solidified by addition of 1% (w/v) agar. Plates were incubated at 30 °C under constant illumination. *Synechococcus* strains were transformed as described by Golden & Sherman (1984), incubated for 48 h at 30 °C under illumination on nitro-cellulose filters (Millipore), and transformants were selected on kanamycin-, chloramphenicol- or streptomycin-containing BG11 plates. For initiation of nitrogen deprivation, mid-exponential-phase BG11-NH₄ cultures grown with the appropriate antibiotics (OD₇₅₀ 0.5) were harvested by centrifugation, washed twice with BG11₀ and finally resuspended in BG11₀ without antibiotics. For initiation of high-light (HL) stress, BG11 cultures were grown with the appropriate

antibiotics to mid-exponential phase (OD₇₅₀ 0.5) under standard illumination conditions, washed twice with BG11 and finally resuspended in BG11 without antibiotics and then transferred to HL conditions (500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). To check the ability to resume growth, drops of the different strains previously subjected to stress were spotted at different times on BG11 plates without antibiotics. Antibiotic concentrations used for *Synechococcus* were 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (kanamycin) and 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (chloramphenicol and streptomycin).

Yeast culture and transformation procedures were as described by Ausubel *et al.* (1999). To perform yeast two-hybrid screenings, previously obtained *Synechococcus* Sau3AI (Burillo *et al.*, 2004) or *Tsp5091* libraries (Burillo, 2006) were transformed into *Saccharomyces cerevisiae* PJ696 and mated to strain Y187 carrying either pUAGC3 or pUAGC301. To determine interaction patterns amongst selected proteins, expression from the three reporters present in PJ696/Y187 diploids was determined as previously described (Burillo *et al.*, 2004).

For bacterial adenylate cyclase two-hybrid assays, *E. coli* DHM1 harbouring appropriate plasmid derivatives was grown at 25–28 °C with ampicillin (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and chloramphenicol (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Complementation was tested on M63 containing maltose (0.3%), thiamin (0.0001%), IPTG (0.5 mM) and X-Gal (80 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

Modelling and structural alignment. The 3D structure model of the NblR receiver domain was produced by the combination of the structural models proposed by the Swiss-model repository (Kopp & Schwede, 2004) and MODBASE (Pieper *et al.*, 2004). This initial model was subsequently subjected to energy minimization using the program CNS (Brunger *et al.*, 1998). The quality of the final model was assessed using the PROCHECK suite of programs (Morris *et al.*, 1992). The receiver domain structures of phosphorylated Spo0A from *Bacillus stearothermophilus* (RCSB code 1QMP) (Lewis *et al.*, 1999), beryllium fluoride-activated PhoB from *E. coli* (RCSB code 1ZES) (Bachhawat *et al.*, 2005), FrzS from *Myxococcus xanthus* (RCSB code 2GKG) (Fraser *et al.*, 2007), beryllium fluoride-activated CheY from *E. coli* (RCSB code 1FQW) (Lee *et al.*, 2001), HP1043 from *Helicobacter pylori* (RCSB code 2PLN) as well as the NblR model were structurally aligned using the LSQKAB program as implemented in the CCP4 suite (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994).

Construction of an *nblR*^{D57A} mutant and derivative strains. An *EcoRI*–*Sall* fragment from plasmid pENS43 carrying the *nblR* gene was cloned into pBluescriptII SK(+), giving plasmid pUAGC235. QuickChange Mutagenesis with primers NblR-D57A-F and NblR-D57A-R and plasmid pUAGC235 as template resulted in plasmid pUAGC238, carrying *nblR*^{D57A} (see Table 2 for primers). To generate appropriate flanking sites, the CS3 cassette (Sm^R) from pRL453 was recombined into *HindIII* pBluescriptII SK(+), giving plasmid pUAGC453. A *HincII*–*EcoRV* fragment containing the CS3 cassette from pUAGC453 was then cloned into the Klenow-treated *StyI* site of pUAGC238 (downstream *nblR*^{D57A}), giving plasmid pUAGC240. Downstream sequences of *nblR* (670 bp) were amplified from genomic *Synechococcus* DNA using primers NblR-down-4F and NblR-down-4R. The PCR product was then cut with *HindIII* and *HincII* and Klenow filled. This blunt fragment was then cloned into *HincII*-cut pUAGC240, giving plasmid pUAGC239, carrying the CS3 cassette between *nblR* and the ORF *Synpcc7942_2306*. Transformation of pUAGC239 into *Synechococcus* resulted in stable chromosomal integration of the CS3 cassette and adjacent sequences, as confirmed by PCR with primers NblR-1F and CS3-2R. The presence of *nblR*^{D57} or *nblR* alleles was checked by a second PCR with primers NblR-1F and NblR-1R followed by digestion with *PvuII*, giving 309, 186 and 51 bp fragments for wild-type *nblR* and 309 and 237 bp fragments for *nblR*^{D57A}. A clone of each type was selected for further analysis (strains WT-RCS3 and NblR^{D57A}-RCS3, respectively).

Table 1. Strains and plasmids

Strain or plasmid	Genotype or relevant characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169 endA1 recA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1</i> λ ⁻	Hanahan (1985)
<i>E. coli</i> DHM1	F ⁻ <i>glnV44</i> (AS) <i>recA1 endA gyrA46 thi-1 hsdR17 spoT1 frbD1 cya-854</i>	Karimova <i>et al.</i> (2005)
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B m _B) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW Cam</i> ^r]	Stratagene
<i>S. cerevisiae</i> Y187	<i>MAT</i> α <i>ura3-52 his3-200 ade2-101 trp1-901 leu2-3,112 gal4Δ met</i> ⁻ <i>gal80Δ URA::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	Harper <i>et al.</i> (1993)
<i>S. cerevisiae</i> PJ696	<i>MAT</i> α <i>ade2Δ trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 cyh^R can^R gal4Δ</i> <i>gal80Δ met2⁻ GAL2::ADE2 GAL1::HIS3 GAL7:lacZ</i>	James <i>et al.</i> (1996)
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	Wild-type <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	Pasteur culture collection
<i>Synechococcus</i> NblR45	NblR ⁻ , Km ^r	Luque <i>et al.</i> (2001)
<i>Synechococcus</i> WT-C103	P _{nblA} :: <i>luxAB</i> into NSII, Cm ^r	Espinosa <i>et al.</i> (2007)
<i>Synechococcus</i> NblR45-C103	NblR ⁻ , P _{nblA} :: <i>luxAB</i> , Cm ^r Km ^r	Salinas <i>et al.</i> (2007)
<i>Synechococcus</i> WT-RCS3	CS3 downstream <i>nblR</i> , Sm ^r	This work
<i>Synechococcus</i> NblR ^{D57A} -RCS3	NblR ^{D57A} , Sm ^r	This work
<i>Synechococcus</i> WT-RCS3-C103	P _{nblA} :: <i>luxAB</i> , Cm ^r Sm ^r	This work
<i>Synechococcus</i> NblR ^{D57A} -RCS3-C103	NblR ^{D57A} , P _{nblA} :: <i>luxAB</i> , Cm ^r Sm ^r	This work
pBluescriptII SK(+)	Cloning vector, Ap ^r	Stratagene
pENS43	1.8 kb genomic <i>nblR</i> fragment cloned into pRL519, Ap ^r	Luque <i>et al.</i> (2001)
pENS38	pPROEX-HTb encoding 6His-NblR, Ap ^r	Luque <i>et al.</i> (2001)
pNblR-RD	pPROEX-HTb encoding 6His-NblR ¹⁻¹²⁴ , Ap ^r	This work
pTM0468	pET22b encoding full-length RR468, Ap ^r	Casino <i>et al.</i> (2007)
pUAGC235	pBluescriptII SK(+) with <i>nblR</i> , Ap ^r	This work
pUAGC238	pBluescriptII SK(+) with <i>nblR</i> ^{D57A} , Ap ^r	This work
pUAGC240	pUAGC238 with CS3, Ap ^r Sm ^r	This work
pUAGC239	pUAGC240 with <i>nblR</i> downstream sequences, Ap ^r Sm ^r	This work
pUAGC453	pBluescriptII SK(+) with CS3, Ap ^r Sm ^r	This work
pGAD424	<i>LEU2</i> , <i>GAL4</i> (768-881)AD, Ap ^r	Bartel <i>et al.</i> (1993)
pGBT9	<i>TRP1</i> , <i>GAL4</i> (1-147)BD, Ap ^r	Bartel <i>et al.</i> (1993)
As pGAD424(+1)	As pGAD424 with a different frame (+1), Ap ^r	Roder <i>et al.</i> (1996)
pGBT9(+1)	As pGBT9 with a different frame (+1), Ap ^r	Roder <i>et al.</i> (1996)
pADC	<i>LEU2</i> , <i>GAL4</i> -AD for C-terminal cloning, Ap ^r	Millson <i>et al.</i> (2003)
pBDC	<i>TRP1</i> , <i>GAL4</i> -BD for C-terminal cloning, Ap ^r	Millson <i>et al.</i> (2003)
pUAGC51	<i>GAL4AD</i> : NblS ²⁷²⁻⁶⁶⁴ , Ap ^r	Espinosa <i>et al.</i> (2006)
pUAGC52	<i>GAL4BD</i> : NblS ²⁷²⁻⁶⁶⁴ , Ap ^r	Espinosa <i>et al.</i> (2006)
pUAGC53	<i>GAL4AD</i> : NblS, Ap ^r	Espinosa <i>et al.</i> (2006)
pUAGC54	<i>GAL4BD</i> : NblS, Ap ^r	Espinosa <i>et al.</i> (2006)
pUAGC1	<i>GAL4AD</i> : NblR, Ap ^r	Burillo (2006)
pUAGC3	<i>GAL4BD</i> : NblR, Ap ^r	Burillo (2006)
pUAGC300	<i>GAL4AD</i> : NblR ¹⁻¹⁷¹ , Ap ^r	This work
pUAGC301	<i>GAL4BD</i> : NblR ¹⁻¹⁷¹ , Ap ^r	This work
pUAGC597	NblR: <i>GAL4AD</i> , Ap ^r	This work
pUAGC598	NblR: <i>GAL4BD</i> , Ap ^r	This work
pUAGC615	<i>GAL4AD</i> : NarB, Ap ^r	This work
pUAGC616	<i>GAL4BD</i> : NarB, Ap ^r	This work
pUAGC310	<i>GAL4BD</i> : NarB ¹⁵⁴⁻³⁴⁴ , Ap ^r	This work
pUAGC311	<i>GAL4AD</i> : NarB ¹⁵⁴⁻³⁴⁴ , Ap ^r	This work
pUAGC312	<i>GAL4BD</i> : NarB ¹⁵⁴⁻²⁵⁵ , Ap ^r	This work
pUAGC313	<i>GAL4AD</i> : NarB ¹⁵⁴⁻²⁵⁵ , Ap ^r	This work
pUAGC314	<i>GAL4BD</i> : NarB ¹¹²⁻³⁸² , Ap ^r	This work
pUAGC315	<i>GAL4AD</i> : NarB ¹¹²⁻³⁸² , Ap ^r	This work
pUAGC324	<i>GAL4BD</i> : NdhH ⁵⁴⁻²⁸³ , Ap ^r	This work
pUAGC325	<i>GAL4AD</i> : NdhH ⁵⁴⁻²⁸³ , Ap ^r	This work
pT25	<i>CyaA</i> (1-224)T25, Cm ^r	Karimova <i>et al.</i> (1998)
pUT18c	<i>CyaA</i> (225-399)T18, Ap ^r	Karimova <i>et al.</i> (1998)
pUAGC439	T25: NblS, Cm ^r	Espinosa <i>et al.</i> (2006)
pUAGC600	T25: NblR, Cm ^r	This work
pUAGC601	T18: NblR, Ap ^r	This work
pUAGC604	T25: NblR ¹²⁵⁻²²⁹ , Cm ^r	This work
pUAGC605	T18: NblR ¹²⁵⁻²²⁹ , Ap ^r	This work
pUAGC602	T25: NarB, Cm ^r	This work
pUAGC603	T18: NarB, Ap ^r	This work

Table 2. Oligonucleotides

Name	Sequence
ADC-F	5'-CAAGCTATACCAAGCATACAATCCAAGATG-3'
ADC-R	5'-GGAATTAATTCGGCTTTATCCATCTTTGCAAAGGC-3'
BDC-F	5'-CAACTCCAAGCTTGAAGCAAGCCTCGATG-3'
BDC-R	5'-CGATAGAAGACAGTAGCTTCATCTTTGCG-3'
CS3-2R	5'-ACAAAACGGTTTACCAGCAT-3'
NblR-1F	5'-GAGTGAGGAAGAATTCTGATCGCGCCAGCCTC-3'
NblR-1R	5'-CTCTCGCGTCGACACTTAGCGCGGATGCTC-3'
NblR-3	5'-GGCAGCGCAGTCGACTTTGAAGCCATG-3'
NarB-1F	5'-GAGGGAATTCTCGATCTCGATCTCTCGAAGTTTC-3'
NarB-1R	5'-GCCTAGAGGTCGACTTAGCGATCG-3'
NblR ADC-F	5'-AGCATACAATCCAAGATGATCGCGCCAGCCTCGCCACACA-3'
NblR ADC-R	5'-CGCTTTATCCATCTTTGCAAAGGCGCTTTGCGGTAGGACATAACCG-3'
NblR BDC-F	5'-GCTTGAAGCAAGCCTCGATGATCGCGCCAGCCTCGCCACAC-3'
NblR BDC-R	5'-CAGTAGCTTCATCTTTGCGCTTTGCGGTAGGACATAACC-3'
Transgadgbt-1F	5'-CGCACATCATCATCGGAAGAGAGTAGTAACAAAGGTCAAAGAC AGTTGACTGTATCGCGGAACCCAAAAAAGAGATCG-3'
Transgadgbt-1R	5'-ATAACTATTTAATAATAAAAAATCATAAATCATAAGAAATTCGCCCGAATT AGCTTGGCGTTTTTCAGTATCTACGATTC-3'
NblR bth1-F	5'-TGAGGGGATCCTATGATCGCGC-3'
NblR bth1-R	5'-ATCGCGGTACCTTAGCTTTTCGC-3'
NblR bth2-F	5'-TACAGGATCCACCTGCTGCTCA-3'
NarB bth-1F	5'-GCGCGGATCCAATGTTTCGATC-3'
NarB bth-1R	5'-TTGCGGTACCTTAGATTGTGAAG-3'
NblR-D57A-F	5'-GATTTAGTCATCGTCGCTCGCATGGCGGGCGG-3'
NblR-D57A-R	5'-CCGCCCGCCATGCGAGCGACGATGACTAAATC-3'
NblR-down-4F	5'-TGTAGAAGCTTGGCGCTC-3'
NblR-down-4R	5'-CTTAGGTGCGACTGCAGTCTCGTCATC-3'
NblR-RD-F	5'-GGCGCCATGGTCGCGCCAGCCTCGCC-3'
NblR-RD-R	5'-GCAGAAGCTTATCGTTGTAATAGAG-3'

To obtain wild-type and *nblR*^{D57} derivatives carrying the *P_{nblA}::luxAB* reporter fusion, plasmid pUAGC239 was transformed into strain WT-C103 (Espinosa *et al.*, 2007) and transformant clones analysed as above to independently recover each type of *nblR* alleles (strains WT-RCS3-C103 and NblR^{D57A}-RCS3-C103).

Construction of yeast and bacterial two-hybrid plasmids. A 485 bp fragment from the *nblR* gene was PCR amplified with primers NblR-1F and NblR-1R, cut with *EcoRI* and *SalI* and cloned into pGAD424(+1) and pGBT9(+1), giving plasmids pUAGC300 (GAL4AD:NblR¹⁻¹⁷¹) and pUAGC301 (GAL4BD:NblR¹⁻¹⁷¹), respectively. To produce a NblR:GAL4AD protein fusion, PCR amplification of *nblR* sequences with primers NblR ADC-F and NblR ADC-R was followed by a second PCR with primers ADC-F and ADC-R. This product was mixed with *NruI*-opened pADC and transformed into *S. cerevisiae* PJ696, to produce, by homologous recombination, plasmid pUAGC597. Similarly, to obtain a NblR:GAL4BD protein fusion, primers NblR BDC-F and NblR BDC-R and then BDC-F and BDC-R were used in consecutive PCRs, the product mixed with linear pBDC and transformed into *S. cerevisiae* Y187, giving plasmid pUAGC598. To obtain bacterial adenylate cyclase two-hybrid (BACTH) derivatives, *nblR* was PCR amplified with primers NblR bth1-F and NblR bth1-R, cut with *BamHI* and *KpnI*, and cloned into pT25 or pUT18c, resulting in plasmids pUAGC600 (T25:NblR) and pUAGC601 (T18:NblR), respectively. The same procedure but using primers NblR bth2-F and NblR bth1-R resulted in plasmids pUAGC604 (T25:NblR¹²⁵⁻²²⁹) and pUAGC605 (T18:NblR¹²⁵⁻²²⁹).

The *narB* sequence was PCR amplified using primers NarB bth1-F and NarB bth1-R, cut with *BamHI* and *KpnI*, and cloned into pT25 or pUT18c, resulting in plasmids pUAGC602 (T25:NarB) and pUAGC603 (T18:NarB), respectively. To obtain plasmids pUAGC615 (GAL4AD:NarB) and pUAGC616 (GAL4BD:NarB), the *narB* sequence was amplified with primers NarB-1F and NarB-1R, cut with *EcoRI* and *SalI* and cloned into pGAD424(+1) and pGBT9(+1).

Inserts from prey plasmids pUAGC311 (GAL4AD:NarB¹⁵⁴⁻³⁴⁴), pUAGC313 (GAL4AD:NarB¹⁵⁴⁻²⁵⁵) and pUAGC315 (GAL4AD:NarB¹¹²⁻³⁸²), obtained in yeast two-hybrid screenings using NblR as bait, were PCR amplified using primers transgadgbt-1F and transgadgbt-1R. The PCR together with linearized (*EcoRI-SalI*) pGBT9 was then transformed into *S. cerevisiae* PJ696, giving plasmids pUAGC310 (GAL4BD:NarB¹⁵⁴⁻³⁴⁴), pUAGC312 (GAL4BD:NarB¹⁵⁴⁻²⁵⁵) and pUAGC314 (GAL4BD:NarB¹¹²⁻³⁸²). The same strategy was used to obtain plasmid pUAGC324 (GAL4BD:NdhH⁵⁴⁻²⁸³) from pUAGC325 (GAL4AD:NdhH⁵⁴⁻²⁸³).

Protein cloning, expression and purification. DNA sequences encoding residues 1-124 of NblR (6His-NblR-RD) were PCR amplified from *Synechococcus* genomic DNA using primers NblR-RD-F and NblR-RD-R. The PCR product was cloned into the *NcoI* and *HindIII* sites of plasmid pPROEX-HTb (Invitrogen), creating an in-frame fusion to the N-terminal His₆-tag. The resulting plasmid was named pNblR-RD.

The RR468 protein was expressed and purified as previously described (Casino *et al.*, 2007). For expression of 6His-NblR and 6His-NblR-RD

proteins, plasmids pENS38 and pNblR-RD were transformed into the *E. coli* strain BL21-codonPlus (DE3)-RIL (Stratagene). Cells were grown in the autoinductive ZYP-5052 medium supplemented with ampicillin (100 µg ml⁻¹) and chloramphenicol (33 µg ml⁻¹), and the expression of proteins was carried out following an autoinduction method (Studier, 2005). Cells were harvested, disrupted by sonication, and the soluble fraction was purified by Ni-affinity chromatography using Protino Ni-TED 1000 (Macherey-Nagel). Elution of the protein was carried out using 250 mM imidazol. The purest fractions (as determined by SDS-PAGE and Coomassie blue staining) were pooled, washed with storage buffer (25 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl), concentrated using Amicon Ultra (Millipore) and stored at -80 °C. Proteins were quantified spectrophotometrically using the method of Bradford (Bio-Rad).

Phosphorylation assay with acetyl phosphate and resolution by native PAGE and 2D gel electrophoresis. Purified 6His-NblR, 6His-NblR-RD and RR468 were autophosphorylated in kinase buffer (50 mM Tris pH 8.0, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂) containing 12.5 mM acetyl phosphate for 1 h at room temperature. After phosphorylation, loading buffer (62.5 mM Tris pH 6.8, 30 % glycerol, 0.01 % bromophenol blue) was added in a 1:4 ratio to the samples and these were subsequently subjected to Native PAGE on a 10 % gel at 100 V for 2 h at 4 °C.

To evaluate phosphorylation by 2D gel electrophoresis, the reactions with acetyl phosphate were carried out in a final volume of 10 µl, including 15 µg 6His-NblR-RD or 6 µg RR468. The phosphorylation reactions were stopped by the addition of 90 µl lysis buffer (8 M urea, 2 % CHAPS), 1 µl 1 M DTT and 0.5 µl ampholytes pH 4-7. Control samples without acetyl phosphate were run in parallel. Samples consisting of the unphosphorylated proteins or a mix of equal amounts of unphosphorylated and phosphorylated proteins, where the unphosphorylated proteins were used as internal control, were isoelectrically focused for each protein in the first dimension using a 7 cm Immobiline Drystrip (pH 4.0-7.0; GE Healthcare) and an Ettan IPGphor (Amersham Biosciences) system following the indications of the manufacturers. The samples were focused at 500 V for 0.25 kV h, 1000 V for 0.5 kV h and 6000 V for 7.5 kV h at 20 °C. Proteins were resolved in the second dimension by SDS-PAGE using 15 % acrylamide gels.

Both types of gels were stained with Coomassie blue and images analysed using a Fuji LAS-3000 imaging system and the MultiGauge Fujifilm program.

Gel filtration chromatography. Gel filtration chromatography was carried out in a Superdex 200 HR 10/30 column (Amersham Biosciences) equilibrated with running buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl) and calibrated with a cocktail of molecular mass standards, containing Blue Dextran 2000 (~2000 kDa), β-amylase (200 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), BSA (66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), cytochrome *c* (12.4 kDa) and ATP (0.57 kDa). Samples (100 µl) of 6His-NblR or 6His-NblR-RD containing 150 µg protein in running buffer were individually applied to the column, eluted with running buffer at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹ and collected in 1 ml fractions. The fractions were analysed by SDS-PAGE. Protein elution profiles were monitored by measuring the absorbance at 280 nm. For evaluation of the acetyl phosphate effect, the samples were incubated for 1 h at room temperature with acetyl phosphate and MgCl₂ (12.5 mM) before chromatography. Sample oxidation was carried out by treatment with 0.3 mM Cu(II)-(o-phenanthroline)₃ (Lee *et al.*, 1995) for 30 min at 37 °C prior to gel filtration. Sample reduction was carried out by incubation with 10 mM DTT for 30 min at room temperature, and the chromatography running buffer was supplemented with 1 mM DTT.

Determination of luciferase activity. To determine bioluminescence, 1 ml of cultures grown to mid-exponential phase were adjusted to an OD₇₅₀ of 0.5 and supplemented with decanal to a final concentration of 0.25 mM from a 50 mM stock solution made up in 10 % DMSO. Light emission was recorded in a Berthold LB9509 luminometer. Bioluminescence was recorded every 20 s for 10 min. Light emission increased to a maximum and then declined. Maximum luminescence at the peak, presented as RLU (relative light units) by the instrument, is the value used at each selected time point.

Determination of pigment contents spectrophotometrically. Whole-cell absorbance spectra were obtained in order to estimate pigment contents. Samples (1 ml) of cultures were taken at the indicated times, diluted with fresh medium to an OD₇₅₀ 0.5, and absorbance spectra (500-800 nm) were recorded on a UV/Visible Ultrospec 2100 pro (GE Healthcare Life Sciences). Pigment content was calculated based on absorbance maxima at 631 nm for phycocyanin and 684 nm for chlorophyll *a*, essentially as described by Myers *et al.* (1980).

RESULTS AND DISCUSSION

NblR lacks residues conserved in canonical response regulators

Three groups of amino acids are essential for phosphorylation of RDs and the consequent response: the phosphoaccepting aspartate (Asp57 in CheY numeration), the catalytic residues (Asp12, Asp13 and Lys109) and the conformational switch residues (Thr87 and Tyr106) (Dyer & Dahlquist, 2006). However, NblR lacks two of these key amino acids (see Fig. 1b). In this context, it is worth noting recent reports of atypical RRs with striking deviations from canonical RDs (Fraser *et al.*, 2007; Schar *et al.*, 2005). To illustrate key discrepancies between canonical RDs, NblR RD and other atypical RDs, we produced a 3D structure model of the NblR RD and used it to generate a structural alignment with selected canonical and non-canonical RDs. In order to emphasize the catalytic residue disposition in the alignment, we chose the CheY and PhoB beryllium fluoride-activated structures (Lee *et al.*, 2001) as prototypical RDs, as well as the phosphorylated Spo0A structure (Lewis *et al.*, 1999), the first canonical RD crystallized in the phosphorylated form. The structures of *Myxococcus xanthus* FrzS (Fraser *et al.*, 2007) and *Helicobacter pylori* HP1043 (Schar *et al.*, 2005) were used as a model of atypical RDs. As shown in Fig. 1(a), NblR apparently retains the overall folding of RDs, as is the case with the RDs from FrzS and HP1043. In NblR, the highly conserved aspartic acid and threonine residues (Asp13 and Thr87 in CheY) are substituted by serine and methionine (Ser14 and Met85), respectively. Asp13, probably the main residue involved in Mg²⁺ binding (Hubbard *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2001), is substituted for Ser and Lys, respectively, in FrzS and HP1043. Consistent with these changes, FrzS is insensitive to Mg²⁺ and HP1043 cannot be phosphorylated *in vitro* (Fraser *et al.*, 2007; Schar *et al.*, 2005).

Met85 of NblR is at the conserved Thr/Ser position that plays a critical role in activation of RRs. Upon

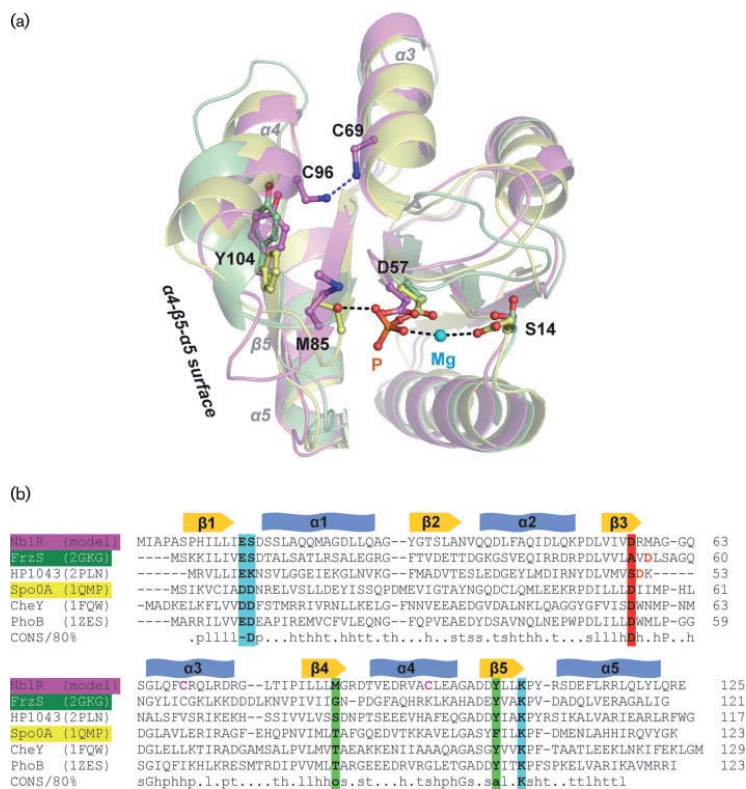


Fig. 1. Structure and sequence comparisons of NblR RD with canonical and non-canonical RR RDs. (a) Ribbon representation of the 3D model of NblR RD (magenta) superimposed on the RD structures of the phosphorylated canonical RR Spo0A from *B. stearothermophilus* (yellow; 1QMP) and the non-canonical RR FrzS from *M. xanthus* (green; 2GkG). The residues at the phosphoaccepting aspartate, the Mg^{2+} -chelating and conformational switch positions are represented in ball-and-stick with carbon atoms in the same colour as the corresponding ribbon structure: oxygen in red, sulphur in blue and phosphorus in orange. Residues are labelled and numbered for NblR. The two cysteine residues of NblR are shown as ball-and-stick and the possible disulfide bridge is denoted by a blue broken line. Black broken lines denote contacts with the phosphoryl group and the Mg^{2+} ion (cyan sphere) in the phosphorylated Spo0A structure. (b) Structure-based sequence alignment for the NblR model with the isolated RD structures of atypical RRs FrzS (2GKG) from *M. xanthus* and HP1043 (2PLN) from *H. pylori*, and canonical RRs Spo0A (1QMP) from *B. stearothermophilus*, CheY (1FQW) and PhoB (1ZES) from *E. coli* was performed using LSQKAB (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). Strand and helices of NblR are indicated above the sequence alignment as labelled yellow and blue boxes, respectively. Consensus sequence for each position (>80% occurrence) was taken from the SMART server (Letunic *et al.*, 2006) and appears below the sequence alignment (CONS/80% line) printed following the SMART abbreviation code [upper-case letters indicate the corresponding amino acid; lower-case letters correspond to the following amino acid groups: o (S,T), - (D,E), l (L,V), a (F,H,W,Y), s (A,C,D,G,N,P,S,T,V), p (C,D,E,H,K,N,Q,R,S,T), t (A,C,D,E,G,H,K,N,Q,R,S,T), h (A,C,F,G,H,I,K,L,M,R,T,V,W,Y), . (any)]. The conserved phosphoaccepting aspartic acid position is shaded in red, the conserved catalytic residue positions in light blue and the switch residue positions in green. The alternative phosphoaccepting aspartate residues in FrzS and HP1043 are highlighted in red and the NblR cysteine residues in magenta.

phosphorylation, this conserved Thr/Ser residue is hydrogen bonded with the phosphoryl group, inducing the repositioning of the loop that connects the β 4 strand with the α 4 helix and the concomitant orientation inwards of an

exposed aromatic residue in β 5 (Tyr106 in CheY). This orchestrated movement is called the ‘T-loop-Y’ coupling switch and its ultimate output is the reorganization of the α 4- β 5- α 5 surface, leading to changes in the affinity for the

effector domain, downstream protein targets, or, in the OmpR-PhoB family, receiver dimerization (Dyer & Dahlquist, 2006). The presence of methionine in this position, which precludes the hydrogen bond with the phosphoryl group, would prevent this activation switch. Thus, the Ser14 and Met85 substitutions would impair phosphorylation and the consequent activation of NblR.

NblR is not phosphorylated *in vitro* by acetyl phosphate

Response regulators can be phosphorylated *in vitro* and *in vivo* by the small phosphate donor acetyl phosphate (McCleary & Stock, 1994). The *pta* gene, encoding phosphotransacetylase, has not been identified in the genome of *Synechococcus* and therefore phosphorylation of response regulators by acetyl phosphate is unlikely to be of physiological significance in this cyanobacterium. However, the ability of acetyl phosphate to phosphorylate a given response regulator *in vitro* would indicate that the protein can be phosphorylated *in vivo*.

The differences, at the level of primary structure, between the NblR RD and canonical regulators strongly suggested that phosphorylation at the conserved Asp57 is not the mechanism of NblR activation. To investigate this issue, we first performed *in vitro* phosphorylation assays with acetyl phosphate. Both full-length NblR (6His-NblR) and the NblR RD (6His-NblR-RD) were overproduced and purified. Phosphorylation was compared with RR468, a canonical RR protein from *Thermotoga maritima*, on a non-denaturing gel (Fig. 2a). Consistent with phosphorylation-induced dimerization in RRs of the OmpR/PhoB family (Bachhawat *et al.*, 2005), incubation of RR468 with acetyl phosphate induces a band shift. In contrast,

6His-NblR-RD and 6His-NblR did not change in mobility, suggesting that these proteins were not phosphorylated. Experiments carried out in parallel with NblR and NblR-RD proteins after 6His-tag removal with TEV protease showed equivalent results (data not shown).

To exclude possible artefacts interfering with detection of phosphorylated forms of 6His-NblR-RD and RR468 in native gels, we used additional experimental approaches. Since the addition of a phosphoryl group to proteins reduces their pI by around 0.2 units (Jeon *et al.*, 2001), we performed 2D gel electrophoresis before and after addition of the phosphodonor. In full agreement with previous results, incubation with acetyl phosphate shifted RR468 towards the acidic part of the gel and had no effect on 6His-NblR-RD (Fig. 2b). Finally, the samples were subjected to mass spectroscopy, confirming that the incubation with acetyl phosphate introduces a single phosphoryl group in RR468 and that 6His-NblR-RD did not change its mass (data not shown), confirming the lack of phosphate incorporation to NblR proteins.

Phosphorylation of Asp57 is not required for NblR functions

The structural features of the NblR RD noted above and its lack of phosphorylation by acetyl phosphate strongly suggested that, in spite of conservation, Asp57 was not involved in NblR activation. To determine whether this residue still plays a regulatory role during acclimation to stress, we constructed *Synechococcus* strains in which Asp57 was replaced by Ala. The strategy for allelic replacement is outlined in Supplementary Fig. S1 (available with the online version of this paper). Strain NblR^{D57A}-RCS3 contains the mutation at its chromosomal emplacement

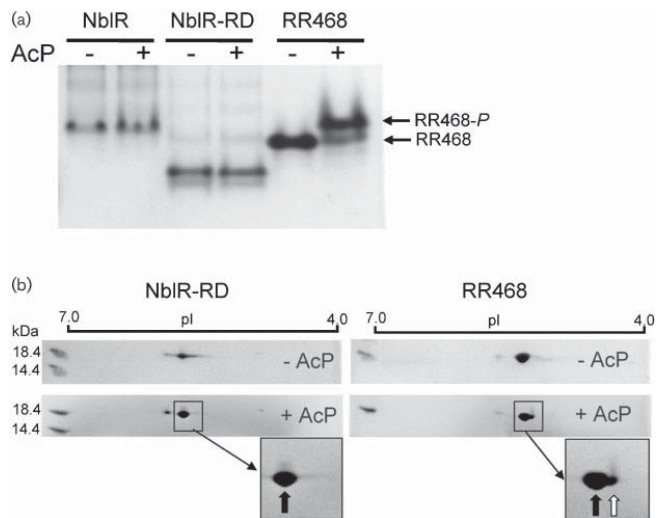


Fig. 2. Phosphorylation with acetyl phosphate and analysis by native and 2D gel electrophoresis. (a) 6His-NblR, 6His-NblR-RD and RR468 were incubated in the presence (+AcP) or absence (-AcP) of acetyl phosphate and separated according to their charge/mass relation by native PAGE. Unphosphorylated and phosphorylated forms of RR468 are indicated. (b) 6His-NblR-RD and RR468 were incubated in presence or absence of acetyl phosphate for 60 min. Samples for 2D gel electrophoresis consisted of the unphosphorylated proteins (-AcP) or a mix of equal amounts of unphosphorylated and phosphorylated proteins (+AcP), where the unphosphorylated protein was used as internal control. The unphosphorylated and phosphorylated forms in +AcP gels are indicated with filled and open arrows, respectively.

(*nblR*^{D57A} allele) and the streptomycin-resistance cassette CS3 located downstream. To exclude polar effects and minimize possible artefacts due to the presence of the CS3 cassette, a streptomycin-resistant control strain retaining the wild-type *nblR* allele (WT-RCS3) was generated in parallel. Homozygosis for CS3 alleles was promptly achieved and it was confirmed that the presence of the streptomycin-resistant cassette CS3 did not confer significant phenotypic differences to the wild-type *Synechococcus* strain under standard or stress conditions (data not shown). For simplicity, only data produced with the strain WT-RCS3 are shown as control and referred to as wild-type hereafter.

To determine the impact of the D57A substitution on NblR function, we analysed the ability of the *nblR*^{D57A} mutant to respond to conditions requiring NblR activity. In particular, high light (HL) irradiation and nitrogen deficiency allow clear discrimination between wild-type *Synechococcus*

and *nblR* null derivatives (Luque *et al.*, 2001; Salinas *et al.*, 2007; Schwarz & Grossman, 1998). As shown in Fig. 3(a), when wild-type and mutant derivatives were subjected to HL irradiation only the *nblR* null mutant (strain NblR45) ceased growth. The *nblR*^{D57A} strain continued to grow, at a rate similar to that of the wild-type control. At different times (up to 4 days), drops of all cultures were plated and incubated in various conditions to visually determine their ability to resume growth. As shown in Fig. 3(b), only the null mutant failed to recover appropriately, while the ability of the *nblR*^{D57A} mutant to recover from stress is similar to that of the wild-type, indicating that Asp57 is not required to increase the resistance of *Synechococcus* to HL stress (Fig. 3b, panel HL). Equivalent results, i.e. no difference between wild-type and *nblR*^{D57A} strains in conditions in which the null mutant is clearly impaired, were obtained when cultures were subjected to nitrogen starvation (Fig. 3b, panel -N).

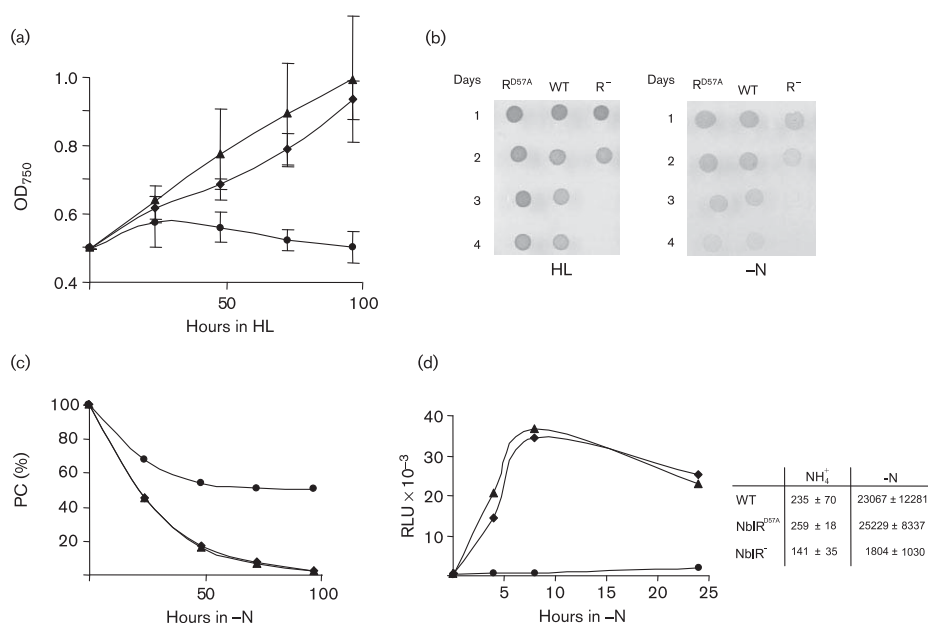


Fig. 3. Effect of the D57A substitution at NblR on *Synechococcus* cultures subjected to stress. (a) Growth, as measured by OD₇₅₀, of WT-RCS3 (▲), NblR^{D57A}-RCS3 (◆) and NblR45 (●) at 500 μmol photons m⁻² s⁻¹. Mean values and standard deviations of three independent experiments are shown. (b) Drops (5 μl) of cultures from NblR^{D57A}-RCS3 (R^{D57A}), WT-RCS3 (WT) and NblR45 (R⁻) were spotted on BG11 solid medium after nitrogen deprivation (-N) or high-light (HL) stress conditions up to 4 days, incubated in standard light conditions and photographed 5 days later. A picture taken from one representative experiment is shown in each case. (c) Relative amount of phycocyanin (PC) as a function of time. Strains NblR^{D57A}-RCS3, WT-RCS3 and NblR⁻ were transferred at mid-exponential phase from ammonium-containing to nitrogen-depleted medium (-N). Mean values from three or four experiments are shown. (d) Time-course of P_{nblA}::luxAB induction in *Synechococcus* strains. Cells were grown in the presence of NH₄⁺ and when they reached mid-exponential phase, they were shifted to nitrogen-free medium. After nitrogen deprivation at time 0, bioluminescence from the reporter strains was recorded. Data from one representative experiment out of three is shown. Mean values and standard deviations at time 0 (NH₄⁺) and 24 h after nitrogen deprivation (-N) from three independent experiments are given in the inset table.

To determine the impact of the D57A substitution on *nblA* gene induction and chlorosis, we analysed the absorbance spectra of mutant and control cultures subjected to nitrogen stress as well as the expression of the reporter fusion $P_{nblA}::luxAB$ (Espinosa *et al.*, 2007), which is positively regulated by NblR (Salinas *et al.*, 2007). As shown in Fig. 3(c), the kinetics of phycocyanin loss were identical in *nblR*^{D57A} and wild-type cultures subjected to nitrogen starvation, conditions in which the NblR⁻ strain maintained high phycocyanin levels. In line with this, when *nblR*^{D57A} and wild-type cultures carrying the $P_{nblA}::luxAB$ reporter fusion were subjected to nitrogen deprivation, a strong and equal increase in the bioluminescence signal was observed in wild-type and *nblR*^{D57A} strains but not in NblR⁻ cultures (Fig. 3d), thus indicating that Asp57 does not play a role in *nblA* gene activation under the stress conditions used here.

Canonical receivers, pseudo-receivers and the PIARR group

Several proteins with RD-like structural folds lacking residues involved in aspartic acid phosphorylation and signal transduction and having extended loop regions that align poorly to canonical RD have been characterized. The cyanobacterial circadian clock protein KaiA (Williams *et al.*, 2002) is one of these proteins with a pseudo-RD. However, the RDs of FrzS, HP1043 and NblR are not as divergent from canonical RDs as pseudo-RD (see Fraser *et al.*, 2007 for an extended discussion) and they still contain some of the consensus residues around the canonical phosphorylation pocket and the output face (Fig. 1). Importantly, FrzS, HP1043 and the NblR-modelled RDs maintain the essential nature of the $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ face, suggesting its involvement in signal propagation. In the case of FrzS, the switch Tyr and a neighbouring His residue have been shown to be essential for function. Therefore, in spite of the lack of phosphorylation, these atypical RDs conserve key features involved in signal propagation. To recognize the existence of alternative input mechanisms for signal transduction within the two-component RR superfamily, we propose the term PIARR, standing for phosphorylation-independent activation of response regulator. In this manner, in addition to the grouping into classical RR families on the basis of output domain homology, proteins differing in the mechanism of input signalling, the so-called hybrid RDs (Fraser *et al.*, 2007), can also be distinguished on the basis of receiver features.

In vitro and *in vivo* assays indicate that NblR is monomeric

OmpR/PhoB regulators are DNA-binding proteins with a high degree of conservation of the $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ surface and it has been proposed that they all share a common mechanism of activation that involves dimerization of RDs using the $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ surface (Gao *et al.*, 2007; Toro-Roman *et al.*, 2005). Output domain homology places

NblR and HP1043 with the abundant OmpR/PhoB family of RRs. HP1043 is constitutively active *in vivo* and purified HP1043 is a dimer whose RD structure resembles the active and phosphorylated form of PhoB. Since helix–turn–helix proteins in general and all characterized OmpR/PhoB family members in particular bind to DNA as dimers, it was important to address the oligomerization status of NblR.

To determine the oligomeric state of NblR *in vitro*, 6His-NblR and 6His-NblR-RD proteins were subjected to gel filtration chromatography on a Superdex 200 column. 6His-NblR and 6His-NblR-RD eluted as single peaks with elution volumes of 15.1 ml and 16.1 ml that corresponded on the calibrated column to masses of 28 000 and 16 000 Da, respectively (Fig. 4a). The calculated masses for the polypeptide of 6His-NblR and 6His-NblR-RD are 28 590 and 15 800 Da respectively, in agreement with a monomeric state. Although our data showed that NblR is not phosphorylated *in vitro* by small phosphodonors (see above), the effect of the acetyl phosphate in the quaternary structure of NblR was also evaluated. As expected, pre-incubation with acetyl phosphate had no appreciable effects on the elution volume of either protein (Fig. 4b).

The structural model of NblR strongly suggests the possibility of a disulphide bridge between Cys69 and Cys96 (Fig. 1a). To explore the possibility that the redox state could regulate the $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ surface and, consequently, dimerization, we also estimated the molecular mass of 6His-NblR and 6His-NblR-RD under oxidizing and reducing conditions. The incubation of both proteins with the reducing agent DTT and subsequent chromatography in the Sephadex 200 column equilibrated with a buffer containing DTT showed that both proteins behaved as monomers (Fig. 4c). To ensure a complete oxidation state, the proteins were incubated with the oxidizing agent Cu-phenanthroline for 30 min prior to the chromatography. The oxidized proteins showed a similar elution profile to both the non-treated protein and the reduced protein (Fig. 4d). Therefore, in our experimental conditions, the redox state had no major effect on the oligomeric nature of the purified NblR proteins analysed. To assess the impact of the 6His-tag on the quaternary structure, analogous filtration assays were carried out with both proteins after tag removal; these gave similar results (data not shown).

The *in vitro* data, indicating that 6His-NblR and 6His-NblR-RD are monomeric, are still compatible with NblR activation by dimer formation in *Synechococcus* and we wondered whether we could find *in vivo* indications of associations between NblR monomers using two-hybrid interaction assays. We reasoned that, although these systems would not allow specific activation by stress signals, they could be more sensitive than *in vitro* systems and/or provide a more physiological environment for monomer association. With this in mind, we performed assays using the yeast two-hybrid system, based on

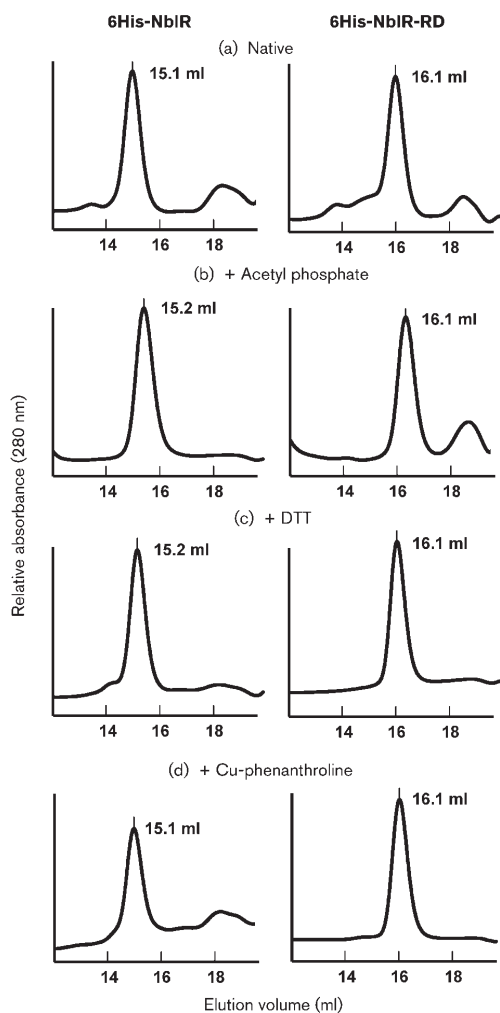


Fig. 4. Gel filtration analysis of 6His-NblR and 6His-NblR-RD. The absorbance elution profiles of 6His-NblR (left) and 6His-NblR-RD (right) proteins after chromatography on Superdex 200 HR under different conditions are shown: (a) native, (b) phosphorylated with acetyl phosphate, (c) reduced with DTT, and (d) oxidized with Cu-phenanthroline. The elution volumes for each peak are indicated.

reconstitution of GAL4 transcriptional activity (Fields & Song, 1989) and the BACTH system, based on reconstitution of a cyclic AMP signalling cascade in an *E. coli cya* strain (Karimova *et al.*, 1998). For yeast two-hybrid analyses, constructs included two full-length (NblR) and two C-terminally truncated derivatives of NblR (NblR¹⁻¹⁷¹), each one fused to upstream GAL4 domains

(GAL4BD and GAL4AD), and two full-length NblR derivatives, each one fused to C-terminally located GAL4BD and GAL4AD polypeptides (see Table 1 and Fig. 5 for plasmid details). The downstream location of GAL4 domains in fusion proteins was aimed at minimizing possible artefacts resulting from inappropriate conformations of the NblR RD contiguous to the GAL domain, i.e. false negatives. Expression of *HIS3*, *ADE2* and *lacZ* reporters in Y187/PJ696 diploids containing relevant pairs of fusion proteins was determined as previously described (Burillo *et al.*, 2004). All six protein fusions gave appropriate expression in yeast, but no signal interactions between NblR proteins were found (nine pair combinations of these proteins were tested, Table 3). The same result was found with full-length NblR derivatives using the independent BACTH system, thus providing additional evidence of the monomeric conformation of NblR *in vivo*. Taken together, both *in vitro* and *in vivo* analyses indicate that the default state of NblR is monomeric.

Interactions of NblR with *Synechococcus* proteins

The yeast two-hybrid system has been shown to detect specific interactions, between cognate two-component proteins (Martinez-Argudo *et al.*, 2001; Ohta & Newton, 2003) and between HKs and specific regulators (Espinosa *et al.*, 2006; Martinez-Argudo *et al.*, 2002). In contrast to classical genetic screens, yeast two-hybrid approaches rely on protein-protein interactions, and not on phenotype or viability, a clear advantage when dealing with phenotypes difficult to assay or essential functions. It should be noted that the relatively downstream location of interaction determinants in HKs, usually preceded by N-terminal transmembrane and sensory domains, increases the chances of identifying these proteins as yeast two-hybrid preys. To further increase the chances of detecting interactions of the relevant receiver domain of NblR, we used GAL4BD-NblR and GAL4BD-NblR¹⁻¹⁷¹ as baits in *Sau3AI* and *Tsp509I*-generated *Synechococcus* yeast two-hybrid libraries (Burillo, 2006; Burillo *et al.*, 2004). However, no HK polypeptides were found in the screenings.

The fact that the HK NblS had been identified in *nbl* screenings, and subsequently proposed as the NblR cognate partner in signal transduction, prompted us to confirm the negative results in our two-hybrid searches and further explore the possibility of a direct protein interaction between NblS and NblR by performing additional and more direct interaction assays with these proteins. To this end, all six GAL4AD or GAL4BD fusions to NblR derivatives used above were assayed in the appropriate combinations with NblS and NblS²⁷²⁻⁶⁶⁴ (see Table 1 and Fig. 5 for plasmid details). For all ten protein fusions, appropriate expression in yeast was previously verified (Espinosa *et al.*, 2006; and data not shown). In agreement with previous results, analysis of reporter expression in diploids containing relevant pairs of fusion proteins

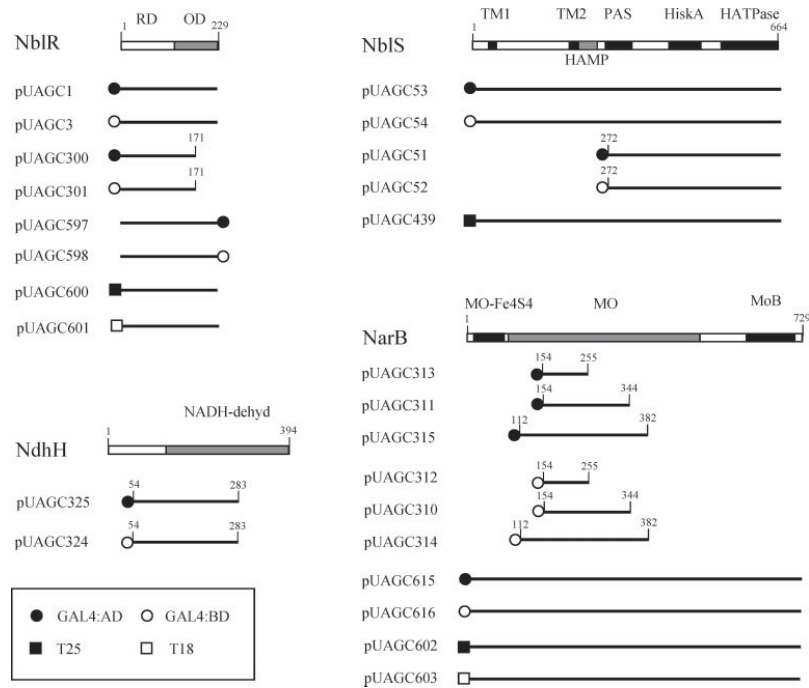


Fig. 5. Schematic representation of the different NblR, NblS, NdhH and NarB polypeptides encoded by two-hybrid plasmids obtained and/or used in this study. Numbers indicate the amino acid boundaries of the polypeptides present in each given plasmid. Domain nomenclature for NblR and NblS as in the text. MO-Fe4S4, molybdopterin Fe4S4 domain; MO, molybdopterin domain; MoB, molybdopterin-binding domain; NADH-dehyd, NADH dehydrogenase domain. The position of yeast (GAL4AD and GAL4BD) and bacterial (T25 and T18) domains related to the polypeptides is shown. Symbols used to represent the different GAL4 or CyaA domains are listed in the inset. The short NarB and NdhH polypeptides fused to GAL4AD domains were obtained in yeast two-hybrid screenings using NblR or NblR¹⁻¹⁷¹ as bait, respectively.

confirmed lack of interaction between NblS and NblR for all six pairs of fusion proteins tested (Table 3).

The BACTH system provides an independent assay particularly appropriate for membrane-anchored bacterial proteins (Karimova *et al.*, 2005) and might therefore provide a more physiological environment for NblS function. We produced fusion proteins of the two fragments (T25 and T18) of the catalytic domain of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase to NblS, and analysed its ability to complement the Cya⁻ phenotype when paired with NblR. Again, no interaction was found between NblS and NblR derivatives. Since appropriate expression in the host *E. coli* strain was verified for the T25-NblS protein, but not for the T18-NblS protein, the latter fusion is not included in Table 1 and Fig. 5. Taken together, the yeast and bacterial two-hybrid analyses strongly argue against protein-protein interactions between the two *nbl* regulators NblS and NblR.

Screening of *Synechococcus* libraries with NblR polypeptides as baits produced unexpected results. Instead of HK

polypeptides, multiple clones containing *narB*, encoding nitrate reductase, and *ndhH*, encoding a subunit of the NDH-1 complex, were found as preys. In particular, screening of the libraries with GAL4BD-NblR as bait rendered *narB* preys while *ndhH* clones appeared in screenings with GAL4BD-NblR¹⁻¹⁷¹. From the size of the clones, it can be inferred that NarB¹⁵⁴⁻²⁵⁵, encoding part of the molybdopterin domain, and the fragment NdhH⁵⁴⁻²⁸³ contain determinants for interaction with NblR. Additional yeast two-hybrid assays validated these interactions and localized the interaction with NarB¹⁵⁴⁻²⁵⁵ to the C-terminal DNA-binding domain of NblR.

The interaction of the output DNA-binding domain of NblR with the nitrate assimilation enzyme was particularly intriguing and prompted us to verify the interaction with the full-length NarB protein and to perform independent protein-protein interactions assays in *E. coli*. Since appropriate expression of the *Synechococcus narB* gene leads to nitrate reductase activity in *E. coli* (Rubio *et al.*,

Table 3. Yeast two-hybrid interactions

The GAL4AD and GAL4BD fusion proteins carried by diploids are indicated on the left and at the top, respectively. In the case of the NblR full-length fusions, the position of the GAL4 domain is also indicated. Asterisks refer to absence of proteins fused to GAL4 domains. Levels of interaction were classified according to the strength of the signals, as previously described (Burillo *et al.*, 2004). ND, Not determined.

	BD- NblR	NblR-BD	NblR ¹⁻¹⁷¹	NblS	NblS ²⁷²⁻⁶⁶⁴	NarB ¹⁵⁴⁻²⁵⁵	NarB ¹⁵⁴⁻³⁴⁴	NarB ¹¹²⁻³⁸²	NarB	NdhH ⁵⁴⁻²⁸³	*
AD-NblR	-	-	-	-	-	+/-	+	+	+	-	-
NblR-AD	-	-	-	-	-	+/-	+	+	+	ND	-
NblR ¹⁻¹⁷¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
NblS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NblS ²⁷²⁻⁶⁶⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NarB ¹⁵⁴⁻²⁵⁵	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NarB ¹⁵⁴⁻³⁴⁴	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NarB ¹¹²⁻³⁸²	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NarB	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NdhH ⁵⁴⁻²⁸³	-	ND	++	-	-	-	-	-	-	+	-
*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1996), it was important to test the NblR–NarB interaction in this heterologous system. BACTH assays confirmed the interaction between NarB and both NblR and NblR¹²⁵⁻²²⁹ derivatives, indicating that NblR and NarB also have considerable affinity to each other in a prokaryotic intracellular environment.

Integration of stress signals by NblR and PIARR proteins

We have shown here that NblR regulation seems to be independent of phosphorylation by HKs and does not fit the two-component paradigm. It should be noted that Kato *et al.* (2008) have very recently obtained some of the results presented in this work: failure to detect a regulatory phenotype for an independently constructed *nblR*^{D57A} mutant and detection of specific interactions between NblR and NarB in yeast two-hybrid screenings with NblR. While these authors did not detect NdhH polypeptides as preys, they detected a protein not found by us, MreC. Fishing of different preys is not surprising given that the strategies for library construction differed between the two laboratories. The challenge is now to determine the physiological significance of the protein–protein interactions with NblR detected by yeast two-hybrid methods.

Nitrogen and sulphur starvation stress signals did not regulate *nblR* transcripts and purified NblR had very low affinity for its target regulatory region at *nblA* (Luque *et al.*, 2001), suggesting that, as expected for a RR, the regulation is at the level of protein activity. NblR might be regulated as other OmpR/PhoB proteins, being able to switch between active dimers and inactive monomers. If that is the case, the implication is that phosphorylation would not be the only means to achieve activation by dimerization within the OmpR/PhoB family.

It is now clear that phosphorylation of canonical RD, the paradigm for signal input into RRs, must coexist with

alternative ways of communication operating in PIARR proteins. It can be anticipated that research with these atypical RRs would greatly deepen our understanding of prokaryotic signal transduction.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank S. Burillo, I. Fuentes, K. Lauchoubi and J. Espinosa for yeast two-hybrid work and/or plasmid construction, J. J. Calvete for mass spectroscopy analyses, and R. Dixon, K. Forchhammer and J. Espinosa for constructive discussions. This work was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia (grants BFU2006-12424 to A. C. and BIO2005-00153 to A. M.) and the Generalitat Valenciana (grant ACOMP06/083 to A. C.). M. L. L.-R. is a fellow of the Fundación Mutua Madrileña Automovilística.

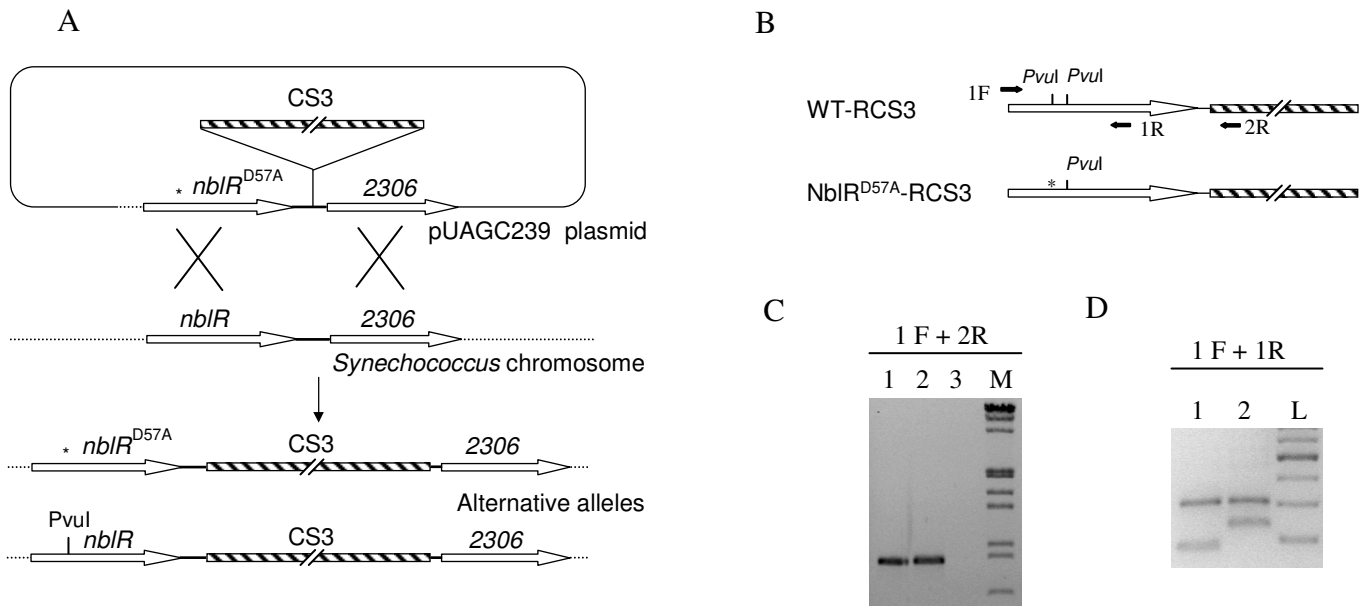
REFERENCES

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. J., Smith, J. A. & Struhl, K. (editors) (1999). *Short Protocols in Molecular Biology: a Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley.
- Bachhawat, P., Swapna, G. V., Montelione, G. T. & Stock, A. M. (2005). Mechanism of activation for transcription factor PhoB suggested by different modes of dimerization in the inactive and active states. *Structure* **13**, 1353–1363.
- Bartel, P., Chien, C. T., Sternglanz, R. & Fields, S. (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* **14**, 920–924.
- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M. & other authors (1998). Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**, 905–921.
- Burillo, S. (2006). Identificación y caracterización de componentes celulares implicados en transducción de señales en *Synechococcus* sp. PCC 7942. PhD thesis, Universidad de Alicante, Spain.
- Burillo, S., Luque, I., Fuentes, I. & Contreras, A. (2004). Interactions between the nitrogen signal transduction protein PII and N-

- acetylglutamate kinase in organisms that perform oxygenic photosynthesis. *J Bacteriol* **186**, 3346–3354.
- Casino, P., Fernandez-Alvarez, A., Alfonso, C., Rivas, G. & Marina, A. (2007). Identification of a novel two component system in *Thermotoga maritima*. Complex stoichiometry and crystallization. *Biochim Biophys Acta* **1774**, 603–609.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**, 760–763.
- Collier, J. L. & Grossman, A. R. (1992). Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *J Bacteriol* **174**, 4718–4726.
- Collier, J. L. & Grossman, A. R. (1994). A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria. *EMBO J* **13**, 1039–1047.
- Dyer, C. M. & Dahlquist, F. W. (2006). Switched or not?: the structure of unphosphorylated CheY bound to the N terminus of FliM. *J Bacteriol* **188**, 7354–7363.
- Espinosa, J., Fuentes, I., Burillo, S., Rodriguez-Mateos, F. & Contreras, A. (2006). SipA, a novel type of protein from *Synechococcus* sp. PCC 7942, binds to the kinase domain of NblS. *FEMS Microbiol Lett* **254**, 41–47.
- Espinosa, J., Forchhammer, K. & Contreras, A. (2007). Role of the *Synechococcus* PCC 7942 nitrogen regulator protein PipX in NtcA-controlled processes. *Microbiology* **153**, 711–718.
- Fields, S. & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245–246.
- Fraser, J. S., Merlie, J. P., Jr, Echols, N., Weisfield, S. R., Mignot, T., Wemmer, D. E., Zusman, D. R. & Alber, T. (2007). An atypical receiver domain controls the dynamic polar localization of the *Myxococcus xanthus* social motility protein FrzS. *Mol Microbiol* **65**, 319–332.
- Gao, R., Mack, T. R. & Stock, A. M. (2007). Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem Sci* **32**, 225–234.
- Golden, S. S. & Sherman, L. A. (1984). Optimal conditions for genetic transformation of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *J Bacteriol* **158**, 36–42.
- Grossman, A. R., Schaefer, M. R., Chiang, G. G. & Collier, J. L. (1993). The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Rev* **57**, 725–749.
- Grossman, A. R., Bhaya, D. & He, Q. (2001). Tracking the light environment by cyanobacteria and the dynamic nature of light harvesting. *J Biol Chem* **276**, 11449–11452.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In *DNA Cloning*, pp. 109–135. Edited by D. M. Glover. Oxford, UK: IRL Press.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805–816.
- Hubbard, J. A., MacLachlan, L. K., King, G. W., Jones, J. J. & Fosberry, A. P. (2003). Nuclear magnetic resonance spectroscopy reveals the functional state of the signalling protein CheY *in vivo* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **49**, 1191–1200.
- James, P., Halladay, J. & Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425–1436.
- Jeon, Y., Lee, Y. S., Han, J. S., Kim, J. B. & Hwang, D. S. (2001). Multimerization of phosphorylated and non-phosphorylated ArcA is necessary for the response regulator function of the Arc two-component signal transduction system. *J Biol Chem* **276**, 40873–40879.
- Kappell, A. D., Bhaya, D. & van Waasbergen, L. G. (2006). Negative control of the high light-inducible *hliA* gene and implications for the activities of the NblS sensor kinase in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *Arch Microbiol* **186**, 403–413.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. & Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5752–5756.
- Karimova, G., Dautin, N. & Ladant, D. (2005). Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol* **187**, 2233–2243.
- Kato, H., Chibazakura, T. & Yoshikawa, H. (2008). NblR is a novel one-component response regulator in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**, 1072–1079.
- Kopp, J. & Schwede, T. (2004). The SWISS-MODEL repository of annotated three-dimensional protein structure homology models. *Nucleic Acids Res* **32**, D230–D234.
- Lee, G. F., Lebert, M. R., Lilly, A. A. & Hazelbauer, G. L. (1995). Transmembrane signaling characterized in bacterial chemoreceptors by using sulphydryl cross-linking *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3391–3395.
- Lee, S. Y., Cho, H. S., Pelton, J. G., Yan, D., Berry, E. A. & Wemmer, D. E. (2001). Crystal structure of activated CheY. Comparison with other activated receiver domains. *J Biol Chem* **276**, 16425–16431.
- Letunic, I., Copley, R. R., Pils, B., Pinkert, S., Schultz, J. & Bork, P. (2006). SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res* **34**, D257–D260.
- Lewis, R. J., Brannigan, J. A., Muchova, K., Barak, I. & Wilkinson, A. J. (1999). Phosphorylated aspartate in the structure of a response regulator protein. *J Mol Biol* **294**, 9–15.
- Luque, I., Zabalón, G., Contreras, A. & Houmard, J. (2001). Convergence of two global transcriptional regulators on nitrogen induction of the stress-acclimation gene *nblA* in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol Microbiol* **41**, 937–947.
- Martinez-Argudo, I., Martin-Nieto, J., Salinas, P., Maldonado, R., Drummond, M. & Contreras, A. (2001). Two-hybrid analysis of domain interactions involving NtrB and NtrC two-component regulators. *Mol Microbiol* **40**, 169–178.
- Martinez-Argudo, I., Salinas, P., Maldonado, R. & Contreras, A. (2002). Domain interactions on the *ntr* signal transduction pathway: two-hybrid analysis of mutant and truncated derivatives of histidine kinase NtrB. *J Bacteriol* **184**, 200–206.
- McCleary, W. R. & Stock, J. B. (1994). Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J Biol Chem* **269**, 31567–31572.
- Millson, S. H., Truman, A. W. & Piper, P. W. (2003). Vectors for N- or C-terminal positioning of the yeast Gal4p DNA binding or activator domains. *Biotechniques* **35**, 60–64.
- Morris, A. L., MacArthur, M. W., Hutchinson, E. G. & Thornton, J. M. (1992). Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* **12**, 345–364.
- Myers, J., Graham, J. R. & Wang, R. T. (1980). Light harvesting in *Anacystis nidulans* studied in pigment mutants. *Plant Physiol* **66**, 1144–1149.
- Ohta, N. & Newton, A. (2003). The core dimerization domains of histidine kinases contain recognition specificity for the cognate response regulator. *J Bacteriol* **185**, 4424–4431.
- Pieper, U., Eswar, N., Braberg, H., Madhusudhan, M. S., Davis, F. P., Stuart, A. C., Mirkovic, N., Rossi, A., Marti-Renom, M. A. & other authors (2004). MODBASE, a database of annotated comparative

- protein structure models, and associated resources. *Nucleic Acids Res* **32**, D217–D222.
- Roder, K. H., Wolf, S. S. & Schweizer, M. (1996). Refinement of vectors for use in the yeast two-hybrid system. *Anal Biochem* **241**, 260–262.
- Rubio, L. M., Herrero, A. & Flores, E. (1996). A cyanobacterial *narB* gene encodes a ferredoxin-dependent nitrate reductase. *Plant Mol Biol* **30**, 845–850.
- Salinas, P., Ruiz, D., Cantos, R., Lopez-Redondo, M. L., Marina, A. & Contreras, A. (2007). The regulatory factor SipA provides a link between NblS and NblR signal transduction pathways in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol Microbiol* **66**, 1607–1619.
- Schar, J., Sickmann, A. & Beier, D. (2005). Phosphorylation-independent activity of atypical response regulators of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **187**, 3100–3109.
- Schwarz, R. & Grossman, A. R. (1998). A response regulator of cyanobacteria integrates diverse environmental signals and is critical for survival under extreme conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11008–11013.
- Sendersky, E., Lahmi, R., Shaltiel, J., Perelman, A. & Schwarz, R. (2005). NblC, a novel component required for pigment degradation during starvation in *Synechococcus* PCC 7942. *Mol Microbiol* **58**, 659–668.
- Stock, A. M., Robinson, V. L. & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**, 183–215.
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**, 207–234.
- Toro-Roman, A., Mack, T. R. & Stock, A. M. (2005). Structural analysis and solution studies of the activated regulatory domain of the response regulator ArcA: a symmetric dimer mediated by the α 4- β 5- α 5 face. *J Mol Biol* **349**, 11–26.
- van Waasbergen, L. G., Dolganov, N. & Grossman, A. R. (2002). *nblS*, a gene involved in controlling photosynthesis-related gene expression during high light and nutrient stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Bacteriol* **184**, 2481–2490.
- Williams, S. B., Vakonakis, I., Golden, S. S. & LiWang, A. C. (2002). Structure and function from the circadian clock protein KaiA of *Synechococcus elongatus*: a potential clock input mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15357–15362.

Edited by: A. Wilde



Supplementary Fig 1. Strategy for generation and analysis of strains WT-RCS3 and NbIR^{D57A}-RCS3. (A) The integration of the CS3 cassette (hatched bars) in the intergenic region (solid bar) between *nbIR* and the downstream ORFs Synpcc7942_2306 (open arrows) by homologous recombination is shown schematically. Flanking chromosome regions are represented by dotted lines and plasmid sequences by a continuous line. Depending on specific crossover sites two alternative *nbIR* alleles can be generated. Mutant (*nbIR*^{D57A}) and wild type strains differ at the indicated *PvuI* site. (B) Schematic representation of the allele structure in strains WT-RCS3 and NbIR^{D57A}-RCS3. Relevant *PvuI* sites are shown. Positions of primers used to verify allele structure are indicated by black arrows (C) PCR analysis of WT-RCS3 (lane 1), NbIR^{D57A}-RCS3 (lane 2) and *Synechococcus* sp. PCC7942 (lane3) using primers NbIR-1F (1F) and CS3-2R (2R). (D) *PvuI* digestion of the PCR fragment generated with primers 1F and NbIR-1R (1R). Lane numbers as in (C). M: size marker λ HindIII+EcoRI. L: DNA 100 bp ladder (Fermentas).

4.2.4. La proteína conectora SipA presenta un plegamiento SH3

Como se ha mencionado en apartados anteriores, la interacción entre NblS y SipA fue descubierta mediante ensayos de doble híbrido en levaduras a partir de librerías genómicas de *Synechococcus elongatus* utilizando derivados truncados de NblS como cebo. La interacción entre SipA y NblS fue mapeada en el dominio de unión a ATP de NblS. La ausencia de otras histidina quinasas como presas evidenció la especificidad de la interacción entre ambas proteínas, por lo que SipA se consideró como un nuevo tipo de proteína conectora, aquellas que modulan la actividad de las HKs y los RRs, en los TCS. El conocimiento íntimo a nivel estructural de SipA podría arrojar más luz sobre el mecanismo de acción de esta proteína en particular y sobre la acción de las proteínas conectoras en la transducción de señal mediada por TCS en general.

El trabajo que se incluye a continuación (obra realizada en colaboración con el Dr. José Luís Neira de la Universidad Miguel Hernández de Elche y la Dra. Asunción Contreras de la Universidad Alicante) sugiere que SipA es una proteína de clase β -II, con un plegamiento de tipo SH3. Estos dominios SH3 son el paradigma de las interacciones entre proteína-proteína en eucariotas, adecuándose por lo tanto el plegamiento a su función, aunque su presencia en procariotas es muy rara.

Nuestros intentos por resolver la estructura de SipA mediante cristalografía de rayos X han sido, de momento, infructuosos, por lo que

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

nos propusimos abordar este estudio por técnicas biofísicas, que incluían entre otras espectroscopia de RMN y dicroísmo circular (CD), y bioinformáticas. Para poder llevar a cabo todos estos estudios fue necesario producir grandes cantidades de SipA, con alta pureza, que fue analizada en gran parte en la Universidad de Elche gracias a una estrecha colaboración con el Dr. José Luís Neira. En paralelo a estos estudios realizamos un modelado estructural de SipA.

Mediante tres aproximaciones diferentes abordamos el estudio del estado oligomérico de SipA. Los resultados obtenidos mediante el cálculo del tiempo de relajación T_2 (53ms que correspondía a una masa de 7,5 KDa) y mediante ensayos de cromatografía de exclusión molecular (SEC) (volumen de elución de 13,42 ml equivalentes a una masa de $7,4 \pm 0,8$ KDa), mostraban a SipA como una proteína monomérica, ya que su peso molecular teórico es de 8,4 KDa. Dobson y colaboradores sugirieron que para un $R_s = 16 \pm 4$ Å la forma que debía tener una proteína era esférica. Los valores de R_s calculados mediante SEC ($R_s = 13,2$ Å) y a través de un método teórico comparando los valores experimentales con los valores teóricos ($R_s = 13,2$ Å) sugerían que SipA presentaba una forma esférica.

Una vez determinado el estado monomérico se comenzó el análisis experimental de la estructura de SipA mediante fluorescencia. El espectro de fluorescencia con un máximo a 336 nm sugería que un solo triptófano (W50) dominaba el espectro y que este se encontraba enterrado y no expuesto al solvente. El espectro de CD en el ultravioleta lejano (UV-far) mostraba una banda negativa alrededor de 200nm y una banda positiva a 195-200 nm correspondiendo a la forma típica de

proteínas β . Las proteínas con este comportamiento son clasificadas como proteínas β -II. El uso del algoritmo K2D predijo la siguiente estructura secundaria: 8% de hélices α , 43% de hojas β y 49% de random-coil, indicando que SipA presentaba un plegamiento de clase β II. La presencia de un campo bajo desplazado de protones Ha a 5,5ppm apoyaba la presencia de hojas β .

La monitorización de cambios en la fluorescencia intrínseca a 336nm, mostró una transición simple con un $pK_a=9,3\pm 0,2$ que correspondía con residuos de K y/o Y. Cuando monitorizamos la energía promedio (λ) se observaron dos transiciones: una a un pH ácido y otra con un $pK_a = 10,5 \pm 0,9$, siendo este valor muy similar al obtenido en la medición de los cambios en la fluorescencia intrínseca. Todos estos datos sugerían que la estructura secundaria era independiente del pH y que su estructura se mantenía en un amplio rango de pH.

Aunque los resultados anteriores mostraban que la estructura de SipA se mantenía en un amplio rango de pH nos preguntamos si esta estructura era estable y si las desnaturalizaciones térmicas y químicas podrían ser reversibles. Las T_m calculadas mediante CD y fluorescencia (desnaturalización térmica) daban un valor de T_m (valor promedio de ambas técnicas = 6K) que no variaba en un amplio rango de pHs. Por el contrario los valores obtenidos mediante desnaturalización química (fluorescencia= $2,61\pm 0,004$ M; CD= $1,9\pm 0,2$ M) indicaron que la desnaturalización tenía lugar en dos estados.

Realizamos un modelado *in silico* de la estructura de SipA mediante el uso de dos programas independientes: MODWEB y SAM-

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TO8. Independientemente del servicio usado y de acuerdo con los datos obtenidos de SEC, el modelo presentaba una forma esférica con una topología correspondiente a un plegamiento SH3. El análisis de estos modelos por el programa VADAR coincidían con los datos calculados mediante CD indicando que SipA presentaba una estructura formada por 45-51% de hojas β y por un 48-54% de bobina. Los modelos estructurales también confirmaban que el W50 se encontraba parcialmente enterrado apoyando los resultados de fluorescencia.

La presencia de un plegamiento tipo SH3 para SipA es el primer paso para entender su mecanismo de acción que añade un nuevo factor a la diversidad de los mecanismos de control que presentan los TCS. La presencia de un motivo SH3 en SipA puede también servir para futuras predicciones de otros dominios SH3 en procariotas, extendiendo la forma de acción de este dominio.

Contribución individual al trabajo

Mi contribución en este trabajo se centro en el clonado de SipA en el vector pPROEx-HTc desde el vector pEt24 suministrado por la Dra. Asunción Contreras y su posterior expresión y purificación en grandes cantidades para la realización de los diferentes ensayos para la caracterización de la misma. En paralelo con la puesta a punto y obtención de proteína SipA en forma soluble, realicé el modelado de la estructura tridimensional de SipA y su posterior análisis. Por último y en colaboración con el Dr. José Luis Neira participé en la realización de los diferentes ensayos de caracterización biofísica de SipA.



The regulatory factor SipA is a highly stable β -II class protein with a SH3 fold

María Luisa López-Redondo^{a,1}, Asunción Contreras^b, Alberto Marina^{a,*}, José L. Neira^{c,d,*}

^aMacromolecular Crystallography Unit, Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC) and CIBERER, 46010 Valencia, Spain

^bDivisión de Genética, Universidad de Alicante, 03080 Alicante, Spain

^cInstituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, 03202 Elche (Alicante), Spain

^dComplex Systems Physics Institute, 50009 Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 December 2009

Revised 20 January 2010

Accepted 20 January 2010

Available online 25 January 2010

Edited by Miguel De la Rosa

Keywords:

Protein stability

Protein structure

Spectroscopy

Fluorescence

SipA

SH3 domain

ABSTRACT

The small regulator SipA, interacts with the ATP-binding domain of non-bleaching sensor histidine kinase (NblS), the most conserved histidine kinase in cyanobacteria. NblS regulates photosynthesis and acclimation to a variety of environmental conditions. We show here that SipA is a highly stable protein in a wide pH range, with a thermal denaturation midpoint of 345 K. Circular dichroism and 1D ¹H NMR spectroscopies, as well as modelling, suggest that SipA is a β -II class protein, with short strands followed by turns and long random-coil polypeptide patches, matching the SH3 fold. The experimentally determined *m*-value and the heat capacity change upon thermal unfolding (ΔC_p) closely agreed with the corresponding theoretical values predicted from the structural model, further supporting its accuracy.

© 2010 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

SipA (non-bleaching sensor histidine kinase, NblS interacting protein A), is a small factor present in cyanobacteria that interacts with the ATP-binding domain of the histidine kinase (HK) NblS [1,2]. NblS regulates a large number of photosynthesis-related genes under a variety of environmental conditions, but the signals mediating SipA regulation of NblS remain elusive. Moreover, SipA stimulates the auto-kinase activity of NblS proteins from *Synechocystis* sp. PCC6803 [3] and *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942 (MLLR and AM, unpublished results). Therefore, SipA exemplified a new type of the two-component system “connectors”, the emerg-

ing group of proteins that modulate the activity of the sensor HKs and effector response regulators (RRs) [4].

Atomic resolution structures of HKs in complex with their cognate RR or connector protein are beginning to shed light on signal transduction mechanisms and phosphorylation transfer in two-component systems [5,6]. Attempts to elucidate the structure of this novel HK regulator by X-ray crystallography have been so far unsuccessful (MLLR and AM, unpublished results), prompting us to explore different conditions to investigate the structure of SipA by nuclear magnetic resonance (NMR) methods and other structural techniques. To provide a framework for the experimental results, we have also modelled SipA structure. Here, we show that SipA is a highly stable protein, with a thermal denaturation midpoint (T_m) of 345 K, and with resistant residual structure around the sole tryptophan at high temperatures and guanidinium hydrochloride (GdmCl) concentrations. Circular dichroism (CD) and 1D ¹H NMR spectroscopies suggest that the protein is a β -II class protein, with short strands followed by turns and long random-coil polypeptide patches in agreement with the modelled SH3 fold.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Ultra-pure GdmCl was from ICN Biochemicals, and its exact concentration was calculated as described [7]. Standard suppliers

Abbreviations: ASA, solvent accessible surface area; ΔC_p , the heat capacity change upon thermal unfolding; CD, circular dichroism; HK, histidine kinase; NMR, nuclear magnetic resonance; NblS, non-bleaching sensor histidine kinase; GdmCl, guanidinium hydrochloride; LEM, linear extrapolation method of chemical-denaturation; RMSD, root mean square deviation; RR, response regulator; T_m , thermal denaturation midpoint; SEC, size-exclusion chromatography; TSP, sodium trimethylsilyl-[2,2,3,3-²H₄]-propionate; UV, ultraviolet; [U]_{50%}, the denaturant concentration at the midpoint of the chemical unfolding reaction

* Corresponding authors. Address: Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC, Jaime Roig, 11, 46010 Valencia. Fax: +34 963690800 (A. Marina); Instituto de Biología Molecular y Celular, Edificio Torregaitán, Universidad Miguel Hernández, Avda. del Ferrocarril s/n, 03202, Elche (Alicante), Spain. Fax: +34 966658758 (J.L. Neira).

E-mail addresses: amarina@bv.csic.es (A. Marina), jlneira@umh.es (J.L. Neira).

¹ These two authors contributed equally to this work.

were used for all other chemicals. Water was deionized and purified on a Millipore system.

2.2. Cloning, expression and purification of SipA

Construction of plasmid, protein expression conditions and removal of the His-tag have been previously described [2]. Protein concentration was determined from the extinction coefficient of model peptides [8].

2.3. Fluorescence

Spectra were collected on a Cary Eclipse spectrofluorometer (Varian) interfaced with a Peltier system. Sample concentration was 1 μM . A 1-cm-path-length quartz cell (Hellma) was used. Experiments were performed at 298 K.

2.3.1. Steady state fluorescence measurements

The experimental set up has been previously described [9]. Chemical-denaturations were carried out at pH 7.0. Changes were monitored by following the fluorescence intensity and/or the average energy, $\langle\lambda\rangle$ [10].

2.3.2. Thermal-denaturations

Thermal-denaturations and their reversibility were carried out as described [9]. Thermal-denaturations were reversible at all pHs, and in the presence of GdmCl.

2.4. CD

Spectra were collected on a Jasco J810 spectropolarimeter with a Peltier unit [9]. The DICHROWEB site [11,12] was used to deconvolute the far-ultraviolet (far-UV) spectra.

2.4.1. Steady state measurements

Far-UV measurements were performed using 8 μM of SipA in 0.1-cm-pathlength quartz cells (Hellma) and raw ellipticity was converted to molar ellipticity, $[\theta]$, as described [9].

In the GdmCl-denaturations and pH-induced unfolding, the far-UV spectra were corrected by subtracting the corresponding baseline; chemical-denaturations were reversible (data not shown).

2.4.2. Thermal-denaturations

Thermal-denaturations and their reversibility were carried out as described [9] with a total protein concentration of 8 μM . Those in GdmCl (at concentrations of 0.5, 0.75 and 1.0 M) were also reversible.

2.5. NMR spectroscopy

The NMR experiments were acquired at 298 K on a Bruker Avance DRX-500 spectrometer (Bruker GmbH) equipped with a triple resonance probe and z-pulse field gradients.

2.5.1. 1D-NMR spectra

Homonuclear 1D-NMR spectra were acquired and processed as described [9,13]. Protein concentration was 90 μM . Spectra were referenced to external sodium trimethylsilyl-[2,2,3,3- $^2\text{H}_4$]-propionate (TSP).

2.5.2. Measurements of the T_2 (transverse relaxation time)

Measurements of the T_2 provide a convenient method to determine the molecular mass of a macromolecule, M . We measured the T_2 by using the 1-1 echo sequence (at echo-times of 2.9 ms and 400 μs). Since the correlation time, τ_c , is $\tau_c \approx \frac{1}{2} T_2$ [13], and, roughly, the M is twice the τ_c , and thus M can be estimated. Experiments

were carried out at 90 and 180 μM of protein concentration, and no variation was observed in the measured T_2 -time (data not shown).

2.6. SEC

Column calibration was carried out as described [9]. SipA samples (7 μM) were loaded at 25 mM Tris (pH 7.3) with 150 mM NaCl at 1 ml min^{-1} in a Superdex G75 HR 10/30 column, running on an AKTA-FPLC system (GE Healthcare) at 298 K, and monitored with an on-line detector at 280 nm. Size-exclusion chromatography (SEC) was used to determine the protein Stokes radius, R_s [9].

2.7. Analysis of the pH-, thermal- and chemical-denaturation curves

The pH-denaturation experiments were analyzed as described [9]. The apparent pK_a reported was obtained from three measurements, carried out with new samples. Chemical-denaturation curves were analyzed by using a two-state model for the unfolding reaction, according to the linear extrapolation method of chemical-denaturation (LEM) [14]. The ΔH_m in thermal-denaturations with GdmCl was obtained from the fitting [9], and used to determine the heat capacity change upon thermal unfolding (ΔC_p), since $\Delta C_p = \left(\frac{\partial \Delta H_m}{\partial T_m}\right)$. Fittings were carried out by using Kaleidagraph (Abelbeck software).

2.8. Modelling of the structure

Models of the three-dimensional structure of SipA were constructed submitting the SipA protein sequence of *Synechococcus* sp. PCC 7942 (NCBI Reference Sequence: YP_400213.1) to the MODWEB [15] and SAM-T08 [16] servers. The resulting models were compared, analyzed and validated using the CCP4 suite of programs [17] and VADAR [18].

3. Results

3.1. SipA is a monomeric protein with a spherical shape

To determine the oligomerization state, we used a three-part approach. First, we estimated the M of SipA by measuring the T_2 -relaxation time. Second, we calculated its R_s and its M by using SEC. And finally, we compared the experimental values with those predicted by using a theoretical method. We did not use analytical ultracentrifugation or multi-angle light scattering due to the large amounts of protein required in those techniques.

The T_2 -relaxation time of SipA was 53 ms, which yields a τ_c of 3.77 ns [13]. This value leads to an estimated M of 7.5 kDa, very close to the calculated value of 8.4 kDa.

SipA eluted at 13.42 ml in the column used, which yields an experimental R_s of 14 ± 2 Å [9]. A similar linear fitting is observed between the M of protein standards and their elution volumes, which leads to an M for SipA of 7.4 ± 0.8 kDa.

The theoretical value of the Stokes radius, r_0 , for a spherical molecule is [9]: $r_0 = \sqrt[3]{\left(\frac{3M\bar{V}}{4N\pi}\right)}$, where \bar{V} is the partial specific volume of the protein ($0.703 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$), and N is Avogadro's number. This equation yields a value of 13.2 Å, which is similar to that obtained by SEC.

Finally Dobson and co-workers have suggested that the R_s of a spherical folded protein is given by: $R_s = (4.75 \pm 1.11) N_u^{0.29}$ [19], where N_u is the number of residues; this leads to a value of 16 ± 4 Å, which is similar to that determined experimentally, and further suggests that the protein has a spherical shape.

3.2. Experimental structural analysis of SipA

The fluorescence spectrum of SipA has a maximum at 336 nm, which suggests that the sole tryptophan (Trp50) dominates the fluorescence spectrum (Fig. 1A, filled circles). Further, the value of the maximum indicates that the tryptophan is buried, since a solvent-exposed tryptophan should have a maximum at c.a. 350 nm [20] (Fig. 1A, blank squares).

The far-UV CD spectrum of SipA shows the typical shape of β protein (Fig. 1B, filled circles). The spectrum is similar to that of β -sheet proteins [11,12], with a distorted β -sheet or very short and irregular strands resembling those of random-coils (that is, a

negative band around 200 nm and a positive one at 195–200 nm). Proteins with this behaviour are classified as β -II proteins and have a lower β -sheet/random-coil ratio than the all- β proteins (the so-called β -I class [21]); the β II proteins can be distinguished from the random-coils because they show thermal-denaturations (see below). The use of the k2D algorithm predicts the following percentages of secondary structure: 8% of α -helix, 43% of β -sheet and 49% of random-coil, confirming that the protein belongs to the β -II class.

The 1D ^1H NMR spectrum of SipA resembles that of a well-folded protein [22], and it shows up-field shifted methyl groups (Fig. 1C, bottom panel) close to 0.0 ppm, and a large dispersion in

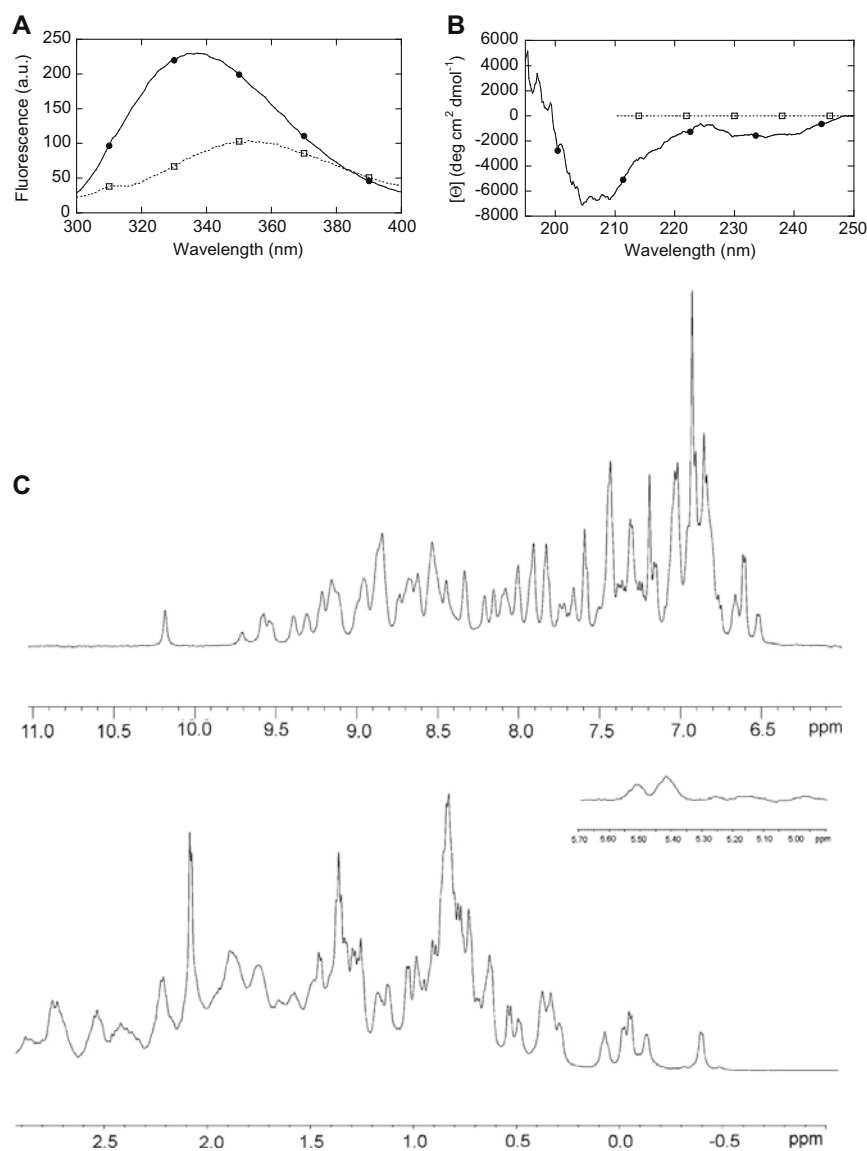


Fig. 1. Structure of SipA. (A) Fluorescence spectra of SipA in the absence (filled circles) and in the presence (blank squares) of GdmCl. (B) Far-UV CD spectrum of SipA in the absence and in the presence of GdmCl (symbols as in A). (C) The amide (top), down-field shifted H α (middle) and methyl (bottom) regions of the 1D ^1H NMR spectrum.

the amide region (Fig. 1C, top panel). The presence of down-field shifted H_{α} protons at ~ 5.5 ppm (Fig. 1C, middle panel) further confirms the presence of a β -sheet.

3.3. Is the structure of SipA pH-dependent?

To find out whether SipA structure is stable in a wide pH-range and/or at a particular pH range, we carried out a spectroscopic characterization of SipA at different pHs.

We followed changes in the intrinsic fluorescence at 336 nm (Fig. 2A, filled circles) either by excitation at 280 or 295 nm. The fluorescence intensity showed a single transition with a pK_a of 9.3 ± 0.2 . This value corresponds to that of a lysine and/or tyrosine residues [23]. On the other hand, when the $\langle \lambda \rangle$ was followed (either by excitation at 280 or 295 nm) (Fig. 2A, blank squares), two transitions were observed: one at acid pH, whose pK_a could not be determined due to the absence of acidic baseline; and other whose $pK_a = 10.5 \pm 0.9$, similar to that obtained by following the changes in intensity. The fact that $\langle \lambda \rangle$ shows two transitions is probably due to its exquisite sensitivity to changes at any wavelength, as it has been described in other proteins [10].

The ellipticity at 222 nm did not show a sigmoidal transition at high pHs (Fig. 2B); at low pHs a transition was observed with not acidic baseline. This result suggests that: (i) the secondary struc-

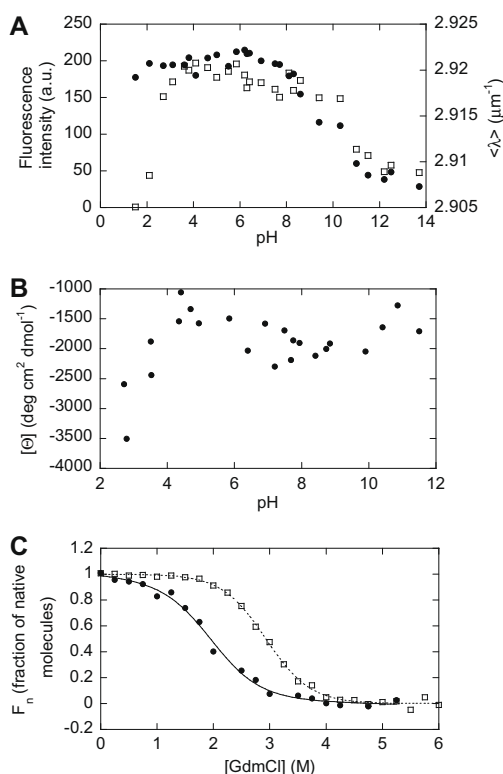


Fig. 2. pH- and chemical-denaturations of SipA. (A) Changes in the fluorescence intensity at 336 nm (filled circles, left axis) and in the $\langle \lambda \rangle$ (blank squares, right axis) versus pH are shown. (B) Changes in the molar ellipticity at 222 nm versus pH are shown. (C) Changes in the fraction of native molecules (defined in [14]) for the CD (filled circles) and $\langle \lambda \rangle$ (blank squares) as the concentration of GdmCl is modified; the lines are the fitting to the two-state equation following the LEM [14].

ture (mainly the scaffold of the β -sheet) was pH-independent, and remains unchanged in a wide pH range; and, (ii) since the transition observed at basic pHs was only monitored by fluorescence, then, it must be associated with a fluorescence residue, which should be probably one of the two tyrosines.

3.4. Conformational stability of SipA

From the above studies, we can conclude that the structure of the protein remains unaltered in a wide pH range. However, although the structure did not change significantly, does the stability do? Further, are both thermal and chemical-denaturations reversible? Trying to address these questions, we carried out the thermal- and chemical-denaturations of SipA.

3.4.1. Thermal-denaturations

The T_m measured either by CD or fluorescence remained unchanged in a wide pH range (Table 1), and only at very high or low pHs, they did change. However, the T_m measured by fluorescence (either by excitation at 280 or 295 nm) was always higher than that measured by CD (in average ~ 6 K) (Fig. 3A and B).

3.4.2. Chemical-denaturations

The denaturant concentration at the midpoint of the chemical unfolding reaction ($[U]_{50\%}$) obtained by fluorescence was higher (2.61 ± 0.04 M) than that determined by CD (1.9 ± 0.2 M) (Fig. 2C); moreover, the m -value from CD was smaller (that is, less co-operative: 1.2 ± 0.3 kcal mol $^{-1}$ M $^{-1}$) than that determined by fluorescence (2.0 ± 0.2 kcal mol $^{-1}$ M $^{-1}$). Taken together, these data indicate that the denaturation in SipA did not follow two-state behaviour, but rather there are species with residual structure around Trp50 (which is the only residue observed by fluorescence excitation at 295 nm).

To estimate the ΔC_p , we monitored the changes in the T_m as the concentration of GdmCl was varied. The thermal stability of the protein (when followed either by CD or fluorescence) decreased when [GdmCl] was raised, as shown by the linear decline in the T_m (data not shown); the slope of the linear regression, $\frac{\partial T_m}{\partial [GdmCl]}$, equals to -15 ± 2 K M $^{-1}$ (from fluorescence measurements) or -17.2 ± 0.9 K M $^{-1}$ (from CD). The slope of the linear regression between ΔH_m and T_m (the ΔC_p) yields a value of 1.36 ± 0.05 kcal K $^{-1}$ mol $^{-1}$ from fluorescence (Fig. 3C), and of 1.75 ± 0.07 kcal K $^{-1}$ mol $^{-1}$ from CD).

3.5. Structural models of SipA

To further validate experimental data, two independent servers were used to generate the structural models of SipA. MODWEB web server selects structural templates from the PDB by sequence alignment and calculates the final model from the sequence-structure matches, by satisfying spatial restraints in terms of probability

Table 1
The T_m of SipA measured by fluorescence and CD.^a

pH	CD ^b	Fluorescence ^c
4.1	345 \pm 1	353.6 \pm 0.4
5.9	346.6 \pm 0.6	355.8 \pm 0.4
6.4	348.6 \pm 0.8	354.4 \pm 0.4
7.0	347.2 \pm 0.8	354.8 \pm 0.7
8.3	348.1 \pm 0.9	355.7 \pm 0.9
9.4	346.6 \pm 0.8	352.1 \pm 0.4
11.5	342.2 \pm 0.5	349.1 \pm 0.3

^a The T_m s were obtained from fitting to the two-state equation.

^b Thermal-denaturations were followed by the changes at 222 nm in the CD spectra.

^c Thermal-denaturations followed by the changes in the fluorescence intensity at 336 nm after excitation at 280 nm.

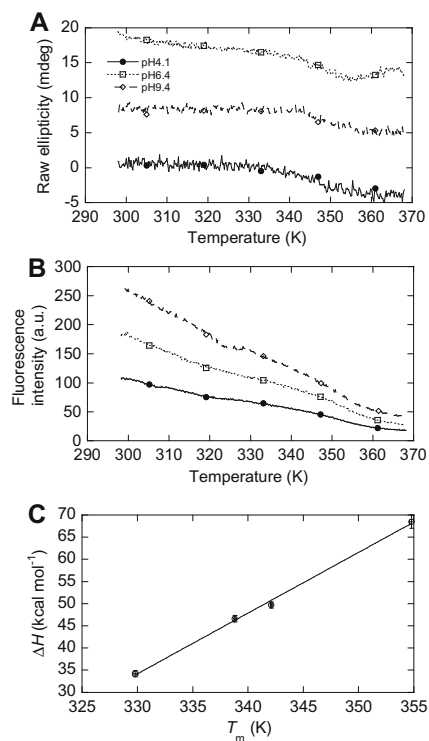


Fig. 3. Thermal-denaturations of SipA. (A) Changes in the ellipticity at 222 nm at different pHs. The y-axis scale is arbitrary, since the thermal-denaturations traces have been scaled up. (B) Changes in the fluorescence intensity at 336 nm after excitation at 280 nm at different pHs (symbols are as in (A)). (C) Linear dependence of ΔH_m versus T_m as measured by fluorescence.

density functions [15]. SAM-T08 web server generates the final model from PDB templates selected by structural homology with hidden Markov models that are built from predicted local structures based in multiple sequence alignments of the target sequence [16]. Irrespective of the server used, the models of SipA presented a single domain fold with a similar topology, which is reflected in the excellent superimposition of the two structures (root mean square deviation for the superimposition of 56 C α atoms is 1.8 Å) (Fig. 4). In agreement with the SEC results the models present a spherical shape, with a topology corresponding to the SH3 fold that is characterized by the presence of five or six β -strands (five strands in the models) arranged as two anti-parallel β -sheets with size-variable linker regions connecting the β -strands [24]. VADAR calculations [18] with the modelled structures suggest that the structure is formed by a 45–51% of β -sheet and a 48–54% of random-coil in close agreement with the data calculated by CD (43% of β -sheet and 49% of random-coil, see above). In both models, there are two β -sheets, formed by two and three strands; in the larger sheet (β 2– β 4) Tyr49 and Trp50 are at the edge of the second strand (Fig. 4). The structures also confirm that Trp50 is partially buried, at the beginning of a β -strand (β 3), supporting the fluorescence results (Fig. 1A). The second β -sheet is formed by two short anti-parallel strands (β 1 and β 5). Tyr17, the other fluorescence residue, is embedded in a SH3 distinctive prominent loop named RT loop (Fig. 4). The models also show a high content of random-coil structure (48–54%), as it would correspond to a β II

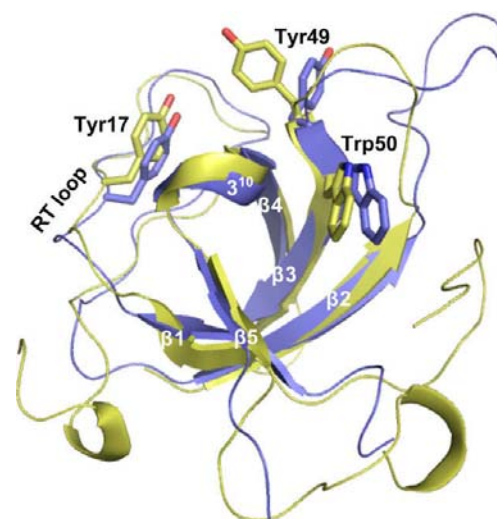


Fig. 4. Structural models of SipA. Ribbon representation of the superimposed SipA model calculated with MODWEB (blue) and SAM-T08 (yellow). Secondary structure elements, as well as the RT loop, are labelled. The side-chains of Tyr17, Tyr49 and Trp50 are represented in ball-and-stick, with carbon atoms in the same colour as the corresponding ribbon structure, and with oxygen and nitrogen atoms in red and blue, respectively.

class protein. The few discrepancies between the two calculated models are restricted to the connecting loops and the N- and C-terminal ends which would correspond with the most flexible regions of the protein. Indeed, sequence comparison of SipA orthologs [1,3] shown that both ends are highly variable in length and composition, indicating that these regions could be adopting a particular conformation in each SipA homolog.

We can further validate the models not only by the agreement with the experimental structural (CD, fluorescence and NMR) and hydrodynamic (SEC) results, but also by their predictive power of the thermodynamic parameters of thermal- and chemical-denaturations: the ΔC_p and m -value, respectively. An m -value can be estimated from the linear relationship between m and ΔASA_{total} [25]: m (cal mol⁻¹ M⁻¹) = 368 + 0.11 ΔASA_{total} . The ΔASA_{total} of one of the modelled structures is 6880.7 Å² (and it is 8578.2 Å², for the other model). The above expression yields 1.12 kcal mol⁻¹ M⁻¹ (1.31 kcal mol⁻¹ M⁻¹, for the other), similar to those measured experimentally (see above).

The molar heat capacity, C_p , of a given conformational state of a protein can be considered as composed as the sum of an intrinsic term (arising from the contribution to C_p of the covalent bonds present in the molecule and the non-covalent protein interactions) and another due to the interactions between surface-exposed residues of the protein and the water molecules (hydration) [26]. Then, the ΔC_p for the transition between two conformational states can be calculated as the difference between the molar heat capacity, C_p , of the final state and that of the initial state. Since the contribution arising from the covalent bonds to C_p is identical for all the accessible conformational states of the protein, ΔC_p is comprised only by the contribution due to internal interactions (among solvent buried groups of the protein) and that due to hydration (protein-water interaction). These can be rationalized by the changes in solvent accessible surface area (ASA) (polar and apolar) induced by the transition between the two conformational states [26]: $\Delta C_p = 0.45\Delta ASA_{apolar} - 0.26\Delta ASA_{polar} - 0.0087\Delta ASA_{total}$, were

$\Delta ASA_{\text{apolar}}$, $\Delta ASA_{\text{polar}}$ and $\Delta ASA_{\text{total}}$, are the differences in apolar, polar and total ASA between the two conformational states. We can estimate the changes in ASA between the fully unfolded (taken as the final denatured state of the protein) and the native state of the protein in one of the models: $\Delta ASA_{\text{apolar}} = 4551.3 \text{ \AA}^2$, $\Delta ASA_{\text{polar}} = 2329.4 \text{ \AA}^2$ and $\Delta ASA_{\text{total}} = 6880.7 \text{ \AA}^2$ (5695 \AA^2 , 2883.6 \AA^2 , 8578.2 \AA^2 , respectively, for the other model). These values yield $\Delta C_p = 1382 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ (or 1223.7 $\text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, for the other model), which is similar to those experimentally obtained (see above), and thus confirm the validity of the structural models obtained. However, it must be indicated that our model is mainly supported directly by the structural spectroscopic (fluorescence, NMR and CD), and hydrodynamic (SEC) methods, and indirectly by the thermal- and chemical-denaturations; nevertheless, it would be very unlikely that other modelled structure would predict so accurately the measured thermodynamic parameters ($\Delta ASA_{\text{apolar}}$, $\Delta ASA_{\text{polar}}$ and $\Delta ASA_{\text{total}}$). To further support the model proposed for SipA, it is important to indicate at this stage that both modelling servers were able to identify PDB templates based on sequence homology with SH3 domains (PDB IDs: 1UG1, 1NG2 and 2QDY). However, final support to the proposed model will come when we resolve the three-dimensional structure.

4. Discussion

This work reveals structural and conformational features of a member of the SipA family for the first time. The protein structure was stable in a wide pH range and unfolded only at low pHs (acid denaturation) and high pHs (probably associated with one out of the two tyrosine residues). The differences observed for the T_m and $[U]_{50\%}$, between fluorescence and CD are due to the fact that fluorescence is monitoring unfolding of a local (probably hydrophobic) cluster around Trp50, but that global unfolding is monitored by CD (as it would be expected, since CD follows the unfolding of the secondary structure). According to this interpretation, unfolding of SipA, despite its small size, does not follow a simple two-state mechanism of unfolding. Instead, there are partially folded forms retaining significant structure, especially around Trp50. However, in contrast to that observed by chemical-denaturations (where the m -values were different for both techniques, see above), the thermal-denaturations must occur by the same global unfolding event (since the ΔC_p s are very similar), although residual persistent structure is present in the neighborhood of Trp50 (as judged by the higher T_m , Fig. 3B).

CD and NMR, as well as two independent predictions of three-dimensional structures for SipA (Fig. 4), generated by servers with different modelling approaches, indicated that SipA is well-folded, with a high content of β -sheet that conforms to a characteristic SH3 fold [24]. SH3 domains, the paradigm for eukaryotic protein-interacting modules, are scarce in prokaryotes (see the SH3 family in PFAM; <http://pfam.sanger.ac.uk>). Because conservation of the fold does not always imply enough amino acid sequence similarity, SipA proteins have been previously missed in SH3 domain searches [27]. Acknowledging the presence of an SH3 fold for SipA is a first step to understand the diversity of signal transduction mechanisms and the new connector players in the so-called two-component systems. The presence of that motif in SipA may also assist in future predictions for SH3 domains, and in the NMR assignments of SipA.

Acknowledgements

We thank Prof. Miguel Angel de la Rosa for handling the manuscript and the referee for helpful suggestions. This work was supported by Ministerio de Educación y Ciencia (Grants BFU2006-

12424, BIO2008-04592, BIO2009-10872, SAF2008-05742-C02-01, CSD2008-00005), Generalitat Valenciana (ACOMP2006/083, ACOMP2009/185) and FIPSE private Foundation (Exp: 36557/06). MLLR was supported by a Fundación Mutua Madrileña fellowship. We deeply thank May García, María del Carmen Fuster, Javier Casanova and Raquel Jorquera for excellent technical assistance.

References

- [1] Espinosa, J., Fuentes, I., Burillo, S., Rodríguez-Mateos, F. and Contreras, A. (2006) SipA, a novel type of protein from *Synechococcus* sp. PCC 7942, binds to the kinase domain of NblS. *FEMS Microbiol. Lett.* 254, 41–47.
- [2] Salinas, P., Ruiz, D., Cantos, R., López-Redondo, M.L., Marina, A. and Contreras, A. (2007) The regulatory factor SipA provides a link between NblS and NblR signal transduction pathways in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol. Microbiol.* 66, 1607–1619.
- [3] Sakayori, T., Shiraiwa, Y. and Suzuki, I. (2009) A *Synechocystis* homolog of SipA protein, Ssl3451, enhances the activity of the histidine kinase Hik33. *Plant Cell Physiol.* 50, 1439–1448.
- [4] Mitrophanov, A.Y. and Groisman, E.A. (2008) Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes Dev.* 22, 2601–2611.
- [5] Bick, M.J., Lamour, V., Rajashankar, K.R., Gordiyenko, Y., Robinson, C.V. and Darst, S.A. (2009) How to switch off a histidine kinase: crystal structure of *Geobacillus stearothermophilus* KinB with the inhibitor Sda. *J. Mol. Biol.* 386, 163–177.
- [6] Casino, P., Rubio, V. and Marina, A. (2009) Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell* 139, 325–336.
- [7] Pace, C.N. (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* 131, 266–280.
- [8] Gill, S.C. and von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182, 319–326.
- [9] Muro-Pastor, M.L., Barrera, F.N., Reyes, J.C., Florencio, F.J. and Neira, J.L. (2003) The inactivating factor of glutamine synthetase, IF7, is a “natively unfolded” protein. *Protein Sci.* 12, 1443–1454.
- [10] Royer, C.A. (1995) Fluorescence spectroscopy in: *Protein Stability and Folding* (Shirley, B.A., Ed.), pp. 65–89, Humana Press, Totowa, NJ.
- [11] Whitmore, L. and Wallace, B.A. (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* 89, 392–400.
- [12] Whitmore, L. and Wallace, B.A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* 32, W668–W673.
- [13] Neira, J.L., Román-Trufero, M., Contreras, L.M., Prieto, J., Singh, G., Barrera, F.N., Renart, M.L. and Vidal, M. (2009) The transcriptional repressor RYBP is a natively unfolded protein which folds upon binding to DNA. *Biochemistry* 48, 1348–1360.
- [14] Clarke, J. and Fersht, A.R. (1993) Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase: increasing the stability of proteins against the rate of denaturation. *Biochemistry* 32, 4322–4329.
- [15] Eswar, N., John, B., Mirkovic, N., Fiser, A., Ilyin, V.A., Pieper, U., Stuart, A.C., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Yerkovich, B. and Sali, A. (2003) Tools for comparative protein structure modeling and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31, 3375–3380.
- [16] Karplus, K. (2009) SAM-T08. HMM-based protein structure prediction. *Nucleic Acids Res.* 37, W492–W497.
- [17] Collaborative Computational Project, Number 4, 1994. The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst. D50*, 760–763.
- [18] Willard, L., Ranjan, A., Zhang, H., Monzavi, H., Boyko, R.F., Sykes, B.D. and Wishart, D.S. (2003) VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res.* 31, 3316–3319.
- [19] Wilkins, D.K., Grimshaw, S.B., Receveur, V., Dobson, C.M., Jones, J.A. and Smith, L.J. (1999) Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques. *Biochemistry* 38, 16424–16431.
- [20] Schmid, F.X. (1997) Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes in: *Protein Structure* (Cerrington, T.E., Ed.) second ed, pp. 261–297, Oxford University Press, Oxford, UK.
- [21] Sreerama, N. and Woody, R.W. (2003) Structural composition of β I- and β II-proteins. *Protein Sci.* 12, 384–388.
- [22] Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons, New York.
- [23] Thurlkill, R.L., Grimsley, G.R., Scholtz, J.M. and Pace, C.N. (2006) pK values of the ionizable groups of proteins. *Protein Sci.* 15, 1214–1218.
- [24] Mayer, B.J. (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *J. Cell Sci.* 114, 1253–1263.
- [25] Myers, J.K., Pace, C.N. and Scholtz, J.M. (1995) Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci.* 4, 2138–2148.
- [26] Gómez, J., Hilsner, V.J., Xie, D. and Freire, E. (1995) The heat capacity of proteins. *Proteins* 22, 404–412.
- [27] D'Aquino, J.A. and Ringe, D. (2003) Determinants of the SRC homology domain 3-like fold. *J. Bacteriol.* 185, 4081–4086.

4.2.5. Nuevos TCS en la regulación de la respuesta al estrés en cianobacterias.

A pesar de la importancia de NblS, la HK más conservada en cianobacterias, su pareja para formar un TCS era todavía desconocida. Después de demostrar en apartados anteriores que NblR no era el regulador de la respuesta socio de NblS, nos propusimos iniciar los experimentos que nos condujesen al descubrimiento de su RR socio.

Utilizando la herramienta informática de predicción de parejas de TCS (<http://www.swissregulon.unibas.ch/cgi-bin/TCS.pl>) desarrollada por Burger y van Nimwegen (Burger & van Nimwegen, 2008) se analizó el genoma de *Synechococcus elongatus* PCC7942 para identificar proteínas candidatas a ser el regulador de la respuesta socio de NblS. Este programa predecía que el RR RpaB y en menor medida SrrA, dos reguladores de la respuesta ortodoxos, podrían ser las parejas de NblS. Mediante ensayos de doble híbrido en levaduras utilizando diferentes formas truncadas de NblS, junto con RpaB, SrrA y RpaA, un tercer RR propuesto en la literatura como posible pareja de NblS, pudimos obtener pruebas experimentales de la interacción entre RpaB y SrrA con NblS, estando de acuerdo con los resultados *in silico*. Los resultados de los ensayos de doble híbrido mostraban que mientras que el truncado NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴, que correspondía al total del dominio citoplasmático de esta HK, interaccionaba con ambos reguladores, no lo hacían del mismo modo los truncados NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ y NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴, que solo incluían la porción catalítica, ya que solo interaccionaban con SrrA, otorgando al dominio HAMP/PAS, presente en la primera, un posible papel en el reconocimiento o afinidad en la unión de RpaB.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como paso obvio para probar esta unión abordamos su análisis *in vitro*. Para ello se clonaron y purificaron diversas construcciones de NblS, así como los dominios aceptores (RD) y la proteína completa (FL) de ambos RR.

La evaluación de la actividad de NblS se realizó usando dos constructos: NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ (que contenía toda la porción intracelular) y NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ (mínima construcción que incluía la porción catalítica). El análisis de la cinética de autofosforilación *in vitro* de ambas formas mostró perfiles similares sugiriendo que la presencia de HAM-PAS, presente en la forma larga, no afectaba a la actividad de autofosforilación. El cálculo de los parámetros cinéticos para NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ ($K_m = 375 \mu\text{M}$; $K_{cat} = 0.0016 \text{min}^{-1}$) y su posterior comparación con parámetros de otras HKs, indicó que NblS tenía una baja actividad catalítica.

Para poder ver *in vitro* pruebas de la interacción entre NblS y ambos reguladores se tuvieron que realizar ensayos de fosfotransferencia. Los ensayos *in vitro* corroboraron la propuesta *in silico* y de doble híbrido, ya que la defosforilación de ambas NblS se correlacionaba con la aparición de los RRs fosforilados, indicando una fosfotransferencia de NblS a RpaBRD y SrrARD. Estos resultados de fosfotransferencia mostraron también una clara preferencia de fosforilación de NblS, en ambas construcciones, hacia SrrARD frente a RpaBRD.

La larga vida media de ambos RR fosforilados (RpaBRD = 11,5h; SrrARD = 30,5h) sugería que debería existir una actividad fosfatasa que los defosforilase. Ensayos de actividad fosfatasa con ambas construcciones de NblS mostraron que mientras que NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ no era

capaz de defosforilar a ninguno de los dos reguladores, NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ conseguía defosforilar, en presencia de ADP, a ambos reguladores sin mostrar preferencia alguna por ninguno de ellos, confirmando esto el requerimiento de los dominios HAM-PAS para esta actividad fosfatasa.

Ensayos posteriores de fosfotransferencia confirmaron la preferencia por parte de NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ de fosfotransferir a SrrARD frente a RpaBRD, incluso cuando RpaBRD excedía a SrrARD en un orden de magnitud. También quisimos comprobar si esta preferencia a la hora de fosfotransferir se mantenía en la hora de defosforilar. Para ello se realizaron ensayos de competición usando NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ frente a ambos P~RR mezclados en cantidades equimolares. Al contrario de lo que ocurría en la fosfotransferencia, aquí ambas cinéticas de defosforilación mostraban perfiles similares indicando que NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ no presentaba preferencia por ningún regulador en esta reacción.

Ensayos *in vivo* de inactivación de *nblS*, *rpaB* y *srrA* nos sirvieron para el estudio de la esencialidad de la ruta. Nuestros análisis genéticos mostraron que la ruta de fosforilación de NblS hacia RpaB era esencial para la viabilidad de la célula, mientras que la ruta que incluye a SrrA no lo era. La imposibilidad de generar cepas de *Synechococcus* donde NblS presentara mutaciones en el lugar predicho de fosforilación (H407A) y en residuos claves para la unión del ATP y su posterior autofosforilación (N524A) nos sirvieron para decir que la fosforilación de NblS es esencial para la supervivencia de *S.elongatus*. Del mismo modo cepas mutantes para RpaB (*rpaB*^{D56A}; *rpaB*^{D56E}) mostraron ser letales para *S.elongatus*. Indicando que el proceso de fosforilación mediado por la ruta NblS-RapB era esencial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un primer estudio del genoma de *S. elongatus*, reveló la presencia de secuencias HLR1, que habían sido previamente descritas como sitios de unión para RpaB, aguas arriba de la región codificante para *srrA*. Ensayos de movilidad electroforética pusieron de manifiesto que RpaB se une a estas secuencias. Análisis mediante RT-PCR de diferentes genes inducibles por estrés en alta luz en cepas salvajes o que sobreexpresaban RpaB o SrrA, mostraron que bajo condiciones estándar de crecimiento los niveles de genes regulados por alta luz así como de *srrA* eran muy bajos, estando esto en concordancia con los resultados obtenidos mediante ensayos de movilidad, mientras que bajo condiciones de estrés se producía un fuerte y transitorio incremento de estos genes así como de *srrA*. Ambos resultados proponían que RpaB podría estar controlando la expresión de *srrA*.

El conjunto de resultados mostrados en este trabajo sugieren un complejo sistema de regulación donde la ruta de fosforilación NblS-RpaB es esencial. Bajo condiciones de crecimiento estándar (LL), NblS fosforilaría a RpaB, el cual regula (positiva o negativamente) genes esenciales así como genes de respuesta a estrés por alta luz (HL) como *hliA*, *nblA* y *srrA*. En el caso de *srrA*, RpaB estaría inhibiendo su expresión. En estas condiciones el ratio de fosforilación SrrA~P: RpaB~P sería ser muy bajo. Bajo condiciones de HL, RpaB sería rápidamente defosforilado por NblS, lo que produciría una desrepresión de *SrrA*. Debido a la esencialidad de la ruta NblS-RpaB asumimos que la defosforilación de RpaB tiene que ser un evento transitorio, durante el cual, SrrA sería sintetizado y preferiblemente fosforilado por NblS amplificando la señal de estrés. Durante un estrés prolongado, cantidades

de RpaB~P regularían los genes de expresión de *srrA*, y el ratio SrrA~P: RpaB~P y la afinidad relativa de cada RRs por sus respectivos genes diana determinarían el patrón de expresión de *rpaB* y *srrA*, conduciendo a la implementación de programas específicos para la aclimatación fotosintética y supervivencia.

Nuestros resultados aportados aquí, demuestran por primera vez un sofisticado circuito regulatorio donde intervienen dos RRs controlados por una misma HK. El sistema NblS proporciona un paradigma de un TCS ramificado formado por una única HK, NblS, y dos RRs, RpaB y SrrA, donde múltiples interacciones reguladoras entre ambos RRs surgen para garantizar la supervivencia y aclimatación de la célula a cambios producidos en su entorno.

Contribución individual al trabajo

Mi contribución en este trabajo consistió en la realización de todos los ensayos *in vitro* para la búsqueda del RR de NblS. Para ello realicé las clonaciones de NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴, SrrARD (dominio aceptor), RpaB (tanto proteína completa como su dominio aceptor) y RpaARD (dominio aceptor). Cuando recibimos confirmación mediante secuenciación de la correcta clonación comencé la búsqueda y puesta a punto de las condiciones de expresión y obtención de proteína soluble de todas las proteínas usadas en este trabajo. Como paso final busqué y puse a punto las condiciones de purificación de todas las proteínas y obtuve cantidad y pureza suficiente para la realización de los diferentes ensayos. Para la caracterización enzimática de las reacciones llevadas a cabo por el

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

sistema, autofosforilación, fosfotransferencia y defosforilación, puse a punto y lleve a cabo todos los ensayos *in vitro*. También calcule las vidas medias de ambos P~RR. Como nuestros resultados mostraban que ambos reguladores, RpaB y SrrA, eran los RR socios de NblS, realicé los ensayos de competición, tanto para la reacción de fosfotransferencia como la de defosforilación, para ver si NblS tenía preferencia en alguna de las actividades por uno u otro regulador. Después de realizar el análisis de las secuencias de ambos reguladores en función de sus estructuras pase a comprobar si RpaB controlaba el promotor de SrrA, amplifiqué las secuencias *HLLR1* de *srrA* y *nblA*, y realicé todos los ensayos de movilidad electroforética. Por último analicé todos los resultados obtenidos y participé en la realización del modelo final propuesto en este trabajo.

Environmental control of phosphorylation pathways in a branched two-component system

Maria Luisa López-Redondo,^{1†} Felix Moronta,^{2†} Paloma Salinas,² Javier Espinosa,² Raquel Cantos,² Ray Dixon,³ Alberto Marina^{1**} and Asunción Contreras^{2*}

¹Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC) and CIBERER, 46010 Valencia, Spain.

²División de Genética, Universidad de Alicante, Apartado 99, E-03080 Alicante, Spain.

³Department of Molecular Microbiology, John Innes Centre, NR4 7UH Norwich, UK.

Summary

NbIS, the most conserved histidine kinase in cyanobacteria, regulates photosynthesis and acclimatization to a variety of environmental conditions. We used *in silico*, *in vivo* and *in vitro* approaches to identify RpaB and SrrA as the cognate response regulators of NbIS and to characterize relevant interactions between components of this signalling system. While genetic analysis showed the importance of the NbIS to RpaB phosphorylation branch for culture viability in *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *in vitro* assays indicated a strong preference for NbIS to phosphorylate SrrA. This apparent discrepancy can be explained by environmental insulation of the RpaB pathway, achieved by RpaB-dependent repression of *srrA* under standard, low light culture conditions. After a strong but transient increase in *srrA* expression upon high light exposure, negative regulation of *srrA* and other high light inducible genes takes place, suggesting cooperation between pathways under environmental conditions in which both RpaB and SrrA are present. Complex regulatory interactions between RpaB and SrrA, two response regulators with a common evolutionary origin that are controlled by a single histidine kinase, are thus emerging. Our results provide a paradigm for regulatory interactions between response regulators in a branched two-component system.

Accepted 8 August, 2010. For correspondence. *E-mail contrera@ua.es; Tel. (+34) 96 5903957; Fax (+34) 96 5909569; **E-mail amarina@ibv.csic.es; Tel. (+34) 96 3391754; Fax (+34) 96 3690800. †The first two authors contributed equally to this work.

Introduction

Two-component systems (TCSs) are widely used in signal transduction and adaptation to environmental changes in bacteria and archaea (Gao *et al.*, 2007). They are also found in lower eukaryota and higher plants, but not in animals (Gao *et al.*, 2007). In the prototype system, the sensor histidine kinase (HK), bearing HisKA and HATPase_c domains autophosphorylates on a conserved histidine residue and this phosphoryl group is transferred to an aspartate of the N-terminal phosphoacceptor receiver domain (Res_reg) of the cognate response regulator (RR). Phosphorylation of the RR leads to conformational changes of the C-terminal effector domain (Trans_Reg_C), modifying its affinity for its targets. Finally, the RR is dephosphorylated by its own phosphatase activity or, in several cases, by the cognate HK. While the domains involved in the different phosphorylation steps are structurally conserved, both sensor and output domains are functionally and structurally diverse (reviewed in depth by Stock *et al.*, 2000). This basic scenario can increase in complexity by the existence of phosphoacceptor intermediaries, 'branched' pathways where one HK recognizes several RRs or vice versa, 'orphan' components with unknown partner or ancillary proteins that modulate the activity of HK or RR, allowing integration of multiple signals and generating sophisticated signalling networks similar to those founded in eukaryotes (Laub and Goulian, 2007; Mitrophanov and Groisman, 2008).

Cyanobacteria contain more genes encoding TCSs per unit genome size than other bacteria (Ashby and Houmard, 2006), a feature that probably reflects the vast number of habitats colonized by these organisms and the regulatory cost of using light as energy source. Additional hallmarks of cyanobacterial TCSs are the predominance of the OmpR/PhoB family amongst RRs (Galperin, 2010) and the high proportion of orphan RRs, that outnumber HKs by almost 2:1 (24:13 in the model system *Synechococcus elongatus* PCC 7942, hereafter referred to as *S. elongatus*). The possible significance of disperse gene organization to the evolution and function of TCSs remains largely unexplored.

The sensor NbIS, the most conserved HK in cyanobacteria (Ashby and Houmard, 2006), is a key player in the perception of multiple environmental parameters and

subsequent adaptation of the metabolic and photosynthetic machineries to changing environmental conditions. NblS was first identified in *S. elongatus* by its implication in the process called chlorosis or bleaching (van Waasbergen *et al.*, 2002), which is triggered by the NblA protein under a variety of stress conditions. Genetic inactivation of *nblS* has not been achieved in the obligate photoautotroph *S. elongatus*. However, null mutants of the orthologous gene from *Synechocystis* sp. PCC6803, called DspA/Hik33 could be maintained in heterotrophic conditions (Suzuki *et al.*, 2000) and have been the subject of extensive transcriptional analyses. DspA/Hik33 has been shown to regulate a large number of genes under a variety of stress conditions, including high light (HL), cold shock, osmotic, salt and oxidative stress (Bartsevich and Shestakov, 1995; Mikami *et al.*, 2002; Marin *et al.*, 2003; Hsiao *et al.*, 2004; Tu *et al.*, 2004). The accepted view is that these different incoming signals would reduce anabolism and cause hyper-reduction of photosynthetic electron transport, leading to redox stress. Thus, NblS (Hik33/DspA) may act as a sensor of photosynthetic redox stress under a variety of environmental circumstances. It may also respond to signals that influence membrane fluidity under certain stress conditions such as cold, osmotic and salt stress (Murata and Los, 2006).

The finding that point mutations in *nblS* resulted in a non-bleaching phenotype (van Waasbergen *et al.*, 2002), prompted the suggestion that NblS was involved in the activation of the RR NblR, which is required for the strong increase in *nblA* gene expression observed during nutrient stress in *S. elongatus* (Schwarz and Grossman, 1998; Luque *et al.*, 2001; Sendersky *et al.*, 2005; Salinas *et al.*, 2007). However, NblR is an atypical RR with homology to the OmpR/PhoB family that does not interact with NblS and is not phosphorylated (Kato *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2008), thus belonging to a new class of Phosphorylation-Independent Activation of Response Regulators (Ruiz *et al.*, 2008). The only protein for which a direct physical interaction with NblS has been reported so far, is SipA, a small regulatory factor conserved in cyanobacteria that binds to the ATP binding domain (HATPase_c) of NblS (Espinosa *et al.*, 2006; Salinas *et al.*, 2007; Lopez-Redondo *et al.*, 2010), stimulating its autophosphorylation activity (Sakayori *et al.*, 2009).

Recent indirect evidence has suggested that RpaB is the cognate RR of NblS. Genes containing HLR1 sequences (High Light Regulatory 1) were shown to be controlled by NblS in *Synechocystis* (Kappell *et al.*, 2006). Subsequently, it was determined that RpaB proteins from both *S. elongatus* and *Synechocystis* bind to HLR1 sequences (Kappell and van Waasbergen, 2007; Seki *et al.*, 2007; Hanaoka and Tanaka, 2008; Seino *et al.*, 2009). In addition, reports of failed attempts to inactivate *nblS* in *S. elongatus* (van Waasbergen *et al.*, 2002;

Kappell *et al.*, 2006), and *rpaB* in *Synechocystis* (Ashby and Mullineaux, 1999) suggested that these two proteins might comprise a TCS essential for cell viability, but no direct proof of RpaB–NblS interaction was provided. On the other hand, genome-wide analysis of cold and hyperosmotic stress-inducible genes suggested that at least two different RRs, Rre26/RpaB and Rre31/RpaA, transduce stress signals in *Synechocystis* (Murata and Los, 2006). However, RpaA does not bind to HLR1 sequences (Kappell and van Waasbergen, 2007) and it turned out to be the cognate RR of SasA, which is involved in circadian cycle regulation (Takai *et al.*, 2006).

In this work we have established that the HK NblS and two RRs with a common evolutionary origin, RpaB (Synpcc7942_1453) and SrrA (Synpcc7942_2416), constitute a branched pathway in which the similarities between the two RRs extend to their output DNA binding domains, thus providing additional opportunities for overlap in their regulatory functions. Remarkably, the NblS system is also unique in that one of the phosphorylation pathways is essential for survival, since *in vivo* phosphorylation of RpaB is required for cell viability and SrrA over production could not substitute for RpaB in regulation of essential gene targets. Paradoxically, *in vitro* assays indicate that SrrA is preferentially phosphorylated by NblS, raising the question of how interference of SrrA with the essential RpaB phosphorylation pathway is avoided. We provide evidence for environmental insulation of the RpaB pathway by means of RpaB-dependent repression of *srrA* under low light (LL) conditions. The fact that expression of *srrA* and other HL inducible genes can be down regulated by over expression of RpaB or SrrA also suggests cooperation between pathways under environmental conditions in which both RRs are present. In summary, the results reported here contribute to the repertoire of regulatory mechanisms used by TCSs to adapt to the changing environment and call attention to the importance of branched TCSs in cyanobacteria.

Results

Two paralogue RRs, RpaB and SrrA, specifically interact with the HK NblS

To search for cognate partners of NblS, we used the web accessible tool for prediction of kinase/regulator interactions (<http://www.swissregulon.unibas.ch/cgi-bin/TCS.pl>) developed by Burger and van Nimwegen (Burger & van Nimwegen, 2008) and based on Bayesian network methods applied to multiple sequence alignment of genomes. According to this method, RpaB is the highest probable NblS RR partner (81% probability), with SrrA as the second best candidate (18% probability). A CheY-like RR (Synpcc7942_0856) was predicted with extremely low

probability (2×10^{-5} %). Interestingly, RpaB and SrrA are both members of the large OmpR/PhoB family of RRs and show a high degree of similarity between them (61% identity). This resemblance and the phylogenetic distribution of *rpaB* and *srrA* genes agree with *srrA* originating from duplication of *rpaB* in a *S. elongatus* ancestor. The *srrA* gene is restricted to species branching with *S. elongatus* (Fig. S1), while *rpaB* is found in all available cyanobacterial genomes.

Previously we used yeast two-hybrid approaches to detect specific interactions between cognate two-component proteins (Martinez-Argudo *et al.*, 2001). Since attempts to retrieve the cognate RR(s) of NblS by screening *S. elongatus* yeast two-hybrid libraries with a truncated NblS derivative as bait (NblS²⁷²⁻⁶⁶⁴) were unsuccessful (Espinosa *et al.*, 2006), we made additional constructs to verify and further investigate the specificity and determinants of yeast two-hybrid interactions with RpaB and SrrA. The SMART (Letunic *et al.*, 2009) and ΔG predictor (Hessa *et al.*, 2007) programs indicate that NblS is a transmembrane protein with the cytoplasmic portion containing HAMP and PAS domains preceding the conserved HisKA and HATPase_c catalytic domains. For yeast two-hybrid assays we made fusion proteins of GAL4AD and GAL4BD domains to RpaB, SrrA, RpaA and additional NblS derivatives. These included full-length NblS (NblS¹⁻⁶⁶⁴) and subsequently smaller truncated derivatives (NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴, NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴, NblS²⁷²⁻⁶⁶⁴, NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴) containing at least the conserved HisKA and HATPase domains. C-terminal deletion derivatives NblS¹⁻²¹⁹ and NblS¹⁻²⁶⁴ were also used as negative controls. The NblS fragments present in the yeast two-hybrid fusion proteins are schematically represented in Fig. 1A (left), alongside a table with a summary of the interaction signals (Fig. 1A right) and a representative YTH assay (Fig. 1B).

In agreement with the *in silico* predictions, only RpaB and SrrA interacted with NblS derivatives. The interactions were specific, since none of these proteins gave signals with other HKs or RRs used as controls. Interestingly, only full-length NblS and the derivative retaining the HAMP region (NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴) interacted with both RpaB and SrrA, while the shorter fragments, NblS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ and NblS²⁷²⁻⁶⁶⁴ gave interaction signals with SrrA. Control C-terminal deletion derivatives NblS¹⁻²¹⁹ and NblS¹⁻²⁶⁴ did not interact with either RR. The fact that NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ gave no interaction with the RRs may be due to occlusion of the HisKA domain by the immediately adjacent N-terminal GAL4 domains. Taken together, the results support the specificity of interactions between NblS and RpaB or SrrA and suggest that, in addition to the main RR–HK interaction determinants located in the HisKA domain of the transmitter module, the HAMP–PAS region of NblS specifically contributes to RpaB recognition or binding affinity.

Autophosphorylation activity of truncated NblS proteins

Affinity-tagged (N-terminal 6His) versions of the truncated proteins NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ and NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ were generated for *in vitro* studies. Most of the recombinant NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ protein was expressed in a soluble form, while NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ could be solubilized from the pellet with low amounts (2 M) of urea, suggesting that it formed weak aggregates rather than inclusion bodies. Attempts to produce intermediary constructs with truncations that extended further into the HAMP and PAS domains were not successful, generating insoluble and/or inactive proteins (data not shown).

We first evaluated the autophosphorylation activity of the two NblS forms using [γ -³²P]-ATP. Time-dependent autophosphorylation assays of NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ and NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ showed similar profiles (Fig. 2A and B), suggesting that the presence of HAMP and PAS domains did not significantly affect the autophosphorylation activity of NblS. Similar results were obtained after N-terminal affinity tag removal by TEV protease treatment of the same proteins (data not shown). Finally, we analyzed the kinetics for the NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ autophosphorylation reaction, which displayed K_m (ATP) and k_{cat} values of 375 μ M and 0.0016 min^{-1} respectively (Fig. 2C). Comparison with the kinetic parameters reported for several HKs (Marina *et al.*, 2001; Noriega *et al.*, 2008; Gutu *et al.*, 2010), including the structural homolog Walk, which has a K_m (ATP) of 42 μ M and a k_{cat} of 0.084 min^{-1} (Gutu *et al.*, 2010), indicates that NblS has a low catalytic activity.

RpaB and SrrA are phosphorylated *in vitro* by NblS with different preferences; contributions of the HAMP and PAS domains to phosphatase activity

To characterize the NblS signalling pathway *in vitro*, we produced 6His affinity-tagged versions of RpaB and SrrA and of their receiver domains (RpaB¹⁻¹²³ and SrrA¹⁻¹³⁰), which include the complete catalytic machinery. The receiver domain of RpaA (RpaA¹⁻¹²²) was similarly produced. Because preparations of full-length versions, particularly RpaB, presented reduced solubility and yielded high batch to batch discrepancies in purity and activity, only results obtained with the receiver domains are reported here.

To evaluate phosphotransfer activity, NblS derivatives were autophosphorylated with [γ -³²P]-ATP for 1 h and free ATP was removed by size exclusion chromatography prior to independent addition of RpaB¹⁻¹²³, SrrA¹⁻¹³⁰ and RpaA¹⁻¹²². In close agreement with our *in silico* and yeast two-hybrid data, dephosphorylation of the two P–NblS derivatives was associated with detection of the phosphorylated forms of RpaB and SrrA, but not of RpaA (Fig. 2D). The increase in P–RpaB and P–SrrA paralleled the decrease of P–NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ during the 15 min of the assay

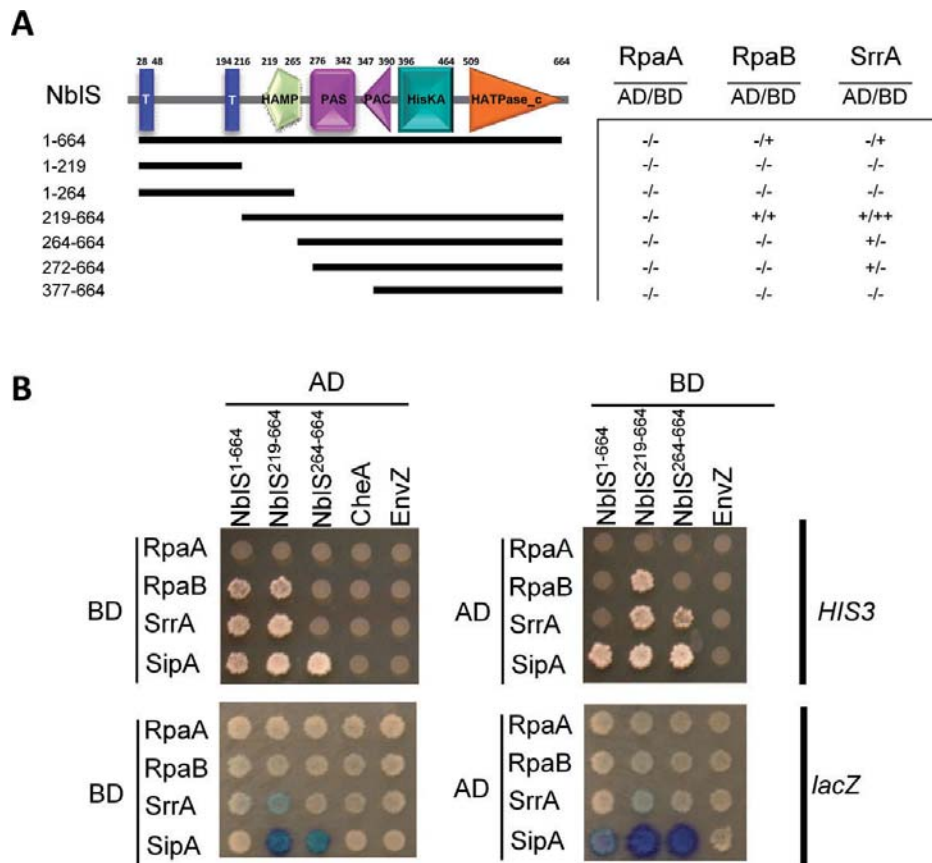


Fig. 1. Interactions between NbIS and RRs, domain determinants.

A. (Left) Schematic representation of NbIS domain organization according to the SMART and ΔG predictor programs with indication of protein fragments generated for YTH and *in vitro* analysis. (Right) Summary of relevant interactions. Symbols represent the strength of the interaction (as described in Burillo *et al.*, 2004).

B. Growth conferred by fusion proteins on histidine-deficient media (top panels) and *lacZ* activity recorded after Xgal assays carried out on diploid control media (bottom panels). Fusions to GAL4AD (AD) and GAL4BD (BD) are indicated. SipA fusion proteins were used as positive interaction controls. Pictures were taken after 4 days growth and 5 h of incubation with Xgal.

(Fig. 2D, right panel). In contrast, the reduction in the level of P-NbIS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ did not correlate with the increase of either P-RpaB or P-SrrA (Fig. 2D, left panel). Both RRs reached a maximum phosphorylation level in ~1 min that declined in the reaction time-course. Simultaneously with the decrease of the P-RR signal (Fig. 2D), NbIS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ phosphotransfer activity quickly decayed (Fig. 2E), suggesting the presence of NbIS phosphatase activity which would be in equilibrium with the phosphotransfer activity as a result of P-RR accumulation. SrrA seems to be a better phosphoacceptor than RpaB for NbIS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ and, especially for NbIS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ (Fig. 2D). In summary, the results indicate that phosphotransfer rates were low in compar-

son with other TCSs (Skerker *et al.*, 2005) and that the HAMP and/or PAS domains of NbIS affect phosphotransfer and are essential for phosphatase activities.

P-RpaB and P-SrrA are very stable but can be dephosphorylated by NbIS in a nucleotide-dependent manner

To determine the intrinsic stability of P-RpaB and P-SrrA, RpaB¹⁻¹²³ and SrrA¹⁻¹³⁰ were phosphorylated using the small phosphodonor [³²P] acetyl phosphate. After removing the free acetyl phosphate by gel filtration chromatography, the relative intensities of P-RpaB and P-SrrA

labelled bands were determined (Fig. 2F), giving half-lives ($t_{1/2}$ values) of 11.5 and 30.5 h respectively.

When P-RpaB¹⁻¹²³ and P-SrrA¹⁻¹³⁰ were incubated with ADP (data not shown) or with equimolar amounts of NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ and NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ (compare control and +NblS lanes in Fig. 2G), the stability of P-RpaB or P-SrrA was not affected. However, ADP promoted NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ (but not NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴) mediated dephosphorylation of both P-RRs (compare -ADP and +ADP lanes in Fig. 2G) with rather similar kinetics (approximately 35 and approximately 20% of each P-RR is detected after 5 and 15 min of incubation with NblS), confirming the requirement of the HAMP-PAS region for NblS phosphatase activity and the reported effect of ADP on certain HKs (Zhu *et al.*, 2000; Jagadeesan *et al.*, 2009).

NblS has preference for SrrA versus RpaB in the phosphotransfer but not in the phosphatase reaction

To investigate the preference of NblS phosphotransfer, NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ and NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ were autophosphorylated as above, incubated with different molar ratios of RpaB¹⁻¹²³ and SrrA¹⁻¹³⁰ and the reaction allowed to proceed for 2 min (Fig. 3A). P-SrrA¹⁻¹³⁰ was the most abundant phosphorylated protein, observed even with a RpaB/SrrA ratio of 9:1. P-RpaB¹⁻¹²³ could only be detected when the phosphatase-deficient NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ protein was used and there was at least as much RpaB as SrrA. This preference of NblS towards SrrA¹⁻¹³⁰ was further confirmed with NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ in a time-course reaction. P-NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ was incubated with equimolar amounts of both RpaB¹⁻¹²³ and SrrA¹⁻¹³⁰ and samples taken at different intervals, up to 30 min (Fig. 3B). P-SrrA¹⁻¹³⁰ was already detectable after 30 s and reached the steady-state after 10 min of reaction, while P-RpaB¹⁻¹²³ needed 2 min for detection and increased with different kinetics. In the same time-course, phosphorylation of RpaB¹⁻¹²³ amounted to approximately 12–17% of P-SrrA¹⁻¹³⁰, thus confirming the phosphotransfer preference of NblS for SrrA.

To investigate the preference for the RRs in the NblS-dependent dephosphorylation reaction, competition assays were performed with NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴. RpaB¹⁻¹²³ and SrrA¹⁻¹³⁰ were phosphorylated with [³²P] acetyl phosphate and mixed in equimolar amounts with sub-stoichiometric amounts of NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ in the presence of ADP. As shown in Fig. 3C, ADP-NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ induced dephosphorylation of P-RpaB¹⁻¹²³ and P-SrrA¹⁻¹³⁰ with similar rates, showing no greater preference for P-SrrA¹⁻¹³⁰ than for P-RpaB¹⁻¹²³.

Only the RpaB branch of the NblS signalling pathway is essential for cell viability in S. elongatus

Reports of failed attempts to inactivate *nblS* or *rpaB* in *S. elongatus* (van Waasbergen *et al.*, 2002; Kappell

et al., 2006), suggested that the corresponding proteins may be essential. To further investigate the essentiality of the NblS system, we first tried to independently inactivate *nblS*, *rpaB* and *srrA* using different marker cassettes and routine procedures for allelic replacement (Figs S2–S4). Wild-type *nblS* or *rpaB* alleles persisted in all transformant clones, supporting previous inferences regarding the essential nature of these genes (Figs S2 and S3). In contrast, complete segregation of *srrA* null alleles from transformant clones was readily achieved (Fig. S4), a result confirming that *srrA* is not essential for cell viability under laboratory conditions (Anandan *et al.*, 1996).

To further confirm that the NblS-RpaB signalling pathway is essential, we introduced an extra copy of the *rpaB* gene into neutral site I under the control of a constitutive promoter present in the C.K1 cassette (Φ C.K1-*rpaB*). Since *rpaB* was readily inactivated in the presence of the ectopic gene fusion, we concluded that RpaB is indeed an essential RR.

Point mutations in key residues required for phosphotransfer confer lethality

To explore whether phosphorylation was required for the essential functions inferred for these proteins, we targeted key phosphorylation sites in both NblS and RpaB. We first constructed NblS variants with point mutations at the predicted site of phosphorylation (H407A) or at a key residue predicted to be required for ATP binding and autophosphorylation (N524A). The *nblS*^{H407A} mutation was linked to a marker cassette (C.S3) and introduced into *S. elongatus* by allelic replacement. After transformation, the Φ (*nblS*^{H407A}-C.S3) allele was detected in a few clones during early restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses but not after additional transfers onto streptomycin-containing plates (Fig. S5). Equivalent results were obtained when the same approach was used to generate the N524A substitution in NblS, that is, *nblS* could not be replaced with the Φ (*nblS*^{N524A}-C.S3) derivative. Instead, clones containing wild-type Φ (*nblS*-C.S3) were obtained in all cases, strongly suggesting that phosphorylation of NblS at H407 is essential for survival of *S. elongatus*.

Next we attempted to mutate the phosphoacceptor Asp and introduce *rpaB*^{D56A} or *rpaB*^{D56E} mutations into *S. elongatus*. Although it is highly unlikely that the corresponding proteins could be phosphorylated *in vivo*, it is possible that they may confer different phenotypes, since in some RRs, a large negatively charged residue at this position can partially mimic the effect of phosphorylation (Klose *et al.*, 1993; Siam and Marczynski, 2003). To infer with confidence that point mutations in *rpaB* could be efficiently introduced by homologous recombination into

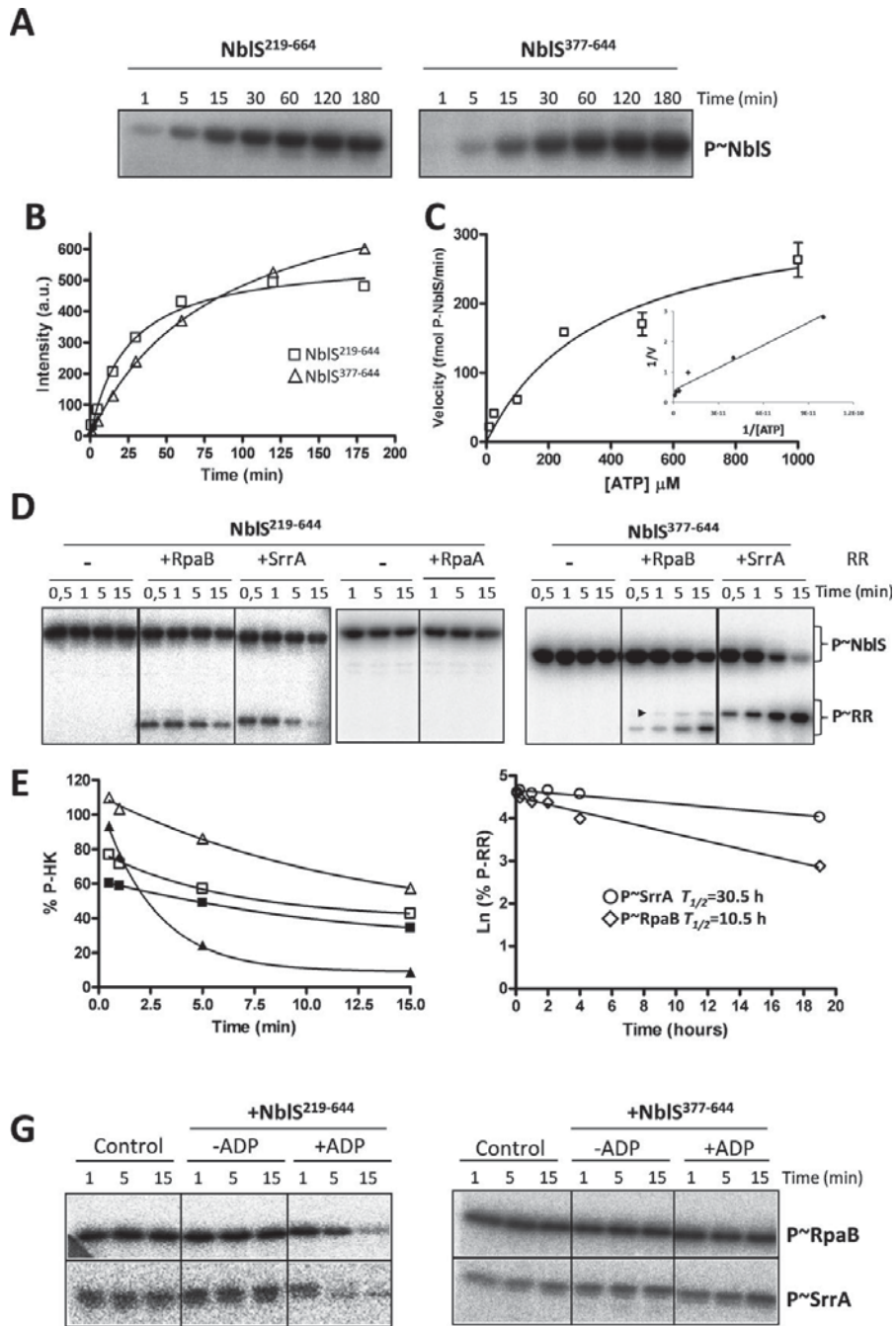


Fig. 2. *In vitro* characterization of autophosphorylation, phosphotransfer and phosphatase reactions of NblS, RpaB and SrrA TCS.

A. Autophosphorylation of NblS. Recombinant NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ (left) or NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ (right) (3.4 μ M) were incubated with [γ -³²P]-ATP (0.3 mM) and aliquots were withdrawn at the indicated time points, separated by SDS-PAGE, visualized by autoradiography and quantified by Phosphor-Imager. The values obtained for a representative experiment are plotted in B.

C. Curve of autophosphorylation reaction. Velocity versus [ATP] curve used to calculate K_m (ATP) and k_{cat} for NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ autophosphorylation. The inset represents Lineweaver–Burk plots of the corresponding reaction velocities as $1/V$ versus $1/ATP$.

D. NblS phosphotransfer reactions with partner candidate RRs. NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ (left) or NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ (right) were phosphorylated as above for 1 h, divided in aliquots and each RR was added in equimolar amounts (approximately 3.4 μ M) with the exception of RpaA that was only tested with NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴. The time-course of the phosphotransfer reaction was followed as in A. A phosphorylated contaminant band that migrates slightly slower than RpaB is observed in the gel and is indicated with a black arrowhead.

E. Plot of P–NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ (squares) and P–NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ (triangles) decay in the phosphotransfer reaction with RpaB (open symbols) or SrrA (closed symbols).

F. Stability of P–RR. RpaB and SrrA were phosphorylated with [³²P] acetyl phosphate and incubated for the indicated times at room temperature. The phosphorylated forms were evaluated by autoradiography and the Ln of average signal intensity of bands versus incubation time was plotted to calculate the half-lives.

G. NblS phosphatase activity of P–RpaB and P–SrrA. RpaB and SrrA were phosphorylated with [³²P] acetyl phosphate for 1 h and approximately 2.8 μ M P–RpaB or P–SrrA were incubated with 2.8 μ M NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ (left) or NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ (right) in the presence (+ADP) or absence (–ADP) of 1 mM ADP and the time-course of P–RR dephosphorylation was followed. Control indicates assays where NblS was omitted.

the genome, we also designed constructs to introduce a silent RFLP allele (*rpaB*^{AatII}, with an *AatII* site engineered at codons 56 and 57) adjacent to the marker cassette (Fig. S3) and compared results obtained with silent and non-silent mutations. While no Φ (C.S3–*rpaB*^{D56A}) or Φ (C.S3–*rpaB*^{D56E}) alleles were detected amongst hundreds of streptomycin-resistant transformants, 22 out of 30 clones from the control transformation carried Φ (C.S3–*rpaB*^{AatII}). We conclude that D56A and D56E substitutions in RpaB are lethal to *S. elongatus*.

To explore the possibility that the RpaB^{D56E} protein could be partially active and allow survival if the corresponding transcripts were expressed at higher levels from a constitutive promoter, we constructed a strain carrying Φ (C.K1–*rpaB*^{D56E}) at neutral site I and then tried to inactivate *rpaB* essentially as before. In three out of eight kanamycin and streptomycin-resistant clones where, according to RFLP analysis, Φ (C.K1–*rpaB*^{D56E}) alleles at neutral site I remained intact, the *rpaB*:C.S3 alleles were not fully segregated. Furthermore, the remaining clones, where complete *rpaB* inactivation was confirmed, had converted the Φ (C.K1–*rpaB*^{D56E}) allele to Φ (C.K1–*rpaB*). Thus, higher levels of the *rpaB*^{D56E} transcripts did not complement RpaB deficiency.

Derepression of *srrA* by HL and transcriptional control of the *RpaB* regulon

Visual inspection revealed the presence of HLR1 sequences just upstream of the *srrA* coding region (Fig. 4A), a location similar to that found in HL inducible promoters. To provide evidence for the functionality of these sequences, a 22 bp DNA fragment containing the HLR1 motifs of *srrA* (–52 to –30) was used as a probe in gel retardation assays. As expected, a shifted complex was observed in the presence of RpaB and the complex was dissociated when the unlabelled probe was

used as competitor (Fig. 4B). A control assay carried out with a *hliA* promoter fragment that included the HLR1 sequences (–61 to –31) required higher amounts of RpaB to generate a similar complex, suggesting higher affinity of RpaB for *srrA* than for *hliA* target sequences.

Next, we provided *in vivo* evidence of the functionality of HLR1 sequences upstream of *srrA* by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses in which we included the HL induced genes *hliA* and *nblA* as positive controls, and the *mpB* gene, expected to be constitutive, as a negative and loading control (Fig. 4C and D). The *sipA* gene, encoding the NblS auxiliary protein SipA was also included in the analyses in order to explore the possibility of its regulation by light. Consistent with reported expression patterns for HLR1-containing genes (Kappell and van Waasbergen, 2007; Seki *et al.*, 2007; Hanaoka and Tanaka, 2008; Seino *et al.*, 2009), *srrA* transcripts were hardly detectable from *S. elongatus* cultures grown under standard light conditions, but became very abundant upon transfer of cultures to HL. In agreement with the lack of an HLR1 motif, *sipA* transcripts did not change in the course of the experiment.

To further support the involvement of RpaB in *srrA* regulation we analyzed the effect of increasing *rpaB* expression on HLR1-regulated genes. To this end, a strain carrying the fusion Φ (C.K1–*rpaB*) was obtained and expression of selected genes was compared by RT-PCR under standard growth conditions. The increase in *rpaB* gene dosage resulted in a significant decrease in transcript levels of all the HL-regulated genes tested, including *srrA* (Fig. 4E and F), thus supporting the inferred repression of *srrA* by RpaB. Western analysis indicates that the CK1RpaBI strain contains just slightly increased levels of RpaB protein (data not shown), suggesting that posttranscriptional regulation prevents over accumulation of RpaB protein.

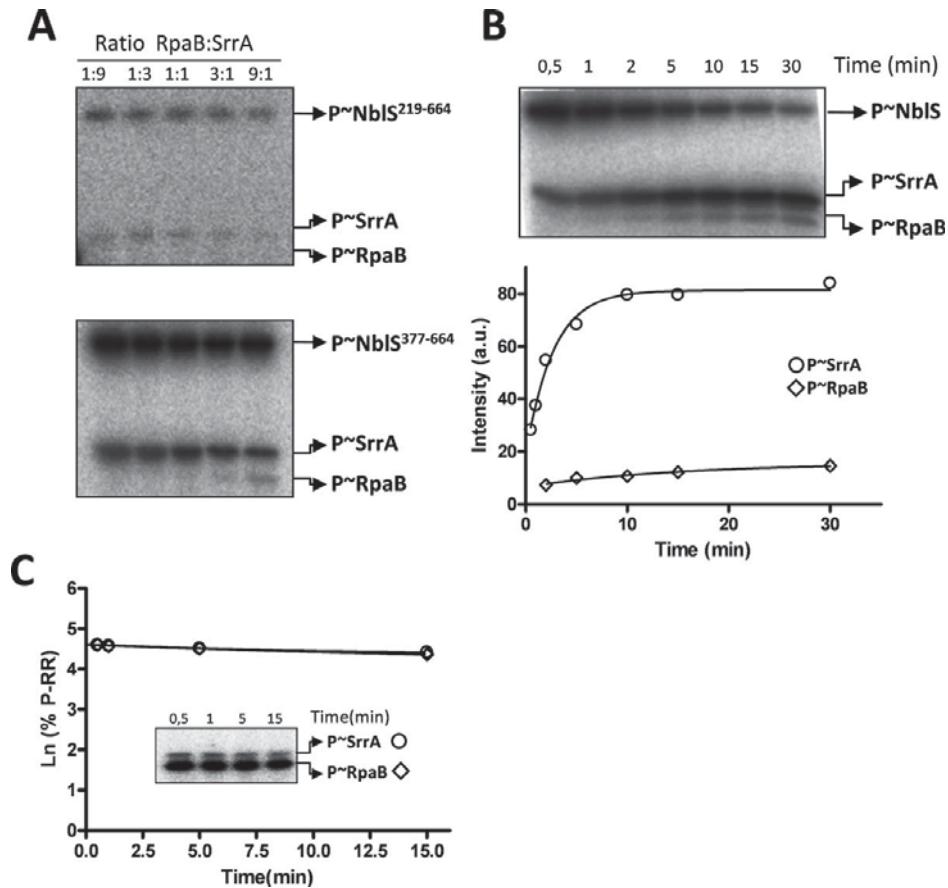


Fig. 3. NblS has preference for SrrA versus RpaB in the phosphotransfer but not in the phosphatase reaction. (A, B) NblS phosphotransfers preferentially to SrrA rather than RpaB. A. NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ (upper) or NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ (lower) were phosphorylated with [γ -³²P]-ATP (0.3 mM) for 30 min and independent aliquots were incubated with different molar ratios of RpaB : SrrA. The phosphotransfer reactions were carried out for 2 min and phosphorylated species, indicated by arrows and labelled, were visualized by autoradiography after SDS-PAGE. B. NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ was phosphorylated as in A and mixed with equimolar amounts of RpaB and SrrA (final concentration of RR is two times the concentration of HK) and the time-course of the phosphotransfer reaction was followed by autoradiography (upper panel) and the bands corresponding to the P-RR (indicated by arrows and labelled) were quantified and plotted (lower panel). C. NblS does not exhibit a preference for either P-RpaB or P-SrrA in the phosphatase reaction. RpaB and SrrA were phosphorylated with [³²P] acetyl phosphate and incubated with NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ in 1/10 relationship (RR/NblS) in the presence of 1 mM ADP. Time-course of P-RR dephosphorylation induced by NblS was monitored by autoradiography (inset), P-RRs were quantified and represented as the Ln of average signal intensity of bands versus incubation time.

The structure of the RR PhoB in complex with its DNA targets has identified four positions that would confer DNA binding specificity (Blanco *et al.*, 2002). RpaB and SrrA both contain the same residues at these positions (Fig. S6), thus raising the question of whether SrrA can also regulate RpaB target genes. To explore this issue, a strain expressing higher levels of *srrA* transcripts, CK1SrrAI, was constructed using the same approach

used for *rpaB* and analyzed in parallel with relevant control strains under standard culture conditions. Interestingly, the Φ (C.K1-*srrA*) construct also had a negative impact on the transcript levels from the HLR1-controlled genes *hliA* and *nblA*, although less pronounced than the observed with Φ (C.K1-*rpaB*) (Fig. 4E and F). The apparently healthy phenotype of *S. elongatus* carrying Φ (C.K1-*srrA*) suggests that increasing the levels of *srrA*

transcripts is not enough to compromise RpaB phosphorylation. In addition, we can not exclude that *srrA* is also postranscriptionally regulated.

The similarities between RpaB and SrrA and the low level of expression of *srrA* under LL (standard growth conditions) made us question whether increased *srrA* expression from a constitutive promoter could substitute for RpaB essential functions. To explore this issue, *S. elongatus* was transformed with *rpaB*::C.S3 and Φ (C.K1-*srrA*) constructs (Figs S3 and S4), and multiple clones corresponding to double transformants (kanamycin- and streptomycin-resistant) were analysed by PCR. However, complete segregation of the *rpaB*::C.S3 alleles could not be detected after several transfers onto selective media (data not shown), suggesting that SrrA can not regulate essential RpaB target genes.

Discussion

Given the transient nature of most signals regulating TCSs, the great majority of HKs and RRs are not required for survival of laboratory cultures. However, we have shown that phosphorylation of both NblS and RpaB are essential for cell viability and thus these two proteins conform to an essential TCS, or rather the essential branch of a more complex TCS. In the few cases of TCSs where only the RR is essential (Winkler and Hoch, 2008), acetyl phosphate appears to substitute for the HK (Wolfe, 2010). The fact we were not able to obtain viable cultures of *S. elongatus* when NblS was inactivated or replaced with non-phosphorylatable substitutions agrees with the apparent absence of *pta* genes (encoding phosphotransacetylase) in this cyanobacterium.

A paradigm for essential TCSs is provided by YycGF, WalkR or VicKR, which are involved in cell-wall metabolism in low G + C Gram-positive bacteria (Dubrac *et al.*, 2008). Interestingly, the structural organization of these essential HKs is remarkably similar, with N-terminally anchored membrane regions and HAMP and PAS domains preceding the HisKA and HATPase_c domains. With the exception of NblS, this particular domain organization has not been found in other cyanobacterial HKs (Ashby and Houmard, 2006). It has been proposed that YycG activity is triggered by detection of the levels of available Lipid II in the extracytoplasmic compartment (Dubrac *et al.*, 2008). Given the involvement of NblS in detection of changes in membrane fluidity associated with stress conditions such as chilling, osmotic and salt stress (Murata and Los, 2006), it is tempting to propose that NblS could detect signals emanating from membrane activity.

In response to unknown signals, non-essential auxiliary proteins interact with the HKs YycG and NblS to modulate their activity. In the former system they are membrane anchored and have a negative role (Szurmant *et al.*, 2007;

Szurmant *et al.*, 2008), while the auxiliary protein SipA stimulates autophosphorylation by interacting with the HATPase_c domain of NblS. This stimulatory role is consistent with the slow autophosphorylation and phosphotransfer rates of NblS proteins observed *in vitro* (Fig. 2).

Sequence analysis of RpaB and SrrA receiver domains guided by the structures of HK853/RR468 and ThkA/TrrA complexes from *Thermotoga maritima* (Casino *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 2009) allows prediction of RR residues likely to interact with NblS (Fig. S6) and can be used to rationalize the results reported here. Current data indicate that HK-RR recognition is mediated mainly by the interaction of the HK HisKA domain with the α 1-helix and the three loops (L3, L4 and L5) surrounding the Asp phosphoacceptor in the RR. In spite of the high degree of identity between the receiver domains of RpaB and SrrA (73%), four out of the seven residues in the α 1-helix, that are predicted to interact with NblS, differ between them (three conservative substitutions and the change of RpaB Thr23 for SrrA Met31). These substitutions may explain the differences between the two RRs found in our interaction and phosphotransfer analyses. Since NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ showed a higher phosphotransfer rate than NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ for both RRs, interactions of the PAS and/or HAMP domains with the RRs may occur during the phosphotransfer reaction. However, the higher preference of both NblS derivatives for SrrA suggests that contacts with PAS and/or HAMP domains are related to the formation of a productive HK-RR complex rather than discriminating between the RRs.

In the ThkA-TrrA complex the PAS domain of ThkA interacts with the α 4-helix of TrrA. The fact that residues of α 4 in RpaB and SrrA are quasi-identical (only a Glu/Asp conservative change) agrees with the similar susceptibility of the two RRs for NblS phosphatase activity. The strict PAS domain requirement for the phosphatase activity supports the current vision that both reactions are not the reverse of each other (Gao and Stock, 2009) and agrees with recent reports on YycG and ThkA (Yamada *et al.*, 2009; Gutu *et al.*, 2010). The gain of function mutation G379D (within the PAS domain) in the *nblS-1* strain (van Waasbergen *et al.*, 2002) further supports the regulatory importance of the PAS domain.

The strong preference of NblS to phosphorylate SrrA and the importance of the NblS to RpaB phosphorylation branch for culture viability can be reconciled with the presence of a negative regulatory circuit working at two different levels. SrrA protein would interfere with NblS-mediated phosphorylation of RpaB, while RpaB-P would be involved in transcriptional down regulation of the *srrA* gene. Environmental cues would impact on this circuit to switch between two gene expression programs, one that is implemented exclusively by RpaB and a second, triggered by RpaB dephosphorylation, that requires both

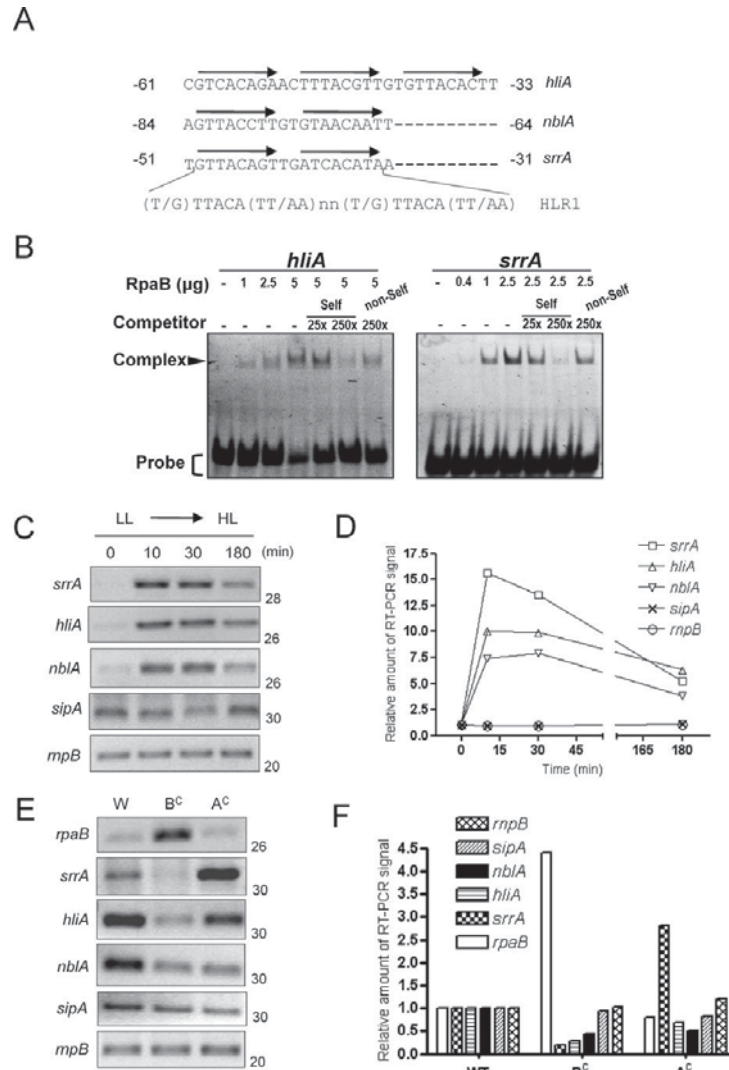


Fig. 4. Analysis of HLR1 sequences and HL inducible transcripts.

A. Alignment of putative HLR1 sequences upstream of *srrA* with those of *hliA* and *nblA* indicating positions relative to the start codon. Arrows indicate each repeating unit within the HLR1 motif. A consensus sequence is shown underneath.

B. Competitive gel mobility shift assay to detect specific RpaB binding to HLR1 motifs. Fluorescein labelled DNA fragments (50 fmol) containing the HLR1 motifs of *srrA* or *hliA* were incubated with increasing amounts of full-length RpaB in the presence or absence of either the same unlabelled competitor probe (self) or an unlabelled non-specific competitor fragment (non-self) at the indicated molar fold excesses.

C. Expression levels of *srrA*, *hliA*, *nblA* and *sipA* during HL stress. RT-PCR assays were carried out with wild-type *S. elongatus* grown under LL conditions (lane 0), then shifted to HL conditions to further extract RNA at indicated time points in minutes (lanes 10, 30 and 180).

D. Quantification of the band intensity of transcript in RT-PCR of C by ImageJ software. Values are presented relative to that in LL-grown cells.

E. Expression levels of *rpaB*, *srrA*, *hliA*, *nblA* and *sipA* in over expression strains. RT-PCR assays from WTK (wild-type control, lane W), CK1RpaBI (lane B^c) and CK1SrrAI (lane A^c) strains grown under standard light.

F. Quantification of the band intensity of transcripts in the RT-PCR of E by ImageJ software. Values are presented relative to that in wild-type strain. In C and E a representative experiment from one of two independent RNA extractions is shown and *mpB* is used as a loading control. Amplification cycles used on PCR reactions are indicated at the right of each picture.

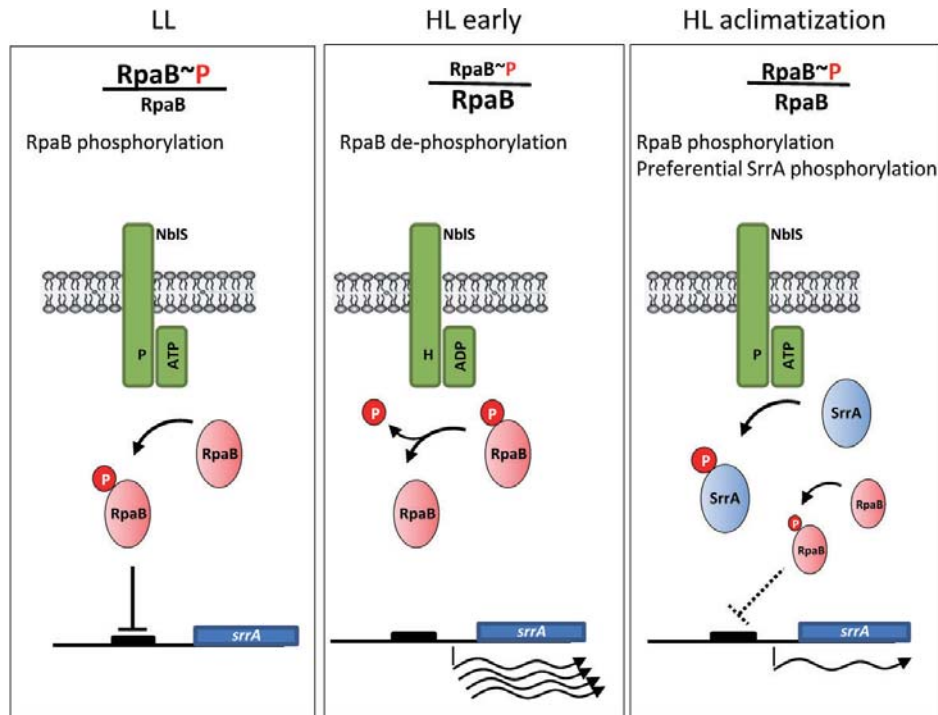


Fig. 5. Model for light acclimatization in the branched NbIS system. Only regulatory interactions between the two RRs and the HL inducible *srrA* gene are illustrated. Left panel, under LL RpaB (pink ovals) is phosphorylated by NbIS and *srrA* gene expression repressed by RpaB-P. The RpaB-P/RpaB ratio is high. Central panel, upon HL exposure NbIS is transiently switched to the phosphatase conformation, leading to RpaB dephosphorylation and subsequent derepression of *srrA*. The RpaB-P/RpaB ratio is low. Right panel, NbIS regains kinase activity (mechanism unknown) in spite of HL persistence. The phosphotransfer preference, that results in SrrA (blue ovals) interference with RpaB phosphorylation, is counterbalanced by RpaB-mediated down regulation of the *srrA* gene. The RpaB-P/RpaB ratio would reach equilibrium at intermediate levels. Lines with blunted ends indicate a negative effect on gene expression, which is smaller when the line is dashed. Waved arrows indicate *srrA* transcripts. Black blocks represent repressible HLR1 sites. Although RpaB protein levels would remain constant, RpaB is represented smaller than SrrA in the right panel to emphasize competition for NbIS phosphorylation.

RpaB and SrrA. The key contributions of this work to the function of NbIS in the context of HL acclimatization are incorporated in Fig. 5. A common feature with the precedent model, supported from work on different laboratories (see Hanaoka & Tanaka, 2008 for an extended discussion), is the induction of RpaB dephosphorylation upon transfer of cultures to HL.

During standard growth conditions, simplified here as LL, NbIS phosphorylates RpaB, which in turn would regulate (positively and/or negatively) unknown essential target genes as well as repress 'HL stress genes', including *hliA*, *nbIA* and *srrA*. This latter repression would prevent interference of SrrA with the RpaB phosphorylation branch. Since the SrrA-P : RpaB-P ratio would be very low, RpaB-P would be the main controller of the HLR1 regulon. In the context of the NbIS pathway, this

situation can be referred as pathway insulation for the essential RpaB branch.

Upon exposure to HL, RpaB-P would be rapidly dephosphorylated, resulting in derepression of 'stress genes' *hliA*, *nbIA* and *srrA*. Because of the essential role inferred for NbIS-dependent phosphorylation of RpaB, we presume that RpaB dephosphorylation is a transient event, during which SrrA would be synthesized and preferentially phosphorylated by NbIS to the detriment of RpaB-P levels, thus amplifying the stress signal.

During HL stress SrrA would implement stress-specific programs to adapt the photosynthesis machinery to HL and down regulate previously derepressed genes. Two independent lines of evidence support the idea that SrrA represses at least some RpaB targets during prolonged HL stress: the RpaB-independent downregulation of *hliA*

(Hanaoka and Tanaka, 2008) and the faster bleaching of SrrA-deficient strains (data not shown), which agrees with the negative impact that increased *srrA* gene dosage has on *nblA* transcript levels (Fig. 4). In addition, mechanisms to prevent the RpaB-P : RpaB ratio from reaching irreversibly low levels and compromise cell viability must be operative during prolonged HL stress, amongst them down regulation of *srrA* gene expression. During prolonged stress, the SrrA-P : RpaB-P ratio and the relative affinity of each of the RRs for their respective gene targets would determine the expression pattern of the partially overlapping RpaB and SrrA regulons and lead to implementation of specific programs for photosynthesis acclimatization and survival.

Branched pathways with multiple HKs phosphorylating a RR (many-to-one) or one HK phosphorylating multiple RRs (one-to-many) emphasize the complexity of interactions involving two-component regulators. So far, known examples of one-to-many pathways are from systems where regulators display atypical domain organization or are part of phosphorelays (Laub and Goulian, 2007). The paradigmatic TCS for chemotaxis is also a branched system where the HK (CheA) presents a non-orthodox domain organization and the two RRs (CheY and CheB) differ in structural organization and cellular functions (Kirby, 2009). In contrast, in the NblS system, the HK displays an orthodox HisKA/HATPase domain arrangement and the RRs (RpaB and SrrA) are paralagous proteins with the same domain organization suited for transcriptional regulation, a feature that increases the potential for complex regulatory interactions.

The interplay of negative regulatory interactions between RpaB and SrrA is reminiscent of the classic lysis-lysogen switch of phage λ in which the two related regulators CI and Cro repress each others genes (Oppenheim *et al.*, 2005), and of the recently reported SinR-SlrR switch for cell separation in *Bacillus subtilis* (Chai *et al.*, 2010) where protein-protein, as well as DNA-protein interactions take place. In the NblS system interactions take place at the level of DNA-protein interactions and at the level of protein activity, by means of the inferred competition between the phosphorylation branches of the NblS system.

In summary, the NblS system provides a paradigm for a branched TCS made up of orthodox HK and RR components, where multiple regulatory interactions between closely related RRs take place to ensure acclimatization and survival. Under non-stress conditions these interactions result in pathway insulation of the essential RpaB branch, while stress lead to a dynamic situation where both pathways are operative. Further work aiming to identify relationships amongst orphan HKs and RRs is required to understand the regulatory potential of branched TCSs.

Experimental procedures

Strains, plasmids and oligonucleotides

Cloning procedures were carried out with *Escherichia coli* DH5 α . See Table S1 for relevant genotypes of strains, Tables S2–S4 for plasmids and Table S5 for primers.

Molecular genetic techniques, culture conditions and protein purification

Synechococcus elongatus strains were routinely grown photoautotrophically at 30°C while shaking under constant illumination (50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provided by cool white fluorescent lights (denoted as standard light or LL conditions). The level of HL was 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (provided by SON-T PIA PLUS Philips bulbs). Photon flux densities were measured with LI-250 quantum-meter (LI-COR Bioscience). Media used was BG11 (BG11_o plus 17.5 mM NaNO₃ and 10 mM HEPES/NaOH pH 7.8). For growth on plates, the medium was solidified by addition of 1% (w/v) agar. Plates were incubated at 30°C under constant illumination. *S. elongatus* strains were transformed as described (Golden and Sherman, 1984), incubated for 48 h at 30°C under illumination on nitro-cellulose filters (Millipore), and transformants were selected on kanamycin, chloramphenicol or streptomycin-containing BG11 plates. Antibiotics concentrations used for *S. elongatus* were 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (kanamycin), 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (chloramphenicol and streptomycin) and 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (ampicillin).

Yeast culture and transformation procedures were as described (Ausubel *et al.*, 1999). To determine interaction patterns amongst selected proteins, expression from the three reporters present in PJ696/Y187 diploids was determined as previously described (Burillo *et al.*, 2004). Protein purification is described in the Experimental Procedures in *Supporting information*.

NblS autophosphorylation assays

NblS autophosphorylation were assayed at room temperature in kinase buffer (50 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT). Reaction mixtures generally contained 3.4 μM NblS and the reaction were initiated by the addition of 0.3 mM [γ -³²P]-ATP (1 Ci/mmol; Perkin Elmer). Aliquots of the reaction mixture were withdrawn at indicated times and mixed with 6 \times SDS-PAGE loading buffer. The phosphorylated species were separated by SDS-PAGE (17% polyacrylamide), the gels were dried and the radiolabelled bands were visualized and quantified using a Fluoro Image Analyzer FLA-5000 (Fuji Film) and the program Multi Gauge 2.1 (Fuji Film). To determinate autophosphorylation kinetic parameters NblS²¹⁹⁻⁶⁴⁴ was adjusted to 4 μM , the reactions were started by adding varying concentrations of ATP from 0.01 mM to 1 mM (specific activity ranking from 0.5 to 10 Ci/mmol) and samples were withdraw at 15, 30, 45, 60 and 90 s.

Phosphotransfer assays

For phosphotransfer reactions NblS was phosphorylated with [γ -³²P]-ATP at room temperature for 60 min and P-NblS was

purified by two consecutive steps of gel filtration using PD SpinTrap G-25 columns (GE Healthcare). Purified P-NblS (3.4 μM) was mixed with 3.4 μM of the corresponding RRs at RT for the indicated times. The reactions were quenched in 6 \times loading buffer and were loaded without heating in 17% polyacrylamide gels. Radiolabelled species were detected as above.

RR phosphorylation, P-RR stability and Phosphatase assays

[^{32}P] acetyl phosphate was enzymatically synthesized as reported (Jagadeesan *et al.*, 2009). To autophosphorylate RRs, [^{32}P] acetyl phosphate was added to 2.8 μM of response regulators in kinase buffer and the mixture was incubated for 60 min at RT. P-RR were purified using PD SpinTrap G-25 columns (GE Healthcare).

To determine the stability of the phosphoryl group on the response regulators, P-RR were incubated at RT and aliquots removed at the indicated times, quenched with 6 \times loading buffer and stored at -20°C . The samples were loaded without heating in SDS-PAGE, resolved as above and the phosphorylated species were quantified by phosphorimaging.

NblS-dependent RR dephosphorylation assays were carried out with 2.8 μM P-RR and 2.8 μM kinase at RT in kinase buffer, the reaction was quenched to different times with 6 \times sample buffer and analyzed as above.

Electrophoretic gel mobility shift assays

Probes containing *S. elongatus* *srrA* and *hliA* promoters (nucleotides -52 to -30 and -61 to -31 relative to the translation initiation site respectively) were prepared by annealing equimolar amounts of 5' fluorescein labelled complementary oligonucleotides SrrA-probe-Flc(+):SrrA-probe-Flc(-), and HliA-probe-Flc(+):HliA-probe-Flc(-) respectively.

Binding reactions were performed by mixing recombinant RpaB (from 13.3 to 166.6 pmol) with 50 fmol of fluorescein labelled probe and 1 μg of poly(dI-dC) in a final volume of 20 μl of binding buffer (20 mM HEPES, pH 8, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 0.1 mM EDTA, 5% glycerol and 1 mM dithiothreitol), at 4°C for 30 min. For competition assays, recombinant RpaB in binding buffer was preincubated with a 25- or 250-fold excess amount of unlabelled competitor DNA fragment at 4°C for 30 min. DNA-protein complexes were resolved on a native 6% polyacrylamide gel, run at 100 V and 4°C for approximately 1 h and visualized on the Fuji Film FLA3000 gel imaging system (Ex 473 nm; Y520 filter).

Construction and analysis of nblS, rpaB and srrA derivative strains

Strategies used for construction of *nblS*, *rpaB* and *srrA* derivative strains, and description of plasmids are provided in the Experimental Procedures, Table S2 and Figs S2–S5 in Supporting information.

RT-PCR analyses

Synechococcus elongatus cells were routinely grown until they reached mid-exponential phase ($\text{OD}_{750} \sim 0.5$) in LL conditions. For HL treatments the cultures were exposed to 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ white light and at the indicated times, 50 ml of aliquots were removed for RNA extractions. The samples were rapidly chilled on ice, centrifuged and pellets stored at -20°C . Total RNA was isolated using a hot phenol method and treated with DNase I (Turbo DNase, Ambion). After PCR verification that no contaminant DNA was present, 0.5 μg of total RNA was retrotranscribed in a total volume of 30 μl with RevertAid H Minus M-MuL V Reverse Transcriptase (Fermentas) using primers RnpB-R, RpaB7942-2R, SrrA-OV-1R, NewhliA-R, NblA-R and Sip1-BTH-R. Five microlitres of sample of retrotranscription reactions were subjected to different amplification cycles to optimize reactions, using Biotools DNA Polymerase (Biotools B&M Laboratories), with the following primer pairs: RpaB-BYTH-1F/RpaB7942-2R, SrrAD64A-F/SrrA-OV-1R, NewhliA-F/NewhliA-R, NblA-F/NblA-R, Sip1-BTH-F/Sip1-BTH-R and RnpB-F/RnpB-R.

Acknowledgements

This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación (Grants BFU2009-07371, BIO2009-10872 and Prometeo/2009/051) and Ministerio de Educación (PR2009-0378). Thanks to Sociedad de Relaciones Internacionales, Universidad de Alicante, for Felix Moronta's grant.

References

- Anandan, S., Nalty, M.S., Cogdell, D.E., and Golden, S.S. (1996) Identification of two classes of transcriptional regulator genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Arch Microbiol* **166**: 58–63.
- Ashby, M.K., and Houmar, J. (2006) Cyanobacterial two-component proteins: structure, diversity, distribution, and evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 472–509.
- Ashby, M.K., and Mullineaux, C.W. (1999) Cyanobacterial *ycf27* gene products regulate energy transfer from phycobilisomes to photosystems I and II. *FEMS Microbiol Lett* **181**: 253–260.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1999) *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*. New York, NY: Wiley.
- Bartsevich, V.V., and Shestakov, S.V. (1995) The *dspA* gene product of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 influences sensitivity to chemically different growth inhibitors and has amino acid similarity to histidine protein kinases. *Microbiology* **141** (Pt 11):2915–2920.
- Blanco, A.G., Sola, M., Gomis-Ruth, F.X., and Coll, M. (2002) Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure* **10**: 701–713.
- Burger, L., and van Nimwegen, E. (2008) Accurate prediction of protein-protein interactions from sequence alignments using a Bayesian method. *Mol Syst Biol* **4**: 165.

- Burillo, S., Luque, I., Fuentes, I., and Contreras, A. (2004) Interactions between the nitrogen signal transduction protein PII and N-acetyl glutamate kinase in organisms that perform oxygenic photosynthesis. *J Bacteriol* **186**: 3346–3354.
- Casino, P., Rubio, V., and Marina, A. (2009) Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell* **139**: 325–336.
- Chai, Y., Norman, T., Kolter, R., and Losick, R. (2010) An epigenetic switch governing daughter cell separation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **24**: 754–765.
- Dubrac, S., Bisicchia, P., Devine, K.M., and Msadek, T. (2008) A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalkR (YycGF) essential signal transduction pathway. *Mol Microbiol* **70**: 1307–1322.
- Espinosa, J., Fuentes, I., Burillo, S., Rodríguez-Mateos, F., and Contreras, A. (2006) SipA, a novel type of protein from *Synechococcus* sp. PCC 7942, binds to the kinase domain of NblS. *FEMS Microbiol Lett* **254**: 41–47.
- Galperin, M.Y. (2010) Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol* **13**: 150–159.
- Gao, R., and Stock, A.M. (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* **63**: 133–154.
- Gao, R., Mack, T.R., and Stock, A.M. (2007) Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem Sci* **32**: 225–234.
- Golden, S.S., and Sherman, L.A. (1984) Optimal conditions for genetic transformation of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *J Bacteriol* **158**: 36–42.
- Gutu, A.D., Wayne, K.J., Sham, L.T., and Winkler, M.E. (2010) Kinetic characterization of the WalRKSpn (VicRK) two-component system of *Streptococcus pneumoniae*: dependence of WalkSpn (VicK) phosphatase activity on its PAS domain. *J Bacteriol* **192**: 2346–2358.
- Hanaoka, M., and Tanaka, K. (2008) Dynamics of RpaB-promoter interaction during high light stress, revealed by chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant J* **56**: 327–335.
- Hessa, T., Meindl-Beinker, N.M., Bernsel, A., Kim, H., Sato, Y., Lerch-Bader, M., et al. (2007) Molecular code for transmembrane-helix recognition by the SecE1 translocon. *Nature* **450**: 1026–1030.
- Hsiao, H.Y., He, Q., Van Waasbergen, L.G., and Grossman, A.R. (2004) Control of photosynthetic and high-light-responsive genes by the histidine kinase DspA: negative and positive regulation and interactions between signal transduction pathways. *J Bacteriol* **186**: 3882–3888.
- Jagadeesan, S., Mann, P., Schink, C.W., and Higgs, P.I. (2009) A novel 'four-component' two-component signal transduction mechanism regulates developmental progression in *Myxococcus xanthus*. *J Biol Chem* **284**: 21435–21445.
- Kappell, A.D., and van Waasbergen, L.G. (2007) The response regulator RpaB binds the high light regulatory 1 sequence upstream of the high-light-inducible *hliB* gene from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Arch Microbiol* **187**: 337–342.
- Kappell, A.D., Bhaya, D., and van Waasbergen, L.G. (2006) Negative control of the high light-inducible *hliA* gene and implications for the activities of the NblS sensor kinase in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *Arch Microbiol* **186**: 403–413.
- Kato, H., Chibazakura, T., and Yoshikawa, H. (2008) NblR is a novel one-component response regulator in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**: 1072–1079.
- Kirby, J.R. (2009) Chemotaxis-like regulatory systems: unique roles in diverse bacteria. *Annu Rev Microbiol* **63**: 45–59.
- Klose, K.E., Weiss, D.S., and Kustu, S. (1993) Glutamate at the site of phosphorylation of nitrogen-regulatory protein NTRC mimics aspartyl-phosphate and activates the protein. *J Mol Biol* **232**: 67–78.
- Laub, M.T., and Goulian, M. (2007) Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet* **41**: 121–145.
- Letunic, I., Doerks, T., and Bork, P. (2009) SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* **37** (Database issue):D229–D232.
- Lopez-Redondo, M.L., Contreras, A., Marina, A., and Neira, J.L. (2010) The regulatory factor SipA is a highly stable beta-II class protein with a SH3 fold. *FEBS Lett* **584**: 989–994.
- Luque, I., Zabulon, G., Contreras, A., and Houmard, J. (2001) Convergence of two global transcriptional regulators on nitrogen induction of the stress-acclimation gene *nblA* in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol Microbiol* **41**: 937–947.
- Marina, A., Mott, C., Auyzenberg, A., Hendrickson, W.A., and Waldburger, C.D. (2001) Structural and mutational analysis of the PhoQ histidine kinase catalytic domain. Insight into the reaction mechanism. *J Biol Chem* **276**: 41182–41190.
- Marin, K., Suzuki, I., Yamaguchi, K., Ribbeck, K., Yamamoto, H., Kanesaki, Y., et al. (2003) Identification of histidine kinases that act as sensors in the perception of salt stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 9061–9066.
- Martinez-Argudo, I., Martin-Nieto, J., Salinas, P., Maldonado, R., Drummond, M., and Contreras, A. (2001) Two-hybrid analysis of domain interactions involving NtrB and NtrC two-component regulators. *Mol Microbiol* **40**: 169–178.
- Mikami, K., Kanesaki, Y., Suzuki, I., and Murata, N. (2002) The histidine kinase Hik33 perceives osmotic stress and cold stress in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Mol Microbiol* **46**: 905–915.
- Mitrophanov, A.Y., and Groisman, E.A. (2008) Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes Dev* **22**: 2601–2611.
- Murata, N., and Los, D.A. (2006) Histidine Kinase Hik33 is an important participant in cold-signal transduction in cyanobacteria. *Physiol Plant* **126**: 17–27.
- Noriega, C.E., Schmidt, R., Gray, M.J., Chen, L.L., and Stewart, V. (2008) Autophosphorylation and dephosphorylation by soluble forms of the nitrate-responsive sensors NarX and NarQ from *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **190**: 3869–3876.
- Oppenheim, A.B., Kobilier, O., Stavans, J., Court, D.L., and Adhya, S. (2005) Switches in bacteriophage lambda development. *Annu Rev Genet* **39**: 409–429.

- Ruiz, D., Salinas, P., Lopez-Redondo, M.L., Cayuela, M.L., Marina, A., and Contreras, A. (2008) Phosphorylation-independent activation of the atypical response regulator NblR. *Microbiology* **154**: 3002–3015.
- Sakayori, T., Shiraiwa, Y., and Suzuki, I. (2009) A *Synechocystis* homolog of SipA protein, Ssl3451, enhances the activity of the histidine kinase Hik33. *Plant Cell Physiol* **50**: 1439–1448.
- Salinas, P., Ruiz, D., Cantos, R., Lopez-Redondo, M.L., Marina, A., and Contreras, A. (2007) The regulatory factor SipA provides a link between NblS and NblR signal transduction pathways in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol Microbiol* **66**: 1607–1619.
- Schwarz, R., and Grossman, A.R. (1998) A response regulator of cyanobacteria integrates diverse environmental signals and is critical for survival under extreme conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11008–11013.
- Seino, Y., Takahashi, T., and Hihara, Y. (2009) The response regulator RpaB binds to the upstream element of photosystem I genes to work for positive regulation under low-light conditions in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *J Bacteriol* **191**: 1581–1586.
- Seki, A., Hanaoka, M., Akimoto, Y., Masuda, S., Iwasaki, H., and Tanaka, K. (2007) Induction of a group 2 sigma factor, RPOD3, by high light and the underlying mechanism in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Biol Chem* **282**: 36887–36894.
- Sendersky, E., Lahmi, R., Shaltiel, J., Perelman, A., and Schwarz, R. (2005) NblC, a novel component required for pigment degradation during starvation in *Synechococcus* PCC 7942. *Mol Microbiol* **58**: 659–668.
- Siam, R., and Marczyński, G.T. (2003) Glutamate at the phosphorylation site of response regulator CtrA provides essential activities without increasing DNA binding. *Nucleic Acids Res* **31**: 1775–1779.
- Skerker, J.M., Prasol, M.S., Perchuk, B.S., Biondi, E.G., and Laub, M.T. (2005) Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol* **3**: e334.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183–215.
- Suzuki, I., Los, D.A., Kanesaki, Y., Mikami, K., and Murata, N. (2000) The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis*. *EMBO J* **19**: 1327–1334.
- Szurmant, H., Mohan, M.A., Imus, P.M., and Hoch, J.A. (2007) YycH and YycI interact to regulate the essential YycFG two-component system in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **189**: 3280–3289.
- Szurmant, H., Bu, L., Brooks, C.L., 3rd, and Hoch, J.A. (2008) An essential sensor histidine kinase controlled by transmembrane helix interactions with its auxiliary proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 5891–5896.
- Takai, N., Nakajima, M., Oyama, T., Kito, R., Sugita, C., Sugita, M., et al. (2006) A KaiC-associating SasA-RpaA two-component regulatory system as a major circadian timing mediator in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 12109–12114.
- Tu, C.J., Shrager, J., Burnap, R.L., Postier, B.L., and Grossman, A.R. (2004) Consequences of a deletion in *dspA* on transcript accumulation in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *J Bacteriol* **186**: 3889–3902.
- van Waasbergen, L.G., Dolganov, N., and Grossman, A.R. (2002) *nblS*, a gene involved in controlling photosynthesis-related gene expression during high light and nutrient stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Bacteriol* **184**: 2481–2490.
- Winkler, M.E., and Hoch, J.A. (2008) Essentiality, bypass, and targeting of the YycFG (VicRK) two-component regulatory system in Gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **190**: 2645–2648.
- Wolfe, A.J. (2010) Physiologically relevant small phosphodors link metabolism to signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **13**: 204–209.
- Yamada, S., Sugimoto, H., Kobayashi, M., Ohno, A., Nakamura, H., and Shiro, Y. (2009) Structure of PAS-linked histidine kinase and the response regulator complex. *Structure* **17**: 1333–1344.
- Zhu, Y., Qin, L., Yoshida, T., and Inouye, M. (2000) Phosphatase activity of histidine kinase EnvZ without kinase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 7808–7813.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Supporting information

Environmental control of phosphorylation pathways in a branched two-component system.

Maria-Luisa López-Redondo², Felix Moronta¹, Paloma Salinas¹, Javier Espinosa¹, Raquel Cantos¹, Ray Dixon³, Alberto Marina^{2*} and Asunción Contreras^{1*}

¹División de Genética, Universidad de Alicante, Apartado 99, E-03080 Alicante, Spain

² Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC) and CIBERER, 46010 Valencia, Spain

³ John Innes Centre, NR4 7UH Norwich, UK

The first two authors contributed equally to this work

*Corresponding authors

TABLE OF CONTENTS:

- Supporting Tables

- **TABLE S1.** Strains used in this work
- **TABLE S2.** Plasmids for genetic manipulation of *S. elongatus*
- **TABLE S3.** Plasmids for over expression of proteins in *E. coli*
- **TABLE S4.** Plasmids for yeast two-hybrid assays
- **TABLE S5.** Oligonucleotides.

- Supporting Experimental Procedures

- Supporting Figures

- **Fig. S1.** RpaB and SrrA in Cyanobacteria.
- **Fig. S2.** Genetic inactivation of *nblS*.

- **Fig. S3.** Mutational analysis of *rpaB* in *S. elongatus*.
- **Fig. S4.** Mutational analysis of *srrA* in *S. elongatus*.
- **Fig. S5.** Generation and analysis of strains NblSCS3 and NblS^{H407A}CS3.
- **Fig. S6.** RpaB and SrrA sequence comparison.

- **Supporting References**

Table S1. Strains used in this work

Strain	Genotype or relevant characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i> DH5 α	F' ϕ 80 <i>lacZ</i> MAM15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (trc ⁺ mcr ⁺) <i>deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1 λ</i>	(Hanahan 1985)
<i>E. coli</i> GM119	F' <i>dam-3 dem-6 melB1 lacY1 galK2 galT22 tonA31 tsx-78 supE44 mlr-1 thi-1</i>	(Marinus and Morris 1973)
<i>E. coli</i> DHM1	F' <i>glnV44(AS) recA1 endA gyrA46 thi-1 hsdR17 spoT1 fhbD1 cyd-854</i>	(Karrimova et al. 2005)
<i>S. cerevisiae</i> Y187	MAT α <i>ura3-52 his3-200 ade2-101 trp1-901 leu2-3, 112 gal4 Δ mef gal80 Δ</i> <i>URA::GALL_{URS}-GALL_{TRP}-lacZ</i>	(Harper et al. 1993)
<i>S. cerevisiae</i> P1696	MAT α <i>ade2 Δ trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 cyh^R can^R gal4 Δ gal80 Δ me12</i> <i>GAL2::ADE2 GAL1::HIS3 GAL7::lacZ</i>	(James et al. 1996)
<i>S. elongatus</i>	Wild-type <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	Pasteur culture collection
<i>S. elongatus</i> WTK	C.K1 into NSI, Km ^r	(Espinosa et al. 2010)
<i>S. elongatus</i> StrAS(-)	StrA, <i>srrA::C.S3</i> , Smt ^r	This work
<i>S. elongatus</i> CK1StrAI	StrA (Con); Φ (C.K1-StrA) NSI, Km ^r	This work
<i>S. elongatus</i> NbISK(-)	NbIS, <i>nbIS/nbIS::C.K1(-)</i> , Km ^r	This work
<i>S. elongatus</i> NbISK(+)	NbIS, <i>nbIS/nbIS::C.K1(+)</i> , Km ^r	This work
<i>S. elongatus</i> NbISC(-)	NbIS, <i>nbIS/nbIS::C.C2(-)</i> , Cm ^r	This work
<i>S. elongatus</i> NbISC(+)	NbIS, <i>nbIS/nbIS::C.C2(+)</i> , Cm ^r	This work
<i>S. elongatus</i> NbISCSS3	Φ (<i>nbIS::C.S3(-)</i>), Smt ^r	This work
<i>S. elongatus</i> NbIS ^{4407A} CS3	Φ (<i>nbIS^{4407A}::C.S3(-)</i>)/ Φ (<i>nbIS::C.S3(-)</i>), Smt ^r	This work
<i>S. elongatus</i> RpABK(-)	RpAB, <i>rpAB/rpAB::C.K1(-)</i> , Km ^r	This work
<i>S. elongatus</i> RpABK(+)	RpAB, <i>rpAB/rpAB::C.K1(+)</i> , Km ^r	This work
<i>S. elongatus</i> RpABS(-)	RpAB, <i>rpAB/rpAB::C.S3(-)</i> , Smt ^r	This work
<i>S. elongatus</i> CK1RpABI	RpAB (Con), Φ (C.K1- <i>rpAB</i>) NSI, Km ^r	This work
<i>S. elongatus</i> CS3(+)-RpAB	Φ (C.S3(+)- <i>rpAB</i>), Smt ^r	This work
<i>S. elongatus</i> CS3(+)-RpAB ^{4del}	Φ (C.S3(+)- <i>rpAB^{4del}</i>), Smt ^r	This work
<i>S. elongatus</i> CK1RpAB ^{D56F}	RpAB ^{D56F} (Con), Φ (C.K1- <i>rpAB^{D56F}</i>) NSI, Km ^r	This work

Table S2. Plasmids for genetic manipulation of *S. elongatus*

Plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
pBluescriptIII SK(+)	Cloning vector, Ap ^r	Stratagene
pRL161	C.K1, Ap ^r Km ^r	(Elhai and Wolk 1988)
pT25	CyA(1-224)T25, Cm ^r	(Karimova et al. 2005)
pUAGC453	pBluescriptIII SK(+) with C.S3, Ap ^r Sm ^r	(Ruiz et al. 2008)
pUAGC613	pUAGC623 with C.K1 into NSI, Ap ^r Km ^r	(Espinosa et al. 2010)
pUAGC655	pBluescriptIII SK(+) with a 1789 pb genomic <i>srrA</i> fragment, Ap ^r	This work
pUAGC656	pUAGC655 with <i>srrA</i> ::C.S3, Ap ^r Sm ^r	This work
pUAGC660	pUAGC613 with Φ (C.K1- <i>srrA</i>), Ap ^r Km ^r	This work
pUAGC226	<i>nhS</i> ::C.K1(-), Ap ^r Km ^r	This work
pUAGC227	<i>nhS</i> ::C.K1(+), Ap ^r Km ^r	This work
pUAGC228	<i>nhS</i> ::C.C2(-), Ap ^r Cm ^r	This work
pUAGC229	<i>nhS</i> ::C.C2(+), Ap ^r Cm ^r	This work
pUAGC584	pUAGC453 with ORE Sympec7942_0923, Ap ^r Sm ^r	This work
pUAGC586	pUAGC584 with Φ (<i>nhS</i> -C.S3(-)), Ap ^r Sm ^r	This work
pUAGC587	pUAGC586 with Φ (<i>nhS</i> ^{6407A} -C.S3(-)), Ap ^r Sm ^r	This work
pUAGC265	pUAGC586 with Φ (<i>nhS</i> ^{NS534A} -C.S3(-)), Ap ^r Sm ^r	This work
pUAGC589	pBluescriptIII SK(+) with a 1553 pb genomic <i>rpdB</i> fragment, Ap ^r	This work
pUAGC593	<i>rpdB</i> ::C.K1(+), Ap ^r Km ^r	This work
pUAGC594	<i>rpdB</i> ::C.K1(-), Ap ^r Km ^r	This work
pUAGC596	<i>rpdB</i> ::C.S3(-), Ap ^r Sm ^r	This work
pUAGC759	pUAGC613 with Φ (C.K1- <i>rpdB</i>), Ap ^r Km ^r	This work
pUAGC763	pUAGC589 with Φ (CS3(+)- <i>rpdB</i>), Ap ^r Sm ^r	This work
pUAGC771	pUAGC763 with Φ (CS3(+)- <i>rpdB</i> ^{<i>AdnI</i>}) with <i>AdnI</i> target, Ap ^r Sm ^r	This work
pUAGC773	pUAGC763 with Φ (CS3(+)- <i>rpdB</i> ^{<i>D56E</i>}) and <i>Bst</i> UI target, Ap ^r Sm ^r	This work
pUAGC777	pUAGC763 with Φ (CS3(+)- <i>rpdB</i> ^{<i>D56E</i>}) and <i>Xho</i> I target, Ap ^r Sm ^r	This work
pUAGC780	pUAGC759 with Φ (C.K1- <i>rpdB</i> ^{<i>D56E</i>}) and <i>Xho</i> I target, Ap ^r Sm ^r	This work

Table S3. Plasmids for over expression of proteins in *E. coli*

Plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
pPROEX-HTa	His-tag cloning vector, Ap ^r	Invitrogen
pPROEX-HTb	His-tag cloning vector, Ap ^r	Invitrogen
pLIC-SGC1	His-tag cloning vector, Ap ^r	(Stols et al. 2002)
pUAGC55	pPROEX-HTa encoding 6His-NbIS, Ap ^r	This work
pUAGC56	pPROEX-HTa encoding 6His-NbIS ²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ , Ap ^r	(Salinas et al. 2007)
pUAGC57	pPROEX-HTa encoding 6His-NbIS ³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ , Ap ^r	This work
pUAGC258	pPROEXHTb encoding 6His-RpaB, Ap ^r	This work
pUAGC270	pLIC-SGC1 encoding 6His-NbIS ²¹⁹⁻⁶⁶⁴ , Ap ^r	This work
pUAGC271	pPROEXHTb encoding 6His-RpaB ¹⁻¹²³ , Ap ^r	This work
pUAGC272	pPROEXHTb encoding 6His-SrrA ¹⁻¹³⁰ , Ap ^r	This work
pUAGC273	pLIC-SGC1 encoding 6His-SrrA, Ap ^r	This work
pUAGC274	pPROEX-HTb encoding H6-RpaA ¹⁻¹²² , Ap ^r	This work

Table S4. Plasmids for yeast two-hybrid assays

Plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
pGAD424	LEU2, GAL4(768-881)AD, Ap ^r	(Bartel et al. 1993)
pGAD424 (+1)	As pGAD424 with a different frame (+1), Ap ^r	(Roder et al. 1996)
pGAD424 (+2)	As pGAD424 with a different frame (+2), Ap ^r	(Roder et al. 1996)
pGBT9	TRP1, GAL4(1-147)BD, Ap ^r	(Bartel et al. 1993)
pGBT9 (+1)	As pGBT9 with a different frame (+1), Ap ^r	(Roder et al. 1996)
pGBT9 (+2)	As pGBT9 with a different frame (+2), Ap ^r	(Roder et al. 1996)
pUAGC51	GAL4AD:NbIS ²⁷²⁻⁶⁶⁴ , Ap ^r	(Espinosa et al. 2006)
pUAGC52	GAL4BD:NbIS ²⁷²⁻⁶⁶⁴ , Ap ^r	(Espinosa et al. 2006)
pUAGC53	GAL4AD:NbIS, Ap ^r	(Espinosa et al. 2006)
pUAGC54	GAL4BD:NbIS, Ap ^r	(Espinosa et al. 2006)
pUAGC423	GAL4AD:SipA, Ap ^r	(Espinosa et al. 2006)
pUAGC424	GAL4BD:SipA, Ap ^r	(Espinosa et al. 2006)
pUAG101	GAL4AD:CheA, Ap ^r	(Martinez-Argudo et al. 2001)
pUAG501	GAL4AD:EnvZ ^{HNG} , Ap ^r	(Martinez-Argudo et al. 2002)
pUAG502	GAL4BD: EnvZ ^{HNG} , Ap ^r	(Martinez-Argudo et al. 2002)
pUAGC633	GAL4AD:NbIS ¹⁻²¹⁹ , pGAD424 (+2), Ap ^r	This work
pUAGC634	GAL4BD:NbIS ¹⁻²¹⁹ , pGBT9 (+2), Ap ^r	This work
pUAGC635	GAL4AD:NbIS ¹⁻²⁶⁴ , pGAD424 (+2), Ap ^r	This work
pUAGC636	GAL4BD:NbIS ¹⁻²⁶⁴ , pGBT9 (+2), Ap ^r	This work
pUAGC637	GAL4AD:NbIS ²¹⁹⁻⁶⁶⁴ , pGAD424 (+1), Ap ^r	This work
pUAGC638	GAL4BD:NbIS ²¹⁹⁻⁶⁶⁴ , pGBT9 (+1), Ap ^r	This work
pUAGC639	GAL4AD:NbIS ²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ , pGAD424 (+1), Ap ^r	This work
pUAGC640	GAL4BD:NbIS ²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ , pGBT9 (+1), Ap ^r	This work
pUAGC641	GAL4AD:NbIS ³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ , pGAD424 (+1), Ap ^r	This work
pUAGC642	GAL4BD:NbIS ³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ , pGBT9 (+1), Ap ^r	This work
pUAGC651	GAL4AD:SrrA, pGAD424, Ap ^r	This work
pUAGC652	GAL4BD:SrrA, pGBT9, Ap ^r	This work
pUAGC751	GAL4AD:RpaB, pGAD424, Ap ^r	This work
pUAGC752	GAL4BD:RpaB, pGBT9, Ap ^r	This work
pUAGC753	GAL4AD:RpaA, pGAD424, Ap ^r	This work
pUAGC754	GAL4BD:RpaA, pGBT9, Ap ^r	This work

Table S5. Oligonucleotides.

Name	Sequence (5' to 3')	Named as
2416-BTH-1F	GCGCGGATCCCATGCGATCGCTTAAAG	1F, Fig.S4
2416-BTH-1R	CAAGCGGTACCTAGGCTCCAGCCGC	2R, Fig.S4
2416-INACT-1F	GACGGATCCACGGGCAAGCGCAAC	
2416-INACT-1R	CGTAGTTCGACAGGGGTTGCAGGGAC	
2416-YTH-1F	CGAGGATCCATATGCGATCGCTTAAAG	
2416-YTH-1R	GCCACTGCAGCTAGGCTCCAGCCGC	
CS3-2F	ACAAAACGGTTTACCAGCAT	2F, Fig.S3; 1R, Fig.S4; 2R, Fig.S5
CK1-2F	GGGGATCTCATGCTGGAG	1F, Fig.S3; 2F, Fig.S2 and S4
HliA-probe-Flc(+)	Flc-ACGTCACAGAACTTTACGTTGTGTTACACTTCA	
HliA-probe-Flc(-)	Flc-TGAAAGTGAACACAACGTAAAGTTCTGTGACGT	
NblA-F	ATGCTCCCCCTCTCCCCGA	
NblA-R	CTTCCTTGGCGAATCATGCCTTGAAG	
NblS-1F	GAGCAGCTGAATTCGCTGGCCCTTTGG	
NblS-4F	AGTGAAGTCGGAATTGGCAC	1F, Fig.S5
NblS-3R	CTGCTCGATCGGTTG	2R, Fig.S2
NblS-219YBTH-F	GAGGGATCCTATTGCGAGTTGGTG	
NblS-219YBTH-R	GGTCTGCAGGTACCTAAATGGGGCGCGTG	
NblS-264YBTH-R	GGTCTGCAGGTACCTAGGCATAGCCCTCTAG	
NblS-down-F	CCGGCTAGTTCGACCCGCTCAAC	
NblS-down-R	CGATGGTACCGAGTAGTGCCAAACGCTGCCG	
NblS-down-2R	ATTCCACACCCAGCTGCTTC	1R, Fig.S5
NblS-G379D-F	GAAAGACATTGCTGTCCAGC	2F, Fig.S5
NblS-G379D-R	GCAATGTCTTTCACGTTCCG	1R, Fig.S2
NblS-H407A-F	CATTAGCAATGTCTCCGCCGAGCTGCCAACGCC	
NblS-H407A-R	GGCGTTCGCAGCTCGGCGGACATTGCTAATG	
NblS-I620V-R	CACTAACTAAGTGAATGCGG	3R, Fig.S2
NblS-N524A-F	GCCAACTTAGTCGGCGCCGCTTAAAGTTCACCGC	
NblS-N524A-R	GCGGTGAACTTAAAGGGCGGCGCCGACTAAGTTGGC	
NblS-PRO-1F	CATATTGGCGCCATGCTGGGCCTT	
NblS-PRO-R	CATTCTGCAGCTAGCCGGTG	
NblS-PRO-A264F	CATATTGGCGCCGCGCCAGAA	1F, Fig.S2
NblS-PRO-V377F	CATATTGGCGCCGTGAAAGGCAT	
NblS219-pLIC(+)	TACTTCCAATCCATGATTGCGGAGTTGGTGGAG	
NblS219-pLIC(-)	TATCCACCTTACTGCTAGCCGGTGCTGACGC	
NewhliA-F	ATGCGTAGCGGACGGACAG	
NewhliA-R	TTAGCTCAAGCCGCTCGCG	
NSIA-F	GACGGGTACCTCTGCTGG	3F, Fig.S4
NSI-R	TGCCTGAAAGCGTGACGAGC	3R, Fig.S4
RnpB-F	GTGAGGAGAGTGCCACAGAA	
RnpB-R	TAAGCCGGGTTCTGTTCTCT	
RpaA7942-1F	CTAGATGGCGCCATGAAACCCCGCATC	
RpaA7942-1R	CTTAGTTCGACTCAGGACGCCGAAGG	
RpaA-RD-NcoI(+)	GGCGCCATGGAACCTTCCATCCTGATC	
RpaA-RD-HindIII(-)	TGCTCTAAGCTTACGCCTAAGCAGCGCTTTC	
RpaA-YTH-1F	CCCGGAATTCTACCCTATGAAACCCC	
RpaA-YTH-1R	GCTCAGTTCGACGGGTTTCAGGACGCC	
RpaB7942-1F	CTAGATGGCGCCCTTGGAAAATCGCAAGG	
RpaB7942-1R	CATACTCGAGCTAACGCCCTTCTTC	
RpaB7942-2R	CATACTCGAGCTACCGACGACGACCCGAG	1R, Fig.S3
RpaB-BYTH-1F	GAGAGGATCCCTTTGGAAAATCGCAAGG	
RpaB-BYTH-1R	GATTCTGCAGGCGCTGGCTGCTC	
RpaB-D56A-F	CCGGATCTCGTGGTGGCTCGCGGTGATGATGCCCAAGCTCG	
RpaB-D56A-R	CGAGCTTGGGCATCATCACCGCGAGCACCACGAGATCCGG	

Table S5. Oligonucleotides (cont.)

Name	Sequence	Used as
RpaB-D56DV57V-F	CCGGATCTCGTGGTGCTC GACGTC ATGATGCCCAAGCTCG	
RpaB-D56DV57V-R	CGAGCTTGGGCATCAT GACGTC GAGCACCACGAGATCCGG	
RpaB-D56E-F	CCGGATCTCGTGGTGCTC GAGG TGATGATGCCCAAGCTCG	
RpaB-D56E-R	CGAGCTTGGGCATCATC ACTCGAGC ACCACGAGATCCGG	
RpaB-inac-1F	TATA CTCGAGC ACCAGAGAACCCGA	3F, Fig.S3
RpaB-inac-1R	CATT GAATTCC ATCGCGATCGCT	
RpaB-RD-NcoI(+)	GGCG CCATGG AAAAATCGCAAGGAAAAAATCCTCGTTG	
RpaB-RD-HindIII(-)	GAAAA AGCTT ACCGACGCAGCACCCGAGCG	
RpaB-SD-1F	TTTTGGCGCCTCTGAGTCAACCG	
Sip1-BTH-F	ACCCGGATCCCTCTATGGATTTTG	
Sip1-BTH-R	GGGGGTACCTTGATTCAGAC	
SrrAD64A-F	GATCGTGTGGCTGTGATGCTACCCAAACTCG	
SrrA-FL-pLIC(+)	TACTTCCAATCCATGCGATCGCTTAAAGCTG	
SrrA-FL-pLIC(-)	TATCCACCTTACTGCTTCGCGGACCTCGGATC	
SrrA-OV-3F	CCGCAA AGCTT GTTACAGTT	
SrrA-OV-1R	GCGTGAATTCGGGTAAAGTCAGG	
SrrA-OV-2R	GGCG GTCGAC CTAGGCTCCAGC	
SrrA-probe-Flc(+)	Flc-TTGTTACAGTTGATCACATAAA	
SrrA-probe-Flc(-)	Flc-TTTATGTGATCAACTGTAACAA	
SrrA-RD-NcoI(+)	GGCG CCATGG GATCGCTTAAAGCTGTC	
SrrA-RDHindIII(-)	TCAA AGCTT ACCGGCGCAGAATTGTGGCG	

Restriction site sequences relevant for cloning or detection of mutations are indicated in bold and/or underlined.

Supporting Experimental Procedures

Protein cloning, expression and purification

To construct plasmids pUAGC55 and pUAGC57, for expression of 6His-derivatives of NblS and NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴, *nblS* coding sequences were amplified from *S. elongatus* genomic DNA with primer pairs NblS-PRO-F/NblS-PRO-R or NblS-PRO-V377F/NblS-PRO-R, cut with *EheI* and *PstI* and cloned into pPROEX-HTa (Invitrogen). In a similar way, we constructed plasmid pUAGC258 for expression of 6His-RpaB using primers RpaB7942-1F/RpaB7942-1R, cut with *EheI* and *XhoI* and cloned into pPROEXHTb. For construction of plasmids pUAGC271, pUAGC272 and pUAGC274, for expression of 6His-derivatives of RpaB¹⁻¹²³, SrrA¹⁻¹³⁰ and RpaA¹⁻¹²², corresponding coding sequences were PCR amplified using primer pairs RpaB-RD-NcoI(+)/RpaB-RD-HindIII(-), SrrA-RD-NcoI(+)/SrrA-RD-HindIII(-) and RpaA-RD-NcoI(+)/RpaA-RD-HindIII(-), respectively. PCR products were cut with *NcoI* and *HindIII*, and cloned into pPROEX-HTb. Plasmids pUAGC270 and pUAGC273 for expression of a 6His-NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ and 6His-SrrA were constructed by ligase-independent cloning into pLIC-SGCI vector (Stols et al. 2002) the PCR products generated with the primer pairs NblS219-pLIC(+)/NblS219-pLIC(-) and SrrA-FL-pLIC(+)/SrrA-FL-pLIC(-). All plasmids described are listed in Supplemental Table S3 and oligonucleotides sequences and relevant restriction sites are shown in Supplemental Table S5.

Recombinant proteins were expressed in *E. coli* strain BL21 (DE) or BL21-CodonPLUS(DE3)-RIL (Novagen) following two alternative protocols. *E. coli* clones carrying plasmids to over express RRs were grown in medium LB supplemented with ampicillin (100 µg ml⁻¹) and chloramphenicol (33 µg ml⁻¹) at 37°C until OD_{600nm} reached 0.15-0.2 that the temperature was lowed to 25°C and the incubation was continued to an OD_{600nm} of ~0.5, 1mM isopropyl-1-thio-galactopyranoside (IPTG) was added and incubation at 25°C was continued for 4 hours. NblS variants were over expressed following an autoinduction

method (Studier 2005) from *E. coli* clones transformed with the corresponding vectors and grown in the autoinductive ZYP-5052 medium supplemented with ampicillin (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and chloramphenicol (33 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

All the proteins, with the exception of NbIS³⁷⁷⁻⁶⁴⁴, were purified following a similar protocol. The cells were harvested by centrifugation, and resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 5% Glycerol). Cells were disrupted by sonication and unbroken cells and cell debris removed by centrifugation at 18 000 g for 30 min at 4°C. The supernatant was loaded onto Ni²⁺-HiTrap column (GE Healthcare) equilibrated in A buffer (50 mM Tris pH 8.0, 150mM M NaCl, 5% glycerol) and the protein was eluted with buffer A supplemented with 200 mM of imidazol. The purest fractions, as determined by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining, were pooled and submitted to a size exclusion chromatography using a Sephadex 75 or 200 (GE Healthcare) equilibrated with buffer A. Again, the purest fractions were pooled, concentrated using Amicon (Millipore) and store at -80°C.

For the purification of NbIS³⁷⁷⁻⁶⁴⁴, the insoluble fraction after cell disruption was washed three times with the lysis buffer and resuspended in lysis buffer supplemented with 2M urea, purified on Ni²⁺-HiTrap column, as described above with the inclusion of 2M urea in the buffers and the urea was eliminated in the size exclusion chromatography purification step.

Construction of Yeast two-hybrid plasmids

EheI-PstI fragments from pUAGC56 (6His-NbIS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴) and pUAGC57 (6His-NbIS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴) were cloned into pGAD424 (+1) and pGBT9 (+1) cut with *SmaI* and *PstI* to obtain NbIS²⁶⁴⁻⁶⁶⁴ and NbIS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ fusion derivatives. To construct plasmids pUAGC633 (GAL4AD:NbIS¹⁻²¹⁹) and pUAGC634 (GAL4BD:NbIS¹⁻²¹⁹), *nbIS* sequences were amplified with NbIS-1F and NbIS-219YBTH-R, cut with *EcoRI* and *PstI* and cloned into pGAD424

(+2) and pGBT9 (+2). With the same rationale, the following polypeptides were fused to GAL4 domains (oligos used in each case are indicated in brackets): NblS¹⁻²⁶⁴ (NblS-1F + NblS-264YBTH-R), NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ (NblS-219YBTH-F + NblS-PRO-R), RpaB (RpaB-BYTH-1F + RpaB-BYTH-1R), RpaA (RpaA-YTH-1F + RpaA-YTH-1R) and SrrA (2416-YTH-1F + 2416-YTH-1R). All the two-hybrid plasmids, and the pGAD424 and pGBT9 versions used for the corresponding plasmids are listed in Table S4; oligonucleotides sequences and relevant restriction sites for cloning are shown in Table S5.

Insertional inactivation of the *nblS* gene in *S. elongatus*

The 1.3 kb kanamycin resistance cassette C.K1 was extracted from pRL161 with *HincII*, and cloned into plasmid pUAGC54 (GAL4BD:NblS) purified from GM119, cut with *ClaI* and Klenow-treated. The two resulting plasmids, pUAGC226 and pUAGC227, carry the C.K1 cassette in antisense or sense, respectively, to *nblS* with an internal deletion. Similar plasmids, pUAGC228 and pUAGC229, were constructed in which *nblS* was inactivated by insertion of a chloramphenicol-resistance cassette (a shorter 970 bp version of C.C2 described by Elhai and Wolk 1988) obtained from plasmid pT25 cut with *Sau3AI* and Klenow-treated. Plasmid pUAGC226 was then transformed into *S. elongatus* and representative kanamycin resistant clones selected were designated as NblSK(-) strain. The same procedure was carried out with plasmid pUAGC227, giving strain NblSK(+). Plasmids pUAGC228 and pUAGC229 were also transformed into *S. elongatus*. Representative chloramphenicol resistant clones selected from those transformations gave strains NblSM(-) and NblSM(+), respectively. The presence of *nblS* wild-type alleles in both kanamycin and chloramphenicol resistant clones was checked by PCR using primers NblS-PRO-A264F and NblS-G379D-R, giving a 365 bp band. Presence of *nblS*::C.C2 alleles was checked by PCR using primers NblS-PRO-A264F and NblS-3R, giving a 1030 bp band, and presence of *nblS*::C.K1 alleles was checked using primers CK1-2F and NblS-I620V-R, giving a 465 bp band.

Strategies for *rpaB* mutational analysis

An 1559 bp DNA fragment containing *rpaB* and flanking regions was obtained by PCR on genomic DNA of *S. elongatus* using primers RpaB-inac-1F and RpaB-inac-1R, cut with *XhoI* and *EcoRI* and cloned into pBluescriptII SK (+), giving plasmid pUAGC589. The cassette C.K1 was extracted from pRL161 with *HincII*, and cloned into plasmid pUAGC589 previously cut with *HincII* and *StyI* and Klenow-treated. The two resulting plasmids, pUAGC593 and pUAGC594, carry the C.K1 cassette in sense or antisense, respectively, to *rpaB* with an internal deletion. A similar plasmid, pUAGC596, was constructed in which *rpaB* gene was inactivated by insertion, in antisense to *rpaB*, of a streptomycin-resistance cassette (C.S3) obtained from plasmid pUAGC453 with *EcoRV* and *HincII*. Plasmids pUAGC593, pUAGC594 and pUAGC596 were transformed into *S. elongatus* and representative clones were designated as RpaBK(+), RpaBK(-) or RpaBS(-) strain, respectively. *rpaB*::C.S3 alleles were checked by PCR with CS3-2F and RpaB7942-2R (a 165 bp band for positive clones), and RpaB7942-inac-1F and RpaB7942-2R (879 and 2364 bp, respectively for *rpaB* and *rpaB*::CS3 alleles).

To obtain a plasmid carrying Φ (C.K1-*rpaB*) flanked by *S. elongatus* NSI sequences (hereafter NSI), *rpaB* coding sequences were amplified from *S. elongatus* genomic DNA using primers RpaB-SD-1F and RpaB7942-1R, cut with *EheI* and *XhoI* and cloned into pUAGC613, giving plasmid pUAGC759. Transformation of pUAGC759 into *S. elongatus* resulted in the CK1RpaBI strain. The Φ (C.K1-*rpaB*) allele was amplified into a 458 bp band with CK1-2F and RpaB7942-2R.

The C.S3 cassette was extracted from pUAGC453 with *EcoRV* and *HincII* and cloned into the *BstEII* site of plasmid pUAGC589 giving plasmid pUAGC763, carrying the C.S3 cassette located between Synpcc7942_1452 and *rpaB* and in sense to *rpaB* gene. Plasmid pUAGC763 was used as template for QuickChange Mutagenesis in combination with primers

RpaB-D56DV57V-F/RpaB-D56DV57V-R (silent mutation *rpaB^{AatII}*; incorporating an *AatII* restriction site at codons 56-57), RpaB-D56A-F/RpaB-D56A-R (mutation *rpaB^{D56A}*; incorporating a *BstUI* restriction site) and RpaB-D56E-F/RpaB-D56E-R (*rpaB^{D56E}*; incorporating an *XhoI* restriction site) resulting in plasmids pUAGC771, pUAGC773 and pUAGC777, respectively. These plasmids were transformed into *S. elongatus* and integration of C.S3 upstream of *rpaB* was verified by PCR with RpaB-inac-1F and RpaB7942-R primers (879 and 2643 bp bands, respectively for *rpaB* and C.S3-*rpaB* alleles). RFLP analysis after digestion of RpaB-BYTH-1F/RpaB7942-2R PCR products with the corresponding enzyme (see Supporting Experimental Procedures), allowed distinction between *rpaB* (unique 391 bp band) *rpaB^{AatII}* (182 and 209 bp), *rpaB^{D56A}* (178 and 213 bp) and *rpaB^{D56E}* (175 and 216 bp) alleles.

Plasmid pUAGC759 was used as template for QuickChange Mutagenesis in combination with primers RpaB-D56E-F/RpaB-D56E-R, resulting in plasmid pUAGC780, carrying Φ (C.K1-*rpaB^{D56E}*) flanked by NSI sequences. Plasmid pUAGC780 was transformed into *S. elongatus* and kanamycin resistant clones were selected. PCR verification of correct integration of Φ (C.K1-*rpaB^{D56E}*) was carried out as for Φ (C.K1-*rpaB*), and the presence of C.K1-*rpaB^{D56E}* was checked by RFLP analysis (*XhoI* digestion of CK1-2F/RpaB7942-2R PCR product), giving a 458 bp band for C.K1-*rpaB* and two fragments of 242 and 216 bp for C.K1-*rpaB^{D56E}*. A representative clone, named CK1RpaB^{D56E}I was transformed with plasmid pUAGC596 and PCR analysis of streptomycin and kanamycin resistant derivatives was carried out as described for RpaBS(-) and CK1RpaB^{D56E}I strains.

Construction of null and constitutive *srrA* mutant strains

An 1789 bp DNA fragment containing *srrA* and its flanking regions was PCR amplified using primers 2416-INACT-1F and 2416-INACT-1R, cut with *BamHI* and *SalI* and cloned into pBluescriptII SK(+), giving plasmid pUAGC655. The cassette C.S3 was extracted

from pUAGC453 with *HincII* and cloned into plasmid pUAGC655 previously cut with *MscI* and *EcoRI* and Klenow treated. The resulting plasmid pUAGC656, carries the C.S3 cassette in antisense to *srrA* with an internal deletion. After transformation of this plasmid in *S. elongatus*, a clone resistant to streptomycin, thereafter strain SrrAS(-), was selected for further analysis. PCR verification of correct integration of C.S3 into *srrA* was carried out with primers 2416-BTH-1F and CS3-2F, giving a 178 bp band only when *srrA*::C.S3 allele were present, and 2416-BTH-1F and 2416-BTH-1R, giving a 789 bp band for *srrA* wild type allele and a 2170 bp band for *srrA*::C.S3 allele. To obtain a strain in which *srrA* was constitutively expressed, a DNA fragment comprising *srrA* coding sequences and additional upstream 40 bp was amplified using primers SrrA-OV-3F y SrrA-OV-2R, cut with *HindIII* and *SalI* and cloned into pUAGC613. The resulting plasmid, pUAGC660, carries Φ (C.K1-*srrA*) flanked by *S. elongatus* NSI sequences. After transformation of pUAGC660 in *S. elongatus*, a kanamycin resistant clone, thereafter strain CK1SrrAI, was selected for further analysis. The presence of Φ (C.K1-*srrA*) allele was checked by PCR using primers CK1-2F and 2416-OV-1R, giving a 624 bp band, and the presence of NSI wild type alleles was checked using primers NSIA-F and NSI-R, giving a 900 bp band when NSI wild type was present and a 3027 bp band when Φ (C.K1-*srrA*) was integrated into NSI.

Strategy for construction of *nblS*^{H407A} and *nblS*^{N524A} strains.

Almost full length ORF Synpcc7942_0923 was PCR amplified with primers NblS-down-F and NblS-down-R, cut with *SalI* and *KpnI* and cloned into pUAGC453 plasmid cut with same enzymes, giving plasmid pUAGC584. An *EheI-PstI* fragment from pUAGC55 was cloned into plasmid pUAGC584 cut with *SmaI-PstI* giving plasmid pUAGC586, carrying cassette C.S3 located between *nblS* and Synpcc7942_0923 sequences in antisense to both ORFs. QuickChange Mutagenesis with primers NblSH407A-F and NblSH407A-R (mutation *nblS*^{H407A}, removing a *BssSI* restriction site) and plasmid pUAGC586 as template resulted in

plasmid pUAGC587, carrying $\Phi(nblS^{H407A}-C.S3(-))$ allele. QuickChange Mutagenesis with primers NblS-N524A-F and NblS-N524A-R (mutation $nblS^{N524A}$; incorporating an *EheI* restriction site) and plasmid pUAGC586 as template resulted in plasmid pUAGC265, carrying $\Phi(nblS^{N524A}-C.S3(-))$ allele. Plasmids pUAGC587 and pUAGC265 were then used to transform *S. elongatus* and streptomycin resistant clones were selected. PCR verification of the correct integration of C.S3 was confirmed using primers NblS-G379D-F and CS3-2F, giving a 900 bp band. Presence of *nblS* wild-type alleles was checked by PCR with primers NblS-4F and NblS-down-2R, giving a 480 bp band. Analysis of the presence of $\Phi(nblS^{H407A}-C.S3(-))$ alleles was carried out by PCR with primers NblS-G379D-F and CS3-2F followed by digestion with *BssSI*, giving an 850 bp fragment for *nblS* wild-type allele and 900 bp for $nblS^{H407A}$ allele. Analysis of the presence of $\Phi(nblS^{N524A}-C.S3(-))$ alleles were carried out by PCR with primers NblS-H407A-F and NblS-I620V-R followed by digestion with *EheI* (giving an 665 bp fragment for *nblS* wild-type allele and two fragments of 375 + 290 pb for $nblS^{N524A}$ mutation).

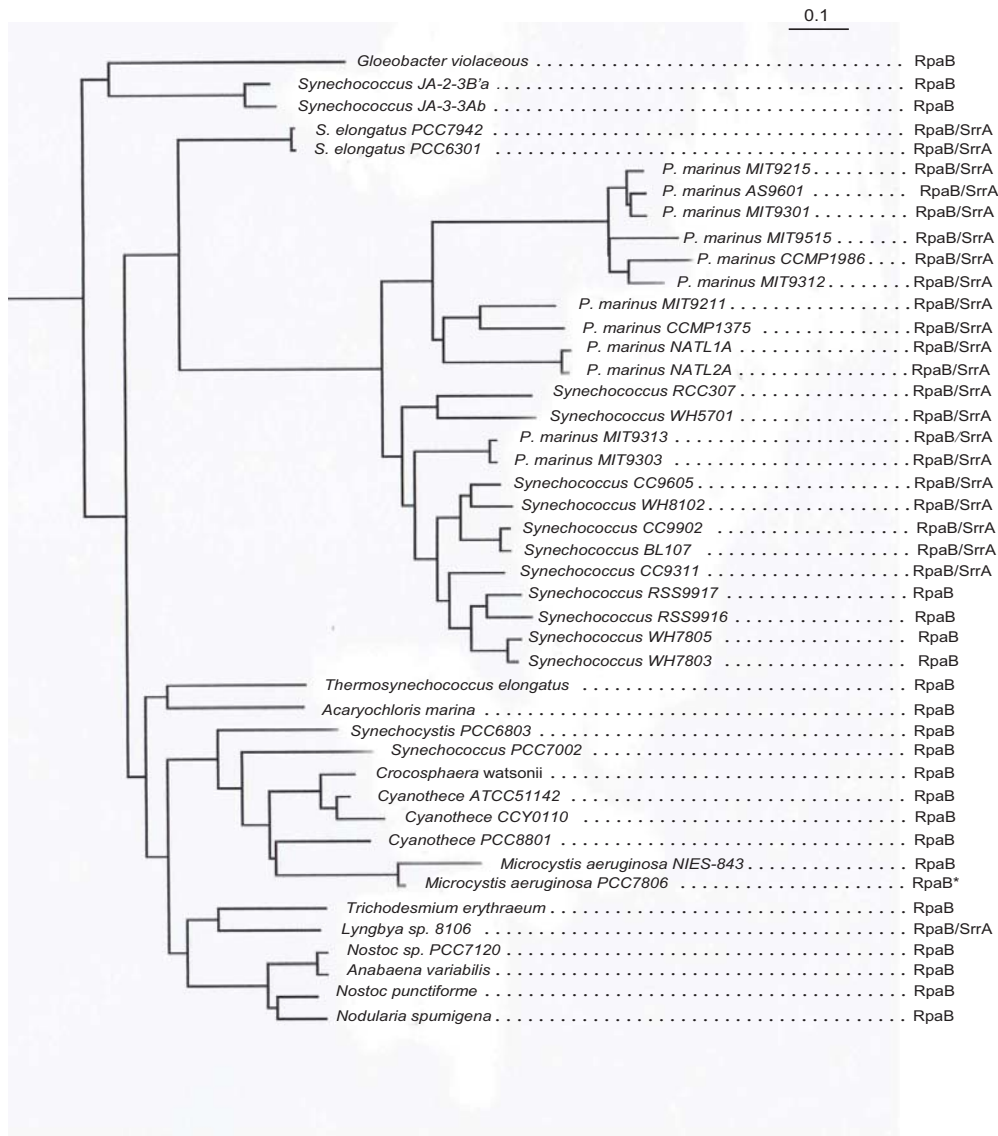


Fig. S1. RpaB and SrrA in Cyanobacteria. A maximum-likelihood distance tree described by Gupta and Mathews (Gupta and Mathews 2010), based on concatenated sequences for 44 conserved cyanobacterial proteins. The presence of either only RpaB or both (RpaB/SrrA) is indicated for each strain. The asterisk indicates the presence of only RpaB in a genome not sequenced completely. To identify RpaB and SrrA orthologs, BLAST analysis was carried out at NCBI database. When identical best match was retrieved for RpaB and SrrA searches, the lowest E-value was used to assign the sequence to RpaB or SrrA class.

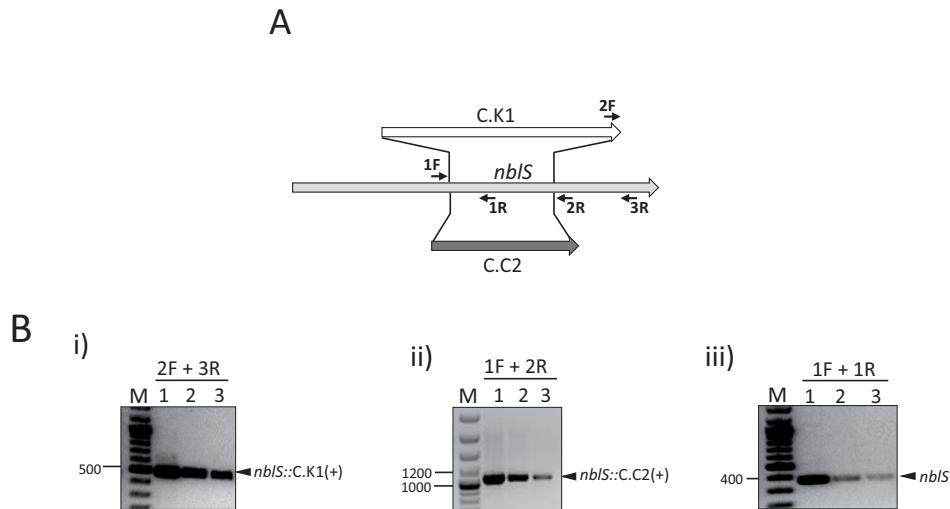


Fig. S2. Genetic inactivation of *nbIS*. (A) Schematic representation of *nbIS* null alleles obtained by C.K1 (kanamycin-resistance) or C.C2 (chloramphenicol-resistance) cassette insertion into internally deleted *nbIS* regions present at plasmids pUAGC227 and pUAGC229, respectively. Derivatives where the resistance cassette was in the opposite orientation were also obtained (pUAGC226 and pUAGC228). Positions of relevant primers are indicated by black arrows. (B) PCR analysis of controls and representative clones of NblSK(+) and NblSC(+) strains as indicated i) Detection of *nbIS*/CK1 junction. Lane 1, plasmid pUAGC227; Lane 2 and 3, two representative clones from strain NblSK(+). ii) Detection of C.C2/*nbIS* junction. Lane 1, plasmid pUAGC229; Lane 2 and 3, two representative clones from strain NblSC(+). iii) Detection of wild type *nbIS* alleles. Lane 1, wild-type strain; Lane 2, one representative clone from strain NblSC(+); Lane 3, one representative clone from strain NblSK(+). Relevant alleles (pointed with arrowheads) and particular bands for size marker are shown to the right and left, respectively. M lanes, size marker Gene Ruler 100-bp Plus DNA Ladder from Fermentas.

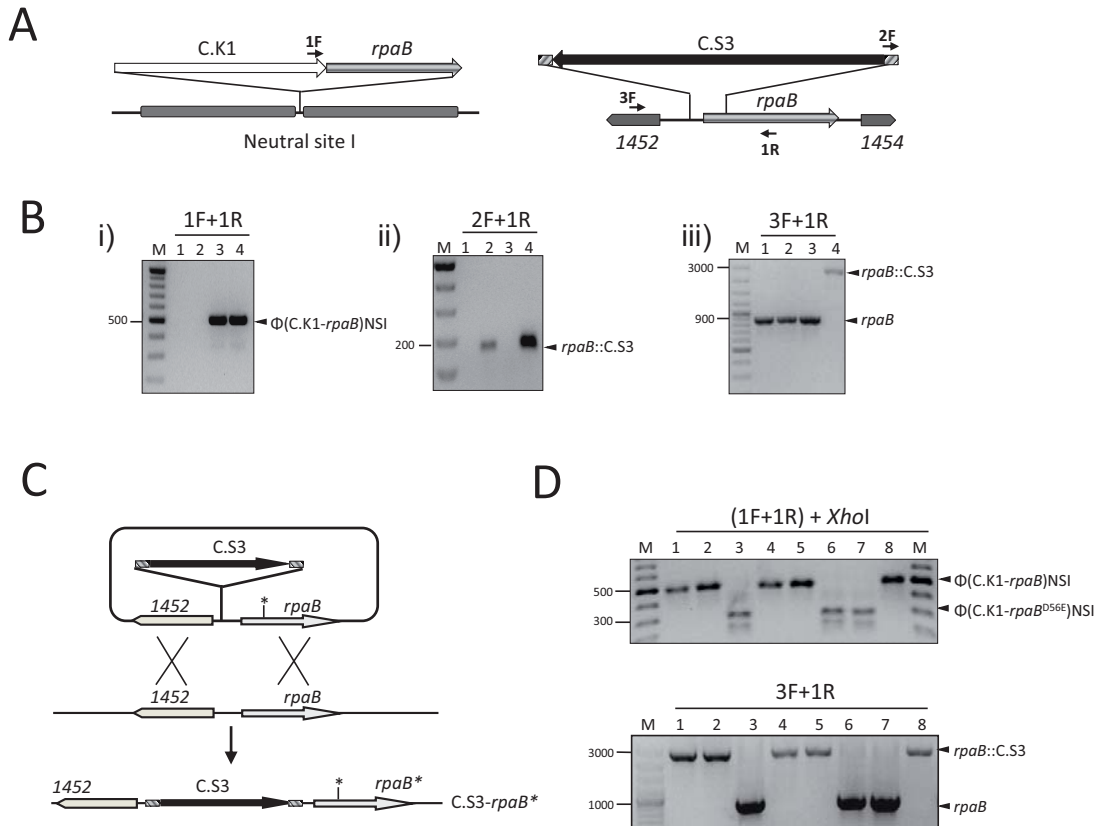
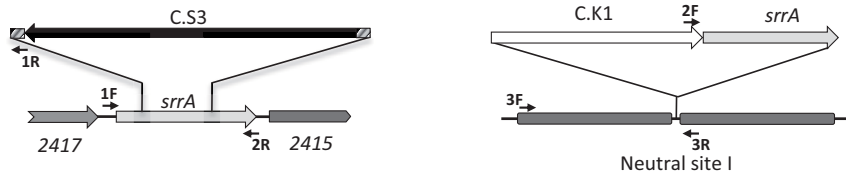
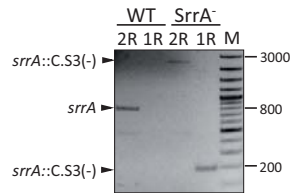


Fig. S3. Mutational analysis of *rpaB* in *S. elongatus*. (A) Constructs for ectopic expression (left), and inactivation (right) of the *rpaB* gene with positions of primers used for PCR analysis indicated by black arrows in one or another scheme. (B) Detection of C.K1/*rpaB* junctions (i), C.S3/*rpaB* junctions (ii) and *rpaB* wild type or *rpaB*::C.S3 alleles (iii) by PCR analysis of recipient controls (wild-type strain, lane 1; CK1RpaBI strain, lane 3) and a representative clone from each strain after transformation with the *rpaB* null allele *rpaB*::C.S3 (Lanes 2 and 4, respectively). (C) Strategy for generation of strains containing point mutations at position corresponding to D56 (denoted by an asterisk). (D) RFLP Analysis of streptomycin (and kanamycin) resistant clones (numbered 1 to 8) after introduction of *rpaB*::C.S3 into strain CK1RpaB^{D56E}I with *Xho*I (top panel) and PCR (bottom). Note that shorter PCR bands are preferentially amplified in heteroallelic clones (lanes 3, 6 and 7 in D, lane 2 in B iii)). Relevant alleles (pointed with arrowheads) and size marker bands (labeled M) are shown to the right and left of figures in B and D.

A



B



C

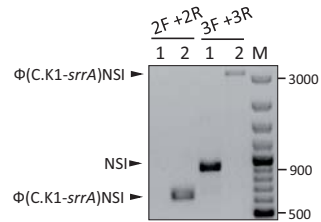


Fig. S4. Mutational analysis of *srrA* in *S. elongatus*. (A) Constructs for inactivation (left) or ectopic expression (right) of the *srrA* gene. Positions of relevant primers are indicated by black arrows. (B) PCR analysis of wild-type (WT) and SrrAS (SrrA⁻) strains. Lanes 1R, detection of *srrA*/C.S3 junction using primers 1F +1R; Lanes 2R, detection of *srrA* wild-type or *srrA::C.S3* alleles using primers 1F +2R. (C) PCR analysis of wild-type (lanes 1) and CK1SrrAI (lanes 2) strains with the indicated primers to detect wild type and mutant alleles. Other details as in previous figure.

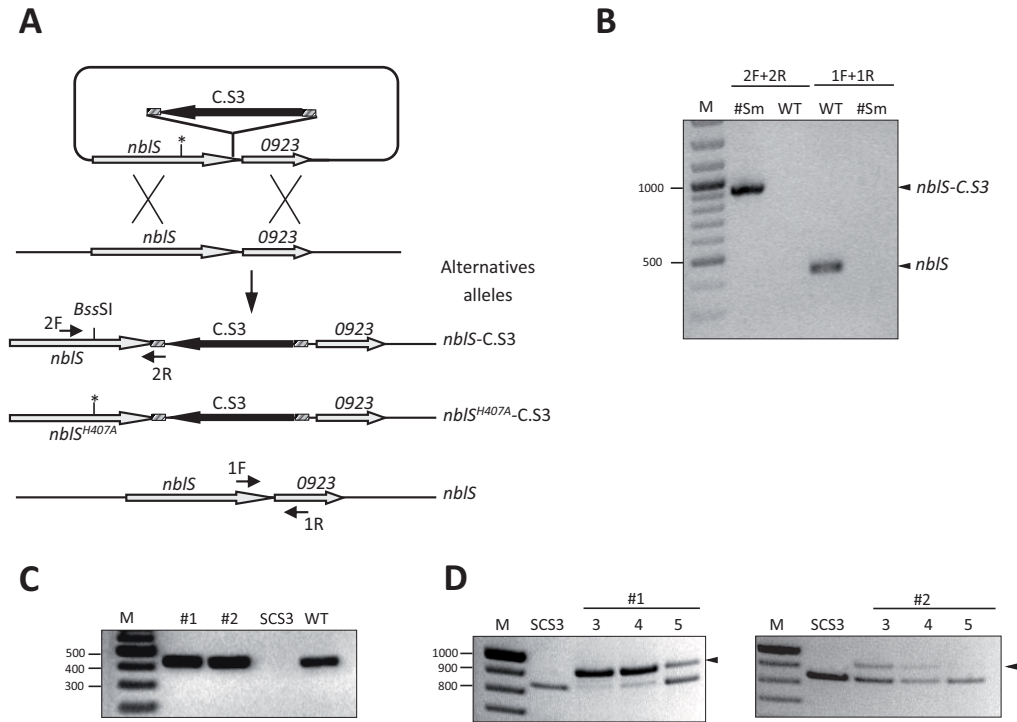


Fig. S5. Generation and analysis of strains NblSCS3 and NblSH407ACS3. (A) Schematic representation of the strategy followed for allelic replacement. Positions of relevant primers are indicated as black arrows and point mutation H407A is denoted by an asterisk. (B) Segregation of *nblS*-C.S3 alleles was confirmed in 68 out of 72 streptomycin-resistant clones. PCR analysis with pairs of primers 2F + 2R and 1F + 1R of recipient control (wild type strain, lanes WT) and a representative streptomycin-resistant clone (lanes #Sm). PCR products corresponding to specific alleles are pointed with an arrowhead at the right. (C) Detection of *nblS* wild type alleles in streptomycin-ampicillin resistant clones derived from pUAGC587 integration event. PCR analysis with primers 1F+1R of NblSCS3 and wild-type strains (lane SCS3 and WT, respectively) and two representative clones (lanes #1 and #2), after five consecutive transfers onto streptomycin plates. (D) Loss of *nblS* point mutation H407A in NblSH407ACS3 strain. RFLP with *BssSI* in control strain NblSCS3 (lane SCS3) and representative clones #1 (left panel) and #2 (right panel). Analyses were carried out on the two selected clones after three, four and five consecutive transfers onto streptomycin containing plates (lanes 3, 4 and 5, respectively). Other details as in previous figures.

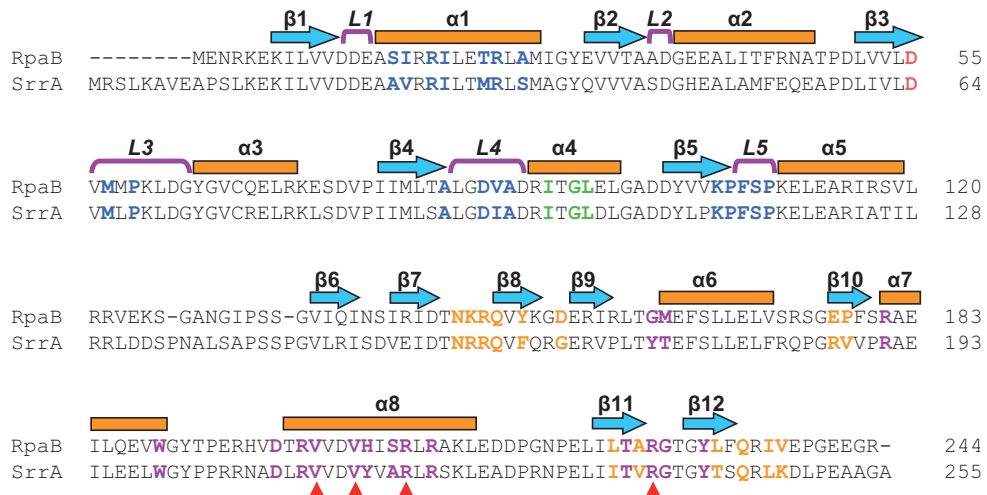


Fig. S6. RpaB and SrrA sequence comparison. Sequences of RpaB and SrrA are aligned and the predicted secondary structure elements are shown above the alignment as orange boxes and blue arrows for α helices and β strands, respectively. The loops surrounding the phosphoacceptor Asp (red lettering) are shown as downward-facing magenta brackets. The residues involved in interaction between the HK catalytic domains and RR receiver domain in the HK853-RR468 complex (Casino et al) are shown in blue lettering, whereas those residues of the RR that are interacting with the HK PAS domain in the ThkA-TrrA complex (Yamada et al) are shown in green lettering. The residues implicated in DNA recognition and protomer-protomer interactions in the PhoB-DNA structure (Blanco et al) are shown in magenta and orange lettering, respectively, and the positions conferring DNA specificity in PhoB are denoted by red arrowheads.

Supporting References

- Bartel P, Chien CT, Sternglanz R, Fields S. 1993. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* **14**(6): 920-924.
- Elhai J, Wolk CP. 1988. A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene* **68**(1): 119-138.
- Espinosa J, Castells MA, Laichoubi KB, Forchhammer K, Contreras A. 2010. Effects of spontaneous mutations in PipX functions and regulatory complexes on the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *Microbiology* **156**(Pt 5): 1517-1526.
- Espinosa J, Fuentes I, Burillo S, Rodriguez-Mateos F, Contreras A. 2006. SipA, a novel type of protein from *Synechococcus* sp. PCC 7942, binds to the kinase domain of NblS. *FEMS Microbiol Lett* **254**(1): 41-47.
- Gupta RS, Mathews DW. 2010. Signature proteins for the major clades of Cyanobacteria. *BMC Evol Biol* **10**: 24.
- Hanahan D. 1985. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. in *DNA cloning* (ed. e Glover D), pp. 109-135. IRL Press, Oxford, UK.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**(4): 805-816.
- James P, Halladay J, Craig EA. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**(4): 1425-1436.
- Karimova G, Dautin N, Ladant D. 2005. Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol* **187**(7): 2233-2243.
- Marinus MG, Morris NR. 1973. Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **114**(3): 1143-1150.
- Martinez-Argudo I, Martin-Nieto J, Salinas P, Maldonado R, Drummond M, Contreras A. 2001. Two-hybrid analysis of domain interactions involving NtrB and NtrC two-component regulators. *Mol Microbiol* **40**(1): 169-178.
- Martinez-Argudo I, Salinas P, Maldonado R, Contreras A. 2002. Domain interactions on the *ntr* signal transduction pathway: two-hybrid analysis of mutant and truncated derivatives of histidine kinase NtrB. *J Bacteriol* **184**(1): 200-206.
- Roder KH, Wolf SS, Schweizer M. 1996. Refinement of vectors for use in the yeast two-hybrid system. *Anal Biochem* **241**(2): 260-262.
- Ruiz D, Salinas P, Lopez-Redondo ML, Cayuela ML, Marina A, Contreras A. 2008. Phosphorylation-independent activation of the atypical response regulator NblR. *Microbiology* **154**(Pt 10): 3002-3015.
- Salinas P, Ruiz D, Cantos R, Lopez-Redondo ML, Marina A, Contreras A. 2007. The regulatory factor SipA provides a link between NblS and NblR signal transduction pathways in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol Microbiol* **66**(6): 1607-1619.
- Stols L, Gu M, Dieckman L, Raffin R, Collart FR, Donnelly MI. 2002. A new vector for high-throughput, ligation-independent cloning encoding a tobacco etch virus protease cleavage site. *Protein Expr Purif* **25**(1): 8-15.
- Studier FW. 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**(1): 207-234.

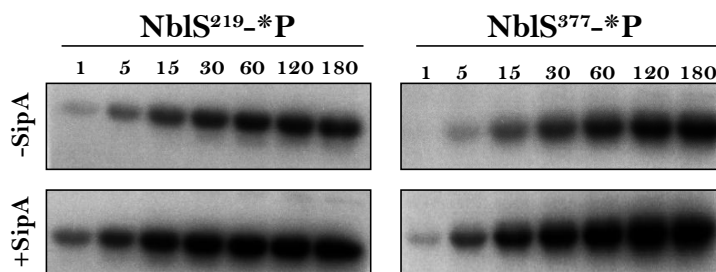
4.2.6. Papel de SipA en en las reacciones catalizadas por NblS

En apartados anteriores, nuestro trabajo ha postulado un posible papel estabilizador de SipA hacia NblS, y el trabajo realizado por el grupo de Suzuki, I. ha mostrado que SipA es capaz de activar la autofosforilación de NblS en *Synechocystis* (Sakayori et al., 2009). Quisimos dar un paso más y estudiar si SipA realizaba la misma función en *Synechococcus*, y si el complejo formado por NblS-SipA estaba afectando a otras de las funciones en las que NblS estaba involucrada.

4.2.6.1. Actividad de autofosforilación de NblS

Lo primero que investigamos fue si SipA afectaba a la actividad de autofosforilación de NblS en *Synechococcus*. Evaluamos la autofosforilación de las dos formas de NblS (NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ y NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴) presentadas en apartados anteriores en presencia de SipA usando [γ -³²P]-ATP. Para ello ambos constructos de NblS (NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ y NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴) se incubaron con cantidades equimoleculares de SipA, se inició la reacción por la adición del nucleótido y las reacciones se pararon a diferentes tiempos. Como se muestra en la figura 31, ambos ensayos de autofosforilación mostraron perfiles similares a los obtenidos en ausencia de SipA.

A



B

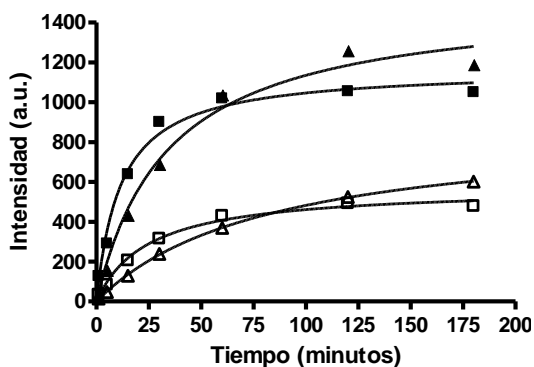


Figura 31. Autofosforilación de NblS en complejo con SipA. A) NblS²¹⁹ (izquierda) y NblS³⁷⁷ (derecha) recombinantes (previa incubación con SipA) fueron incubadas con [³²γP] ATP (0.3mM) y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos. Las muestras fueron separadas en un gel SDS-PAGE, visualizadas por autoradiografía y cuantificadas por Phosphor-Imager. Los valores obtenidos para estas actividades se muestran representados en B) A la izquierda se muestran las representaciones gráficas de las actividades de ambas HKs en presencia de SipA y a la derecha las representaciones gráficas de las actividades de ambas HKs en ausencia de SipA. (□NblS²¹⁹-664; ■NblS²¹⁹-664+SipA; Δ NblS³⁷⁷-664; ▲NblS³⁷⁷-664+SipA).

Un análisis más profundo de los parámetros cinéticos de la reacción utilizando la porción citoplasmática completa de NblS (NblS²¹⁹-

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

⁶⁶⁴) mostró que en presencia de SipA tanto su K_m como su K_{cat} se veían afectadas. SipA inducía un aumento de dos órdenes de magnitud en la afinidad de NblS por el ATP al pasar su K_m de $375 \mu\text{M}$ en ausencia de esta proteína a $4,1 \mu\text{M}$ en su presencia. Del mismo modo la V_{max} de la reacción se veía afectada, aunque en menor manera, al incrementar esta 4,26 veces, pasando a ser 1.476×10^{-12} moles/minuto en presencia de SipA siendo de 3.461×10^{-13} moles/minuto en su ausencia (Tabla 6). Por todo ello SipA inducía un aumento de la eficiencia catalítica de NblS, mostrando NblS en su presencia una K_{cat} de $0,0729 \text{ min}^{-1}$, más cercana a las que presentan otras HKs. Indicando que en ausencia de SipA, NblS es una HK con muy baja actividad catalítica. Estos resultados amplían las observaciones presentadas por Sakayori y colaboradores que tan solo indicaban que SipA inducía un aumento de la actividad de NblS pero no entraba a estudiar su causas en profundidad (Sakayori et al., 2009).

NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴		
	-SipA	+SipA
K_m	375 μM	4,1 μM
K_{cat}	0,0016 min^{-1}	0,079 min^{-1}
V_{máx}	$3,461 \times 10^{-13}$	$1,476 \times 10^{-12}$

Tabla 6. Constantes cinéticas de NblS en presencia y ausencia de SipA

4.2.6.2. SipA no afecta a la actividad de fosfotransferencia de NblS

Después de comprobar que SipA afectaba a la actividad de autofosforilación de NblS, nos preguntamos si también podría influir en las demás reacciones catalizadas por esta enzima. En primer lugar abordamos el estudio de la actividad de fosfotransferencia del grupo fosforilo hacia sus RRs compañeros.

Para evaluar la actividad de fosfotransferencia tanto NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ como NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ se pre-incubaron con cantidades equimoleculares de SipA y posteriormente fueron fosforiladas con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ durante 1 hora, el ATP libre fue eliminado mediante cromatografía de exclusión molecular. Por último, RpaBRD y SrrARD fueron añadidos, y el nivel de fosforilación de estos fue evaluado, a diferentes tiempos, por electroforesis. Como control de la reacción se incluyó el RR RpaARD.

Como se observa en la figura 32 y de acuerdo con los resultados obtenidos en ausencia de SipA y presentados en apartados anteriores, la defosforilación de ambos constructos de NblS también se asoció con la detección de las formas fosforiladas de RpaBRD y SrrARD, pero no de RpaARD. De la misma manera, también se observaron las diferencias encontradas en las formas fosforiladas de ambos reguladores, donde la disminución en el nivel de fosforilación de NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ se asociaba con un aumento del nivel de fosforilación de los RRs, pero no ocurría lo mismo en el caso de NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴, evidenciando la actividad fosfatasa de este último constructo atribuible a los dominios HAMP/PAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

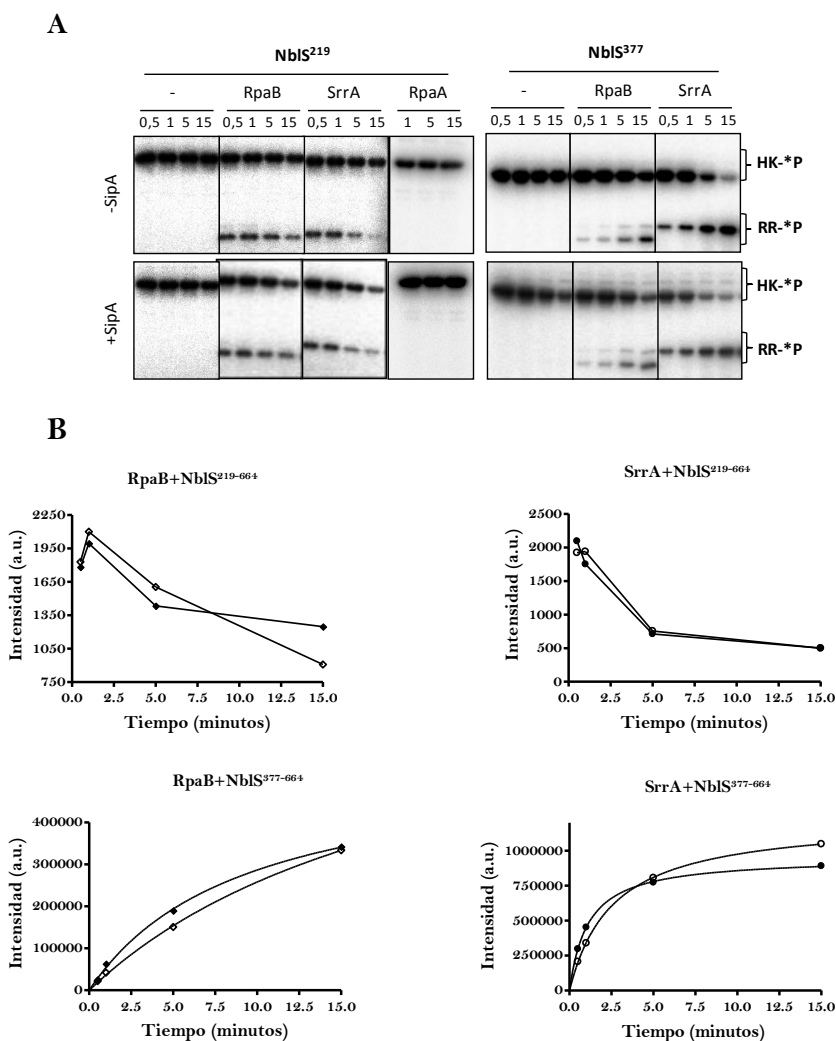


Figura 32. Efecto de SipA en las reacciones de fosfotransferencia de NblS hacia sus RR diana. A) Tanto NblS²¹⁹ como NblS³⁷⁷ (3.4μM, previa incubación con SipA), fueron fosforiladas durante 1 hora, posteriormente se añadieron cantidades equimoleculares de cada RR (3.4μM) con excepción de RpaA que solo fue testada con NblS²¹⁹, y las reacciones fueron paradas a diferentes tiempos. B) Representación gráfica de la fosforilación de cada RR como consecuencia de la fosfotransferencia desde las HKs, tanto en presencia como en ausencia de SipA. (◇RpaB; ◆RpaB + SipA; ○SrrA; ●SrrA + SipA)

Cuando comparamos los valores de defosforilación de ambas HKs en ausencia y presencia de SipA (Figura 32) observamos que los perfiles de defosforilación, y por lo tanto de fosfotransferencia hacia sus RRs, son similares, del mismo modo si comparamos los niveles de fosforilación de ambos RR en ausencia y presencia de SipA (Figura 32) también observamos que los perfiles de fosforilación son similares no existiendo diferencias significativas tras la adición de SipA.

En suma, los resultados obtenidos en presencia de SipA indican que los ratios de fosfotransferencia son similares a los encontrados en ausencia de SipA y por lo tanto que SipA no influye en la reacción de fosfotransferencia desde la HK hacia su RR socio.

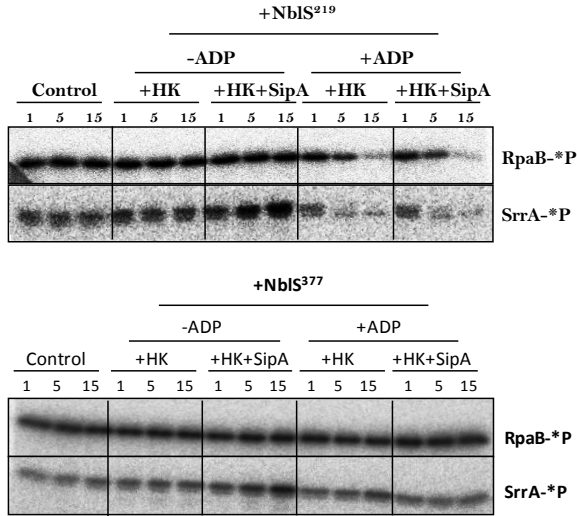
4.2.6.3. Evaluación de la defosforilación de RpaB y SrrA en presencia de SipA

Después de comprobar que la presencia de SipA no influía en la actividad de fosfotransferencia, abordamos el estudio de su efecto en la actividad fosfatasa de NblS.

Para estudiar la defosforilación de RpaB~P y SrrA~P en presencia de SipA, ambos reguladores fueron fosforilados durante 1 hora usando un pequeño fosfodoador acetilfosfato [AcP] marcado con ^{32}P . Cuando ambos RR~P fueron incubados con NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ y NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴, en presencia de SipA, los resultados obtenidos mostraban perfiles similares a los encontrados en ausencia de SipA, indicando que SipA tampoco influía en la actividad fosfatasa de NblS hacia sus RRs socios (Figura 33).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A



B

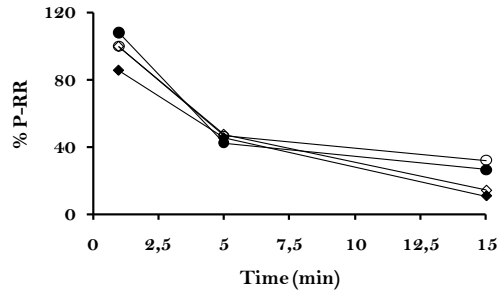


Figura 33. Efecto de SipA en la actividad fosfatasa de NblS. A) 2,8µM de RpaBRD y SrrARD fueron fosforilados con ³²P-AcP durante 1 hora, posteriormente se incubaron con cantidades equimoleculares de NblS²¹⁹ y NblS³⁷⁷ (previamente incubados con SipA) en presencia y ausencia de 1mM de ADP, diferentes alícuotas fueron tomadas a distintos tiempos. **B)** Comparación de la defosforilación, de ambos reguladores, en presencia y en ausencia de SipA, debido a la actividad fosfatasa de NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ dependiente de nucleótido. (◇RpaB; ◆RpaB+SipA; ○SrrA; ●SrrA+SipA).

Al igual que ocurría en ausencia de SipA, el constructo más pequeño (NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴) no exhibía esta actividad fosfatasa, confirmando de nuevo, el requerimiento de la región HAMP-PAS, presente en el constructo NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴, para dicha actividad. Resaltar, que al igual que en ausencia de SipA, esta actividad fosfatasa era dependiente de nucleótido.

4.2.6.4. SipA no influye en la preferencia de NblS por fosfotransferir a sus RRs diana.

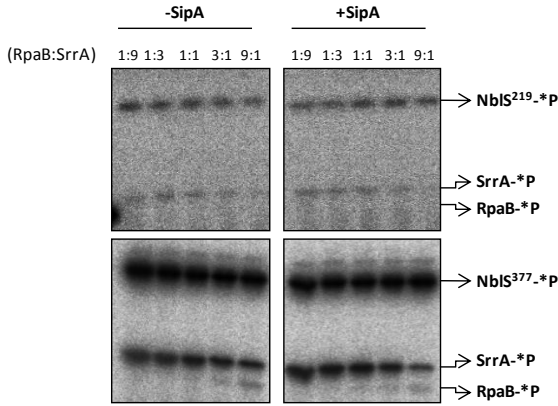
En apartados anteriores vimos que cuando ambos reguladores se mezclaban y se ponían en presencia de NblS, ésta exhibía una clara preferencia por fosfotransferir a SrrA frente a RpaB, mientras que en el caso de su actividad fosfatasa, NblS defosforilaba por igual a ambos reguladores no teniendo preferencia por ninguno.

Para investigar si la presencia de SipA influía en la preferencia que NblS tenía por fosfotransferir a SrrA frente a RpaB, tanto NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴ como NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴, fueron fosforiladas en presencia de SipA durante 1 hora con [γ -³²P]-ATP, e incubadas con diferentes ratios moleculares de RpaBRD y SrrARD, y las distintas reacciones fueron paradas a los 2 minutos del comienzo de la reacción.

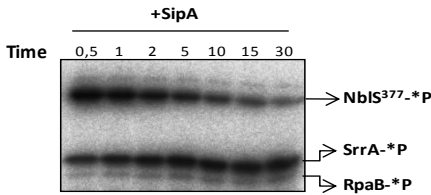
Al igual que en ausencia de SipA, SrrA~P fue la proteína mayoritariamente fosforilada, incluso cuando el ratio RpaB/SrrA era de 9:1 (Figura 34A).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A



B



C

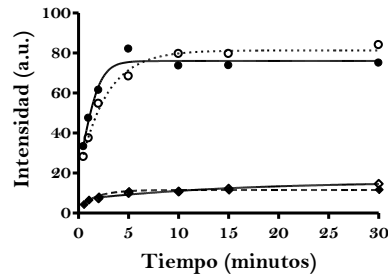


Figura 34. Efecto de SipA en la preferencia de NblS hacia SrrA frente a RpaB. A) NblS²¹⁹ y NblS³⁷⁷ en presencia y ausencia de SipA fueron fosforiladas durante 30 minutos con γ -³²P-ATP (0.3mM), alícuotas independientes fueron incubadas con un exceso molar (10x) de una mezcla de RpaB:SrrA en diferentes ratios molares. Las reacciones fueron paradas a los 2 minutos y las especies fosforiladas fueron visualizadas por autoradiografía en un gel SDS-PAGE. B) NblS³⁷⁷ fosforilado en presencia de SipA como en (A) y mezclado en cantidades equimolares con RpaB y SrrA (la concentración final de ambos reguladores representaba el doble de la de NblS). La reacción de fosfotransferencia fue visualizada mediante radiografía y cuantificada mediante Phosphor-Imager. C) Representación gráfica de las fosforilaciones de ambos reguladores debido a la fosfotransferencia desde NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ en presencia y ausencia de SipA. (○ RpaB; ● RpaB+SipA; ◇ SrrA; ◆ SrrA+SipA).

Esta preferencia fue confirmada cuando NblS³⁷⁷⁻⁶⁶⁴ ~P, en presencia de SipA, fue incubada con cantidades equimoleculares de ambos reguladores y la reacción fue parada a diferentes tiempos hasta 30 minutos. Igual que veíamos en ausencia de SipA, SrrA era el regulador preferentemente fosforilado frente a RpaB. Mientras que SrrA~P podía ser detectado sin problemas a los 30 segundos del inicio de la reacción aumentando en el transcurso de la misma, RpaB ~P aparecía como una tenue banda que se mantenía constante a lo largo de toda la reacción sin aumentar en ningún momento (Figura 34B). De nuevo la cantidad de RpaB fosforilado suponía un 13-17% respecto a la fosforilación de SrrA, confirmando todo esto la preferencia en la fosfotransferencia de NblS hacia SrrA.

Aunque los datos presentados en el apartado 4.2.6.3 indicaban que SipA no tiene efecto en la reacción de defosforilación mediada por NblS, decidimos investigar si lo tenía en la preferencia de NblS por defosforilar a uno de sus RRs. Para tal fin se procedió a la realización de ensayos de competición con NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴. Para ello, RpaBRD y SrrARD fueron fosforilados con ³²P-AcP y mezclados en cantidades equimoleculares con cantidades subestequiométricas (10:1 RR:HK) de NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴, previamente incubada con SipA, en presencia de ADP (Figura 35).

Como se puede ver en la figura 36, la defosforilación de ambos reguladores presentaba ratios similares a los encontrados en ausencia de SipA, no mostrando ninguna preferencia por defosforilar a ningún regulador. Por lo tanto, la presencia de SipA no tiene efecto en el reconocimiento de NblS hacia sus RR diana.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

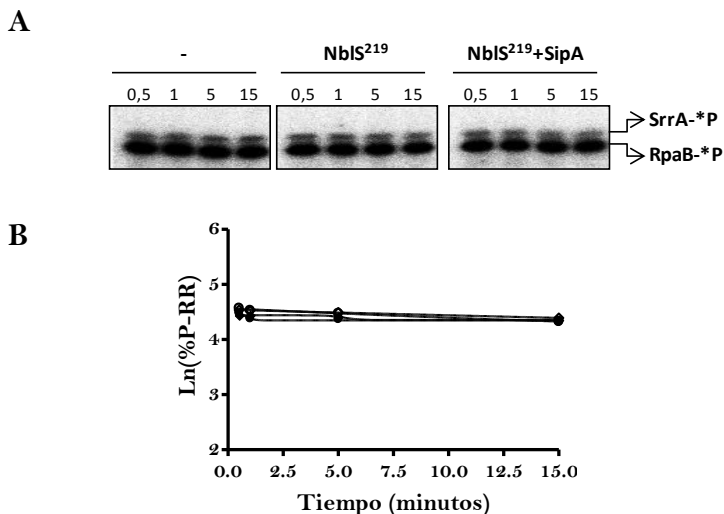


Figura 35. Actividad fosfatasa de NblS. **A)** Como se observa en la figura, NblS en presencia de SipA no tiene preferencia por ninguno de los dos reguladores a la hora de defosforilarlos. Tanto RpaB como SrrA fueron fosforilados con [³²P] acetil-fosfato e incubados con NblS²¹⁹⁻⁶⁶⁴, en complejo con SipA, en una relación molar HK/RR de 1/10, en presencia de 1mM de ADP. **B)** Las bandas correspondientes a los reguladores fosforilados fueron cuantificadas y representadas como el Ln del porcentaje de RR-P a tiempo cero en ausencia de NblS.

Discusion

Los resultados aportados aquí sugieren que SipA tiene un efecto muy importante en el aumento de la afinidad, por parte de NblS, del nucleótido y algo menor en la Vmax, lo que indica que SipA ayudaría a que el lugar de unión del ATP se conformase, más que inducir cambios en la conformación del enzima que produjesen un acercamiento del nucleótido y la His fosforilable. Este papel es consistente con los bajos

ratios de autofosforilación y fosfotransferencia de NblS observados *in vitro* en ausencia de SipA.

Aunque SipA afectaba a la actividad de autofosforilación de NblS, también vimos que esta no tenía ningún efecto sobre las otras reacciones, indicando que su unión a NblS no debe modificar para nada los sitios de unión de estas proteínas y por lo tanto no debe interactuar con ellas. Los ensayos de doble híbrido en levaduras llevados a cabo por el laboratorio de la Dra. Asunción Contreras, usando SipA como cebo frente a múltiples clones de longitud variable de NblS, pusieron de manifiesto que la zona donde SipA interactuaba con NblS era el dominio C-terminal de unión a ATP (Espinosa et al., 2006). De acuerdo con esto, si nos fijamos en la secuencia de NblS observamos su dominio CA posee una inserción y posiblemente, esta inserción podría estar involucrada en el reconocimiento y la unión entre NblS y SipA, lo que estaría de acuerdo con todo lo anterior, ya que si la unión ocurriese en otra zona de NblS, posiblemente se verían afectadas otras actividades además de la autofosforilación.

4.3. BUSQUEDA DE INHIBIDORES DE HISTIDINA QUINASAS

4.3.1. Acoplamiento de compuestos pequeños

En los últimos años, los procesos de cribado para identificar nuevos compuestos con propiedades farmacéuticas deseables han sufrido una revolución. Los avances recientes en biología celular y molecular han posibilitado la identificación, clonaje, y expresión de numerosas y novedosas dianas. Las mejoras en la automatización de ensayos y en el proceso de computación de los datos han permitido también un enorme incremento en el rendimiento de los ensayos de cribado, tanto biológico como informático. En resumen, todos estos avances tienen el potencial suficiente para impactar diversas áreas del conocimiento en el descubrimiento de drogas.

El acoplamiento (*docking*) molecular es un método computacional que analiza formas de unión entre ligandos potenciales (un fármaco) y un blanco macromolecular cuya estructura es conocida experimentalmente. Particularmente, el acoplamiento molecular se aplica para encontrar la orientación y posición de un ligando en su diana macromolecular mediante cálculos matemáticos llevados a cabo por herramientas informáticas, sin conocer datos experimentales del resultado final, es decir, la estructura tridimensional de la unión ligando-receptor. Esta última es normalmente estudiada por cristalografía de rayos X. Nuestro objetivo fue servirnos de estas herramientas para identificar alguna molécula que nos sirviese como punto de partida para el diseño racional de antibióticos utilizando como dianas moleculares los TCS. En paralelo a estos ensayos de acoplamiento se realizaron ensayos cristalográficos

partiendo de compuestos ya descritos en la literatura como posibles inhibidores de los TCS, tales como geldanamicina, radicicol o novobiocina (Lafitte et al., 2002, Roe et al., 1999, Besant et al., 2002).

La realización de estos estudios de modelización molecular con estructuras cristalizadas del dominio CA de HKs, depositadas en el PDB, nos ayudaría a encontrar pequeñas moléculas que pudiesen bloquear la interacción de la molécula del ATP con este dominio CA y por lo tanto inhibir la autofosforilación de la HK.

Dada la esencialidad y ubicuidad de los sistemas de dos componentes, numerosos estudios han propuesto a las proteínas que los conforman como excelentes dianas para el diseño de inhibidores (Stephenson *et al.*, 2000). En concreto, moléculas que se unan al centro catalítico de las HKs, compitiendo con la molécula de ATP (sustrato natural) y que impidan su autofosforilación actuarían como potentes inhibidores (Figura 36). Estudios de modelado estructural fueron llevados a cabo usando los dominios de unión a ATP de tres histidina quinasas, cuyas estructuras cristalinas se encontraban resueltas y depositadas en el PDB: PhoQ (PDB:1IDO), HK853 (PDB:2C2A) y NRII (PDB:1R62). En el caso de HK853, contábamos con dos estructuras: una de ellas resuelta en solitario (PDB:1IDO) y la otra en complejo con su regulador de la respuesta RR468 (PDB:3DGE). Ambas estructuras se incluyeron en el estudio.

La herramienta computacional elegida para llevar a cabo el estudio fue el programa AutoDock 3.0. Este programa está diseñado para predecir como pequeñas moléculas, como drogas ó sustratos candidatos, se unirán a un receptor (proteína) de estructura tridimensional conocida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Consta de dos programas distintos, AutoDock y AutoGrid (Morris GM & RK, 1998). El primer módulo, AutoDock, realiza el acoplamiento del ligando con la proteína, previamente definida mediante unas coordenadas geométricas llamadas redes o grid, y el segundo, AutoGrid, se encarga de calcular estas redes. Autodock 3.0 toma al componente donde se va acoplar la pequeña molécula (en nuestro caso la proteína) como un cuerpo rígido, por lo que el uso de diferentes estructuras que presenten el mismo sitio de unión o de diferentes conformaciones de la misma proteína pueden servir como reflejo de la flexibilidad intrínseca de la molécula o de variaciones de este centro activo. Por este motivo, además de incluir las estructuras de todos los dominios CA de HKs conocidos, se decidió incluir en el estudio la misma HK incluyendo y excluyendo la tapadera del ATP en el caso que hubiera sido trazada. La tapadera del ATP es una región poco conservada en secuencia y longitud que cubre el nucleótido interaccionando con éste y cuya conformación es altamente variable y dependiente de si la molécula de ATP está presente así como de la interacción con otros dominios de la HK y/o de su complejo con el RR diana (Bilwes *et al.*, 2001, Casino *et al.*, 2009).

Contábamos con recursos computacionales limitados y no muy potentes, y el cálculo de las energías de acoplamiento de un solo compuesto con una estructura concreta tardaba alrededor de 15 minutos. Esto suponía demasiado tiempo teniendo en cuenta la cantidad de ligandos existentes en diferentes bases de datos y que el estudio se realizaría con 6 estructuras distintas. Para poder realizar el estudio en un plazo de tiempo aceptable empleamos una colección reducida de pequeñas moléculas pero que era representativa de un amplio número de

farmacóforos. Esta base de datos denominada “Diversity set”, se deriva de un prefiltro de alrededor de 140.000 compuestos disponibles en el “National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program” por selección de farmacóforos representativos. El resultado de este filtro es una lista que incluye 1.990 compuestos. De ésta lista se excluyeron 167 ligandos que contaban con elementos halogenados ya que el programa Autodock tenía dificultad para el cálculo de sus parámetros energéticos.

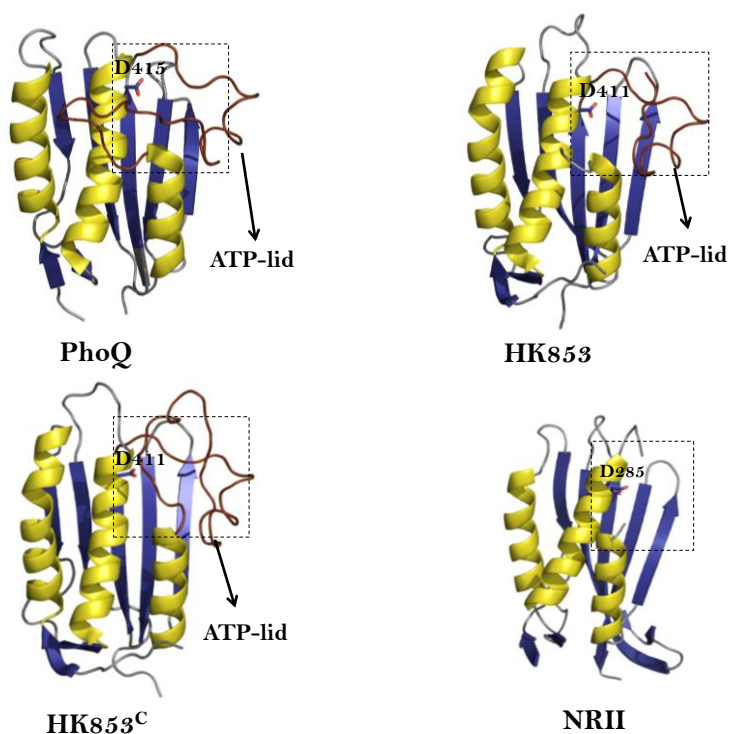


Figura 36. Estructuras del dominio aceptor de las HKs sometidas a estudio. Con línea discontinua se muestra el bolsillo hidrofóbico donde se aloja el nucleótido. En color chocolate se muestra la tapadera del ATP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como paso previo realizamos la simulación de la unión del sustrato natural, ATP, a las proteínas incluidas en el estudio. Este paso nos permitiría validar la robustez del sistema y calcular una energía de unión de referencia. La molécula de ATP fue acoplada en posiciones similares a las encontradas en los diferentes PDBs (en aquellas estructuras que han sido resueltas con este sustrato) validando la aproximación utilizada. Las energías calculadas para la molécula de ATP (Tabla 7) presentaban valores entre 8 y 14 Kcal/mol².

Una vez que teníamos las energías de unión del ATP de cada una de las 6 estructuras y corroboramos que el método utilizado era correcto, procedimos al acoplamiento de los 1823 ligandos de la base de datos “Diversity set” a todas las estructuras cristalinas. Como hemos comentado anteriormente, nuestros recursos computacionales eran limitados y aunque se redujo el número de ligandos candidatos, para completar el estudio se necesitaron más de 1100 horas de computación en una plataforma silicon. Las energías de unión calculadas fueron utilizadas para la creación de una lista de compuestos, donde los mejores candidatos eran aquellos compuestos cuya energía de unión era menor. Para poder normalizar estas energías de unión para cada estructura a estudio, se aplicó la ecuación EBC/EB^{ATP} (EBC = energía de unión de un compuesto; EB^{ATP} = energía de unión para el ATP), donde cocientes positivos y superiores a 1 nos indicarían que estos compuestos presentaban “mejores” energías de unión calculadas que el sustrato natural ATP (Tabla 7). Consideramos como buenos candidatos o candidatos a estudio aquellos compuestos que presentaban energías de

unión normalizadas superiores a 1 para al menos 5 de las 6 estructuras estudiadas.

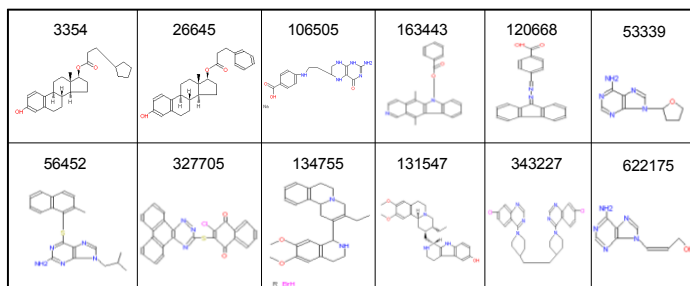


Figura 37. Estructura química de los compuestos seleccionados por acoplamiento.

Según esta aproximación seleccionamos 12 compuestos que como característica estructural común presentaban un gran número de anillos aromáticos (Figura 37), apareciendo estructuras policíclicas (entre 2 y 4 anillos). Los complejos calculados para cada compuesto seleccionado en las diferentes estructuras fueron visualizados y comparados vía superposición de los dominios CA. Esta superposición mostraba que cada ligando se unía de una forma muy similar a todas las HKs, excepto en el caso de NR11. El pequeño bolsillo hidrofóbico que constituía el dominio CA, donde se inserta el anillo de adenina, se encontraba casi siempre ocupado por la misma porción de la molécula e implicaba a dos o más de estos anillos (Figura 38).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

NCS number	EBC/EBATP												Pos.2
	HK853 ($E_{ATP} = -10,12$)		-HK853C ($E_{ATP} = -13,83$)		+HK853C ($E_{ATP} = -13,07$)		-NR11 ($E_{ATP} = -7,95$)		-PhoQ ($E_{ATP} = -9,62$)		+PhoQ ($E_{ATP} = -12,76$)		
	EBC/EB ^{ATP}	Pos.1	EBC/EB ^{ATP}	Pos.1	EBC/EB ^{ATP}	Pos.1	EBC/EB ^{ATP}	Pos.1	EBC/EB ^{ATP}	Pos.1	EBC/EB ^{ATP}	Pos.1	
3354	1,28	17	1,31	17	1,16	4	1,25	38	1,29	14	1,06	16	16
26645	1,28	16	1,34	12	1,08	23	1,25	41	1,32	10	1,05	17	17
106505	1,12	34	1,12	76	1,04	46	1,11	185	1,23	20	1,01	29	46
163443	1,04	82	1,11	83	1,07	28	1,13	154	1,14	47	0,95	56	67
120668	0,99	152	1	218	1,08	22	1,04	342	1,03	150	1	31	138
56452	1,03	103	1,02	187	0,93	189	1,26	35	1,1	35	1,09	28	90
131547	1,16	24	1,43	2	0,8	680	1,3	23	1,37	8	1,09	13	17
327705	1,08	56	1,02	195	1,12	9	1,19	84	1,2	29	0,97	49	54
134755	1,15	30	1,4	4	0,72	1108	1,25	40	1,23	21	1,04	20	28
343227	1,16	27	1,29	19	1,1	15	1,37	10	1,25	18	0,92	91	20
53339	1,05	75	1,05	157	1,06	37	1,48	5	1,17	37	0,93	72	55

Tabla 7. Resultado del Autodock 3.0. En la tabla se muestran las energías normalizadas para cada uno de los compuestos en cada estructura usada en el estudio, así como la energía de unión de la molécula de ATP a cada una de esas estructuras. (Pos.1= posición del ligando en una estructura concreta con respecto al ATP; Pos.2= posición media del ligando en las seis estructuras sometidas a estudio).

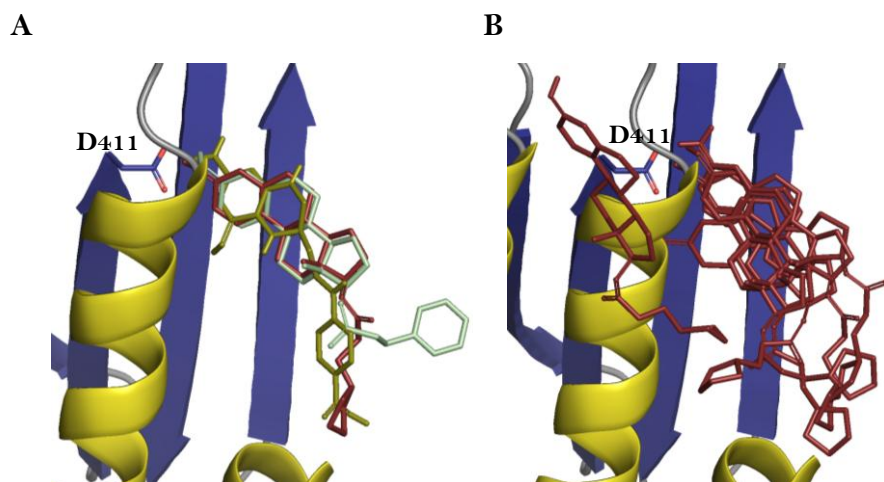


Figura 38. Ejemplo de las mejores soluciones de acoplamiento En la figura (A) vemos como el conjunto de anillos, de tres (rubí 3354, azul claro 26645 y verde 106505) de los 11 ligandos, se aloja en el interior del dominio aceptor de la HK853. En (B) podemos ver la posición del compuesto 3354 en todas estructuras sometidas a estudio. El compuesto que no se inserta en el centro activo correspondía al cálculo con NR11.

El análisis de las energías de unión de la tabla 4 indicaba que 3 de los 11 compuestos poseían energías de unión superiores a la del ATP en las 6 estructuras sometidas a estudio. De estos tres ligandos, dos de ellos eran muy similares, variando tan solo un grupo pentano por un grupo hexano, indicando que el programa era robusto ya que generaba soluciones similares para compuestos similares (Figura 39). Además, la visualización de los resultados de los acoplamientos mostró que la región que se alojaba en el sitio de unión del ATP era la parte común de estos compuestos, reforzando los resultados obtenidos.

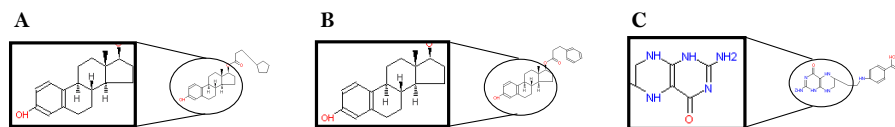


Figura 39. Estructuras de los mejores compuestos de docking. En la figura se representa los compuesto con mejores energías de unión que el nucleótido para todas las estructuras, aumentando el conjunto de anillos que ocupa el bolsillo de unión para la adenina.

4.3.2. Análisis *in vitro* de los compuestos candidatos

Una de la ventajas de la base de datos NCI-diversity es que los compuestos que la componen son libremente suministrados por el NCI, aunque en cantidades limitadas (~10 mg). Una vez obtenidos de esta fuente, observamos que todos los compuestos candidatos presentaban muy baja o nula solubilidad en agua, obstaculizando esta propiedad el análisis de su actividad bajo condiciones habituales de ensayo. Estos compuestos sólo eran solubles en disolventes orgánicos y se decidió el uso del DMSO, al 100%, para su completa disolución.

Por facilidades de producción de proteína y optimización de los ensayos de actividad, decidimos testar los diferentes inhibidores utilizando cuatro HKs diferentes: HK853 (*T.marítima*), DcuS (*E.coli*), SrrB (*S.aureus*) y NRII (*E.coli*). El hecho de tener que disolver estos compuestos en DMSO nos obligó a tener que evaluar el efecto del DMSO sobre la actividad de autofosforilación de las HKs con las que trabajaríamos. Para ello medimos la actividad de autofosforilación de todas ellas, utilizando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, en presencia de diferentes

concentraciones de DMSO. Los ensayos mostraron que la HK que en menor medida veía afectada su autofosforilación a una concentración de DMSO del 10%, era HK853, siendo, por este motivo, junto con la facilidad que presentaba su producción y purificación, la HK utilizada de forma prioritaria para testar estos compuestos (Figura 40).

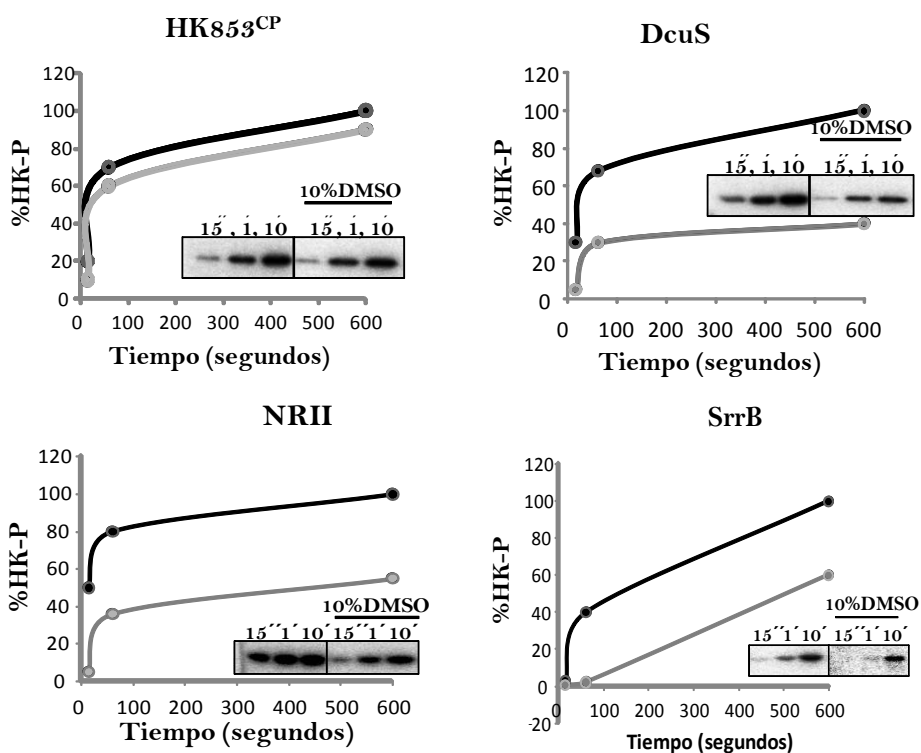


Figura 40. Ensayo representativo del efecto del DMSO en la actividad de diferentes HKs. Se midió la fosforilación de las distintas HKs hasta 10 min (valro que representa el 100 % de fosforilación) en presencia de 10 % DMSO (gris) o en su ausencia (negro). En los insertos se muestra los gels a partir de los se realiza la cuantificación

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como hemos dicho, estos compuestos eran poco solubles en soluciones acuosas, por lo tanto los resultados obtenidos de los ensayos de inhibición llevados a cabo, suponen un dato orientativo y no un valor absoluto, ya que no conocemos en realidad la cantidad de compuesto disuelto a las concentraciones de DMSO (10%) en las que se realizó el ensayo. Los ensayos de IC₅₀ se realizaron con la HK853^{CP} a una única concentración de ATP y concentraciones crecientes de los compuestos (ver materiales y métodos). Como vemos en la figura 41 el 45% de los compuestos presentaban valores de IC₅₀ mayores de 1 mM y el resto, con la excepción del compuesto 3354, daban valores del orden del micromolar aunque cercanos al milimolar. El compuesto 3354 presentaba un valor de IC₅₀ cercano a 30 μ M perfilándose como un buen candidato de partida para el rediseño dirigido, mediante estudios cristalográficos en nuestro caso, de un inhibidor con alta actividad.

COMPUESTO	IC ₅₀
120.688	744,8 μ m
163443	165,3 μ m
131547	>1mM
106505	257,5 μ m
327705	>1mM
53339	425,7 μ m
56452	>1mM
3354	27,97 μ m
622175	320 μ m
26645	>1mM
343227	>1mM

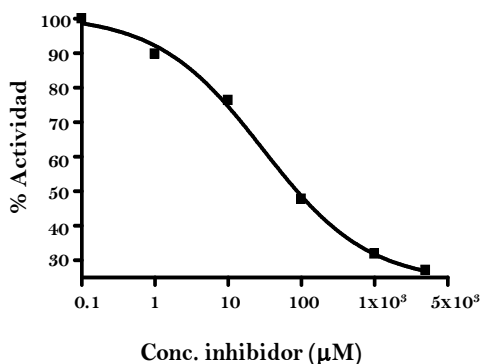


Figura 41. Valores de IC₅₀. En la tabla se muestran los valores de IC₅₀ para cada uno de los 11 compuestos candidatos sometidos a estudio (Izquierda). Ejemplo de un ensayo de IC₅₀ con el inhibidor 3354 (derecha).

Los altos valores de IC₅₀ indicarían que la unión de 9 de los 11 compuestos a HK853 era muy débil o nula. Como vemos en la figura 37, los compuestos presentaban estructuras complejas con múltiples anillos aromáticos y los ensayos de acoplamiento mostraron que tan solo de 2 a 4 de estos anillos se alojaban en el bolsillo hidrofóbico de las HKs. Estas porciones de los compuestos que no interaccionan con la proteína podrían estar impidiendo ó tal vez disminuyendo su unión a la HK y por lo tanto siendo la responsable de los elevados valores de IC₅₀, aparte del problema de la solubilidad de estos compuestos que nos podrían llevar a calcular IC₅₀ sobrevalorados.

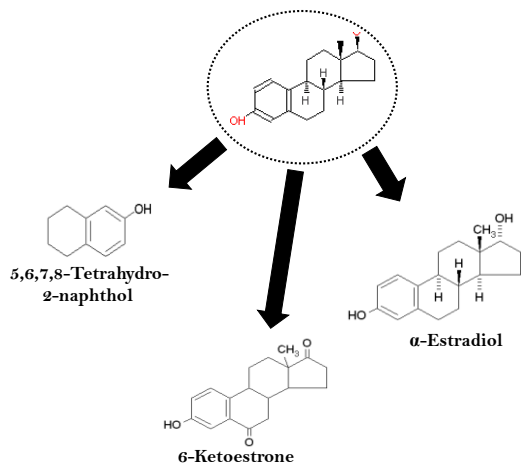
Como alternativa a estos problemas se buscaron y adquirieron compuestos comerciales que fuesen más solubles en soluciones acuosas y con estructuras más simples. Tras visualizar los complejos propuestos por Autodock decidimos utilizar compuestos que tan solo conservasen la mayor parte del conjunto de anillos que penetraba en el bolsillo hidrofóbico del sitio de unión al nucleótido de las HKs (Figura 39). Sin duda el posible número de compuestos a ensayar era amplísimo por lo que nos limitamos a los derivados de los tres compuestos (3354, 26643 y 106505) comunes a todas las proteínas a estudio.

De estos tres compuestos dos de ellos eran muy similares, tan solo existía un pequeño cambio de un ciclopentano por un ciclohexeno en la zona que no interaccionaba con las HKs. La visualización de las estructuras mostró que ambas introducían el grupo naftol en el bolsillo hidrofóbico de la HK mientras que el tercer compuesto, 106505, se observó que el grupo introducido era pteridina. De este modo se

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

eligieron derivados del grupo naphthol y el grupo pteridina para los diferentes ensayos.

A



B

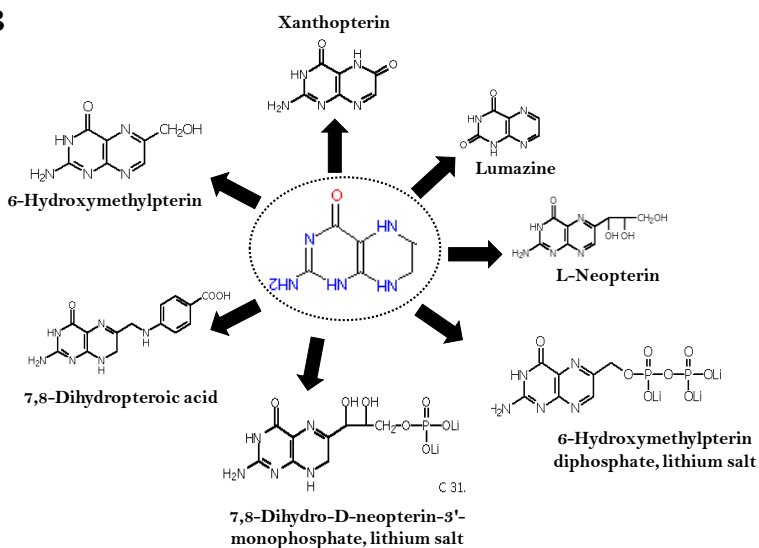


Figura 42. Compuestos elegidos a partir de los resultados derivados del acoplamiento. En la figura se muestran las estructuras de los compuestos elegidos a partir de la porción los ligandos 3364 y 26645 (A) y 106505 (B) que se insertaba en el bolsillo de unión a adenina de las HKs en los ensayos de acoplamientos.

Para los derivados del naftol se utilizaron compuestos derivados del estradiol, ya que eran estructuralmente similares al conjunto de anillos que se introducía dentro del bolsillo hidrofóbico. (Figura 42A). Dentro del grupo pteridina se evaluaron desde compuestos básicos, como la Xanthopterina, hasta otros más complejos que trataban de imitar la molécula de ATP como la 6-Hydroxymethylpterin diphosphate (Figura 42B).

Debido al volumen de compuestos que manejábamos en este momento nos fue materialmente imposible evaluar la IC₅₀ para todos los compuestos, por lo que decidimos realizar solo ensayos preliminares de inhibición con la HK853 mediante un test básico que consistía en ver la inhibición a concentraciones altas (4mM) de cada compuesto. Estos ensayos mostraron que la mayor parte de estos compuestos inhibían la autofosforilación de HK853.

Aunque estos datos parecían prometedores, aun quedaba por demostrar si la inhibición era específica ya que ha sido descrito que muchos inhibidores de HKs no son verdaderamente inhibidores competitivos, sino que ejercen su acción de forma inespecífica mediando la agregación de la HK (Stephenson et al., 2000). La agregación de la proteína por parte del compuesto daría como resultado la no fosforilación de la misma, llevándonos a una interpretación errónea del resultado y dando como buen inhibidor a un determinado compuesto sin serlo. Para descartar esta posibilidad en los compuestos a estudio, realizamos ensayos preliminares encaminados a evaluar el poder de agregación de estos compuestos. Siguiendo el protocolo descrito por Stephenson y colaboradores((Stephenson et al., 2000), basado en el uso de geles nativos

confirmamos que compuestos como Xanthopterin, L-Neopterin, Acido Tetrahidrohomoopteroico, α -Estradiol y 4-(Metilamino) acido benzoico, producían la agregación de las HKs HK853, NR11, DcuS y SrrB a concentraciones entre 200 μ M y 4mM. Por ello, la inhibición observada se debía a la aglutinación de la proteína y no su inhibición.

4.3.3. Cristalización, difracción y resolución

Sin duda obtener la estructura de una HK unida a alguno de estos compuestos, aunque las constantes de unión e inhibición no fueron muy prometedoras, nos serviría como punto de partida para su mejora tanto desde el punto de vista de su capacidad inhibitoria como para mejorar su solubilidad.

Contábamos en nuestro laboratorio con dos HKs cuya purificación era rápida y sencilla, donde las condiciones de cristalización nos eran conocidas y los cristales que se producían difractaban a alta resolución. Estas proteínas eran el dominio de unión a ATP de CheA (residuos 354-540) y la porción catalítica de HK853^{CP} (residuos 327-479) ambas de *T. maritima*.

Para obtener cristales de estas proteínas con los compuestos revelados por los ensayos de acoplamiento podíamos intentar dos tipos de estrategia:

1. Empapado o “soaking”
2. Co-cristalización

CheA cristalizaba tanto en presencia como ausencia de nucleótido mientras que HK853^{CP} solo cristalizaba en presencia de este (Figura 43).

Como hemos dicho seguimos dos aproximaciones para obtener cristales. La primera aproximación por “soaking” o empapado consistía en obtener cristales de la proteína en ausencia de sustrato, de este modo el centro activo se encontraría vacío. Posteriormente estos cristales se introducirían en solución de cristalización, a la cual se ha añadido el compuesto a estudio, esperando que este compuesto difunda hasta unirse al centro activo. Los cristales de CheA podían obtenerse en ausencia del sustrato por lo que resultaban ideales para esta aproximación.

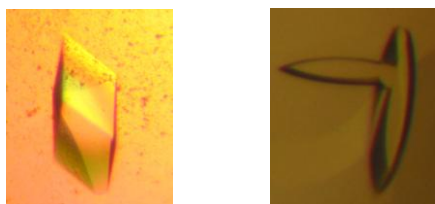


Figura 43. Fotografía de los cristales de CheA y HK853^{CP}. En la figura se muestra los cristales característicos que se obtienen con CheA (izquierda) y HK0853^{CP} (derecha).

La segunda metodología usada era la co-cristalización de una mezcla de proteína-compuesto que implicaba, en la mayor parte de los casos, la búsqueda de condiciones novedosas de cristalización, aunque siempre se testaba la cristalización del complejo en las condiciones ya conocidas. Esta aproximación era más costosa, pero era la única posible de utilizar si la unión del compuesto a la proteína producía cambios conformacionales importantes, de ocurrir esto, la aproximación por empapado no era válida, ya que los cambios destruirían los cristales. Para esta segunda metodología HK853^{CP} era la proteína idónea, ya que solo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

habíamos obtenido cristales cuando el centro activo estaba ocupado, por lo que la aparición de cristales en una condición de cristalización podría indicar que el compuesto a estudio estaba unido al centro activo.

Para la obtención de cristales se siguieron ambas aproximaciones con todos los ligandos con los que contábamos, tanto los obtenidos por acoplamiento como los adquiridos con posterioridad, tras el análisis de sus estructuras, así como con la clorobiocina (descrito como inhibidor de HKs), obteniendo por ambas aproximaciones un gran número de cristales (Figura 44).




























Compuesto	CheA-Cocristalizada	CheA-Soaking	HK853-Cocristalizada
Xanthopterin			
Lumazine			
120688			
56454			
163443			
106505			
L-Neopterin			
Estradiol			
Clorobiocina			
Benzoico			
Ketoestrone			
26645			
3354			
53339			
Napthol			
131547			
327705			
134755			
343227			

Figura 44. Tabla que muestra los cristales obtenidos por las diferentes técnicas así como las proteínas donde se obtuvieron.

En total se difractaron más de 400 cristales. Las pruebas iniciales y los primeros datos de difracción fueron recogidos en un ánodo rotatorio (IBMB, Barcelona) ya que es conocido que la radiación produce radicales libres que dañan el cristal como por ejemplo rompiendo puentes disulfuro o cadenas laterales aromáticas, siendo los compuestos con alto número de anillos muy susceptibles a este daño (Martin Weik*† & Israel Silmani, 1999, Weik & Colletier, 2010). Al recoger los datos en un ánodo rotatorio minimizábamos este problema, aunque posteriormente muchos de ellos fueron difractados en el Sincrotrón ESRF (Grenoble, Francia) para obtener resultados a su máxima resolución.

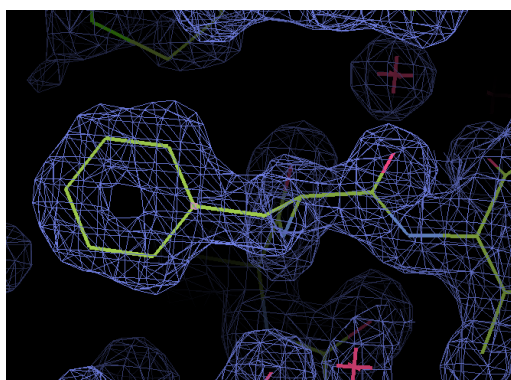


Figura 45. Detalle del mapa de densidad obtenido por ArpWarp para CheA. En la figura podemos ver la alta resolución obtenida para CheA identificándose perfectamente cada residuo. También podemos ver las aguas puestas en lugares donde existe densidad que no corresponde a la proteína.

Los datos de difracción variaban dependiendo de la proteína, en el caso de HK853^{CP} la resolución de los cristales oscilaba entre 2.2 y 2.6 Å, mientras que los cristales que procedían de CheA³⁵⁴⁻⁵⁴⁰ difractaban desde 1.6 hasta 1.8Å. Como ya hemos mencionado, ambas proteínas se

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

encontraban resueltas y depositadas en el PDB, por lo que las diferentes estructuras pudieron ser resueltas por reemplazo molecular.

Como teníamos un volumen muy grande de datos, necesitábamos un método rápido y fiable para poder analizar el contenido del centro activo de cada cristal y comprobar si contenía ó no el ligando correspondiente. Ya que nuestros datos de difracción eran muy buenos podíamos usar el programa ARPwARP para un trazado preliminar y la obtención de un mapa a la máxima resolución que diesen los datos (Figura 45). El mapa que obteníamos de ARPwARP colocaba aguas en las densidades que no podían ser explicadas por la secuencia de la proteína, por lo que si en el centro activo encontrábamos una densidad de diferentes aguas cuya forma se asemejase al compuesto, posiblemente el cristal contuviese dicho ligando. En este caso los datos seguirían un trazado y refinados más exhaustivos.

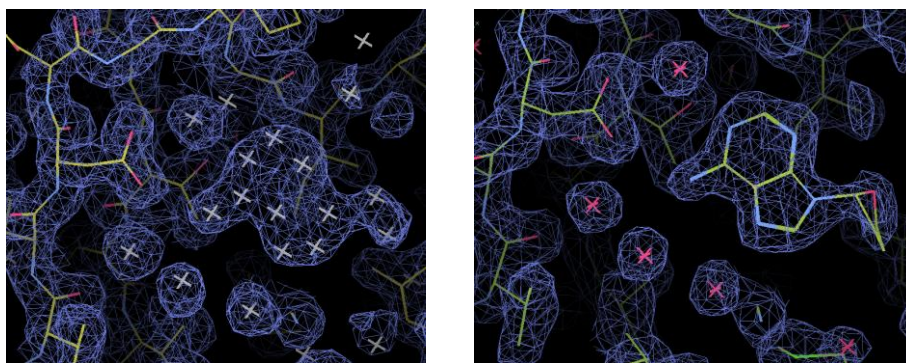


Figura 46. Detalle del centro activo de la HK CheA. (izquierda) densidad electrónica extra que el mapa de ArpWarp nos mostró ubicando en dicha densidad moléculas de agua no siendo atribuible a la secuencia de la proteína; (derecha) ubicación del compuesto 53339 en esta densidad extra.

Después de esta exhaustiva búsqueda y analizar todas las difracciones tan solo se pudo encontrar densidad electrónica atribuible a uno de los ligandos en el centro activo de la HK CheA obtenido por cocrystalización con dicho ligando (Figura 46). En concreto correspondía al ligando, 6-amino-9-(tetrahidro-2-furil)-9H-purina (NCS_53339). El modelo final se construyó utilizando ciclos sucesivos de construcción y refinado con los programas Coot y Refmac5 respetivamente (Tabla 8) (Figura 46).

Datos de difracción		Datos cristalográficos	
λ (Å)	$\lambda = 0.95296$	Grupo espacial	$P2_1$
Rango de resolución	36.81-1.6 (1.68-1.6)	Dimensiones de la celda (Å)	a=40.982 b=59.076 c=66.886
R_{merge} (%)	4.5 (22.8)	Ángulos (°)	$\alpha = \gamma = 90$ $\beta = 97.29$
I/ σ I	21.4 (5.8)	Rango de resolución (Å)	36.81-1.60
Nº reflexiones (observadas/únicas)	208712/50781 (30069/7394)	Datos de refinamiento	
Complejidad	100 (100)	Rcrys (%)	21.5
Multiplicidad	4.1 (4.1)	Rfree (%)	25.6
		Nº de átomos de proteína	3037
		RMSD	
		Desviación de enlace (Å)	0.015
		Desviación de ángulos (°)	1.657
		Media B-factor (Å ²)	16.906
		Mapa Ramachandran	
		Más favorables (%)	97,91%
		Permitidas (%)	2,09%
		Permitidas generosamente (%)	0%
		No permitidas (%)	0%

Tabla 8. Datos de difracción, cristalográficos y del refinamiento del complejo CheA_53339.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este modelo los residuos que unían el compuesto así como las moléculas de solvente implicadas en la unión fueron trazadas sin ambigüedad (Figura 47).

Como se observa en la Figura 47, el compuesto 53339 tenía una base estructural muy similar a la del nucleótido de ATP, en concreto, presentaba el anillo de adenina que ocupaba el mismo lugar que el correspondiente del ATP y un grupo furil que se localizaba en el lugar de la ribosa (Figura 48).

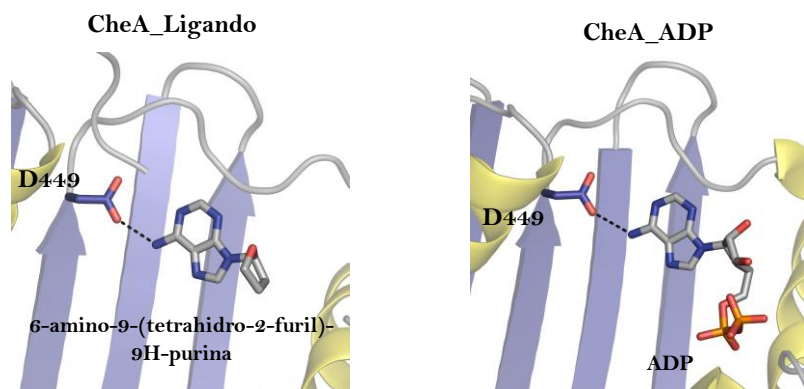


Figura 47. Detalle del bolsillo hidrofóbico de la histidina quinasa CheA en complejo con el ligando NCS_53339 y con la molécula de ADP.

Por su similitud con el sustrato original, este compuesto no podía utilizarse como punto de partida para el diseño de fármacos, aunque este resultado mostraba que la aproximación seguida en este estudio era válida. A su vez los datos indicaban que sería necesario un estudio en mayor profundidad que implicara, por ejemplo, el uso de bibliotecas de compuestos mayores y programas de cálculo que dotasen de flexibilidad a residuos del centro activo. Esta aproximación parecía fuera de nuestro alcance debido a nuestra capacidad técnica y experiencia previa, pero en

colaboración con otros grupos intentamos abordarlos aunque aún no se han generado resultados que puedan ser presentados en esta memoria de tesis.

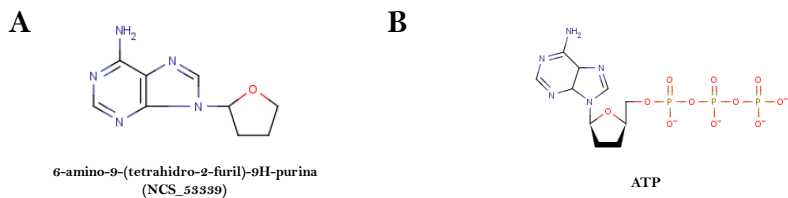


Figura 48. A) Estructura del compuesto 6-amino-9-(tetrahydro-2-furil)-9H-purina, B) estructura de la molécula de ATP.

5. CONCLUSIONES

1. SipA, vía su interacción con NblS, es un nuevo componente del mecanismo de señalización en la adaptación a condiciones de estrés en cianobacterias.
2. El plegamiento SH3, paradigma eucariótico de los módulos de interacción proteína-proteína propuesto para SipA, introduce una nueva forma de regulación dentro de los TCS.
3. SipA parece tener un papel estabilizador sobre la HK NblS y activa su autofosforilación.
4. NblR no es el regulador de la respuesta socio de NblS y por lo tanto no forman parte del mismo TCS.
5. Deben existir mecanismos alternativos e independientes de la fosforilación para la activación de un grupo de RRs, entre los que se encuentra NblR, y que hemos denominado PIARR (*Phosphorylation-Independent Activation of Response regulator*).
6. RpaB y SrrA son los reguladores de la respuesta socios de la HK NblS, formando estas 3 proteínas el primer ejemplo de un TCS ramificado formado por proteínas ortodoxas.
7. NblS muestra preferencias hacia sus RR dianas en la reacción de fosfotransferencia pero no en la de defosforilación y requiere la presencia de los dominios HAMP-PAS para esta última reacción
8. El conector SipA no influye en las reacciones de fosfotransferencia y defosforilación entre NblS y sus RRs diana.

CONCLUSIONES

9. La estructura tridimensional de la HK SrrB^{CP}, junto con las homologas de otras HKs, muestran que el dominio CA realiza un movimiento de cuerpo rígido sobre un área conservada para catalizar las diferentes reacciones implicadas en el mecanismo de transducción de la señal por TCSs.

10. Los datos estructurales disponibles de los dominios CA de diferentes HKs, son un punto de partida válido para la búsqueda *in silico* de moléculas con capacidad de ocupar el sitio de unión del nucleótido, y por ello, inhibidores potenciales de HKs.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1994a) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**: 760-763.
- (1994b) Collaborative Computational Project. *The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. Acta Cryst. D50 Number 4*: 760-763.
- Albanesi, D., M. Martin, F. Trajtenberg, M. C. Mansilla, A. Haouz, P. M. Alzari, D. de Mendoza & A. Buschiazzi, (2009) Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 16185-16190.
- Alpuche Aranda, C. M., J. A. Swanson, W. P. Loomis & S. I. Miller, (1992) Salmonella typhimurium activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10079-10083.
- Alves, R. & M. A. Savageau, (2003) Comparative analysis of prototype two-component systems with either bifunctional or monofunctional sensors: differences in molecular structure and physiological function. *Mol Microbiol* **48**: 25-51.
- Appleby, J. L., J. S. Parkinson & R. B. Bourret, (1996) Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* **86**: 845-848.
- Ashby, M. K. & J. Houmard, (2006) Cyanobacterial two-component proteins: structure, diversity, distribution, and evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 472-509.
- Ashby, M. K. & C. W. Mullineaux, (1999) Cyanobacterial ycf27 gene products regulate energy transfer from phycobilisomes to photosystems I and II. *FEMS Microbiol Lett* **181**: 253-260.
- Baier, K., H. Lehmann, D. P. Stephan & W. Lockau, (2004) NblA is essential for phycobilisome degradation in Anabaena sp. strain PCC 7120 but not for development of functional heterocysts. *Microbiology* **150**: 2739-2749.
- Barrett, J. F. & J. A. Hoch, (1998) Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1529-1536.
- Bekker, M., M. J. Teixeira de Mattos & K. J. Hellingwerf, (2006) The role of two-component regulation systems in the physiology of the bacterial cell. *Sci Prog* **89**: 213-242.

- Besant, P. G., M. V. Lasker, C. D. Bui & C. W. Turck, (2002) Inhibition of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase and Sln1 yeast histidine kinase by the antifungal antibiotic radicicol. *Mol Pharmacol* **62**: 289-296.
- Bick, M. J., V. Lamour, K. R. Rajashankar, Y. Gordiyenko, C. V. Robinson & S. A. Darst, (2009) How to switch off a histidine kinase: crystal structure of *Geobacillus stearothermophilus* KinB with the inhibitor Sda. *J Mol Biol* **386**: 163-177.
- Bienert, R., K. Baier, R. Volkmer, W. Lockau & U. Heinemann, (2006) Crystal structure of NblA from *Anabaena* sp. PCC 7120, a small protein playing a key role in phycobilisome degradation. *J Biol Chem* **281**: 5216-5223.
- Bilwes, A. M., L. A. Alex, B. R. Crane & M. I. Simon, (1999) Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* **96**: 131-141.
- Bilwes, A. M., C. M. Quezada, L. R. Croal, B. R. Crane & M. I. Simon, (2001) Nucleotide binding by the histidine kinase CheA. *Nat Struct Biol* **8**: 353-360.
- Brodsky, I. E. & J. S. Gunn, (2005) A bacterial sensory system that activates resistance to innate immune defenses: potential targets for antimicrobial therapeutics. *Mol Interv* **5**: 335-337.
- Bunn, M. W. & G. W. Ordal, (2004) Receptor conformational changes enhance methylesterase activity during chemotaxis by *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **51**: 721-728.
- Cadoret, J. C., B. Rousseau, I. Perewoska, C. Sicora, O. Cheregi, I. Vass & J. Houmard, (2005) Cyclic nucleotides, the photosynthetic apparatus and response to a UV-B stress in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* **280**: 33935-33944.
- Cai, S. J. & M. Inouye, (2003) Spontaneous subunit exchange and biochemical evidence for trans-autophosphorylation in a dimer of *Escherichia coli* histidine kinase (EnvZ). *J Mol Biol* **329**: 495-503.
- Casino, P., A. Fernandez-Alvarez, C. Alfonso, G. Rivas & A. Marina, (2007) Identification of a novel two component system in *Thermotoga maritima*. Complex stoichiometry and crystallization. *Biochim Biophys Acta* **1774**: 603-609.
- Casino, P., V. Rubio & A. Marina, (2009) Structural Insight into Partner Specificity and Phosphoryl Transfer in Two-Component Signal Transduction. *Cell*.

- Collier, J. L. & A. R. Grossman, (1992) Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *J Bacteriol* **174**: 4718-4726.
- Collier, J. L. & A. R. Grossman, (1994) A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria. *EMBO J* **13**: 1039-1047.
- Chou, K. C., G. M. Maggiora, G. Nemethy & H. A. Scheraga, (1988) Energetics of the structure of the four-alpha-helix bundle in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 4295-4299.
- Djordjevic, S. & A. M. Stock, (1998) Chemotaxis receptor recognition by protein methyltransferase CheR. *Nat Struct Biol* **5**: 446-450.
- Dufresne, A., M. Salanoubat, F. Partensky, F. Artiguenave, I. M. Axmann, V. Barbe, S. Duprat, M. Y. Galperin, E. V. Koonin, F. Le Gall, K. S. Makarova, M. Ostrowski, S. Oztas, C. Robert, I. B. Rogozin, D. J. Scanlan, N. Tandeau de Marsac, J. Weissenbach, P. Wincker, Y. I. Wolf & W. R. Hess, (2003) Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10020-10025.
- Dutta, R. & M. Inouye, (2000) GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem Sci* **25**: 24-28.
- Dutta, R., L. Qin & M. Inouye, (1999) Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol Microbiol* **34**: 633-640.
- Espinosa, J., I. Fuentes, S. Burillo, F. Rodriguez-Mateos & A. Contreras, (2006) SipA, a novel type of protein from *Synechococcus* sp. PCC 7942, binds to the kinase domain of NblS. *FEMS Microbiol Lett* **254**: 41-47.
- Eswar, N., S. R. Begum, G. Sivanandhy & P. Eswar, (2003) Association of parental consanguinity prevalent among those patients having dental anomalies. A retrospective study of 42 cases. *Indian J Dent Res* **14**: 33-38.
- Fields, P. I., E. A. Groisman & F. Heffron, (1989) A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* **243**: 1059-1062.
- Foyer, C. H., J. C. Lescure, C. Lefebvre, J. F. Morot-Gaudry, M. Vincentz & H. Vaucheret, (1994) Adaptations of Photosynthetic Electron Transport, Carbon Assimilation, and Carbon Partitioning in

- Transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* Plants to Changes in Nitrate Reductase Activity. *Plant Physiol* **104**: 171-178.
- Fukushima, T., I. Furihata, R. Emmins, R. A. Daniel, J. A. Hoch & H. Szurmant, A role for the essential YycG sensor histidine kinase in sensing cell division. *Mol Microbiol* **79**: 503-522.
- Galperin, M. Y., (2004) Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol* **6**: 552-567.
- Galperin, M. Y., (2005) A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol* **5**: 35.
- Galperin, M. Y., (2006) Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol* **188**: 4169-4182.
- Gao, R., T. R. Mack & A. M. Stock, (2007) Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem Sci* **32**: 225-234.
- Gao, R. & A. M. Stock, (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* **63**: 133-154.
- Gileadi, O., N. A. Burgess-Brown, S. M. Colebrook, G. Berridge, P. Savitsky, C. E. Smee, P. Loppnau, C. Johansson, E. Salah & N. H. Pantic, (2008) High throughput production of recombinant human proteins for crystallography. *Methods Mol Biol* **426**: 221-246.
- Glazer, A. N., C. Chan, R. C. Williams, S. W. Yeh & J. H. Clark, (1985) Kinetics of Energy Flow in the Phycobilisome Core. *Science* **230**: 1051-1053.
- Gotoh, Y., Y. Eguchi, T. Watanabe, S. Okamoto, A. Doi & R. Utsumi, Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* **13**: 232-239.
- Grossman, A. R., M. R. Schaefer, G. G. Chiang & J. L. Collier, (1993) The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Rev* **57**: 725-749.
- Guarnieri, M. T., L. Zhang, J. Shen & R. Zhao, (2008) The Hsp90 inhibitor radicicol interacts with the ATP-binding pocket of bacterial sensor kinase PhoQ. *J Mol Biol* **379**: 82-93.
- Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer & H. Tschape, (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* **23**: 1089-1097.

- Hanaoka, M. & K. Tanaka, (2008) Dynamics of RpaB-promoter interaction during high light stress, revealed by chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant J* **56**: 327-335.
- Hecht, G. B., T. Lane, N. Ohta, J. M. Sommer & A. Newton, (1995) An essential single domain response regulator required for normal cell division and differentiation in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J* **14**: 3915-3924.
- Hellingwerf, K. J., (2005) Bacterial observations: a rudimentary form of intelligence? *Trends Microbiol* **13**: 152-158.
- Hendrickson, W. A., (1991) Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science* **254**: 51-58.
- Hendrickson, W. A. a. O., C.M., (1997) Phase determination from multiwavelength anomalous diffraction measurements. **276**.
- Hoch, J. A., (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3**: 165-170.
- Hsiao, H. Y., Q. He, L. G. Van Waasbergen & A. R. Grossman, (2004) Control of photosynthetic and high-light-responsive genes by the histidine kinase DspA: negative and positive regulation and interactions between signal transduction pathways. *J Bacteriol* **186**: 3882-3888.
- Hulko, M., F. Berndt, M. Gruber, J. U. Linder, V. Truffault, A. Schultz, J. Martin, J. E. Schultz, A. N. Lupas & M. Coles, (2006) The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell* **126**: 929-940.
- Inouye, M., (2006) Signaling by transmembrane proteins shifts gears. *Cell* **126**: 829-831.
- Jagadeesan, S., P. Mann, C. W. Schink & P. I. Higgs, (2009) A novel "four-component" two-component signal transduction mechanism regulates developmental progression in *Myxococcus xanthus*. *J Biol Chem* **284**: 21435-21445.
- Jesu´s A. G. Ochoa de Alda, C. L., Jean-Claude Thomas & a. J. Houmard, (2004) Immunolocalization of NblA, a protein involved in phycobilisome turnover, during heterocyst differentiation in cyanobacteria. *Microbiology* **150**: 1377-1384.

BIBLIOGRAFÍA

- Kanesaki, Y., H. Yamamoto, K. Paithoonrangsarid, M. Shoumskaya, I. Suzuki, H. Hayashi & N. Murata, (2007) Histidine kinases play important roles in the perception and signal transduction of hydrogen peroxide in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant J* **49**: 313-324.
- Kappell, A. D., D. Bhaya & L. G. van Waasbergen, (2006) Negative control of the high light-inducible *hliA* gene and implications for the activities of the NblS sensor kinase in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *Arch Microbiol* **186**: 403-413.
- Kappell, A. D. & L. G. van Waasbergen, (2007) The response regulator RpaB binds the high light regulatory 1 sequence upstream of the high-light-inducible *hliB* gene from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Arch Microbiol* **187**: 337-342.
- Karplus, K., (2009) SAM-T08, HMM-based protein structure prediction. *Nucleic Acids Res* **37**: W492-497.
- Khorchid, A. & M. Ikura, (2006) Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer. *Int J Biochem Cell Biol* **38**: 307-312.
- Kim, D. & S. Forst, (2001) Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology* **147**: 1197-1212.
- Kitayama, T., R. Iwabuchi, S. Minagawa, S. Sawada, R. Okumura, K. Hoshino, J. Cappiello & R. Utsumi, (2007) Synthesis of a novel inhibitor against MRSA and VRE: preparation from zerumbone ring opening material showing histidine-kinase inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* **17**: 1098-1101.
- Kleerebezem, M., L. E. Quadri, O. P. Kuipers & W. M. de Vos, (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **24**: 895-904.
- Konstantinidis, K. T. & J. M. Tiedje, (2004) Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 3160-3165.
- Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lafitte, D., V. Lamour, P. O. Tsvetkov, A. A. Makarov, M. Klich, P. Deprez, D. Moras, C. Briand & R. Gilli, (2002) DNA gyrase interaction with coumarin-based inhibitors: the role of the

- hydroxybenzoate isopentenyl moiety and the 5'-methyl group of the noviose. *Biochemistry* **41**: 7217-7223.
- Laub, M. T. a. M. G., (2007) Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet* **41**: 121-145.
- Leslie, A. G. W., (1992) Joint CCP4 and ESF-EACMB. *Newsletter on Protein Crystallography (Daresbury Laboratory, Warrington, U.K.)*.
- Lopez-Redondo, M. L., F. Moronta, P. Salinas, J. Espinosa, R. Cantos, R. Dixon, A. Marina & A. Contreras, (2010) Environmental control of phosphorylation pathways in a branched two-component system. *Mol Microbiol* **78**: 475-489.
- Luque, I., G. Zabulon, A. Contreras & J. Houmard, (2001) Convergence of two global transcriptional regulators on nitrogen induction of the stress-acclimation gene *nblA* in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol Microbiol* **41**: 937-947.
- MacColl, R., (1998) Cyanobacterial phycobilisomes. *J Struct Biol* **124**: 311-334.
- Marin, K., I. Suzuki, K. Yamaguchi, K. Ribbeck, H. Yamamoto, Y. Kanasaki, M. Hagemann & N. Murata, (2003) Identification of histidine kinases that act as sensors in the perception of salt stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9061-9066.
- Marina, A., C. Mott, A. Auyzenberg, W. A. Hendrickson & C. D. Waldburger, (2001) Structural and mutational analysis of the PhoQ histidine kinase catalytic domain. Insight into the reaction mechanism. *J Biol Chem* **276**: 41182-41190.
- Marina, A., C. D. Waldburger & W. A. Hendrickson, (2005) Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *EMBO J* **24**: 4247-4259.
- Martin Weik*†, R. B. G. R., Gitay Kryger§, Sean McSweeney‡, Maria L. Raves¶, Michal Harel§, Piet Gros*, & J. K. Israel Silmani, and Joel L. Sussman§**††, (1999) Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation. *PNAS*.
- Mascher, T., J. D. Helmann & G. Unden, (2006) Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 910-938.

BIBLIOGRAFÍA

- Mizuno, T., (1997) Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res* **4**: 161-168.
- Mizuno, T., T. Kaneko & S. Tabata, (1996) Compilation of all genes encoding bacterial two-component signal transducers in the genome of the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *DNA Res* **3**: 407-414.
- Morris GM, G. D., Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew & O. A. J. C. C. RK, (1998) "Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function". *J Comput Chem* **19**:1639
- Murata, N. D. A. L., (2006) Histidine Kinase HiK33 is an important participant in coldsignal transduction in cyanobacteria. *Physiologia plantarum* **126**: 17-27.
- Ninfa, E. G., M. R. Atkinson, E. S. Kamberov & A. J. Ninfa, (1993) Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. *J Bacteriol* **175**: 7024-7032.
- Nixon, B. T., C. W. Ronson & F. M. Ausubel, (1986) Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 7850-7854.
- Ohmori, M., M. Ikeuchi, N. Sato, P. Wolk, T. Kaneko, T. Ogawa, M. Kanehisa, S. Goto, S. Kawashima, S. Okamoto, H. Yoshimura, H. Katoh, T. Fujisawa, S. Ehira, A. Kamei, S. Yoshihara, R. Narikawa & S. Tabat, (2001) Characterization of genes encoding multi-domain proteins in the genome of the filamentous nitrogen-fixing Cyanobacterium *anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res* **8**: 271-284.
- Patti, J. M. & M. Hook, (1994) Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Curr Opin Cell Biol* **6**: 752-758.
- Perraud, A. L., V. Weiss & R. Gross, (1999) Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol* **7**: 115-120.

- Qin, Z., J. Zhang, B. Xu, L. Chen, Y. Wu, X. Yang, X. Shen, S. Molin, A. Danchin, H. Jiang & D. Qu, (2006) Structure-based discovery of inhibitors of the YycG histidine kinase: new chemical leads to combat *Staphylococcus epidermidis* infections. *BMC Microbiol* **6**: 96.
- Quon, K. C., G. T. Marczynski & L. Shapiro, (1996) Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* **84**: 83-93.
- Rocap, G., F. W. Larimer, J. Lamerdin, S. Malfatti, P. Chain, N. A. Ahlgren, A. Arellano, M. Coleman, L. Hauser, W. R. Hess, Z. I. Johnson, M. Land, D. Lindell, A. F. Post, W. Regala, M. Shah, S. L. Shaw, C. Steglich, M. B. Sullivan, C. S. Ting, A. Tolonen, E. A. Webb, E. R. Zinser & S. W. Chisholm, (2003) Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* **424**: 1042-1047.
- Roe, S. M., C. Prodromou, R. O'Brien, J. E. Ladbury, P. W. Piper & L. H. Pearl, (1999) Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem* **42**: 260-266.
- Sakayori, T., Y. Shiraiwa & I. Suzuki, (2009) A *Synechocystis* homolog of SipA protein, Ssl3451, enhances the activity of the histidine kinase Hik33. *Plant Cell Physiol* **50**: 1439-1448.
- Salem, K. & L. G. van Waasbergen, (2004) Photosynthetic electron transport controls expression of the high light inducible gene in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *Plant Cell Physiol* **45**: 651-658.
- Salinas, P., D. Ruiz, R. Cantos, M. L. Lopez-Redondo, A. Marina & A. Contreras, (2007) The regulatory factor SipA provides a link between NblS and NblR signal transduction pathways in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol Microbiol* **66**: 1607-1619.
- Sato, S., Y. Shimoda, A. Muraki, M. Kohara, Y. Nakamura & S. Tabata, (2007) A large-scale protein protein interaction analysis in *Synechocystis* sp. PCC6803. *DNA Res* **14**: 207-216.
- Schwarz, R. & K. Forchhammer, (2005) Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a

- complex network of cellular responses. *Microbiology* **151**: 2503-2514.
- Schwarz, R. & A. R. Grossman, (1998) A response regulator of cyanobacteria integrates diverse environmental signals and is critical for survival under extreme conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11008-11013.
- Seino, Y., T. Takahashi & Y. Hihara, (2009) The response regulator RpaB binds to the upstream element of photosystem I genes to work for positive regulation under low-light conditions in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *J Bacteriol* **191**: 1581-1586.
- Seki, A., M. Hanaoka, Y. Akimoto, S. Masuda, H. Iwasaki & K. Tanaka, (2007) Induction of a group 2 sigma factor, RPOD3, by high light and the underlying mechanism in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Biol Chem* **282**: 36887-36894.
- Sendersky, E., R. Lahmi, J. Shaltiel, A. Perelman & R. Schwarz, (2005) NblC, a novel component required for pigment degradation during starvation in *Synechococcus* PCC 7942. *Mol Microbiol* **58**: 659-668.
- Singh, M., B. Berger, P. S. Kim, J. M. Berger & A. G. Cochran, (1998) Computational learning reveals coiled coil-like motifs in histidine kinase linker domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2738-2743.
- Skerker, J. M., M. S. Prasol, B. S. Perchuk, E. G. Biondi & M. T. Laub, (2005) Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol* **3**: e334.
- Song, Y., D. Peisach, A. A. Pioszak, Z. Xu & A. J. Ninfa, (2004) Crystal structure of the C-terminal domain of the two-component system transmitter protein nitrogen regulator II (NRII; NtrB), regulator of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **43**: 6670-6678.
- Stephenson, K., Y. Yamaguchi & J. A. Hoch, (2000) The mechanism of action of inhibitors of bacterial two-component signal transduction systems. *J Biol Chem* **275**: 38900-38904.
- Stock, A. M., V. L. Robinson & P. N. Goudreau, (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183-215.
- Stols, L., M. Gu, L. Dieckman, R. Raffin, F. R. Collart & M. I. Donnelly, (2002) A new vector for high-throughput, ligation-independent

- cloning encoding a tobacco etch virus protease cleavage site. *Protein Expr Purif* **25**: 8-15.
- Suzuki, I., Y. Kanasaki, K. Mikami, M. Kanehisa & N. Murata, (2001) Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis*. *Mol Microbiol* **40**: 235-244.
- Suzuki, S., A. Ferjani, I. Suzuki & N. Murata, (2004) The SphS-SphR two component system is the exclusive sensor for the induction of gene expression in response to phosphate limitation in *synechocystis*. *J Biol Chem* **279**: 13234-13240.
- Takai, N., M. Nakajima, T. Oyama, R. Kito, C. Sugita, M. Sugita, T. Kondo & H. Iwasaki, (2006) A KaiC-associating SasA-RpaA two-component regulatory system as a major circadian timing mediator in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12109-12114.
- Taylor, B. L. & I. B. Zhulin, (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 479-506.
- Tomomori, C., T. Tanaka, R. Dutta, H. Park, S. K. Saha, Y. Zhu, R. Ishima, D. Liu, K. I. Tong, H. Kurokawa, H. Qian, M. Inouye & M. Ikura, (1999) Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ. *Nat Struct Biol* **6**: 729-734.
- Tu, C. J., J. Shrager, R. L. Burnap, B. L. Postier & A. R. Grossman, (2004) Consequences of a deletion in *dspA* on transcript accumulation in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *J Bacteriol* **186**: 3889-3902.
- Usher, K. C., A. F. de la Cruz, F. W. Dahlquist, R. V. Swanson, M. I. Simon & S. J. Remington, (1998) Crystal structures of CheY from *Thermotoga maritima* do not support conventional explanations for the structural basis of enhanced thermostability. *Protein Sci* **7**: 403-412.
- van Waasbergen, L. G., N. Dolganov & A. R. Grossman, (2002) *nblS*, a gene involved in controlling photosynthesis-related gene expression during high light and nutrient stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Bacteriol* **184**: 2481-2490.

BIBLIOGRAFÍA

- Weik, M. & J. P. Colletier, (2010) Temperature-dependent macromolecular X-ray crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 437-446.
- West, A. H. & A. M. Stock, (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**: 369-376.
- Willard, L., A. Ranjan, H. Zhang, H. Monzavi, R. F. Boyko, B. D. Sykes & D. S. Wishart, (2003) VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res* **31**: 3316-3319.
- Wolanin, P. M., P. A. Thomason & J. B. Stock, (2002) Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol* **3**: REVIEWS3013.
- Zapf, J., U. Sen, Madhusudan, J. A. Hoch & K. I. Varughese, (2000) A transient interaction between two phosphorelay proteins trapped in a crystal lattice reveals the mechanism of molecular recognition and phosphotransfer in signal transduction. *Structure* **8**: 851-862.
- Zhang, W. & L. Shi, (2005) Distribution and evolution of multiple-step phosphorelay in prokaryotes: lateral domain recruitment involved in the formation of hybrid-type histidine kinases. *Microbiology* **151**: 2159-2173.
- Zhu, Y., L. Qin, T. Yoshida & M. Inouye, (2000) Phosphatase activity of histidine kinase EnvZ without kinase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7808-7813.