

## Índice

1.	Introducción	1
1.1.	Sistemas de Dos Componentes	3
1.2.	Arquitectura y clasificación de los TCS	4
1.2.1.	Histidinas Quinasas	5
1.2.2.	Reguladores de la Respuesta	16
1.3.	Mecanismos enzimáticos de la transducción de la señal en TCS	21
1.3.1.	Detección y transmisión del estímulo	22
1.3.2.	Autofosforilación	23
1.3.3.	Reacción de Fosfotransferencia	26
1.3.4.	Reacción Fosfatasa	28
1.4.	Distribución y evolución de los TCS	29
1.5.	Reconocimiento y especificidad	31
1.6.	Importancia en la biomedicina	34
2.	Objetivos	37
3.	Materiales y Métodos	41
3.1.	Técnicas de biología molecular	43
3.1.1.	Clonación de genes	43
3.1.2.	Mutagénesis dirigida	46
3.2.	Producción de proteínas	49
3.2.1.	Expresión de proteínas	49
3.2.2.	Purificación de proteínas	50
3.3.	Métodos de caracterización de proteínas	53
3.3.1.	Separación de proteínas en función de su estado nativo o desnaturalizado	53
3.3.2.	Cuantificación de proteínas	55
3.4.	Caracterización de proteínas fosforilables	55
3.4.1.	Ensayos de fosforilación con [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P] ATP	55
3.4.2.	Ensayos de fosforilación y desfosforilación de los RR utilizando AcP32.....	58
3.4.3.	Visualización de la fosforilación de OmpR mediante cromatografía de exclusión molecular	60

3.5.	Cálculo de la afinidad por interferometría en bicapa (BLI)	60
3.5.1.	Sistema HK853-RR468	61
3.5.2.	Sistema EnvZ-OmpR	61
3.5.3.	Sistema Methanobrevibacter sp.	61
3.6.	Ensayos de movilidad electroforética (EMSAs)	62
3.7.	Ensayos en geles de Phos-tag	63
3.8.	Ensayos de Cristalización	63
3.8.1.	Cristalización del complejo HK853-RR468 en sus variantes silvestres y mutantes	64
3.8.2.	Cristalización de OmpRRECG63V	66
3.8.3.	Cristalización de la HK ancestral HKMet	66
3.8.4.	Cristalización de RRs RRMET589-1 y RRMET572 de Methanobrevibacter sp.	66
3.9.	Recogida de datos y procesado	66
4.	Resultados	69
4.1.	Estudio funcional y estructural de la reacción de fosfotransferencia	71
4.1.1.	Reacción de fosfotransferencia en HisKA HKs	72
4.1.2.	Efecto de mutaciones en RR468 sobre las actividades de fosfotransferencia y fosfatasa	73
4.1.3.	Estructuras del complejo HK853 con los mutantes de RR468	80
4.2.	Estudio funcional y estructural de la influencia del pH en las reacciones enzimáticas	99
4.2.1.	Disposición de la His fosforilable en HKs de la familia HisKA.....	100
4.2.2.	Estructuras del complejo HK853-RR468 a distintos pHs	103
4.2.3.	Efectos del pH en la actividad fosfatasa de HK853 – RR468	116
4.2.4.	Influencia del pH en las actividades de autofosforilación y fosfotransferencia de HK853	120
4.2.5.	Influencia del pH en las actividades del sistema EnvZ-OmpR.....	124
4.3.	Caracterización de una mutación clínica en el TCS EnvZ-OmpR	127
4.3.1.	Efecto de la fosforilación de OmpR en el residuo Gly63	129
4.3.2.	Interacción de los mutantes de OmpR en Gly63 con EnvZ	133
4.3.3.	Interacción de los mutantes de OmpR en Gly63 con los promotores ompF y ompC	137
4.3.4.	Estructura cristalina de OmpRRECG63V	139
4.4.	Estudio evolutivo de la especificidad en el reconocimiento HK – RR.....	146
4.4.1.	Búsqueda de TCS que presenten “cross-talk”	147
4.4.2.	Autofosforilación de las HKs	155

4.4.3.	Fosfotransferencia a los RRs	157	
4.4.4.	Reconocimiento de HKMet por RRs de Methanobrevibacter sp. Amb4.....		161
5.	Discusión General	169	
5.1.	Estudio funcional y estructural de la reacción de fosfotransferencia.....	171	
5.2.	Estudio funcional y estructural de la influencia del pH en las reacciones enzimáticas		174
5.3.	Caracterización de una mutación clínica en el TCS EnvZ-OmpR	176	
5.4.	Estudio evolutivo de la especificidad en el reconocimiento entre HK y RR.....		178
6.	Conclusiones	181	
7.	Referencias	185	