

Resumen

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

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

Por otra parte, se analizó la influencia de la mutación G63V en el RR OmpR, que fue descrita como una mutación relacionada con la resistencia al antibiótico ertapenem. Para esto se generaron mutantes en OmpR en la posición G63, tanto en el dominio REC aislado como en la proteína completa. Los estudios bioquímicos de estas mutaciones demostraron como la mutación en esta posición disminuía la capacidad del RR para fosforilarse e incluso a dimerizar. Esto afectaba a la afinidad de este RR para interactuar con su ADN correspondiente, las cajas *ompF* y *ompC*. Estos efectos se lograron evidenciar con la estructura de OmpR_{REC}^{G63V}, donde se observó como la mutación generaba un cambio conformacional al reducir el tamaño del L β 3 α 3 y generaba un bolsillo hidrofóbico donde quedaba atrapada la cadena lateral de la Val.

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