

Resumen

Enmarcada en la línea de investigación de nuestro laboratorio sobre señalización por nitrógeno principalmente en la cianobacteria *Synechococcus elongatus* PCC7942, con esfuerzos centrados en las proteínas PII y PipX y su red de señalización, esta Tesis amplía el espectro de moléculas investigadas en relación con dicha red.

Estudia y caracteriza el miembro no canónico de la superfamilia de la proteína PII denominado CutA, generalmente anotado como de protección frente a metales divalentes, altamente conservado en todos los dominios de la vida (incluidos animales y el ser humano). En ella examinamos la posible protección frente a metales provista por CutA en dos bacterias muy distantes, *Escherichia coli* y *Synechococcus elongatus*, usando *knockouts* para ambas del gen que codifica para CutA. Ni los estudios de complementación en *E. coli* del gen silvestre ni los observacionales de sensibilidad a metales en *S. elongatus* han dado soporte a la función anotada para CutA, a pesar de que demostramos mediante seguimiento turbidimétrico que el Cu^{2+} hace agregar a la proteína CutA pura de *S. elongatus* (producida recombinantemente) y por tanto se une a ella, aunque con una afinidad baja por comparación con las concentraciones tóxicas de este metal para dicha cianobacteria.

Buscando profundizar en el conocimiento de CutA, hemos determinado a muy alta resolución mediante difracción de rayos X la estructura de esta proteína de *S. elongatus*, sin evidenciar complejo alguno con cobre, pero demostrando que los tres bolsillos intersubunidades en el homotrímero de CutA son capaces de transportar moléculas orgánicas (en nuestro caso Bis-Tris). Estos resultados apoyan una posible función de CutA basada en la unión a estos bolsillos de biomoléculas neutras o positivamente cargadas y capaces de formar varios puentes de hidrógeno con las paredes de potencial negativo y fuerte carácter polar de estos bolsillos.

También hemos estudiado la proteína PipY de *S. elongatus*, identificada recientemente como pareja funcional de la antes mencionada PipX, determinando sus propiedades espectroscópicas, unión de piridoxal fosfato (PLP) y resolviendo su estructura mediante difracción de rayos X. Probamos que PipY es monomérica y que tiene PLP unido. Su estructura no apoya que sea un enzima, siendo aparentemente apropiada para ejercer una posible función en la homeostasis de PLP. Dado que muy recientemente se ha descrito una epilepsia genética humana dependiente de vitamina B₆ debida a mutaciones en el gen humano ortólogo de *pipY*, *PROSC* (ahora llamado *PLPBP*; codifica la proteína PLPHP), usamos inicialmente PipY de *S. elongatus* y luego *PROSC* humana como banco de pruebas de la patogenicidad de las mutaciones que se han asociado a esta epilepsia, utilizando para ello mutagénesis dirigida y producción de las formas silvestre y mutantes de estas proteínas, comparando sus propiedades. Estos estudios han demostrado la patogenicidad y establecido mecanismos para la misma para cada una de las mutaciones de cambio de sentido de *PROSC* descritas hasta ahora en esta epilepsia. Nuestros estudios han representado un importante avance en la comprensión de las proteínas de tipo PipY y de la epilepsia asociada a la forma humana de las mismas.