



Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Fisiología Celular

Doctorado en Ciencias Biomédicas

**Caracterización de la transferencia del grupo fosforilo en la
cinasa sensora ArcB de *Escherichia coli***

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias (Biomédicas)

P r e s e n t a:

M. en C. Gabriela Rosario Peña Sandoval

Tutor

Dr. Dimitris Georgellis

México DF

Junio 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), mediante el proyecto 37342-N y DEGAPA-PAPIIT, UNAM mediante el proyecto IN221106/17.

Al CONACyT por la beca doctoral otorgada durante toda mi estancia de posgrado.

Al posgrado en Ciencias Biomédicas por el respaldo económico para la asistencia a congresos nacionales y por el apoyo en la impresión de ésta tesis.

Comité Tutoral

Dr. Dimitris Georgellis
Dra. Irma Romero Álvarez
Dr. Georges Dreyfus Cortés

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y mi corazón. Sin importar en donde estén o si alguna vez leen estas dedicatorias quiero agradecerles por ser parte de mi, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

A mis padres, sabiendo que no existirá una forma de agradecer una vida de sacrificio y esfuerzo, quiero que sientan que el objetivo logrado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudo a conseguirlo fue su apoyo.
Gracias Gerardo Peña Y Flor Sandoval por ser mis papás.

A mis hermanas Nadia y Alejandra, por ser comprensivas y apoyarme en todo. Les deseo lo mejor en la vida

A Dimitris Georgellis, porque gracias tu guía y respaldo he llegado a realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida, fruto del apoyo y la confianza que depositaste en mi, con los cuales he logrado terminar mi doctorado por lo cual te viviré eternamente agradecida.
Con cariño y respeto.

A todos mis compañeros del laboratorio Claudia Rodríguez, Adrián Álvarez, Luis Núñez, Itzel Vargas, Oscar Sánchez, Ricardo González, Pedro Hernández, Carlos Barba, Javier de la Mora y todos los que me hicieron falta. Gracias por todos los momentos que pasamos juntos.

A todos mis profesores, no solo del doctorado sino de toda mi vida, mil gracias por que de alguna manera forman parte de lo que ahora soy especialmente al Dr. Pepe Granados y Dra. Lúcia Taylor.

A mis amigos de siempre Ana Martínez, Martha Vega, Yoslin Monroy, Saralina García, Verónica Mondragón, Fabiola Méndez y todos aquellos que por algún motivo se extraviaron e este momento de mi memoria. Gracias por ser tan lindos conmigo.

A mi amor Pedro Villanueva Rached, gracias por regresar a mi vida y pasar conmigo todos esos momentos tan hermosos.

Te adoro.

Agradezco a Claudia Rodríguez Rangel y a Javier de la Mora por la asistencia técnica otorgado durante la realización de éste trabajo.

A la Gerardo Coello Coutiño, Ivette Rosas Arciniega y Juan M. Barbosa por su asesoría en temas informáticos.

A la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por la síntesis de oligonucleótidos y secuenciación.

Índice

	Página
Resúmen	8
Abstract	9
Introducción	10
Sistemas de transducción de señales de dos componentes	10
Estructura de los sistemas de dos componentes	11
Cinasa sensora	11
Regulador de respuesta	13
Activación de los sistemas de dos componentes por estímulos ambientales	13
Sistema de dos componentes Arc en <i>E coli</i>	15
Transmisión y decaimiento de la señal en el sistema Arc	19
Justificación	21
Objetivos	22
Materiales y Métodos	23
Cepas y plásmidos utilizados	24
Proteínas recombinantes utilizadas	26
Medios y condiciones de crecimiento	28
Células competentes	28
Transformación	29
Mantenimiento de las cepas	29
Sobreexpresión y purificación de proteínas recombinantes	29
Ensayos de fosforilación	31
Fosforilación de His-ArcB	32
Comparación de la estructura secundaria de His-ArcB His-ArcB ^{H*} y His-ArcB ^{G*}	32
Incapacidad de las mutantes His-AcrB ^{H*} y His-AcrB ^{G*} de autofosforilarse	33
Capacidad de las mutantes His-ArcB ^{H*} y His-ArcB ^{G*} de recibir el grupo fosforilo en el dominio receptor y/o	

transmisor secundario	33
Complementación <i>in vitro</i> de His-ArcB ^{H*} con His-ArcB ^{G*}	34
Promoción de heterodímeros	34
Formación de heterodímeros His-ArcB ^{H*} -His-ArcB ^{G*}	35
Ensayos de Western Blot	35
Complementación <i>in vivo</i> entre las mutantes	
ArcB ^{H*} y ArcB ^{G*}	36
Efecto del incremento de ArcB ^{G*} sobre la autofosforilación de ArcB ⁷⁸⁻⁵²⁰	36
Efecto del aumento de ArcB ^{G*} sobre la regulación de los reporteros $\lambda\phi(IldP'-LacZ)$ y $\lambda\phi(IldP'-LacZ)$ en cepas con fondo genético ArcB silvestre	37
Ensayos de β -galactosidasa	37
Transferencia del grupo fosforilo de H ₁ hacia D ₁ <i>in vitro</i>	38
Transferencia del grupo fosforilo de D ₁ hacia H ₂ <i>in vitro</i>	39
Resultados	40
Proteínas obtenidas	40
Fosforilación de His-ArcB	40
Resultados de la autofosforilación	41
Comparación de la estructura secundaria de His-ArcB, His-ArcB ^{H*} y His-ArcB ^{G*}	41
Incapacidad de las mutantes His-ArcB ^{H*} y His-ArcB ^{G*} de autofosforilarse	42
Capacidad de las mutantes His-ArcB ^{H*} y His-ArcB ^{G*} de recibir el grupo fosforilo en el dominio receptor y/o transmisor secundario	44
Complementación <i>in vitro</i> de His-ArcB ^{H*} con His-ArcB ^{G*}	45
Promoción de intercambio y de formación de heterodímeros	46
Formación de heterodímeros His-ArcB ^{H*} /MBP-ArcB ^{G*}	47
Complementación <i>in vivo</i> entre las mutantes	

ArcB ^{H*} y ArcB ^{G*}	48
El incremento de His-ArcB ^{G*} no afecta la autofosforilación de His-ArcB ⁷⁸⁻⁵²⁰	51
Efecto del aumento de ArcB ^{G*} no afecta la actividad de ArcB en cepas con fenotipo ArcB silvestre	52
Resultados del fosfo-relevo	53
Transferencia <i>in vitro</i> del grupo fosforilo de H ₁ hacia D ₁	54
Transferencia <i>in vitro</i> del grupo fosforilo de D ₁ hacia H ₂	56
Discusión	58
Conclusiones	61
Perspectivas	61
Literatura citada	62

Resumen

El sistema de dos componentes Arc de *Escherichia coli*, juega un rol muy importante en la regulación del metabolismo de la energía a nivel transcripcional. Este sistema contiene a la proteína citosólica ArcA, que funciona como regulador de respuesta (RR) y a la cinasa sensora (CS) ArcB, que se encuentra anclada a la membrana. En condiciones aeróbicas, la actividad cinasa de ArcB es silenciada por la oxidación de dos residuos de cisteína que se encuentran localizados en la porción "linker", los cuales participan en la formación de enlaces disulfuro intermolecular. Bajo estas condiciones, ArcB actúa como fosfatasa de su RR reconocido ArcA-P. En condiciones anaeróbicas de crecimiento ArcB se activa como cinasa, experimentando fosforilación a expensas de ATP.

En este trabajo se presentan experimentos que indican que, cuando ArcB se encuentra activa como cinasa, la autofosforilación ocurre a través de una reacción intramolecular. Lo anterior quiere decir que el sitio de unión a ATP (la caja G) y el sitio de fosforilación His²⁹² debe estar presente en el dominio de fosfotransmisor primario (H₁) de la misma molécula, lo que diverge del modelo comúnmente aceptado de que las CS se autofosforilan intermolecularmente.

Por otro lado, ArcB en una CS atípica entre otras características (las cuales serán descritas posteriormente), por que aparte de presentar los elementos necesarios de una CS típica contiene además un dominio receptor primario (D₁) y un dominio fosfotransmisor secundario (H₂) y es una proteína bifuncional, lo que quiere decir que en su actividad cinasa transfosforila a ArcA y en condiciones anaeróbicas funciona como fosfatasa de ArcA-P. Para ambas actividades, ArcB utiliza los mismos centros catalíticos de los dominios D₁ y H₂, lo que hace interesante el conocer si la dirección que toma el grupo fosforilo en el fosfo-relevo (actividad cinasa), es diferente a el fosfo-relevo reverso (actividad fosfatasa). En este trabajo, se presentan resultados preliminares acerca del tipo de reacción (intermolecular o intramolecular) por el cual el fosfo-relevo es llevado a cabo.

Abstract

The Arc two-component system, plays an important role in regulating energy metabolism at the level of transcription in bacteria. This system comprises a cytosolic response regulator ArcA protein and transmembrane protein ArcB sensor kinase. In aerobic conditions, the kinase activity of ArcB is silenced by the two cysteine residues localized in the linker portion, that participate in the intermolecular disulfide bond formation. In consequence ArcB dephosphorylates its cognate response regulator. In aerobic growth conditions ArcB is active as kinase and autophosphorylates at expense of ATP.

In this work we present experiments that indicate that ArcB autophosphorylates through an intramolecular reaction which diverges from the usually envisaged intermolecular autophosphorylation of homodimeric histidine kinases.

In the other hand, ArcB contains a primary receptor domain (D_1) and a secondary phosphotransfer domain (H_2), that use for the kinase activity (transphosphorylating ArcA) and for the phosphatase activity (dephosphorylating ArcA-P). For both activities the protein uses the same catalytic domains D_1 and H_2 , for that reason is interesting to know if the direction of the phosphoryl group is different in the phosphorelay and in the reverse phosphorelay when dephosphorylates ArcA-P. In this work, we present preliminary results about the kind of reaction (intermolecular or intramolecular) by the phosphorelay is realized.

Introducción

Sistemas de transducción de señales de dos componentes

Los organismos unicelulares viven en ambientes en los cuales las condiciones ambientales tales como la humedad, la osmolaridad, los niveles de toxinas, la disponibilidad de nutrientes y la temperatura entre otros, pueden variar rápida e inesperadamente. Para sobrevivir a estos cambios, las bacterias constantemente monitorean las condiciones externas y ajustan adecuadamente su desarrollo, estructura y fisiología, a través de circuitos moleculares llamados sistemas de dos componentes (SDC). Este término, fue acuñado para describir un grupo de proteínas con función reguladora que fueron encontradas en bacterias (57, 59, 69) sin embargo, a la fecha se han encontrado cientos de estos sistemas en eubacterias, arqueas y algunos eucariontes como plantas y hongos (77).

A través de los SDC, las bacterias modulan la expresión génica en respuesta a las fluctuaciones en su ambiente. Regulan una gran cantidad de procesos como la adquisición de nutrientes (fósforo, nitrógeno, carbono), el metabolismo de la energía, adaptación a variables físicas y químicas del ambiente (pH, osmolaridad, cantidad de luz), comunicación celular, interacciones simbióticas (fijación de nitrógeno) y patogénicas (transferencia de plásmidos, producción y secreción de toxinas, factores de adherencia), división celular y patrones de desarrollo complejo (esporulación, desarrollo de cuerpos fructíferos), entre otros (3, 24, 60, 78, 91).

Los SDC se encuentran principalmente en organismos procariontes. Estos constituyen cerca del 1% de las proteínas codificadas (87). La bacteria Gram negativa *E. coli* posee 62 proteínas pertenecientes a estos sistemas: 29 cinasas sensoras (24 ortodoxas y 5 híbridas) y 32 reguladores de respuesta (55). Estos sistemas también han sido reportados en eucariontes y arqueas aunque en menor cantidad (77).

Estructura de los sistemas de dos componentes

El prototipo de los SDC, consiste en una proteína cinasa sensora (CS) y una proteína efectora o regulador de respuesta (RR) (39, 69). Ambas proteínas presentan en su estructura dominios transmisores y/o receptores. Los dominios transmisores, poseen un núcleo de cinasa con un residuo de histidina muy conservado, y los dominios receptores contienen un residuo de aspartato conservado.

Cinasa Sensora

Las CS son proteínas que tienen un segmento amino terminal citosólico corto. Se encuentran ancladas a la membrana citoplasmática por dos segmentos transmembranales hidrofóbicos, entre los cuales se incluye un dominio periplásmico de aproximadamente 150 residuos de aminoácidos (Fig. 1).

El segmento transmembranal se une a la porción citoplásmica por medio de la porción “linker”, que funge como conexión entre la región transmembranal y el dominio de fosfotransmisor. En esta porción, se pueden encontrar otros elementos como por ejemplo un “zipper”, que consiste en una hélice compuesta por residuos hidrofóbicos en una cara de la hélice e hidrofílicos en la otra cara. Característicamente posee cuatro residuos de leucina repetidos en cada séptima posición (LX₆LX₆LX₆LX₆). Son motivos involucrados en la formación de homo y heterodímeros a través de la interacción intermolecular de las hélices. Se han encontrado principalmente en proteínas reguladoras de unión a DNA; sin embargo también en proteínas transmembranales como las CS (1, 8, 43, 89).

Otro elemento que puede estar presente en la porción “linker”, es el dominio PAS (acrónimo formado por los nombres de primeras proteínas en las cuales fueron identificadas las secuencias repetidas imperfectas: PER de *Drosophila* – period clock protein-; ARNT de un vertebrado –aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator y SIM de *Drosophila* –single-minded protein-) (92). Este dominio monitorea cambios en cambios en el potencial rédox, luz, oxígeno y pequeños ligandos dependiendo del cofactor asociado (65, 92). Los dominios PAS son de

aproximadamente 100 aminoácidos y típicamente se localizan adyacentes al segundo fragmento transmembranal (Fig. 1)

El dominio de autofosforilación, contiene un núcleo de cinasa con un residuo conservado de histidina (His), que sirve como sitio de unión al grupo fosforilo que es extraído del ATP (Fig. 1). La caja G es rica en residuos de glicina y su función es unir ATP, cuando la cinasa se encuentra activa. Todas las cajas mencionadas anteriormente, usualmente se encuentran contiguas pero el espacio entre ellas varía dependiendo de la cinasa sensora (87).

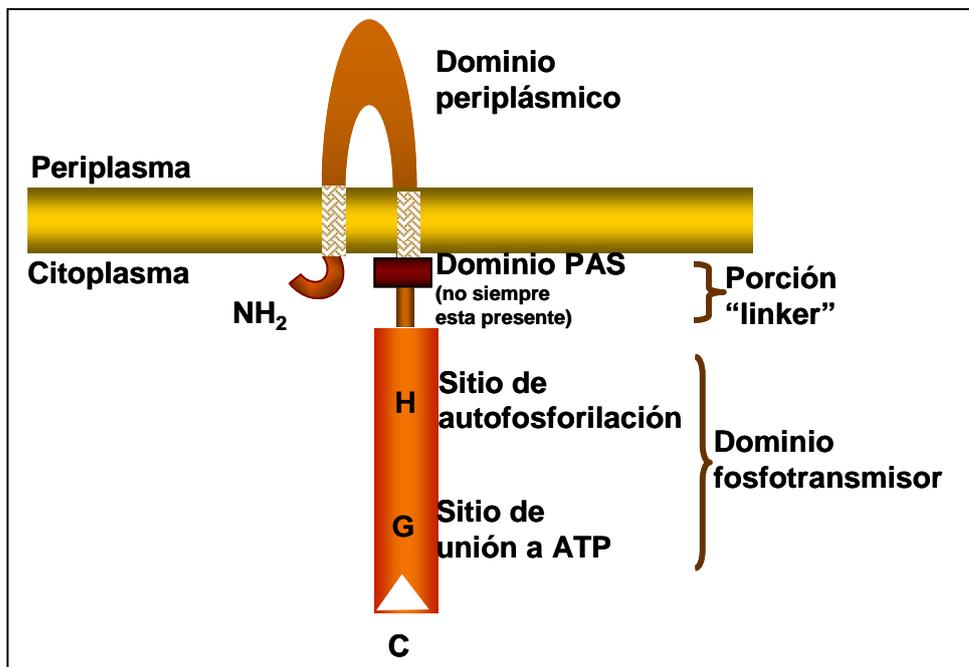


Figura 1. Representación estructural de una SC típica. Generalmente se encuentra anclada a la membrana por dos porciones transmembranales, consta de un dominio periplásmico prominente y una porción citosólica catalítica con una caja G cuya función es unir ATP y un residuo de His conservado en el sitio de autofosforilación.

Las CS tripartitas son poco usuales en procariontes, su arquitectura es compleja, ya que además de contener las estructuras de una cinasa ortodoxa, tienen un dominio receptor con un residuo de aspartato (Asp) y un dominio de fosfotransferencia con una histidina conservada (His). Ambos residuos pueden encontrarse en módulos independientes como es el caso de la cinasa Kin de

Bacillus subtilis (9) o estar fusionadas entre sí como por ejemplo BvgS de *Bordetella pertussis* (84) o ArcB de *Escherichia coli*, la que se describirá con mayor profundidad mas adelante.

Regulador de Respuesta

El regulador de respuesta (Fig. 2), contiene un dominio receptor donde se localiza un residuo de Asp conservado y un dominio efector que generalmente es de unión a DNA mediante el cual activa o reprime la expresión de genes específicos como por ejemplo ArcA de *E.coli*. Existen ejemplos de sistemas en los que el dominio COOH-terminal del regulador de respuesta funciona como enzima, un ejemplo es CheB de *E. coli* que es una metil esterasa (74), otro ejemplo es RegA de *Dictyostelium discoideum* que es una fosfodiesterasa de AMPc (73).

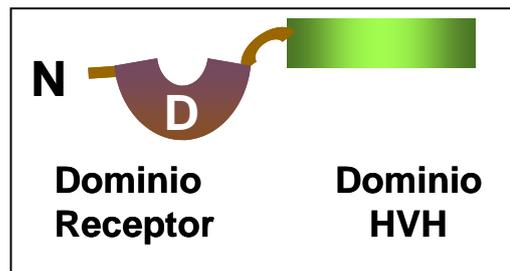


Figura 2. Modelo típico de una proteína RR. Se localizan en el citoplasma, consta de un dominio receptor y uno efector que en la mayoría de los casos un dominio de hélice-vuelta-hélice (HVH) para unión a DNA.

Activación de los sistemas de dos componentes por estímulos ambientales

En general, se cree que la detección del estímulo ocurre en el dominio periplásmico; sin embargo, se tienen ejemplos en los que esta se lleva a cabo en la región citoplásmica (21, 49, 81). La activación de los SDC puede presentarse en forma más compleja, por ejemplo en sistemas en donde la señal se proporciona

indirectamente a través de la interacción con otras proteínas como es el caso de los componentes del motor flagelar (77).

Una vez percibida la señal, hay cambios conformacionales en la proteína que permiten la unión de ATP a la caja G y a su vez la fosforilación del residuo conservado de His, transfiriéndose posteriormente al RR en su dominio fosfo-receptor (residuo de Asp) (Fig. 3).

Existen variaciones dependiendo del sistema de dos componentes que se trate. La cinasa sensora del sistema de quimiotaxis (CheA) se encarga de fosforilar a dos reguladores de respuesta (CheB y CheY) (45) o el sistema encargado del control de nitrito/nitrato Nar en el que interactúan dos sistemas de regulación que consisten en los sensores homólogos NarX y NarQ, así como sus respectivos reguladores de respuesta NarL y NarP (75).

En las CS tripartitas como TorS, ArcB, y BvgS, la transfosforilación del regulador de respuesta, es por medio de pasos subsecuentes de fosfo-relevo entre residuos de His y Asp (19, 37, 41, 84). Se cree que la complejidad estructural de las CS tripartitas permiten puntos de chequeo dentro del fosfo-relevo (77).

Una vez fosforilado el RR se activa al dominio efector que promueve la transcripción de los operones necesarios para la respuesta específica correcta (78, 87). El rango de vida media en que los RR se mantienen fosforilados tiene tiempos que van desde algunos segundos hasta horas (2, 20, 23, 47).

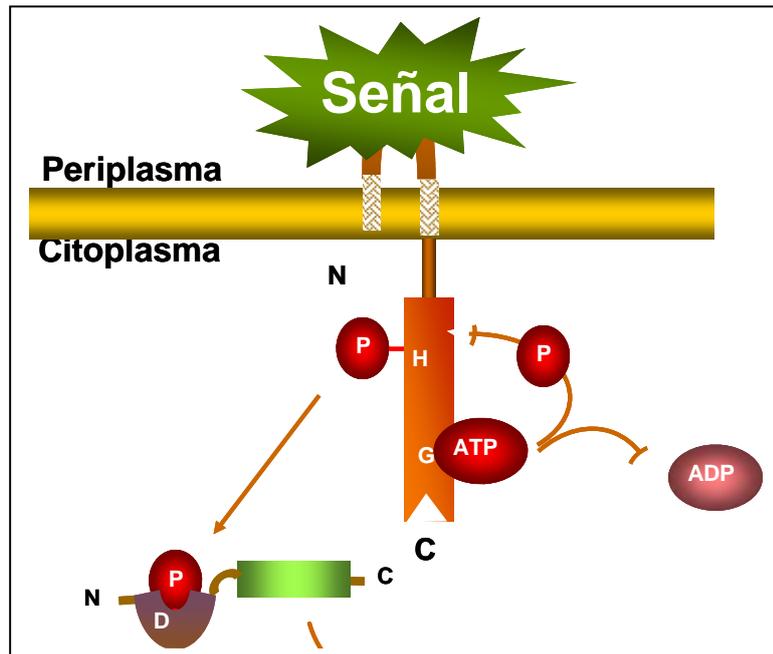


Figura 3. Modelo de activación de los SDC. La figura muestra la activación de un SDC, tras el reconocimiento de la señal, que en este caso es en la porción periplásmica. La fosforilación se lleva a cabo en el residuo de His conservado, una vez que que ATP ha sido hidrolizado en la caja G. Posteriormente el grupo fosforilo es transferido al RR.

Sistema de dos componentes Arc en *E. coli*

E. coli crece tanto en condiciones aeróbicas, anaeróbicas y fermentativas, para lo cual debe ajustar su metabolismo de una forma eficiente, de acuerdo a las condiciones rédox de crecimiento. La respiración aeróbica es preferida, por que el O_2 tiene el poder oxidante mas alto ($E^{\circ} = +820\text{mV}$), entre todos los aceptores de electrones utilizables, siendo la ubiquinona ($E^{\circ} = +100\text{mV}$) el adaptador entre el donador y aceptor de electrones (50).

Cuando la bacteria se encuentra en condiciones anaeróbicas, hay aceptores de electrones alternativos tales como nitrato ($E^{\circ} = +420\text{mV}$), fumarato ($E = +31\text{mV}$), nitrito, o trimetilamina-N-óxido ($E = +0.013 \text{ V}$) utilizando a la menaquinona ($E = -74 \text{ mV}$) y la dimetilmenaquinona ($E^{\circ} = +36\text{mV}$) como intermediario para los tres últimos. En el caso de ausencia de estos aceptores de

electrones, la célula opta por la vía fermentativa para generar energía, en la cual NAD ($E^{\circ} = -320\text{mV}$) hace el papel de adaptador entre el donador y aceptor de electrones. Lo anterior resulta en la excreción de compuestos como D-lactato, acetato, formato, fumarato, etanol, CO_2 y H_2 (6, 86).

El contar con distintos caminos metabólicos para la obtención de energía a nivel transcripcional, frecuentemente requiere la cooperación de varias proteínas de regulación globales. El nitrato, es el aceptor de electrones preferido cuando la célula se encuentra en condiciones anaeróbicas de crecimiento, el control su utilización así como de su reducción a nitrito, se encuentra regulada por los sistemas de dos componentes (75) NarX/L (76) y NarQ/P (66). La regulación transcripcional en respuesta a O_2 , este mediada por el regulador global citosólico Fnr (42) y el sistema de dos componentes ArcA/B (33, 34).

Bajo condiciones de crecimiento anaeróbico, el regulador de Fumarato nitrato reductasa (Fnr), activa la expresión de genes que codifican componentes alternativos de la cadena de transporte de electrones y reprime algunos genes con función aeróbica. Fnr consiste en un dominio de unión a DNA y un dominio sensor. Este último, contiene cuatro residuos de cisteína, capaces de formar un grupo de $(4\text{Fe-4S})^{2+}$ que actúa directamente como sensor de oxígeno (85). Resultados de experimentos de perfiles de expresión génica, demostraron que casi dos tercios de los genes cuya expresión es afectada por Fnr, también son afectados por ArcA (70, 71). El SDC Arc es un regulador global de genes que se expresan en crecimiento en microaerobiosis y anaerobiosis (50)

Los elementos de este SDC fueron descritos en la década de los 80's por Iuchi y Lin (33). El gen *arcA*, localizado en el minuto cero del genoma de *E.coli*, codifica la proteína citosólica de 29 kDa nombrada ArcA (33). Contiene un residuo de Asp⁵⁴ de la región N-terminal (también denominado D₂) el cual tiene como función recibir el grupo fosfato que viene de la CS y un fragmento hélice-vuelta-hélice para unión a DNA en la región C-terminal (Fig. 4).

Se le ha dado otros nombres dependiendo del enfoque de cada estudio como por ejemplo **dye** por que su delección causa sensibilidad a ciertos marcadores colorantes que generan especies reactivas de oxígeno como al azul

de toluidina (68) y azul de metileno (14), **seg** por que al estar mutado se observaron problemas en la replicación (44) y segregación del plásmido F (22, 35), **sfrA** por la regulación del factor sex (o pili) (4, 5, 17) y **cpxC**, por el plásmido de expresión para la conjugación (53). Sin embargo Iuchi y Lin (1988) le llamaron *arcA* por que relacionaron su rol central con la represión anaeróbica de genes asociados a la condición aeróbica de crecimiento (33).

La CS del sistema Arc es la proteína transmembranal ArcB (Fig. 5), de 778 aminoácidos. Esta CS se encuentra anclada a la membrana por dos cruces transmembranales (TM1 y TM2) entre los cuales se encuentra un inusual dominio periplásmico de tan solo 16 aminoácidos (29, 40), mientras que en la mayoría de las CS este dominio consta de alrededor de 150 aminoácidos. Se ha descrito que el dominio transmembranal de ArcB no participa directamente en la recepción de la señal, pero sirve para mantener a la proteína cerca de la señal de activación (40). De TM2 se extiende una porción "linker", la cual contiene un "zipper de leucinas y un dominio PAS putativos (50).

Un análisis de predicción de estructura secundaria en ArcB, reveló que los residuos de leucinas conservados en las posiciones 73, 80, 87 y 94 (20), cumplen con las características propias de un "zipper de leucinas". La funcionalidad de esta estructura en ArcB, fue explorada mediante el reemplazo de los residuos de Leu de las posiciones 80, 87 y 94 por Ala. Se observó que la sustitución en Leu80 y Leu94, no alteraron la capacidad de señalización de ArcB *in vivo* e *in vitro*, mientras que la sustitución de Leu⁸⁷ por Ala, resultó en un fenotipo ArcB nulo *in vivo*, aunque conservó su actividad *in vitro*. Los autores no concluyeron si la Leu⁸⁷ se encuentra implicada en la señalización, pero descartaron la posibilidad de que ArcB contiene un "zipper" de leucinas funcional (52). También se propone que esta cinasa contiene un dominio PAS en su porción "linker" (92).

Conectado a la porción "linker", se encuentra un dominio transmisor primario (H₁) con un residuo de His en la posición 292 (es el sitio de autofosforilación), en este dominio además se encuentra un "pocket" de glicina o caja G (sitio en el que se une a ATP). También contiene un dominio receptor

primario (D_1) con un residuo de Asp en la posición 576 (28, 30-32) y un dominio transmisor secundario (H_2) con un residuo de His en la posición 717 (27) (Fig. 5).

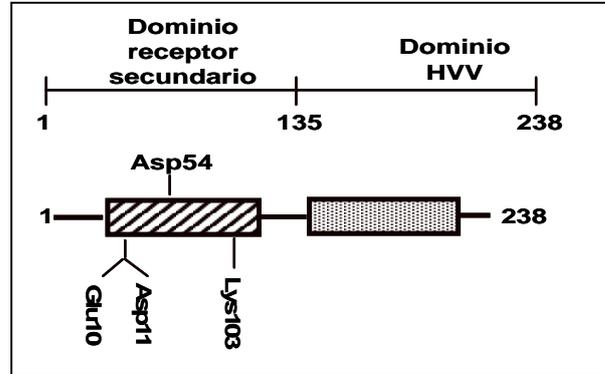


Figura 4. Representación de ArcA o RR del sistema de Arc. Es una proteína citosólica con un dominio receptor (D_1) con un residuo de Asp en la posición 54, y su dominio de hélice-vuelta-hélice para unión a DNA.

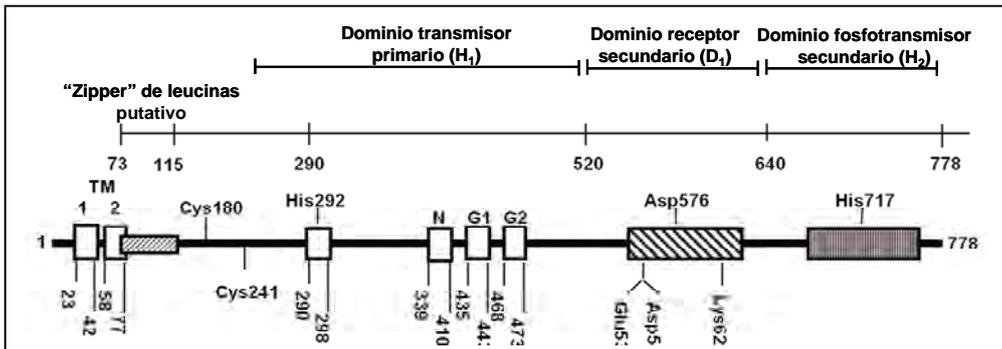


Figura 5. Representación gráfica de la proteína ArcB (20, 49). Se observa una porción NH_2 -terminal corta, seguida de dos segmentos hidrofóbicos que funcionan como anclaje a la membrana. Posteriormente se observa un "zipper" de leucinas putativo; dos residuos de Cys en las posiciones 180 y 241. Seguido el dominio transmisor primario o H_1 , el cual contiene la caja G (sitio catalítico de unión a ATP) y un "pocket" con un residuo de His en la posición 292. ArcB además contiene un dominio receptor primario con un residuo de Asp en la posición 576 y el el COOH-terminal un dominio fosfotransmisor secundario con un residuo de His en la posición 717.

Mediante análisis de alineamiento, (BLAST), se identificaron varios homólogos de ArcB en diferentes especies de bacterias como *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Vibrio fischeri*, *Yersinia pestis*, *Erwinia carotovora* y *Haemophilus influenzae* (51).

Transmisión y decaimiento de la señal en el sistema Arc

Bajo condiciones anaeróbicas, ArcB es activa como cinasa y es autofosforilada a expensas de ATP. Dicho proceso de fosforilación es modulado o incrementado, por ciertos metabolitos tales como piruvato, D-lactato y acetato (18, 67). Subsecuentemente ArcB-P transfosforila a ArcA en pasos de fosfo-relevo vía $\text{His}^{292} \rightarrow \text{Asp}^{576} \rightarrow \text{His}^{717} \rightarrow \text{Asp}^{54}$ (19, 41). También se sugiere que tanto *in vitro* como *in vivo* en condiciones de ayuno ArcA es capaz de autofosforilarse a expensas de acetil fosfato (acetil-P) o carbamoil fosfato (13, 46).

ArcA fosforilada (ArcA-P) actúa como represor de alrededor de 300 operones involucrados en la respiración aeróbica, entre ellos, genes que codifican dehidrogenasas de la clase de las flavoproteínas como la L-lactato deshidrogenasa, varias enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y genes que codifican proteínas del complejo citocromo o oxidasa y por el contrario activa un pequeño número de genes que codifican proteínas asociadas al metabolismo anaeróbico o fermentativo, como por ejemplo genes que codifican a el citocromo *d* y piruvato formato liasa (28, 33).

En crecimiento aeróbico, se sabe que la actividad cinasa de ArcB es inhibida por quinonas oxidadas (21), las cuales funcionan como la señal que apaga el sistema (Figura 6). El silenciamiento de la actividad cinasa, ocurre mediante un mecanismo molecular que involucra la oxidación de dos residuos de Cys localizados en la porción "linker" de ArcB, los cuales participan en la formación intermolecular de enlaces disulfuro (49). Bajo estas condiciones ArcB funciona como fosfatasa, catalizando la desfosforilación de ArcA vía un fosfo-relevo reverso que involucra al residuo de Asp^{54} del dominio receptor de ArcA y hacia $\rightarrow \text{His}^{717} \rightarrow \text{Asp}^{576}$ de ArcB, liberándose finalmente Pi (20, 62) (Fig. 6)

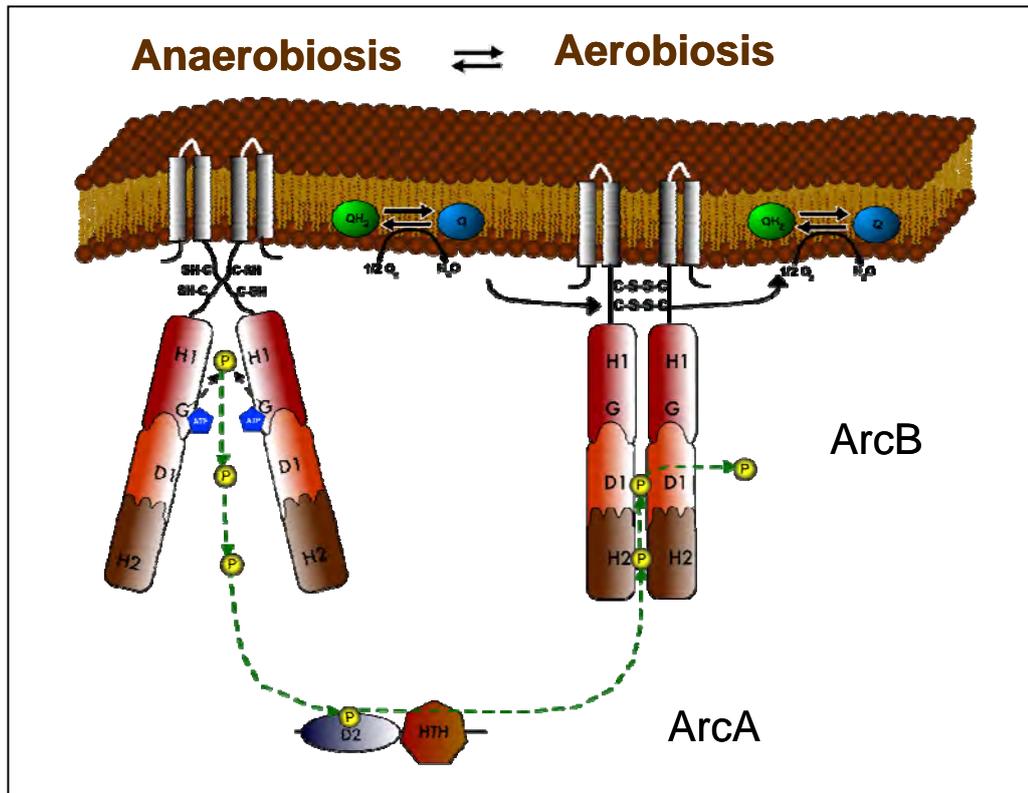


Figura 6. Actividades de cinasa y fosfatasa de ArcB. Se esquematiza la bicapa lipídica con la presencia de homodímeros de ArcB en condiciones anaeróbicas (lado izquierdo) y condiciones aeróbicas (lado derecho). La proteína ArcB se encuentra anclada a la membrana por dos cruces transmembranales. Seguido de uno de estos cruces, sigue la porción “linker” que contiene un “zipper” de leucinas y un dominio PAS (ambos dominios son putativos hasta la fecha). También en esta porción, se encuentran dos residuos de cisteínas en las posiciones 180 y 241, que se encuentran involucrados en el silenciamiento de la actividad cinasa (ver texto).

Justificación

A pesar de que a la fecha, la cinasa sensora ArcB ha sido ampliamente estudiada y se conoce que, esta anclada a la membrana, su función, la señal que apaga el sistema, el fosfo-relevo por el cual transfosforila y desfosforila a ArcA, no se han realizado trabajos que aclaren como se lleva a cabo la transferencia del grupo fosforilo, cuando se encuentra activa como cinasa. El modelo generalmente aceptado, es que las CS se encuentran unidas a la membrana en forma de homodímeros (15, 79, 82, 87), y la autofosforilación ocurre por reacción intermolecular (56, 77, 80, 90). Lo anterior quiere decir que el ATP es unido en la caja G de un monómero y transfiere el grupo γ -fosforilo al residuo de His del monómero compañero (Fig. 7A). Algunos ejemplos incluyen EnvZ (90), NtrB (58), CheA (80), así como la CS tripartita BvgS (11). Lo anterior hace interesante conocer si ArcB también sigue el modelo generalmente aceptado de autofosforilación intermolecular.

Por otro lado ArcB es una proteína bifuncional, lo que quiere decir que actúa como cinasa en condiciones anaeróbicas y como fosfatasa en condiciones aeróbicas. Para realizar ambas funciones ArcB utiliza a los residuos de Asp⁵⁷⁶ y His⁷¹⁷, lo anterior hace interesante conocer que es lo que permite diferenciar cual es la direccionalidad que toma el grupo fosforilo en ambas condiciones de crecimiento. Un rubro importante que se comenzó a tratar en el presente trabajo, fue el de evidenciar si el fosfo-relevo es llevado a cabo por reacción intermolecular (Fig. 7C) o intramolecular (Fig. 7D), cuando la proteína esta activa como cinasa.

Objetivos

- 1.- Identificar si la reacción de autofosforilación es realizada por reacción intermolecular (Fig. 7A) o intramolecular (Fig. 7 B) en la CS ArcB cuando se encuentra activa como cinasa.
- 2.- Explorar si el fosfo-relevo es realizado por reacción intramolecular (Fig. 7C) o intermolecular (Fig. 7D) cuando ArcB se encuentra activa como cinasa.

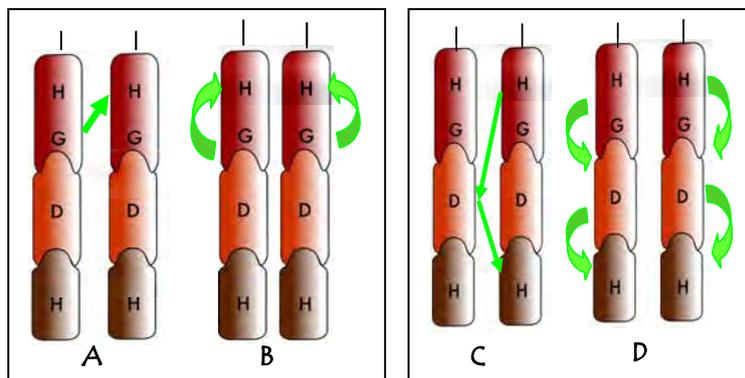


Figura 7. A y B) Tipos de reacciones por las que puede ser llevada a cabo la autofosforilación en ArcB. A) Ejemplificación de una reacción de autofosforilación intermolecular, en la cual un monómero une ATP y fosforila al residuo de His del monómero compañero dentro del homodímero. B) Ejemplificación de la autofosforilación intramolecular, en la cual la caja G une ATP y fosforila al residuo de His del mismo monómero dentro del homodímero. **C y D) Tipos de reacciones por los que puede ser llevado a cabo el fosfo-relevo en ArcB.** C) Ejemplificación de fosfo-relevo intermolecular, en el residuo de His²⁹² transfiere el grupo fosforilo al residuo de Asp⁵⁷⁶ y este a su vez al residuo de His⁷¹⁷ del monómero compañero dentro del homodímero. B) Ejemplificación del fosfo-relevo intramolecular en el cual el grupo fosforilo es transferido en los centros catalíticos del mismo monómero dentro del homodímero.

Materiales y Métodos

Para verificar como es la transferencia del grupo fosofrilo en el paso de la autofosforilación y del fosfo-relevo en la cinasa sensora ArcB, se realizaron una serie de ensayos *in vitro*, combinando péptidos variantes de ArcB en condiciones reductoras y en presencia de $\gamma^{32}\text{P}$ ATP, realizando distintas cinéticas dependiendo de la planeación de cada ensayo. Para confirmar los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, se realizó la comparación, de la expresión de los genes reporteros $\lambda\Phi(\text{IldP}'\text{-LacZ})$ y $\lambda\Phi(\text{cyd-LacZ})$, los cuales en condiciones de anaerobiosis son reprimido y activado respectivamente por ArcA-P condiciones anaeróbicas. Esta actividad fue cuantificada con ensayos de β -galactosidasa realizados a crecimientos de cultivos de *E. coli* transformadas con distintos plásmidos, dependiendo de la planeación de cada experimento.

Se siguieron una serie de protocolos, para el mantenimiento de las cepas y los vectores utilizados, la obtención de proteínas recombinantes, así como los ensayos necesarios para realizar este trabajo, los cuales serán descritos a continuación.

Cepas y plásmidos utilizados

Tabla 1. Cepas, plásmidos y “primers” utilizados

Nombre de la cepa	Características	Utilidad	Referencia
<i>E. coli</i> DH5α	F- ϕ 80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-, mk+) <i>phoA</i> supE44 <i>thi-1 gyrA96 relA1</i> λ-	Como reservorio y mantenimiento a -70°C de los plásmidos construidos y utilizados en este trabajo.	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21	B F- <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B - m _B -) gal [malB ⁺] _{K-12} (λ ^S)	Para mantenimiento del vector MX065 y sobreexpresión de MBP-ArcB ^{G*}	Stratagene
<i>E. coli</i> M15	Esta cepa esta diseñada para la sobreexpresión de proteínas a partir de genes insertados en el vector pQE30.	Para sobreexpresión de las proteínas variantes de ArcB que contienen el epítotope de His	New Englan
<i>E. coli</i> ECL 5002	Contiene ArcB silvestre y al gen reportero λφ(<i>lIdP'</i> - <i>lacZ</i>) que es reprimido por ArcB en anaerobiosis.	Como control de la represión del gen reportero por ArcB en condiciones anaeróbicas.	(40)
<i>E. coli</i> ECL 5003	Esta cepa contiene ArcB silvestre y al reportero λφ(<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>), que es activado por ArcB en anaerobiosis	Como control de la activación del gen reportero por ArcB en condiciones anaeróbicas.	(40)
<i>E. coli</i> ECL 5012	Cepa ArcB nula y contiene al reportero λφ(<i>lIdp-lacZ</i>)	Como control de ArcB nula y para complementación con ArcB y ArcB ^{G*} plasmídico.	(40)
<i>E. coli</i> ECL 5004	Cepa ArcB nula y contiene al reportero λφ(<i>cydA'-lacZ</i>)	Como control de ArcB nula y para complementación con ArcB y ArcB ^{G*} plasmídico.	(40)
<i>E. coli</i> ECL 5030	Cepa mutante en el sitio de autofosforilación y contiene al gen reportero λφ(<i>lIdP'-lacZ</i>)	Para ensayos de complementación <i>in vivo</i> con ArcB ^{G*} plasmídico.	(41)
<i>E. coli</i> ECL 5022	Cepa mutante en el sitio de autofosforilación y contiene al gen reportero λφ(<i>cydA'-lacZ</i>)	Para ensayos de complementación <i>in vivo</i> con ArcB ^{G*} plasmídico.	(41)
Nombre del plásmido	Características	Utilidad	Referencia
pBAD30	Ampicilina ^R	Para expresión de ArcB ^{1-520G*} en cepas ArcB silvestre	Beckwith Lab
pBluescript II KS +	Ampicilina ^R	En pasos intermedios para la construcción de vectores utilizados en este trabajo	Lablife
pEXT21	Spectinomycin ^R	Construcción de los plásmidos que fueron utilizados en los ensayos de complementación <i>in vivo</i>	(16)
pMALC2	Ampocilina ^R	Construcción del vector pMX065 para la obtención de la proteína MBP-ArcB ^{G*}	Lablife
pQE30	Ampicilina ^R	Construcción de plásmidos	Quiagen

		que contienen variantes de ArcB	
pQE30ArcB ⁷⁸⁻⁷⁷⁸	ArcB ⁷⁸⁻⁷⁷⁸ silvestre o ArcB	Sobreexpresión de la proteína ArcB ⁷⁸⁻⁷⁷⁸	(19)
pQE30ArcB ⁷⁸⁻⁵²⁰	Codifica para His-ArcB ⁷⁸⁻⁵²⁰ o dominio H ₁	Sobreexpresión de la proteína ArcB ⁷⁸⁻⁵²⁰ o dominio H ₁	(19)
pMX020	pBAD30 +RBS +arcB ⁵²¹⁻⁷⁷⁸	Pasos intermedios, para construir pMX065	(62)
pMX025	Este plásmido con tiene el gen <i>arcB</i> ^{78-778G470A,G472A} y se obtuvo la proteína ArcB ^{G*} la cual es incapaz de unir ATP.	Sobreexpresión de la proteína His-ArcB ^{G*}	(61)
pMX028	Este plásmidos contiene al gen <i>arcB</i> ^{78-778H292Q} , que codifica para la proteína ArcB ^{H*} , que es incapaz de autofosforilarse.	Sobreexpresión de His-ArcB ^{78-778H292Q}	(61)
pMX039	Plásmido de bajo número de copias (3) al cual se le introdujo el <i>promotor de arcB</i> y el gen <i>arcB</i> ¹⁻⁷⁷⁸ .	Expresión para los ensayos de complementación <i>in vivo</i>	(61)
pMX040	pBluescript + <i>promotor de arcB</i> + <i>arcB</i> ^{1-778G470A,G472A}	Utilizado en pasos intermedios para la construcción de otros vectores	(61)
pMX041	Plásmido de bajo número de copias que contiene al <i>promotor de arcB</i> y al gen <i>arcB</i> ^{1-778G470A,g472A} que codifica para ArcB ^{G*}	Expresión de ArcB ^{1-778G*} en ensayos de complementación <i>in vivo</i>	(61)
pMX064	pQE30 contiene el gen <i>arcB</i> ^{78-520 G470A,G 472A} , que codifica para el dominio H ₁ de ArcB ^{G*} , en cual no puede unir ATP.	Pasos intermedios para la construcción de pMX065	(61)
pMX065	Este plásmido contiene al gen <i>arcB</i> ^{1-520G470A,G472A} que codifica para ArcB ^{1-520G*}	Expresión <i>in vivo</i> de ArcB ^{1-520G*} , bajo un promotor inducible con arabinosa, con la finalidad de aumentar la cantidad de ArcB ^{1-520G*} en la célula.	(61)
pMX067	pMALC2 + <i>arcB</i> ^{78-778 G470A, G472A}	Sobreexpresión de MBP-ArcB ^{G*}	(61)
pMX712	PBluescript+ <i>promotor de arcB</i> +ArcB ¹⁻⁷⁷⁸	Pasos intermedios para la construcción de otros vectores	(61)

“Primers”	Secuencia	Mutación/Dirección	Referencia
ArcBG2	5´-CGGCCAGAGCAATAGCGGTGCCGG TGGC-3´	Caja de unión a ATP (G470A,G472A)/ Forward	(61)
ArcBH*	5´-GGTGTACGCGCAATTCTTGACTGATGGTGG´-3	Caja de	(61)

		autofosforilación (His ²⁹² Gln)/Forward	
ArcB 661-3'	5'- CCCGGATCCCATATGGAGCAACTGGAGGAGTC ACGAC-3'	Interno de <i>acrB</i> / reverso	(19)
EZ-1	5'- CCCGATCCATATGGAGCAACTGGAGGAGTCAC GAC-3'	Término de <i>arcB</i> /reverso	(19)

Para verificar la correcta construcción de cada plásmido, se purificaron siguiendo el protocolo de extracción de DNA de roche. Posteriormente se digirió el DNA durante 1 h con las enzimas de restricción *BamH1-HindIII*. Los fragmentos fueron separados durante 30min en gel de electroforesis de agarosa al 0.8% y para revelarlo, se utilizó la tinción con bromuro de etidio a una concentración de 0.1% para verificar los pesos moleculares de los fragmentos, tomando como referencia el marcador de peso molecular de escalera de 1Kb de Biolabs.

Proteínas recombinantes utilizadas.

Para realizar los ensayos *in vitro* necesarios para este trabajo, se utilizó una variedad de proteínas variantes de ArcB, la que a continuación son esquematizadas en orden de uso (Fig. 8). Para simplificar la purificación de las proteínas variantes de ArcB, se eliminó la parte correspondiente a los fragmentos transmembranales, que comprende los residuos 1 al 77. Se sabe que estas variantes citosólicas son funcionales por que en previos estudios se ha demostrado que la eliminación de estos segmentos no afecta la autofosforilación y la subsecuente transfosforilación al regulador de respuesta (19, 25, 31, 36, 48, 63).

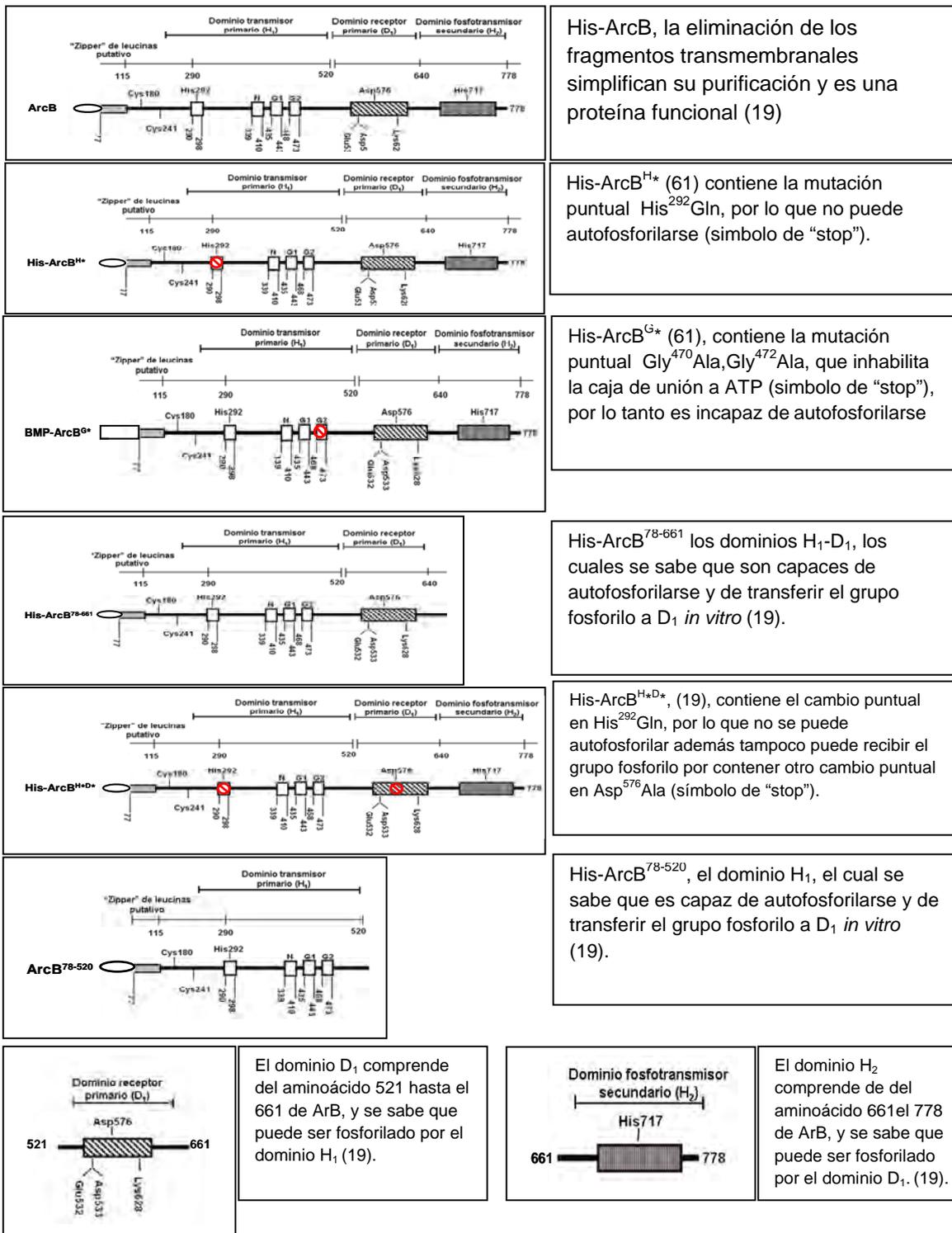


Figura 8. ArcB y sus variantes. Se esquematiza y explica brevemente cada proteína que fue utilizada en el presente trabajo. El símbolo de color rojo (“stop”), señala la función perdida por la presencia de una mutación puntual.

Medios y condiciones de crecimiento

Las condiciones de crecimiento fueron distintas, dependiendo del ensayo realizado. Para selección de células transformantes, se utilizaron placas de medio LB-agar adicionado con glucosa 0.02% y antibiótico de selección. Para crecimiento de las colonias transformantes y para cultivos madre, se utilizaron 5ml de LB-líquido con el antibiótico de selección.

En el caso de los cultivos utilizados para el ensayo de la β -galactosidasa, se utilizó medio LB-líquido adicionado con MOPS (3-(N-Morfolina) ácido propanosulfónico) 0.1 M, D-xilosa 20 mM (medio LB), L-lactato 20 mM como inductor del reportero $\lambda\phi$ (*ltdp-lacZ*), se adicionó el antibiótico de selección necesario para cada plásmido y cuando fue necesario también arabinosa en diferentes concentraciones.

Para el crecimiento aeróbico, las células fueron cultivadas en 5 ml de medio LB con o sin L-lactato, a temperatura de 37°C y con agitación a 300rpm. Para crecimiento en condiciones de microaerobiosis, las células fueron cultivadas en tubos saturados con medio y con tapa de rosca, la agitación fue realizada con magneto.

Células competentes

Para la preparación de células competentes de las cepas necesarias para este trabajo, se utilizó el método descrito por Inouye (26) como se describe.

1. Se toman 200 μ l de un cultivo madre para inocularlos en 20 ml de medio líquido Luria-Bertani Broth (Fluka, BioChemica) al 2% y se incuba el cultivo a 18 °C con agitación hasta a una $OD_{600} = 0.4$.
2. Se incuba el cultivo en hielo durante 10 min y posteriormente se centrifuga a 3000 rpm durante 15 min a 4°C.
3. Se resuspende con cuidado el pellet en 4 ml de buffer TB (72) frío, incubándolo posteriormente en hielo durante 30 min y se centrifuga a 3000 rpm durante 15 min.
4. Se repite el paso anterior.

5. Finalmente la pastilla es resuspendida en 1.6 ml de TB con 7% de DMSO, separando 200 μ l de células en tubos Eppendorff previamente marcados con el nombre del aislado correspondiente.
6. Inmediatamente se procede a la congelación con N₂ líquido y se almacenan a – 75°C hasta su posterior transformación con los plásmidos necesarios.

Transformación

Se incubaron las células en hielo durante 10 min para descongelarlas. Se adicionó 1 μ l de cada plásmido utilizado en este trabajo (Tabla 1). La mezcla fue incubada en hielo durante 30 min y posteriormente se les dio un choque térmico a 43 °C durante 30s. Inmediatamente se le adicionó a cada tubo 1 ml de medio de recuperación (LB 2% y glucosa 0.02%) y se incubaron nuevamente durante 1 h a 37°C. Las células recuperadas fueron centrifugadas a 2500 rpm y posteriormente se sembraron en placas LB-agar (suplementadas con el antibiótico correspondiente según la resistencia del plásmido). Las placas de cultivo sembradas fueron incubadas durante toda la noche a 37°C. Una vez obtenidas colonias aisladas, se inoculó una en 5 ml de LB líquido con el antibiótico de selección, hasta obtener un cultivo denso.

Mantenimiento de las cepas

Para el mantenimiento tanto de las cepas que contienen variantes ArcB mutantes, así como las cepas portadoras de los plásmidos utilizados en este trabajo, primero se inoculó de una colonia transformante en 5 ml de medio líquido Luria Bertani (Sigma) con el antibiótico de selección necesario. Cada cultivo se mantuvo con agitación constante durante 12 h. Posteriormente se agregaron 1400 μ l de cada cultivo en 450 μ l de glicerol al 80% y se congelaron a -70 °C.

Sobreexpresión y purificación de proteínas recombinantes

Para distinguir las reacciones intramoleculares de las intermoleculares fueron generados una serie de péptidos mutantes bloqueados en pasos específicos de los pasos de autofosforilación, y del fosfo-relevo. Estos se obtuvieron mediante sobre-expresión de proteínas utilizando al vector pQE30 el

cual contiene un promotor que se induce con isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG).

Cada vector que codifica las distintas variantes de ArcB, fue utilizado para la transformación de la cepa M15 (pREP4), siguiendo el protocolo anteriormente descrito. De las transformantes obtenidas se tomó una colonia para realizar la sobre-expresión de la proteína. Primero se realizó un cultivo madre en 5 ml de medio Luria Berthani (LB) adicionado con kanamicina y ampicilina 100 mg/ml e incubándolo durante toda la noche a 37°C con agitación.

Al día siguiente, fueron inoculados matraces con 200 ml con medio YT 2x (triptona 16g, extracto de levadura 10g, NaCl 5g por litro de dH₂O) con 3 ml de cada cultivo madre. Los cultivos fueron incubados a 37°C hasta obtener una absorbancia a 600 nm de 0.7. En este punto se adicionó IPTG 1 mM y se prosiguió con la incubación durante 4 h. Terminado este tiempo, el cultivo fue centrifugado a 7000 rpm durante 20 min a 4°C y posteriormente congeladas a -20°C hasta su posterior utilización para la purificación de las proteínas

Cada pastilla de células obtenida, fue descongelada y resuspendida en 5 ml de buffer de lisis (Na₂HPO₄ 50mM, NaCl 300 mM, pH 8) frío. Las células obtenidas fueron sometidas a un tratamiento para lisar células, con la prensa tipo French a 1500 libras de presión. Se recuperó el lisado en un tubo de base redonda, se le agregaron 5 μ l de DNAsa (1 μ g/ml) dejándolo incubar durante 10 min en hielo, y centrifugado a 10000 rpm durante 20 min.

El sobrenadante fue transferido a otro tubo con 2 ml de resina nitrilo-ácido triacético (Ni-NTA) previamente equilibrada con el amortiguador de lisis. La resina se utilizó para unir a la proteína mediante el extremo de histidinas localizada en el NH₂-terminal de las proteínas de acuerdo al protocolo de Quiagen (The Quiaexpressionist, 1992). Tanto la resina como el sobrenadante, fueron mezclados mediante agitación e incubados a 4 °C durante 2 h. La mezcla fue transferida en su totalidad en una columna de polipropileno de 15 ml, dejando el tiempo necesario hasta que la resina se asentara. Se realizaron tres lavados con el amortiguador de lisis, posteriormente con el amortiguador de lavado (Na₂HPO₄ 50mM, NaCl 300mM, glicerol 10%, pH 6.5). Finalmente se realizó la elusión de la

proteína con el amortiguador de elusión (Na_2HPO_4 50mM, NaCl 300 mM, imidazol 0.5M, glicerol 25%, pH 8). Cada una de las proteínas fue dializada en amortiguador de fosfatos (PO_4 0.1M, EDTA , NaCl 0.15M, Glicerol 25%) durante toda la noche con incubación a 4°C, y se realizó la cuantificación y almacenamiento a -20°C hasta su posterior utilización.

También se realizó la extracción de MBP-ArcB^{G*}, a la cual el marcaje de la proteína de unión a maltosa (MBP) le proporcionó un tamaño mayor al de His-ArcB^{H*}. Un cultivo madre de 5 ml de la cepa BL-21 previamente transformada con el plásmido pMX067 (pMALC2+ArcB^{78-778G*}), fueron inoculados en 500ml de medio LB suplementado con ampicilina 100mg/ml y glucosa al 0.2%. El cultivo se dejó crecer a 37°C con agitación, hasta obtener una $\text{OD}_{600}=0.6$, momento en el que se le agregó IPTG 0.3M como inductor de la sobreexpresión de la proteína, incubándose durante 3h mas. Posteriormente, el medio fue centrifugado a 7000 rpm durante 20 min para obtener una pastilla de células que fue congelada hasta su posterior uso.

La pastilla obtenida, fue resuspendida en amortiguador de columna (TrisHCl 20mM, NaCl 0.2M, EDTA 1mM) (Sol. A) frío y se sometieron a 1500 lb de presión en la prensa French para lisar a las células. La suspensión obtenida, fue centrifugada a 10000rpm durante 10min y el sobrenadante fue transferido a un tubo Falcon con 1 ml de resina de amilasa, previamente equilibrada con la Sol. A, agitando durante dos horas a 4°C. La mezcla fue transferida en su totalidad en una columna de polipropileno de 15 ml, dejando el tiempo necesario hasta que la resina se asentara. Se realizaron cinco lavados con la solución A. Finalmente se realizó la elusión de la proteína con el amortiguador de elusión (solución A con maltosa 10mM). Finalmente se realizó la cuantificación y almacenamiento a -20°C hasta su posterior utilización.

Ensayos de fosforilación

Para distinguir las reacciones intramoleculares de las intermoleculares se realizaron varias combinaciones de péptidos mutantes. Fueron incubadas en presencia de 40 μM de ($\gamma^{32}\text{-P}$) ATP (actividad específica de 2Ci/mmol (1Ci=37

GBq) y amortiguador de fosforilación (Heppes 33 mM (pH 7.5), KCl 50mM, MgCl₂ 5mM, ditioneitol 0.1%, EDTA 0.1mM y glicerol 10%) y se probó su habilidad para transferir en grupo fosforilo. Por ejemplo se incubaron ArcB^{H*} (bloqueada en el sitio de autofosforilación) y ArcB^{G*} (incapaz de unir ATP) para verificar su capacidad de transfosforilarse. El mismo principio se utilizó para investigar la autofosforilación y los pasos del fosfo-relevo. Las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente, hasta que terminara cada ensayo, e inmediatamente todas las alíquotas fueron separadas en gel de acrilamida con sodio dodecil fosfato (SDS-PAGE), durante el tiempo necesario para cada ensayo, dependiendo del tamaño de las proteínas. Subsecuentemente cada gel fue teñido con solución de tinción (azul de Coomassie 0.125%, metanol 50%, ac. Acético 10%), hasta que fuera revelada la presencia de las bandas y desteñido hasta quitar el exceso de Coomassie con solución desteñidora (metanol 40% y ácido acético 10%). Posteriormente, cada gel fue secado durante 30min a 80°C y expuesto a un autorradiograma Kodak durante toda la noche a -70°C para que la señal fuera magnificada.

Fosforilación de His-ArcB.

Para estandarizar y verificar las condiciones apropiadas, el primer ensayo realizado fue la fosforilación de His-ArcB. Se efectuó una cinética de fosforilación, incubando aproximadamente 10pmol de la proteína en 30µl de reacción en presencia de [³²P]ATP y amortiguador de fosforilación. Cada treinta segundos, fueron tomados 5µl y se adicionaron a igual cantidad de solución de corrida SDS 5x para detener la reacción. Todas las alíquotas fueron mantenidas a temperatura ambiente hasta que terminó el ensayo y fueron tratadas como se describió anteriormente, para obtener un revelado en autorradiograma.

Comparación de la estructura secundaria de His-ArcB, His-ArcB^{H*} y His-ArcB^{G*}.

Con la finalidad de verificar el correcto plegamiento de His-ArcB, His-ArcB^{G*} y His-ArcB^{H*}, se realizó el análisis de su estructura secundaria por el espectro de UV por dicroísmo circular (CD). Se tomaron aproximadamente 1.5µM de cada

proteína y por separado, se mantuvieron en solución de diálisis (Na_2HPO_4 9.32mM, NaH_2PO_4 6.8 mM y β -mercaptoetanol 10mM) durante toda la noche con la finalidad de quitar el exceso de sales. Posteriormente, fueron transferidas a una cubeta de cuarzo y sometidas a intervalos de luz de 190nm a 260nm.

Incapacidad de las mutantes His-ArcB^{H*} y His-ArcB^{G*} de autofosforilarse.

Para verificar que las mutantes His-ArcB^{H*} y His-ArcB^{G*} no fueran capaces de autofosforilarse, se incubaron aproximadamente 10pmol de cada proteína en 20 μl de reacción, en presencia de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y amortiguador de fosforilación. Durante el experimento se tomaron 5 μl de reacción cada treinta segundos y fueron agregados a igual cantidad de solución de carga de SDS 5x para detener la reacción. Todas las aliquotas fueron incubadas a temperatura ambiente hasta el término de cada experimento y finalmente fueron separadas a SDS-PAGE durante 1h. Una vez terminado el tiempo de la electroforesis, el gel obtenido fueron teñidos para revelar la presencia de la banda, desteñido para quitar el exceso de azul de Coomassie, deshidratado y expuesto a una placa de revelado Kodak durante 12h a -70°C para magnificar la señal radiactiva.

Capacidad de las mutantes His-ArcB^{H*} y His-ArcB^{G*} de recibir el grupo fosforilo en el dominio receptor y/o transmisor secundario.

Con la finalidad de corroborar si His-ArcB^{H*} y His-ArcB^{G*} eran capaces de recibir el grupo fosforilo en el dominio receptor (D_1) o en el dominio fosfotransmisor (H_2), ambas mutantes fueron incubadas con la His-ArcB⁷⁸⁻⁶⁶¹. Se incluyó esta variante (His-ArcB⁷⁸⁻⁶⁶¹), por que en estudios previos se ha mostrado que es capaz de fosforilarse *in vitro* (19).

Para realizar las reacciones, se tomaron aproximadamente 10pmol de cada mutante y se adicionaron a 40 μl de reacción, en presencia de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y amortiguador de fosforilación. Después de 90s de reacción se adicionaron aproximadamente 2pMol de His-ArcB⁷⁸⁻⁶⁶¹ a la mezcla, siguiendo la cinética de fosforilación durante treinta segundos más. Las aliquotas tomadas, fueron mezcladas con 5 μl de solución de carga de SDS 5x para detener la reacción.

Todas las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente hasta que terminara el ensayo y se procedió a correr las muestras en SDS-PAGE, siguiendo el protocolo como se describió anteriormente.

Complementación *in vitro* de His-ArcB^{H*} con His-ArcB^{G*}.

Para verificar si en la CS ArcB la reacción de autofosforilación es intermolecular o intramolecular, se realizó una complementación *in vitro*. Este experimento se realizó con el supuesto que al mezclar ambas mutantes, se formarían heterodímeros, así en caso de que la reacción sea intermolecular la His²⁹² de ArcB^{G*}, será fosforilada por ArcB^{H*}, y en caso de que sea intramolecular, entonces no se observará transferencia del grupo fosforilo (Fig. 7).

Ambas proteínas fueron incubadas en proporción equimolar en 20 µl de reacción en presencia de [γ ³²P]ATP y amortiguador de fosforilación. Cada 30 segundos fueron tomados 5µl de reacción y se adicionaron a igual cantidad de amortiguador de carga de SDS 5x para detener la reacción. Todas las aliquotas fueron mantenidas a temperatura ambiente hasta el término del experimento, y para obtener el autorradiograma, se procedió como se describió anteriormente.

Promoción de heterodímeros

Se mezclaron His-ArcB^{G*} y His-ArcB^{H*} en concentraciones equimolares en 50 µl de solución y con la finalidad de aumentar las posibilidades de que se formaran heterodímeros, la mezcla fue sometida a un tratamiento con urea al 8M durante 30 min para desnaturalizar a las proteínas, subsecuentemente y con la finalidad de que las proteínas fueran renaturalizadas, se eliminó la urea gradualmente, mediante diálisis en un amortiguador de fosfato de sodio (pH 8.0) 0.1M, EDTA 1mM, NaCl 150mM y glicerol 25%. Como control la proteína His-ArcB también fue sometida al mismo tratamiento y por último. Se realizaron ensayos de fosforilación, se tomaron 5 µl de reacción en los tiempos indicados en el análisis de SDS-PAGE y se procedió como se ha explicado anteriormente.

Formación de heterodímeros His-ArcB^{H*}/MBP-ArcB^{G*}.

Con la finalidad de verificar la formación de heterodímeros entre ambas mutantes, se utilizó la proteína recombinante MBP-ArcB^{G*}, la cual contiene un epítipo de la proteína de unión a maltosa (MBP), razón por la cual ahora se puede diferenciar de His-ArcB^{H*} por ser de distinto tamaño.

MBP-ArcB^{G*} fue incubada en una proporción equimolar con His-ArcB^{H*} en presencia de ubiquinona 0.1mM (Q0), para promover la formación de los enlaces disulfuro entre dímeros (49). La mezcla fue incubada con resina Ni-NTA, la cual interactúa con el epítipo de His₆ presente en His-ArcB^{H*}. La resina fue lavada para eliminar la proteína no unida y finalmente se realizó la elusión de His-ArcB^{H*} con imidazol 0.5M. Como control se realizó el mismo procedimiento a una reacción de MBP-ArcB^{G*} sola, la cual fue procesada con la misma secuencia. Ambos eluidos fueron inmunoanalizados por Western blot, utilizando anticuerpos específicos contra MBP.

Ensayos de Western Blot.

Para verificar la presencia y correcto tamaño de las proteínas variantes de ArcB codificadas por los vectores utilizados en los ensayos *in vitro* e *in vivo* (ver tabla 1), se realizaron ensayos de Western Blot. Primero se tomó 1ml a una OD₆₀₀=0.5-0.6 de cada cultivo para centrifugarlo a 14000 rpm. Cada pastilla de células fue resuspendida en amortiguador de carga para proteínas SDS 5X y hervida durante 10min. Se tomaron 10 µl de cada muestra y se fijaron en un SDS-PAGE dejando correr la electroforesis durante una hora y media. Posteriormente, se realizó una transferencia de las proteínas hacia una membrana de nitrocelulosa, durante dos horas en cámara sumergida con solución de transferencia (Tris, glicina, EDTA, con 20% de metanol). Una vez obtenida la membrana, se siguió el protocolo de Amersham para detección de proteínas en membranas.

Complementación *in vivo* entre las mutantes ArcB^{H*} y ArcB^{G*}

Para realizar este ensayo, se utilizaron las cepas ECL5022 $\lambda\phi(\text{cyd-LacZ})$ y ECL5030 $\lambda\phi(\text{IldP}^{\prime}\text{-LacZ})$, las cuales contienen la mutación cromosomal que codifica para ArcB^{His292Gln} (referido en adelante como ArcB^{H*}) y se sabe que su actividad cinasa es nula (41). Cabe aclarar que los genes reporteros contenidos en estas cepas, son activado y reprimido respectivamente por el sistema Arc activo en condiciones anaeróbicas (41). Las cepas mencionadas, fueron transformadas con el vector de expresión de bajo número de copias pMX041 que contiene al promotor de ArcB, así como al gen que codifica para ArcB^{1-778Gly472Ala, Gly472Ala} (referido en adelante como ArcB^{G*}).

De cultivos nocturnos de cada cepa utilizada en este ensayo, se inocularon 10 ml de medio LB suplementado con MOPS 0.1M pH7.4, D-xilosa 20mM, espectinomicina 100mg/ml y en el caso de las cepas que contienen al gen reportero $\lambda\phi(\text{IldP}^{\prime}\text{-LacZ})$ también se adicionó L-lactato como activador. El cultivo fue dividido en dos porciones, la primera se mantuvo a 37°C con agitación y la segunda porción se incubó a 37°C en condiciones anaeróbicas. Cuando los cultivos llegaron a una OD₆₀₀=0.55, se evaluó la actividad de β -galactosidasa y además se verificó la presencia de la proteína por medio de un ensayo tipo Western blot.

Efecto del incremento de ArcB^{G*} sobre la autofosforilación de ArcB⁷⁸⁻⁵²⁰.

Para realizar este ensayo, se agregaron amortiguador de fosforilación, 20pmol de His-ArcB⁷⁸⁻⁵²⁰ en 50 μ l de reacción, la mezcla fue dividida en ocho aliquotas y a cada una de ellas se le adicionó la proteína ArcB^{G*} en concentraciones ascendentes de 1:0 a 1:200pmol aproximadamente. Una vez obtenida cada reacción se le agregó 1 μ l de [γ ³²P]ATP (1 Ci/mmol) e inmediatamente después de 1min, se agregó buffer de carga SDS 5x para detener la fosforilación. Las muestras fueron corridas en un SDS-PAGE durante 1.5h para obtener una correcta separación de las proteínas. Posteriormente, el gel fue teñido hasta que las bandas fueran reveladas y desteñido para quitar el exceso de azul

de Coomassie, se secó durante 30min y finalmente se expuso a una placa de revelado Kodak durante 12 h a -70°C para que fuera magnificada la señal.

Efecto del aumento de ArcB^{G*} sobre la regulación de los reporteros $\lambda\phi(IldP^{\prime}-LacZ)$ y $\lambda\phi(IldP^{\prime}-LacZ)$ en cepas con fondo genético ArcB silvestre.

Para comprobar el significado fisiológico de los resultados obtenidos anteriormente, se realizó la expresión *in vivo* de ArcB^{1-520G*}, en las cepas ECL5001 $\lambda\phi(cyd-LacZ)$ y EC5002 $\lambda\phi(IldP^{\prime}-LacZ)$ que contienen fondo genético *arcB* silvestre. Las cepas mencionadas, fueron transformadas con el plásmido pMX065 (pBAD30+ArcB^{1-520G*}), el cual se encuentra bajo un promotor que es inducido con arabinosa, así al aumentar el inductor se aumentará también la concentración de ArcB^{1-520G*}.

De un cultivo madre, se inoculó una fracción en 100ml de medio LB suplementado con MOPS 0.1M, D-xilosa 20mM, ampicilina 100mg/ml, y en las cepas que contienen al gen reportero $\lambda\phi(IldP^{\prime}-LacZ)$ también se adicionó L-lactato 20mM como inductor, dejándolo crecer hasta una $OD_{600}=0.12$. El cultivo fue dividido en nueve matraces con 10ml y a cada uno se le agregó arabinosa en concentraciones de 0 a 100 μM . El contenido de cada matraz fue nuevamente dividido, la primera porción (5ml) se quedó en el matraz para crecimiento aeróbico con agitación a 300rpm y la segunda se agregó hasta llenar tubos con tapa de rosca para crecimiento anaeróbico en movimiento con magneto. Todos los cultivos se dejaron crecer a una $OD_{600}=0.55$ e inmediatamente se incubaron en hielo para tomar 100 μl que fueron adicionados en la reacción de β -galactosidasa y 1ml para verificar la presencia y el aumento de la proteína ArcB^{1-520G*} por ensayo de Western Blot.

Ensayos de β -galactosidasa

La cuantificación de la actividad enzimática de los genes reporteros utilizados en las distintas cepas, se realizó por medio del ensayo β -galactosidasa (54). En cada ensayo, se tomaron primero 1 ml de medio con células, para medir la OD_{600} y posteriormente 100 μl para adicionarlos en tubos que contenían 900 ml

de buffer Z suplementado con 10 μ l de SDS 0.1% y 20 μ l de cloroformo, se agitó con vortex cada tubo, posteriormente se adicionaron 200 μ l de 0-nitrofenil-B-D-galactopiranosido 0.04 mg/ml incubándose a temperatura ambiente durante 15 min, deteniendo la reacción con 500 μ l de NaCO₃ 1M. Se tomaron lecturas a OD₄₂₀ y OD₅₅₀, los valores fueron utilizados en la fórmula de Unidades Miller:

$$\text{Unidades Miller (UM)} = 1000 \times \frac{\text{OD}_{420} - (1.75 \times \text{OD}_{550})}{(t)(v)(\text{OD}600)}$$

y posteriormente graficados con el programa de computadora Excel.

Transferencia del grupo fosforilo de H₁ hacia D₁ *in vitro*

Para probar si la transferencia del grupo fosforilo del dominio H₁ hacia D₁ es intramolecular o intermolecular, se realizó una cinética de fosforilación. Se utilizó His-ArcB^{H*} por que se sabe es incapaz de autofosforilarse, pero si recibe el grupo fosforilo ya sea en D₁ o en H₂. Se utilizaron los dominios H₁ y D₁ por que suponemos que COOH-terminal del dominio H₁ y el NH₂-terminal del dominio D₁ se reconocerían dentro de la reacción, así si transferencial del grupo fosforilo es intramolecular se obserará transferencia de señal entre estos dominios, en cambio si es intermolecular, se observará transferencia del dominio H₁ hacia el D₁ de ArcB^{H*}.

Primero se incubaron aproximadamente 10pMol de His-ArcB^{H*} presencia de [γ ³²P]ATP con actividad específica de (2Ci/mmol) y amortiguador de fosforilación 1x. Cada 30sec se tomaron 5 μ l de la mezcla y fueron adicionados a igual cantidad de SDS 5x para detener la fosforilación. Trascurridos 90 sec se agregaron aproximadamente 10pMol de ArcB⁷⁸⁻⁵²⁰ (el dominio H₁) con la finalidad de examinar si H₁ era capaz de transferir el grupo fosforilo al dominio D₁ de His-ArcB^{H*}. En esta parte del ensayo, se tomaron cada 15 sec otros 5 μ l de mezcla hasta completar 165sec y por último se adicionó His-ArcB⁵²¹⁻⁶⁶¹ (dominio D₁), tomando nuevamente 5 μ l cada 15 sec, hasta completar los 225 sec.

Una vez que terminó el ensayo, todas las muestras fueron corridas en un SDS-PAGE durante una hora y media, con la finalidad de obtener una correcta separación de las bandas. Subsecuentemente el gel obtenido fue teñido hasta

revelar la presencia de las bandas, desteñido para quitar el exceso de azul de Coomassie, secado durante 30min y finalmente expuesto a un autorradiograma durante 12 h a -70°C para magnificar la señal radiactiva.

Transferencia del grupo fosforilo de D₁ hacia H₂ *in vitro*.

Para realizar este ensayo se realizó una cinética de fosforilación, primero se incubaron aproximadamente 10pMol de His-ArcB^{H1*-D1*} en presencia de [γ ³²P]ATP (2Ci/mmol). Cada 30sec se tomaron 5 μ l de la mezcla y fueron adicionados a igual cantidad de SDS 5x para detener la fosforilación. Trascurridos 90 sec se agregaron aproximadamente 10pMol de His-ArcB⁷⁸⁻⁶⁶¹. En esta parte del ensayo, se tomaron cada 15sec otros 5 μ l de mezcla hasta completar 165sec y por último se adicionó His-ArcB⁶⁶²⁻⁷⁷⁸ (dominio H₂), tomando nuevamente 5 μ l cada 15 sec, hasta completar los 225 sec.

Una vez que terminó el ensayo, todas las muestras fueron corridas en un SDS-PAGE durante una hora y media, con la finalidad de obtener una correcta separación de las bandas. Subsecuentemente el gel obtenido fue teñido hasta revelar la presencia de las bandas, desteñido para quitar el exceso de azul de Coomassie, secado durante 30min y finalmente expuesto a un autorradiograma durante 12 h a -70°C para magnificar la señal radiactiva.

Resultados

Proteínas obtenidas. Para ensayar los pasos de autofosforilación y fosfo-relevo, se realizó la obtención de las proteínas recombinantes necesarias para los ensayos de fosforilación *in vitro*. Los plásmidos utilizados se enlistan en la tabla 1. Para simplificar la purificación de las proteínas variantes de ArcB, se eliminó la parte correspondiente a los fragmentos transmembranales, que comprende los residuos 1 al 77 (ver Fig. 8). Se sabe que estas proteínas recombinantes citosólicas son funcionales por que en estudios previos se ha demostrado que la eliminación de estos segmentos no afecta la autofosforilación y la subsecuente transfosforilación al regulador de respuesta (19, 25, 36, 48, 63). Todas las proteína recombinantes mostradas, contienen las Cis 180 y 247.

Las proteínas fueron sobre-expresadas y obtenidas como se describe en materiales y métodos. En la figura 9 se muestran en un gel de SDS-PAGE 8%, las proteínas utilizadas en este trabajo.

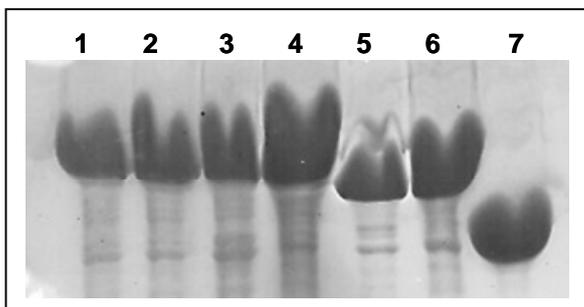


Figura 9. Tinción de las proteínas obtenidas con azul Coomassie. Se observan las proteínas recombinantes variantes de ArcB purificadas como se describe en materiales y métodos. Carril 1 His-ArcB, carril 2 His-ArcB^{H*}, carril 3 His-ArcB^{G*}, carril 4 His-ArcB^{H*D*}, carril 5 His-ArcB⁷⁸⁻⁶⁶¹, carril 6 His-ArcB^{78-661D*}, carril 7 His-ArcB⁷⁸⁻⁵²⁰. *Indica que parte (s) de la proteína contienen mutación (es) puntual (les).

Fosforilación de His-ArcB. Con la finalidad de verificar la fosforilación de His-ArcB en condiciones *in vitro*, se incubó la proteína en presencia de [γ^{32} P]ATP y se realizó una cinética según los tiempos indicados en la figura 10. En la tinción de Coomassie de la figura 10A, se observa la presencia de la proteína y en el

autorradiograma, se muestra la fosforilación de ArcB durante toda la cinética. No obstante, que se observa que la proteína es activa, en este ensayo no fue posible determinar si la autofosforilación ocurre mediante una reacción intramolecular o intermolecular (Fig. 10B).

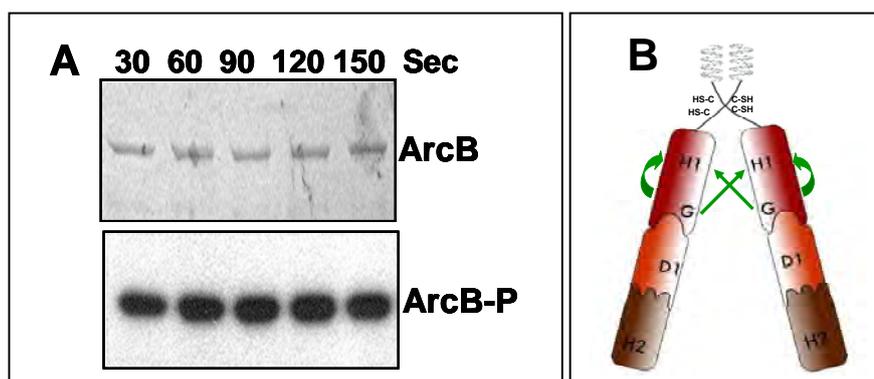


Figura 10. Fosforilación de His-ArcB. A) Tinción de azul de Coomassie del gel de SDS-PAGE, en donde se observa a la proteína His-ArcB y el autorradiograma en donde se observa la actividad de la proteína durante toda la cinética. B) Posibles tipos de reacción por los que puede ocurrir la fosforilación de ArcB. Reacción intramolecular, en la cual la caja G de un monómero une ATP y fosforila su mismo residuo de His y reacción intermolecular en la cual la caja G del monómero a une el ATP y fosforila al residuo de His del otro monómero.

Se aclara que por las características del presente trabajo, de este punto en adelante los resultados fueron divididos en resultados de la autofosforilación y resultados del fosfo-relevo.

Resultados de la Autofosforilación

Comparación de la estructura secundaria de His-ArcB, His-ArcB^{H*} y His-ArcB^{G*}. Para verificar que las proteínas obtenidas hubieran conservado su integridad estructural, se realizó un análisis por CD como se describe en materiales y métodos. Los datos obtenidos del espectro del CD arrojaron que, igual que His-ArcB, ambas mutantes mantuvieron su estructura tridimensional durante la purificación mostrando que contienen características propias de una

proteína globular (Fig. 11). La diferencia observada en los patrones de la gráfica, se debe a las diferencias de concentración entre las muestras de las proteínas, ya que al quitar sales se precipitaron rápidamente durante el experimento.

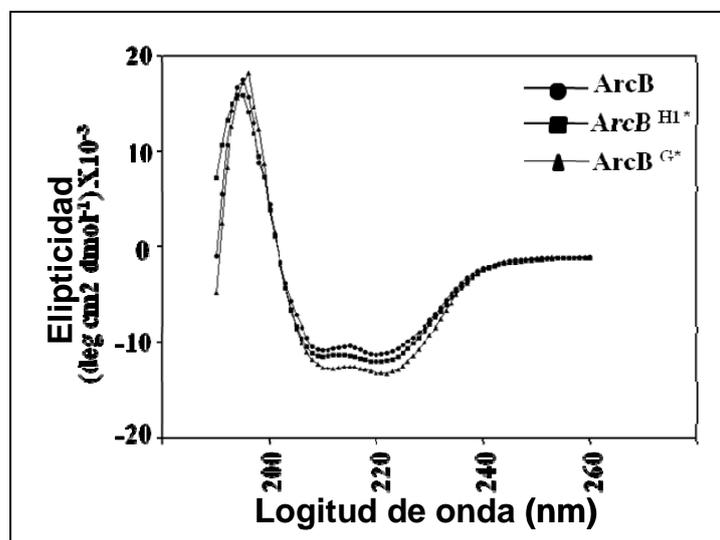


Figura 11. Comparación de la estructura secundaria de His-ArcB, His-ArcB^{H*} y His-ArcB^{G*}. Las mutantes de ArcB muestran el mismo grado de estructura secundaria que la proteína silvestre, indicando que las mutaciones no perturbaron significativamente el plegamiento globular de las proteínas.

Incapacidad de las mutantes His-ArcB^{H*} y His-ArcB^{G*} de autofosforilarse. Es generalmente aceptado que el modelo típico por el cual ocurre la autofosforilación cuando las CS se encuentran activas, es intermolecular (77). Lo anterior significa que un monómero une ATP y fosforila la His del monómero compañero dentro del homodímero (Fig 7A). Para aclarar si este paradigma aplica también en ArcB, se realizó la construcción de los plásmidos pMX025 y pMX028 que codifican para las proteínas recombinantes ArcB^{78-778G470A,G472A}, bloqueada en la caja de unión a ATP (referida en adelante como His-ArcB^{G*}) y ArcB^{78-778H292Q} que es incapaz de autofosforilarse (referida en adelante como His-ArcB^{H*}) y se obtuvieron las proteínas como se describió en materiales y métodos.

Para verificar que las mutantes no fueran capaces de autofosforilarse, cada una fue incubada en presencia de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y se realizó un cinética tomando una muestra de reacción en los tiempos indicados en la figura 12. En las tinciones de Coomassie mostradas, se observa la presencia de His-ArcB^{G*} y His-ArcB^{H*}, por el contrario en las placas de revelado no se observa señal radioactiva, lo que indica que las mutantes no fueron capaces de autofosforilarse (Fig. 12).

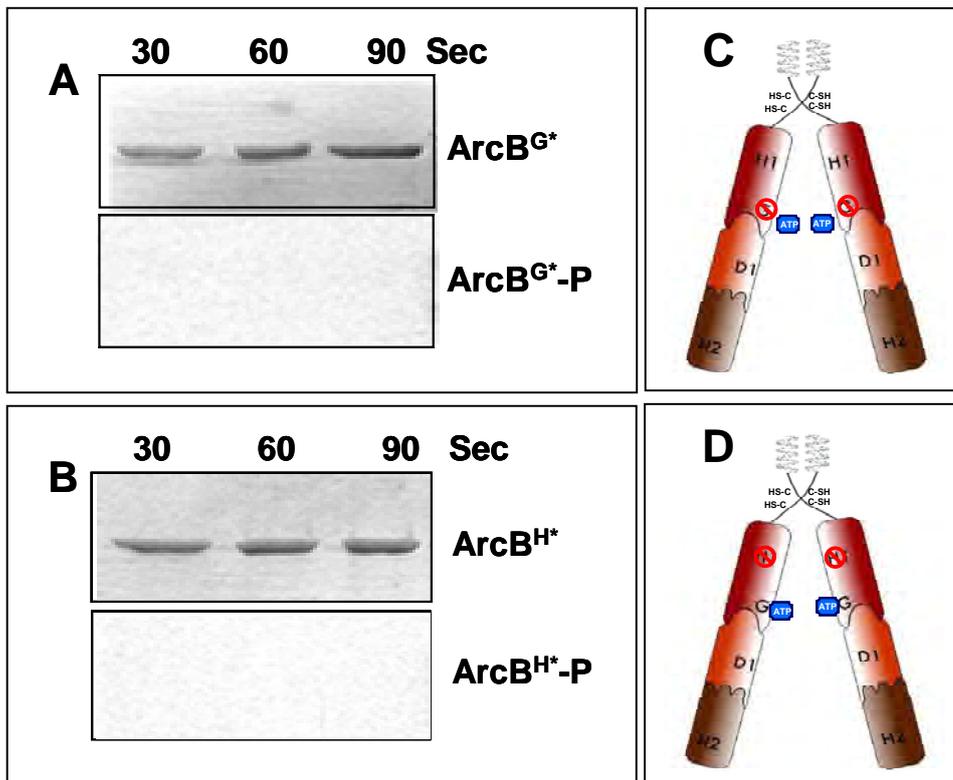


Figura 12. Incapacidad de His-ArcBG* y His-ArcBH* de autofosforilarse. En A y B, se observa la presencia de las proteínas en las tinciones de Coomassie, mientras que en los autorradiogramas no se obtuvo señal radiactiva, lo que indica la incapacidad de autofosforilación de ambas proteínas. Esquematzación de las proteínas mutantes A) His-ArcB^{G*} la cual no puede unir ATP y B) His-ArcB^{H*} que no puede autofosforilarse. El símbolo se “stop” simboliza la pérdida de la función por que se presenta una mutación puntual.

Capacidad de las mutantes His-ArcB^{H*} y His-ArcB^{G*} de recibir el grupo fosforilo en el dominio receptor y/o transmisor secundario. Este ensayo fue realizado para verificar que las proteínas His-ArcB^{H*} (incapaz de autofosforilarse) y His-ArcB^{G*} (incapaz de unir ATP) si pudieran recibir el grupo fosforilo en los pasos posteriores del fosfo-relevo, que incluyen al dominio receptor primario (D₁) o en el dominio fosfotransmisor secundario (H₂). Se realizó una cinética de fosforilación, en la cual se incubaron primero 10μM de cada mutante en presencia de [³²P]ATP. Posteriormente se adicionó aproximadamente 2μM His-ArcB⁷⁸⁻⁶⁶¹, siguiendo la cinética durante 30sec más. Cabe mencionar que la diferencia de concentraciones entre ambas mutantes y His-ArcB⁷⁸⁻⁶⁶¹ se realizó con la finalidad de evitar exceso de señal en His-ArcB⁷⁸⁻⁶⁶¹, que evitara visualizar la transferencia hacia las mutantes.

En la figura 13, se muestran las tinciones con azul de Coomassie, se puede observar la presencia de las proteínas en ambas reacciones. En los autorradiogramas obtenidos, se observa que ninguna de las mutantes puede fosforilarse por sí sola, por el contrario desde el tiempo en que fue adicionada His-ArcB⁷⁸⁻⁶⁶¹, las proteínas recibieron rápidamente el fosfato, indicando que si fueron capaces de recibir el grupo fosforilo ya sea en el Asp⁵⁷⁶ o en la His⁷¹⁷ a través de una reacción intermolecular, lo que indica que así como se ha referido en otras cinasas (15, 26, 82, 87), ArcB funciona también como dímero (Fig. 13), además que las mutaciones puntuales realizadas en la caja G y en el sitio de autofosforilación (His²⁹²Gln) no afectaron la estructura de las proteínas.

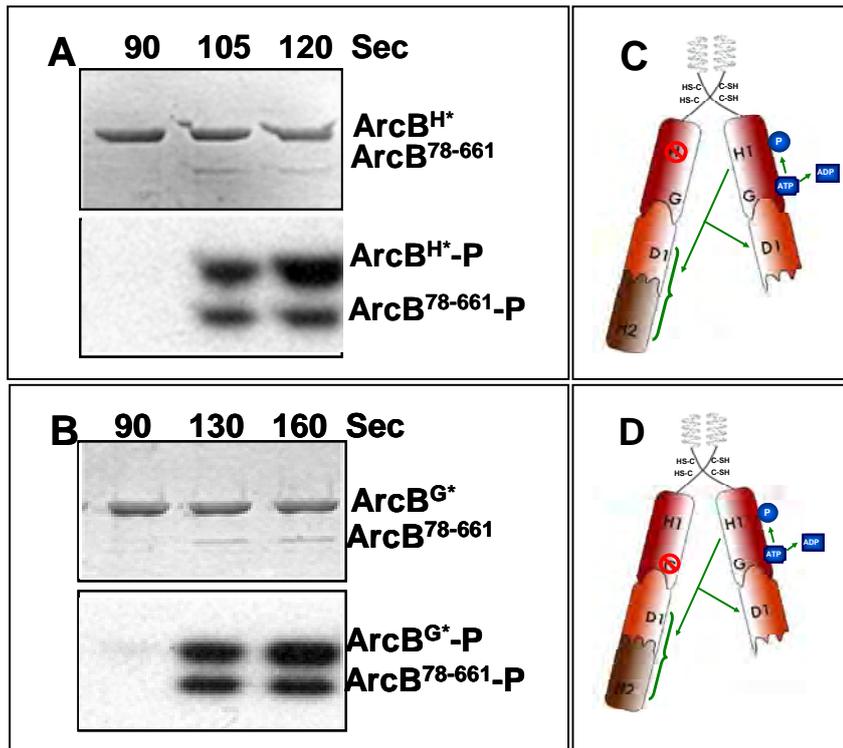


Figura 13. Capacidad de las mutantes de recibir el grupo fosforilo. En A y B se observan las proteínas en las tinciones de azul de Coomassie, en los autorradiogramas, se observa la transferencia del grupo fosforilo de His-ArcB⁷⁸⁻⁶⁶¹ hacia ambas mutantes. Esquematisación de las proteínas mutantes, de His-ArcB⁷⁸⁻⁶⁶¹, así como la posible transferencia del grupo fosforilo hacia los dominios D₁ y/o H₂. El símbolo de “stop” indica la pérdida de la función debido a la mutación puntual.

Complementación *in vitro* de His-ArcB^{H*} con His-ArcB^{G*}. Una vez que se tuvo la certeza que His-ArcB^{H*} y His-ArcB^{G*} estaban correctamente plegadas (Fig. 11), que no eran capaces de autofosforilarse (Fig. 12), y que si podían recibir el grupo fosforilo (Fig.13), se realizó un ensayo de complementación *in vitro*, para aclarar si ArcB sigue el paradigma que dicta que cuando las CS se encuentran activas se autofosforilan intermolecularmente.

Se mezclaron ambas mutantes en proporción equimolar y incubaron en presencia [γ ³²P]ATP, en caso de que la reacción es intermolecular, se podrá detectar señal radiactiva en el autorradiograma ya que la caja G de His-ArcB^{H*}

podrá unir ATP y transferirá el grupo fosforilo al residuo His²⁹² de His-ArcB^{G*}, en caso de que sea intermolecular, no se detectará ninguna señal en la placa de revelado.

En la tinción de azul de Coomassie de la figura 14, se observa la presencia de las proteínas, mientras que en el autorradiograma no se obtuvo señal radioactiva, lo cual sugiere que el grupo fosforilo no fue transferido de His-ArcB^{H*} hacia His-ArcB^{G*}. Lo anterior indica que la reacción de autofosforilación es intramolecular, de cualquier modo también existe la posibilidad de que no se formaran los heterodímeros dentro de la reacción.

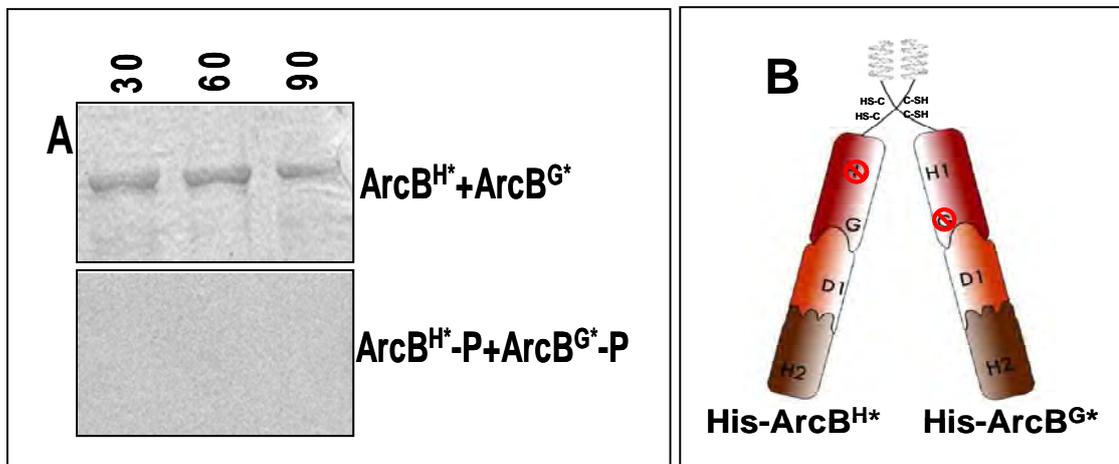


Figura 14. Complementación *in vitro* entre las mutantes de ArcB. A) La tinción de Coomassie en la que se observa ambas proteínas, en los autorradiogramas se observa que el grupo fosforilo no es transferido de His-ArcB^{H*} hacia His-ArcB^{G*}. B) También se muestra la ejemplificación de las mutantes que fueron utilizadas en este ensayo. El símbolo de “stop” indica la pérdida de la función debido a la mutación puntual. C) desitometría realizada

Promoción de intercambio y de formación de heterodímeros. Dado que el ensayo anterior arrojó un resultado negativo y todavía no se puede concluir que la autofosforilación es intramolecular se realizó un ensayo en el cual se promovió la formación de estos. Se realizó una cinética de fosforilación a una reacción que contenía His-ArcB^{G*}/His-ArcB^{H*} en concentraciones equimolares. La reacción previamente fue sometida a procesos de desnaturalización y renaturalización como se describió en materiales y métodos.

En la tinción de azul de Coomassie de la figura 15A y B, se observa la presencia de His-ArcB, así como de la combinatoria His-ArcB^{H*} y His-ArcB^{G*}. En los autorradiogramas correspondientes, se observó que la proteína silvestre sigue siendo eficiente para autofosforilarse (Fig. 15A), mientras que la mezcla de His-ArcB^{H*} y His-ArcB^{G*}, igual que en el experimento anterior no se observó fosforilación lo que apoya los resultados anteriores en los cuales se observó que la autofosforilación es intramolecular (15B).

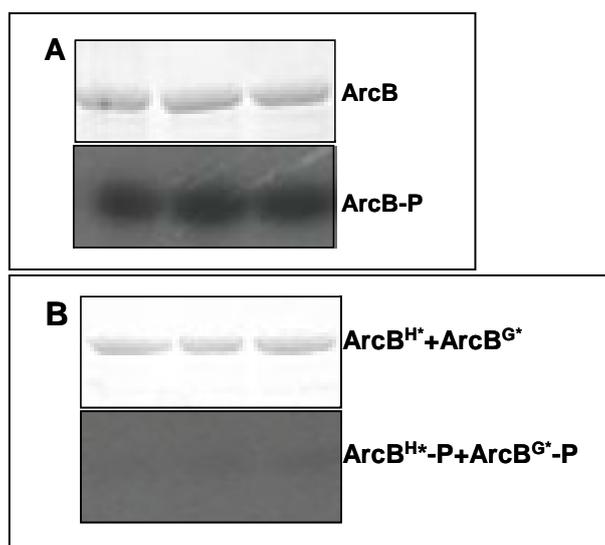


Figura 15.- Fosforilación de las proteínas después de tratamiento de desnaturalización y renaturalización. En las tinciones de azul de Coomassie se reveló la presencia de las proteínas. En los autorradiogramas se observa la autofosforilación de His-ArcB (A) y no se observa transferencia del grupo fosforilo en la complementación *in vitro* (B).

Formación de heterodímeros His-ArcB^{H*}/MBP-ArcB^{G*}. Los resultados previos, sugieren que la reacción de autofosforilación en ArcB es intramolecular, sin embargo las propiedades de ambas mutantes no permiten la identificación de heterodímeros en las reacciones anteriores. Por lo anterior, las proteínas MBP-ArcB^{G*} y BMP-ArcB^{G*}/His-ArcB^{H*} se incubaron en proporción equimolar, en presencia de ubiquinona para promover la formación de enlaces disulfuro entre las mutantes, mediante la oxidación de los dos residuos de Cis (Cis 180 y 241)

presentes en la porción “linker” (49), y se procedió como se describe en materiales y métodos.

El Western Blot de la figura 16A, se muestra el revelado correspondiente a la reacción que contenía solamente MBP-ArcB^{G*}. En el carril 1, se observa la presencia la proteína, en los carriles 2-4 los subsecuentes lavados mostrando que MBP-ArcB^{G*} no interactuó con la resina Ni-NTA y en el carril 5 la ausencia de la proteína en el eluido. En el revelado presentado en la figura 16B se muestra el revelado de la reacción que contenía ambas mutantes. En el carril 1, se observa la presencia de MBP-ArcB^{G*}, en los carriles 2-4 los lavados subsecuentes con los que se eliminó la proteína no unida y por último en el carril 5 se vuelve a observar la presencia de MBP-ArcB^{G*}, lo que confirmó la formación de heterodímeros MBP-ArcB^{G*}/His-ArcB^{H*}.

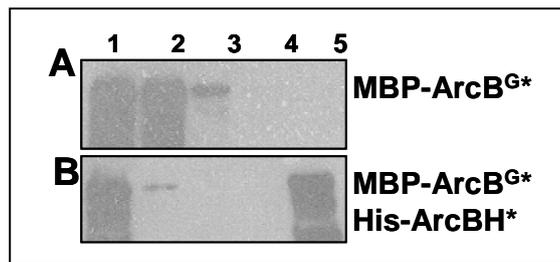


Figura 16. Formación de heterodímeros MBP-ArcB^{G*}/His-ArcB^{H*}. En la placa de revelado del western, se observa en A) el carril 1 la presencia de MBP-ArcB^{G*}, carril 2-4 en los que se observa que los subsecuentes lavados eliminaron la proteína no unida. En B), carril 1 MBP-ArcB^{G*}/His-ArcB^{H*}, carril 2-4 lavados en los que se eliminó la proteína no unida, carril 5 se observa la presencia de MBP-ArcB^{G*}.

Complementación *in vivo* entre las mutantes ArcB^{H*} y ArcB^{G*}. Para cotejar la significancia fisiológica de los resultados obtenidos *in vitro*, se realizó la coexpresión de ArcB^{H*} cromosomal y ArcB^{G*} plasmídico en las cepas ECL5022 $\lambda\phi(\text{cyd-LacZ})$ y ECL5030 $\lambda\phi(\text{IldP}'\text{-LacZ})$, los genes reporteros que contienen son activado y reprimido respectivamente por el sistema Arc cuando se encuentra activo. En este ensayo, se espera la formación de heterodímeros entre las mutantes por que ambas proteínas están siendo codificadas al mismo tiempo y tanto *arcB^{H*}* como *arcB^{G*}* están regulado bajo en promotor de *arcB*.

Se realizó la comparación de la actividad de β -galactosidasa de los reporteros en crecimiento aeróbico y anaeróbico, los resultados se muestran en la figura 16. Como controles se utilizaron cepas ArcB silvestre, Δ ArcB, Δ ArcB transformadas con los plásmidos pMX039 (*promotor de arcB+ArcB*) y pMX041 (*promotor de arcB+ArcB^{G*}*).

En las barras pertenecientes a las cepas con ArcB silvestre y Δ arcB complementada con ArcB plasmídico (pMX039), se observa la regulación efectuada por ArcB sobre ambos reporteros en condiciones de anaerobias de crecimiento. Por el contrario, en las cepas que contienen genotipo Δ arcB y Δ arcB complementado con ArcB^{G*} (pMX041), así como ArcB^{H*} no se observó regulación en ninguno de los reporteros. Tampoco se recupera la regulación en ninguno de los genes reporteros en las cepas en las que se realizó la coexpresión de ArcB^{H*} y ArcB^{G*}. Lo anterior apoya los resultados obtenidos *in vitro*, que sugieren que la autofosforilación es intramolecular (paneles A y B).

Como control de la presencia y/o ausencia de las proteínas de interés, se muestra el autorradiograma de un ensayo de Western blot realizado a cada uno de los cultivos ensayados. Se pudo verificar la presencia o ausencia de la proteína en los carriles indicados, en el último carril se puede observar la coexpresión de ambas proteínas (Fig. 17C).

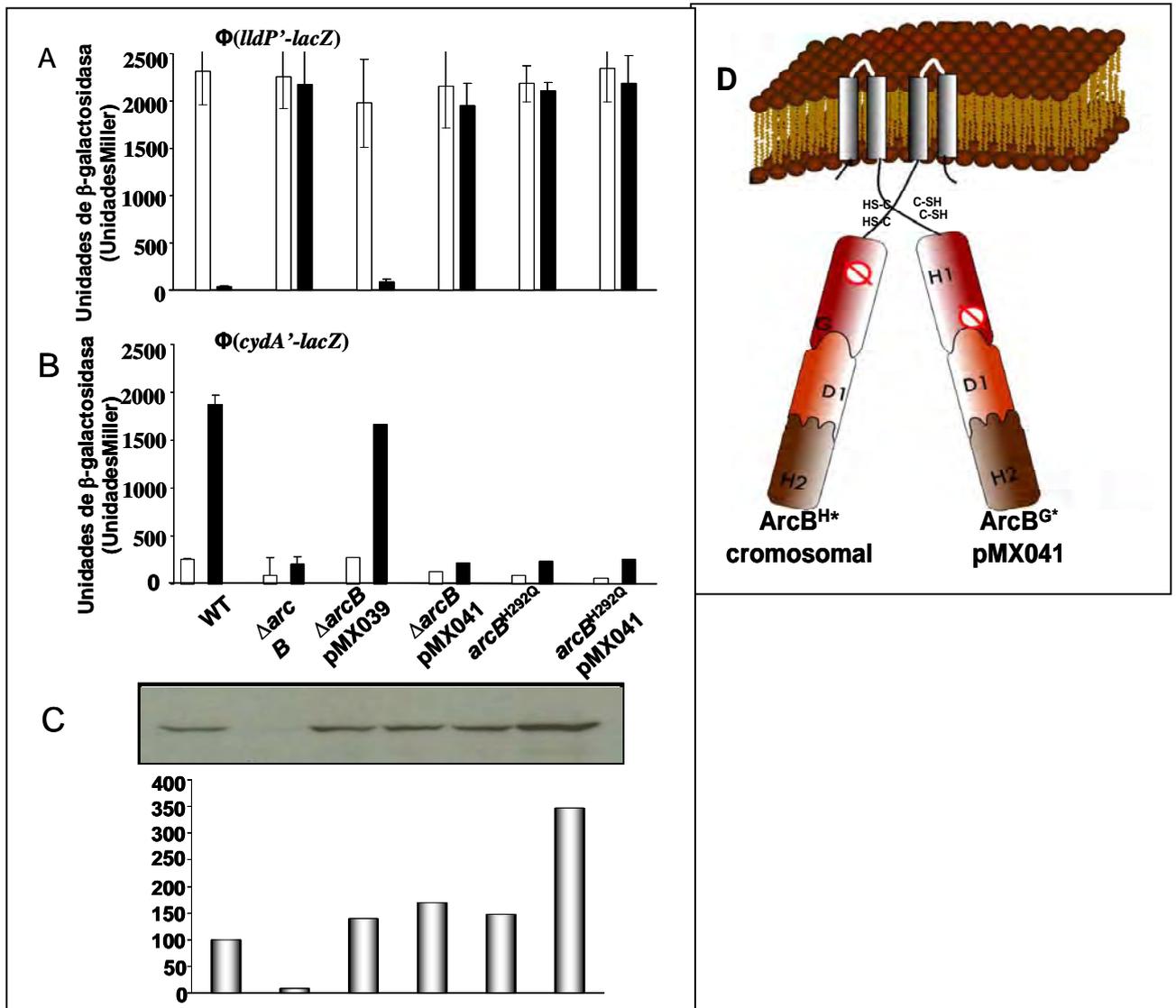


Figura 17. Coexpresión de ArcB^{H*} y ArcB^{G*} in vivo. A y B) Se presenta el promedio de tres ensayos de β -galactosidasa. Como controles del experimento, se utilizaron las cepas ArcB silvestre, ECL 5002 $\lambda\phi(IldP'-lacZ)$ y ECL 5003 $\phi\lambda(cydA'-lacZ)$, ArcB nulo ECL 5012 $\lambda\phi(IldP'-lacZ)$ y ECL 5004 $\lambda\phi(cydA'-lacZ)$, como control del correcto funcionamiento y expresión de los plámidos se utilizaron las ECL 5012 $\lambda\phi(Ildp-lacZ)$ y ECL 5004 $\lambda\phi(cydA'-lacZ)$ transformadas con pMX039 (*promotor de arcB*+ArcB¹⁻⁷⁷⁸) y pMX041 (*promotor de arcB*+ArcB^{G*}) y por último también se utilizó un control de las cepas que contienen ArcB^{H*}, ECL 5030 $\lambda\phi(Ildp-lacZ)$ y ECL 5022 $\lambda\phi(cydA'-lacZ)$. En el panel C se presenta el revelado del Western Blot, en donde se observa la presencia o ausencia de la proteína según la cepa y su correspondiente densitometría expresada en porcentaje de expresión. En el panel D se esquematiza la heterodimerización de las mutantes.

El incremento de His-ArcB^{G*} no afecta la autofosforilación de His-ArcB⁷⁸⁻⁵²⁰. El siguiente ensayo fue realizado para proveer evidencia experimental independiente acerca del tipo de reacción por el cual se lleva a cabo la autofosforilación en ArcB. También con el supuesto de que al aumentar la concentración de His-ArcB^{G*} se favorecería la formación de heterodímeros entre His-ArcB⁷⁸⁻⁵²⁰ y His-ArcB^{G*}. Si hay posibilidades de que la autofosforilación sea realizada en una reacción intermolecular se observará un decremento en la fosforilación de la His-ArcB⁷⁸⁻⁵²⁰, pero en caso de que sea intramolecular, el aumento de ArcB^{G*} no afectaría la fosforilación del His-ArcB⁷⁸⁻⁵²⁰ o dominio H₁.

En la tinción de Coomassie de la figura 18, se observa que el dominio His-ArcB⁷⁸⁻⁵²⁰ se mantiene en constante, mientras que aumenta la concentración de His-ArcB^{G*}. En el autorradiograma se observa que His-ArcB⁷⁸⁻⁵²⁰ se encuentra fosforilada no importando el incremento de ArcB^{G*}, lo que indica que el aumento en la concentración de la proteína mutante no afectó la fosforilación del dominio H₁. Estos resultados apoyan los anteriormente descritos en los cuales se observó que la autofosforilación es realizada en una reacción intramolecular (Fig. 18).

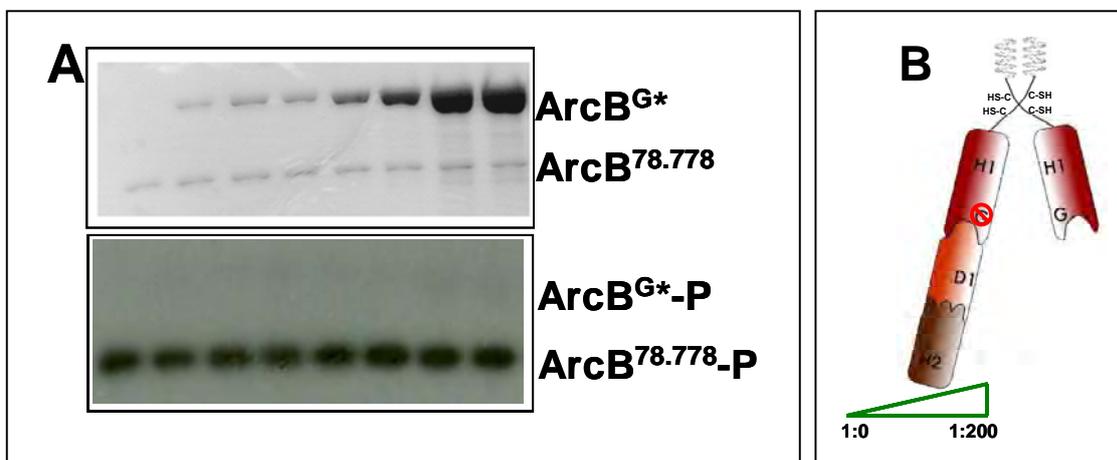


Figura 18.- Efecto del aumento de His-ArcB^{G*}. En la tinción de azul de Coomassie, se observa que His-ArcB⁷⁸⁻⁵²⁰ se mantiene en la misma proporción, mientras que aumenta la concentración de His-ArcB^{G*}. En el autorradiograma, se observa que la fosforilación de His-ArcB⁷⁸⁻⁵²⁰, no es afectada por la concentración de la otra mutante.

Efecto del aumento de ArcB^{G*} no afecta la actividad de ArcB en cepas con fenotipo ArcB silvestre. Este ensayo se realizó con la finalidad de comprobar si el aumento de ArcB^{G*} interviene en la regulación de ArcB sobre los reporteros $\lambda\phi(\text{cyd-LacZ})$ y $\lambda\phi(\text{IldP}'\text{-LacZ})$. Al aumentar la concentración de la mutante se beneficiará la formación de heterodímeros ArcB/ArcB^{1-520G*}, así en caso de que la autofosforilación sea realizada por una reacción intermolecular la regulación de ArcB en condiciones anaeróbicas disminuirá.

Se realizó la expresión *in vivo* de ArcB^{1-520G*} en las cepas ECL5003 y EC5002 que contienen fondo genético *arcB* silvestre. Las cepas fueron transformadas con el plásmido pMX065 (pBAD30+ArcB^{1-520G*}) el cual se encuentra bajo un promotor que es inducido con arabinosa, así al aumentar el inductor se aumenta también la concentración de ArcB^{1-520G*}. Los detalles del ensayo se describen en materiales y métodos.

En la figura 19 se muestra la comparación de la actividad de β -galactosidasa de cepas crecidas en condiciones aeróbicas (barras blancas) y anaeróbicas (barras negras). En los paneles A y B, se muestra el efecto de la sobreexpresión de ArcB^{1-520G*} sobre la regulación de ArcB sobre ambos reporteros. Las barras perteneciente a las cepas Δ ArcB, no se observa regulación, pero en el caso de los aislados con sobreexpresión de ArcB^{1-520G*} (verificado por el Western Blot, Fig. 19C), la regulación se mantiene como se observa en la cepa ArcB silvestre, lo que nos indicó que el aumento de ArcB^{G*}, no afectó la actividad de ArcB endógena confirmando así que la autofosforilación es realizada por una reacción intramolecular.

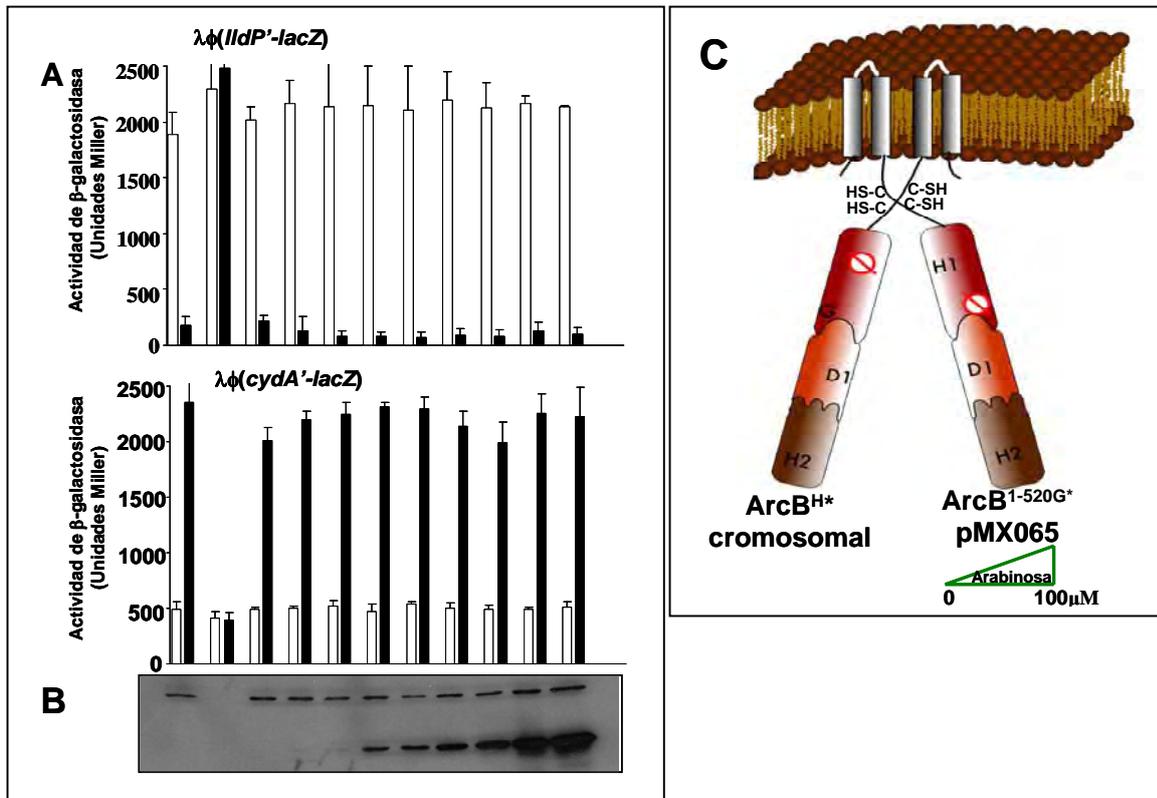


Figura 19.- Efecto del aumento de la concentración de ArcB^{G*} en la regulación de ArcB sobre los reporteros $\lambda\phi(cyd-LacZ)$ y $\lambda\phi(IldP'-LacZ)$. A) Se muestran los promedios obtenidos de tres ensayos. Panel A la sobreexpresión de ArcB^{G*} cepa ECL 5002 $\lambda\phi(IldP'-LacZ)$ y panel B ECL5003 $\lambda\phi(cyd'-LacZ)$ transformada con pMX065 (pBAD30+ArcB^{1-520G*}) El aumento de la expresión de ArcB^{1-520G*} no afectó la regulación de los reporteros por ArcB. Como controles, se utilizaron la cepa ArcB silvestre y $\Delta arcB$. Las barras blancas representan el crecimiento aeróbico y las negras el crecimiento anaeróbico. Debajo de las gráficas se presenta el revelado del western Blot, en el cual se verifica el aumento en la concentración de la proteína mutante. Panel C Esquematización del ensayo.

Resultados del Fosfo-relevo

La proteína ArcB pertenece a la subfamilia de CS tripartitas, por que aparte de contener los elementos distintivos de las cinasas, contiene además un dominio receptor primario (D₁) con un residuo de Asp en la posición 576 (28, 30-32) y un

dominio transmisor secundario (H₂) con un residuo de His en la posición 717 (27) (Fig. 5).

El hecho que el residuo de Asp⁵⁷⁴ y el residuo de His⁷¹⁷ sean utilizados para el fosfo-relevo, cuando la proteína se encuentra activa como cinasa en condiciones anaeróbicas (19, 41) y durante el fosfo-relevo reverso en la actividad fosfatasa (20, 62) permite que ArcB sea una proteína bifuncional (cinasa/fosfatasa).

Lo anterior hace necesario averiguar que es lo que permite diferenciar la dirección que debe llevar el grupo fosforilo en cada una de las actividades de ArcB. A continuación se presentan resultados preliminares que permiten especular si el fosfo-relevo es intramolecular o intermolecular.

Transferencia *in vitro* del grupo fosforilo de H₁ hacia D₁. Para verificar si la transferencia del grupo fosforilo de H₁ hacia D₁ es intramolecular o intermolecular se realizó una cinética de fosforilación como se describe en materiales y métodos.

La figura 20 muestra la tinción de azul de Coomassie en las que se reveló la presencia de todas las proteínas así como los tiempos de adición de cada una de ellas. En el autorradiograma se observa que durante el tiempo de incubación de His-ArcB^{H*}, no fue capaz de autofosforilarse. Cuando fue adicionado el dominio H₁, se autofosforiló rápidamente, manteniéndose así durante los siguientes cuatro tiempos de ensayo. En cambio cuando se agregó el dominio His-ArcB^{521.660} (dominio D₁), éste inmediatamente comenzó a recibir el grupo fosforilo de His-ArcB⁷⁸⁻⁵²⁰, sugiriendo que el fosfo-relevo en este paso es también intramolecular.

Un aspecto por el que argumentamos que esta reacción es intramolecular, es que suponemos que hay reconocimiento entre el COOH-terminal del dominio H₁ y el NH₂-terminal del dominio D₁, así dentro de la reacción ambas proteínas se acoplan y funcionan como una sola proteína.

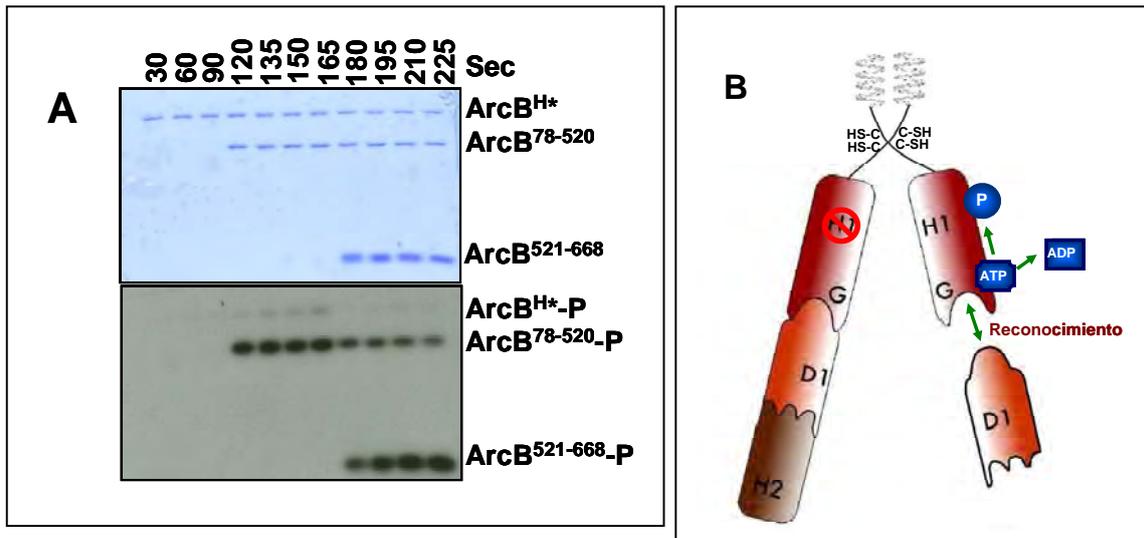


Figura 20. Transferencia *in vitro* del grupo fosforilo de H₁ hacia D₁. A) Se presenta la tinción de azul de Coomassie en donde se observan las proteínas y se indica los tiempos de adición e incubación de cada una dentro de la mezcla de reacción. En el autorradiograma, se observa transferencia de señal de H₁ hacia D₁. B) Esquematación de las proteínas adicionadas, el símbolo de “stop” indica una mutación en la proteína, por lo cual no puede autofosforilar.

Como un control y para verificar si en el paso de fosfotransferencia de H₁ hacia D₁, se presenta transferencia intermolecular, se realizó un ensayo de fosforilación similar al anteriormente descrito pero con otra combinatoria de proteínas.

Inicialmente se probó la capacidad de fosforilación de His-ArcB^{H+} posteriormente se adicionó His-ArcB^{H₁-D₁*}, que si se puede autofosforilar, pero no transfiere el grupo fosforilo al dominio D₁ presente en la proteína y por último se adicionó nuevamente el dominio D₁.

En la tinción de azul de Coomassie de la figura 21, se observa la presencia de las proteínas ensayadas así como los tiempos de adición de cada una. En el autorradiograma, se puede ver que hay transferencia del grupo fosforilo de la proteína ArcB^{H₁-D₁*} hacia el dominio D₁ que se encuentra separado. Lo anterior nos indica que puede haber posibilidades de transferencia intermolecular de H₁ hacia D₁ en ArcB.

Otra posibilidad que puede explicar lo que ocurre en este ensayo, es que al estar el dominio D₁ libre, His-ArcB^{78-661D*} le transfiera el grupo fosforilo de manera inespecífica. Para establecer si la fosfotransferencia de H₁ hacia D₁ es intramolecular o intermolecular, se pueden realizar otros ensayos *in vitro*, con distintas combinatorias como por ejemplo ArcB^{H₁-D₁*-H₂*}/ArcB^{H₁-D₁*}. En esta combinatoria se puede buscar la formación de heterodímeros entre las mutantes y realizar cinéticas de fosforilación en caso de que se observe fosforilación en ArcB^{H₁-D₁*}, entonces este paso del fosfo-relevo sería intermolecular. Otra combinatoria que posiblemente aporte datos importantes es ArcB^{H₁*} con ArcB^{H₁-D₁*} ArcB^{H₂} en este caso se podría verificar la capacidad de fosforilar ArcA.

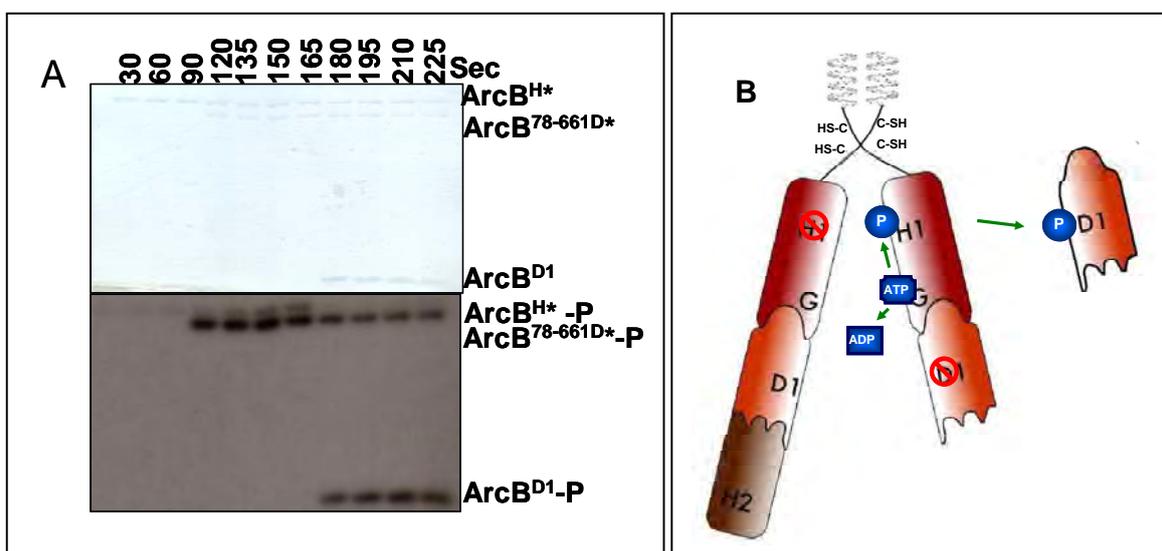


Figura 21. Transferencia *in vitro* de H₁ hacia D₁. A) Tinción de azul de Coomassie se observa la presencia de las proteínas, así como los tiempos de adición B). En el autorradiograma se observa la transferencia de señal hacia el dominio D₁ que puede ser evidencia de fosfotransferencia intermolecular.

Transferencia *in vitro* del grupo fosforilo de D₁ hacia H₂. En este ensayo se probó si la transferencia de dominio D₁ hacia el H₁ es intramolecular o intermolecular. En presencia de [γ ³²P]ATP (2Ci/mmol), se determinó la capacidad de fosforilación de la proteína recombinante ArcB^{H₁-D₁*}, a los 90sec se agregó la proteína ArcB^{H₁-D₁*} en el tiempo 165sec se agregó el dominio H₂.

Como se esperaba His-ArcB^{H1*D1*} fue incapaz de fosforilarse, por el contrario desde que fue adicionada ArcB^{H1-D1}, ésta se fosforiló desde el primer tiempo en que se tomo la alícuota, se observa que en este caso si hay transferencia de señal hacia el dominio H₂ de His-Arcb^{H*D*}. Cuando se agregó His-ArcB⁶⁶¹⁻⁷⁷⁸ (dominio H₂), se observó mayor cantidad de fosfotransferencia cuando (Fig. 22), evidenciando que posiblemente en este paso la fosfotransferencia es realizada en reacciones intra e intermoleculares. Nuevamente se encuentra la posibilidad de que el dominio H₂ interactúe inespecíficamente con His-Arc^{H*D*} ya que se encuentra aislado. Ensayos que pueden aportar información para aclarar si la fosfotransferencia en este paso del fosfo-relevo es intramolecular o intermolecular podría ser el probar la fosforilación de ArcA a partir de la combinatoria His-ArcB^{H1*D1*H2}/His-ArcB^{H1-D1-H2*}, igualmente se deberían realizar ensayos de complementación *in vivo* para validar los datos obtenidos.

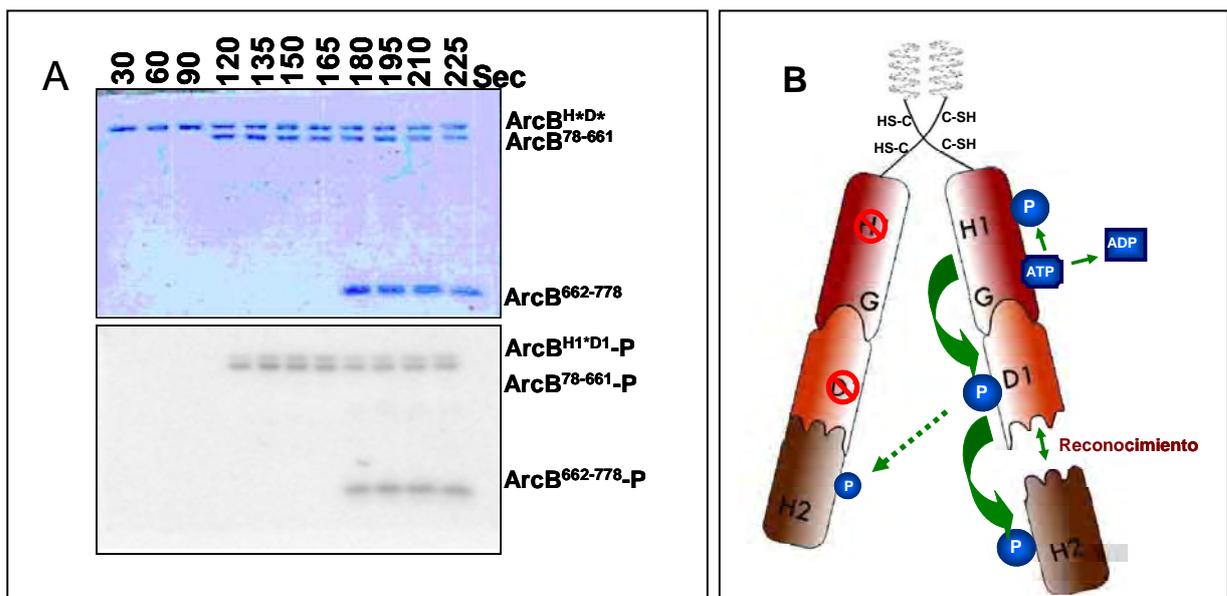


Figura 22. Transferencia *in vitro* de D₁ hacia H₂. A) Tinción con azul de Coomassie, en la cual se reeló la presencia de las proteínas, así como los tiempos en que cada una fue adicionada y el autorradiograma en el que se muestra que El fragmento His-ArcB⁷⁸⁻⁶⁶¹ fosforila tanto a His-ArcB^{H*D*} como al dominio H₂. B) Esquematación de las proteínas utilizadas en esta combinatoria. Los símbolos de “stop” indican las partes de la proteína que no se pueden fosforilar por contener mutaciones puntuales.

Discusión

En organismos procariontes, las CS juegan un importante papel en la adaptación de organismos a cambios ambientales. El sistema de dos componentes ArcA/B es un elemento importante en la regulación transcripcional de bacterias anaeróbicas facultativas para sensar y responder adecuadamente a condiciones redox del crecimiento (21, 38, 50)

El ambiente reductor provoca cambios en la conformación de la proteína, que favorecen la actividad cinasa de ArcB. Dichos cambios permiten la unión de ATP en la caja G, transfiriendo el γ -fosfato en el residuo de His²⁹² (50). Estudios previos (19, 41), así como los ensayos *in vitro* e *in vivo* presentados en este trabajo, confirman que ArcB se encuentra activa como cinasa cuando esta en condiciones anaeróbicas sin embargo, no se sabe cual es el mecanismo (Fig. 7A y B) por el cual se realiza el paso de la autofosforilación.

Con el fin de evidenciar la reacción por la cual es llevada a cabo la autofosforilación en ArcB *in vitro*, se obtuvieron proteínas mutantes en los sitios importantes para este paso. En el capítulo de resultados, se presentaron varios controles a las proteínas recombinantes obtenidas, en las figuras 12A y B, se mostró que His-ArcB^{G*} y His-ArcB^{H*} fueron incapaces de autofosforilarse. Por el contrario, en los autorradiogramas de las figuras 13A y B se observó que rápidamente recibieron el grupo fosforilo de ArcB⁷⁸⁻⁶⁶¹-P ya sea en el Asp⁵⁷⁶ y/o en la His⁷¹⁷ a través de una reacción intermolecular, indicando que son activas. Además el ensayo de CD nos indicó que las mutantes His-ArcB^{G*} y His-ArcB^{H*} conservaron la misma integridad estructural que His-ArcB silvestre (Fig. 11) la cual se fosforiló desde los primeros minutos de ensayo (Fig. 10).

En trabajos realizados en las CS VirA (7), EnvZ (90), CheA (80, 88), NtrB (58), LuxPQ (56), se ha mostrado que la autofosforilación es realizada en una reacción intermolecular entre subunidades dentro del homodímero. En contraste, los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, descritos en las figuras 14 y 15 sugirieron que en ArcB la autofosforilación ocurre por vía intramolecular, ya que la combinación de las proteínas ArcB^{H*} y ArcB^{G*}, no restableció la fosforilación. Se obtuvo la misma observación con los resultados *in vivo* en los cuales cepas que

contienen ArcB^{H*} cromosomal, y que fueron complementadas con ArcB^{G*}, no recuperaron la regulación de los reporteros controlados por el sistema Arc (Fig. 17). Los ensayos anteriores, demuestran que en ArcB, se autofosforila por medio de una reacción intramolecular, lo cual requiere que el sitio de unión a ATP (caja G) y el sitio de fosforilación se encuentren presentes en la misma molécula.

Aunque recientemente se ha sugerido que la CS HK853 de *Thermotoga maritima* la autofosforilación es intramolecular (10), el modelo comúnmente aceptado es que las CS se encuentran como dímeros (12, 15, 69, 87) (83) y se autofosforilan intermolecularmente. En el ensayo de la figura 16, se mostró la formación de heterodímeros entre His-ArcB^{H*} y MBP-ArcB^{G*}. Un aspecto por el cual se piensa que ArcB, debe encontrarse en dímeros dentro de la célula, es que el silenciamiento de la actividad cinasa ocurre mediante la formación intermolecular, de enlaces disulfuro entre los residuos de Cis localizados en las posiciones 180 y 292 de la porción “linker” de la proteína (50). Para que se pueda realizar la formación de estos enlaces, los homodímeros deben encontrarse cerca. ArcB posee un “zipper” de leucina putativo en la porción linker (18), el cual posiblemente actúa como dominio de dimerización.

Por ensayos de resonancia magnética nuclear, se obtuvo la estructura de EnvZ (82). Se observó que el dominio de autofosforilación también funciona para la dimerización, mediante la formación de un “core” central conformado por cuatro hélices. Este centro de dimerización, se encuentra flanqueado por el dominio de unión del ATP, presentándose éste frente a la subunidad compañera, lo que permite que la autofosforilación sea intermolecular (15). Métodos de cristalografía, demuestran que en la cinasa CheA la caja del centro catalítico se encuentra hacia afuera del dominio de unión a ATP (15) y que la fosforilación intermolecular se lleva a cabo por que esta cinasa se congrega en grandes “clusters”. A pesar de las diferencias conformacionales entre estos dos sistemas se ha referido que en ambos casos la autofosforilación ocurre de forma intermolecular. En ArcB, no se ha obtenido una estructura que explique la estructura física del dominio H₁, que proporcione mayor información de por que la autofosforilación intramolecular en ArcB contrasta con el modelo general de las CS.

ArcB pertenece a la subfamilia de cinasas sensoras tripartitas, como LuxQP, BvgS y KinA por lo que dada la diferencia en el mecanismo de la transferencia del grupo fosforilo en el paso de la autofosforilación, es interesante conocer por medio de que tipo de reacción(es) es llevado a cabo el fosfo-relevo.

Las CS tripartitas, transfosforilan a su RR reconocido por fosfo-relevo (11, 19, 41, 64, 84), sin embargo, son pocos los trabajos que se han enfocado en el conocimiento acerca de el o los tipos de reacciones por los cuales puede llevarse a cabo la transferencia del grupo fosforilo. En las CS LuxP y LuxQ se tienen un modelo, que indica que el fosfo-relevo en este paso es intramolecular (56). De igual manera los resultados preliminares presentados en la figura 19, sugieren que el primer paso del fosfo-relevo (de H_1 hacia D_1) es intramolecular, ya que el los primeros tiempos de adición del dominio H_1 , se observa nula transferencia de la señal hacia $ArcB^{H*}$, en cambio se observó una drástica fosforilación cuando se agregó el dominio D_1 . Nuestros resultados preliminares contrastan el modelo descrito para la cinasa BvgS, describe que esta misma reacción es intermolecular (11).

Nuestro argumento para sugerir que este paso es intramolecular, es que al adicionar el dominio D_1 , ocurriría un acoplamiento entre la región C-terminal del dominio H_1 y la N-terminal del dominio D_1 ; sin embargo, al efectuar el control para verificar que no había transferencia intermolecular (Fig. 20), se observó que también el dominio D_1 recibió al grupo fosforilo, lo cual puede explicarse por que al encontrarse el dominio D_1 libre posiblemente se fosforila de manera inespecífica con el dominio H_1 de His-ArcB^{78-661D*} o que realmente si sucede la transferencia intermolecular en este paso. Para aclarar este punto del fosfo-relevo de ArcB, también hace falta realizar ensayos de complementación *in vivo*.

Igual que el paso anterior, se ensayó el fosfo-relevo de D_1 hacia H_2 , en la figura 21 se observa que este paso posiblemente sea realizado en ambas direcciones sin embargo también existe la posibilidad de que al encontrarse el dominio H_2 libre interactúe de manera inespecífica por lo que una combinatoria in Vitro que podría ayudar a esclarecer este punto podría ser hace falta el desarrollo

de experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* para poder confirmar el tipo de reacción por el cual se lleva a cabo este paso.

Conclusiones

- La autofosforilación de ArcB requiere que la caja de unión a ATP (caja G) y el sitio de autofosforilación (His²⁹²), se encuentren presentes en la misma molécula.
- La autofosforilación en la CS ArcB difiere del modelo de autofosforilación comúnmente aceptado.
- Es necesario realizar más ensayos *in vitro* e *in vivo* para esclarecer como es la transferencia del grupo fosforilo durante el fosfo-relevo en ArcB.

Perspectivas

En el presente trabajo, se determinó que la autofosforilación es realizada en una reacción intramolecular. No obstante falta conocer la estructura tridimensional de la proteína, lo cual podría aclarar por que ArcB no se autofosforila como generalmente se ha encontrado en otras CS.

Realizar otros ensayos *in vitro* e *in vivo* que permitan esclarecer si el fosfo-relevo en ArcB es intramolecular o intermolecular.

Otra parte que contribuiría a comprender como funciona ArcB mecanísticamente, es saber si la desfosforilación de ArcA-P es realizada en una vía intermolecular o intramolecular.

Por otro lado, se sabe que la CS ArcB es una proteína bifuncional lo que significa que actúa como cinasa (fosforilando a ArcA) en condiciones anaeróbicas y como fosfatasa (desfosforilando a ArcA-P) en condiciones aeróbicas. Dado que ocupa los residuos Asp⁵⁷⁶ e His⁷¹⁷ tanto para el fosfo-relevo como para el fosfo-relevo reverso, es interesante conocer como se diferencia la dirección que debe llevar el grupo fosforilo en ambas funciones.

Literatura Citada

1. **Abel T**, Maniatis T. 1989. Gene regulation. Action of leucine zippers. *Nature* 341:24-25.
2. **Aiba H**, Nakasai F, Mizushima S, Mizuno T. 1989. Evidence for the physiological importance of the phosphotransfer between the two regulatory components, EnvZ and OmpR, in osmoregulation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 264:14090-14094.
3. **Barrett JF**, Hoch JA. 1998. Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1529-1536.
4. **Beutin L.**, Achtman M. 1979. Two *Escherichia coli* chromosomal cistrons, *sfrA* and *sfrB*, which are needed for expression of F factor *tra* functions. *J Bacteriol.* 139:730-737.
5. **Beutin L**, Manning PA, Achtman AM, Willetts N. 1981. *sfrA* and *sfrB* products of *Escherichia coli* K-12 are transcriptional control factors. *J Bacteriol* 145:840-844.
6. **Böck A**, Sawers G. 1996. Fermentation. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, Neidhardt FC, Ingraham JL, Lin EC, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, and Umberger HE (eds.). Washington, DC: ASM Press. pp 262-282.
7. **Brencic A**, Xia Q, Winans SC. 2004. VirA of *Agrobacterium tumefaciens* is an intradimer transphosphorylase and can actively block vir gene expression in the absence of phenolic signals. *Mol Microbiol* 52:1349-1362.
8. **Buckland R**, Wild F. 1989. Leucine zipper motif extends. *Nature* 338:547.
9. **Burbulys D**, Trach KA, Hoch JA. 1991. Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* 64:545-552.
10. **Casino P**, Rubio V, Marina M. 2009. Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell* 139:325-336.
11. **Cotter PA**, Jones AM. 2003. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol.* 11:367-373.
12. **Chang C**, Stewart RC. 1998. The two-component system. Regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol* 117:723-731.
13. **Drapal N**, Sawers G. 1995. Purification of ArcA and analysis of its specific interaction with the pfl promoter-regulatory region. *Mol Microbiol* 16:597-607.
14. **Drury LS**, Buxton RS. 1985. DNA sequence analysis of the dye gene of *Escherichia coli* reveals amino acid homology between the dye and OmpR proteins. *J Biol Chem* 260:4236-4242.
15. **Dutta R**, Qin L, Inouye M. 1999. Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol. Microbiol.* 34:633-640.
16. **Dykxhoorn DM**, St Pierre R, and T. Linn. 1996. A set of compatible *tac* promoter expression vectors. *Gene* 177:133-136.

17. **Gaffney D**, Skurray R, Willetts N. 1983. Regulation of the F conjugation genes studied by hybridization and *tra-lacZ* fusion. *J. Mol. Biol.* 168:103-122.
18. **Georgellis D**, Kwon O, Lin E. 1999. Amplification of signaling activity of the Arc two-component system of *Escherichia coli* by anaerobic metabolites. An in vitro study with different protein modules. *J. Biol. Chem.* 274:35950-35954.
19. **Georgellis D**, Lynch AS, Lin E. 1997. *In vitro* phosphorylation study of the Arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179:5429-5435.
20. **Georgellis D**, Kwon O, De Wulf P, Lin EC. 1998. Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system. *J. Biol. Chem.* 273:32864-32869.
21. **Georgellis D**, Kwon O, Lin EC. 2001. Quinones as the redox signal for the Arc two-component system of bacteria. *Science* 292:2314-2316.
22. **Hathaway BG**, Bergquist P. 1973. Temperature-sensitive mutations affecting the replication of F-prime factors in *Escherichia coli* K 12. *Mol. Gen. Genet.* 127:297-306.
23. **Hess JF**, Oosawa K, Kaplan N, Simon M. 1988. Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. *Cell* 53:79-87.
24. **Hoch JA**, Silhavy TJ. 1995. Two-component signal transduction, Washington, DC.
25. **Igo MM**, Ninfa AJ, Stock JB, Silhavy TJ. 1989. Phosphorylation and dephosphorylation of a bacterial transcriptional activator by a transmembrane receptor. *Genes Dev* 3:1725-1734.
26. **Inoue H**, Nojima H, Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28.
27. **Ishige K**, Nagasawa S, Tokishita S, Mizuno T. 1994. A novel device of bacterial signal transducers. *EMBO J.* 13:5195-5202.
28. **Iuchi S**. 1993. Phosphorylation/dephosphorylation of the receiver module at the conserved aspartate residue controls transphosphorylation activity of histidine kinase in sensor protein ArcB of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268:23972-23980.
29. **Iuchi S**, Chepuri V, Fu HA, Gennis RB, Lin E. 1990. Requirement for terminal cytochromes in generation of the aerobic signal for the Arc regulatory system in *Escherichia coli*: study utilizing deletions and *lac* fusions of *cyo* and *cyd*. *J. Bacteriol.* 172:6020-6025.
30. **Iuchi S**, Lin EC. 1992. Mutational analysis of signal transduction by ArcB, a membrane sensor protein responsible for anaerobic repression of operons involved in the central aerobic pathways in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174:3972-3980.
31. **Iuchi S**, Lin EC. 1992. Purification and phosphorylation of the Arc regulatory components of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174:5617-5623.
32. **Iuchi S**, Lin EC. 1995. Signal transduction in the Arc system for control of operons encoding aerobic respiratory enzymes. In Two-component signal transduction. Hoch JA, Silhavy T.

33. **Iuchi S**, Lin EC. 1988. *arcA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 85:1888-1892.
34. **Iuchi S**, Cameron DC, Lin EC. 1989. A second global regulator gene (*arcB*) mediating repression of enzymes in aerobic pathways of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 171:868-873.
35. **Jamieson AF**, Bergquist P. 1976. Genetic mapping of chromosomal mutations affecting the replication of the F-factor of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 148:221-223.
36. **Jin SG**, Prusti PK, Roitsch T, Ankenbauer RG, Nester EW. 1990. Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG. J Bacteriol 172:4945-4950.
37. **Jourlin C**, Ansaldi M, Mejean V. 1997. Transphosphorylation of the TorR response regulator requires the three phosphorylation sites of the TorS unorthodox sensor in *Escherichia coli*. J Mol Biol 267:770-777.
38. **Jung WS**, Jung YR, Oh DB, Kang HA, S. Lee, Chavez-Canales M, Georgellis D, and O. Kwon. 2008. Characterization of the Arc two-component signal transduction system of the capnophilic rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens*. FEMS Microbiol. Lett. 284:109-119.
39. **Kofoid EC**, Parkinson J. 1988. Transmitter and receiver modules in bacterial signaling proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 85:4981-4985.
40. **Kwon O**, Georgellis D, Lynch AS, Boyd D, Lin E. 2000. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region. J. Bacteriol. 182:2960-2966.
41. **Kwon O**, Georgellis D, Lin EC. 2000. Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the arc two-component system of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 182:3858-3862.
42. **Lambden PR**, Guest JR. 1976. Mutants of *Escherichia coli* K12 unable to use fumarate as an anaerobic electron acceptor. J Gen Microbiol 97:145-160.
43. **Lau PC**, Wang Y, Patel A, Labbe D, Bergeron H, Brousseau R, Konishi Y, Raylings M. 1997. A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 94:1453-1458.
44. **Lee YS**, Han JS, Jeon Y, and D. Hwang. 2001. The arc two-component signal transduction system inhibits *in vitro* *Escherichia coli* chromosomal initiation. J Biol Chem 276:9917-9923.
45. **Li J**, Swanson RV, Simon MI, Weis R. 1995. The response regulators CheB and CheY exhibit competitive binding to the kinase CheA. *Biochemistry* 34:14626-14636.
46. **Liu X**, Peña-Sandoval GR, Wanner BL, Jung WS, Georgellis D, Kwon O. 2009. Evidence against the physiological role of acetyl phosphate in the phosphorylation of the ArcA response regulator in *Escherichia coli*. J Microbiol 47:657-662.
47. **Lois AF**, Weinstein M, Ditta GS, Henliski D. 1993. Autophosphorylation and phosphatase activities of the oxygen-sensing protein FixL of *Rhizobium meliloti* are coordinately regulated by oxygen. J Biol Chem 268:4370-4375.

48. **Makino K**, Shinagawa H, Amemura M, Kawamoto T, Yamada M, Nakata A. 1989. Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J Mol Biol* 210:551-559.
49. **Malpica R**, Franco B, Rodriguez C, Kwon O, Georgellis D. 2004. Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101:13318-13323.
50. **Malpica R.**, Peña-Sandoval GR, Rodriguez C, Franco B, Georgellis D. 2006. Signaling by the Arc two-component system provides a link between the redox state of the quinone pool and gene expression. *Antioxid. Redox Signal* 8:781-795.
51. **Manukhov IV**, Bertsova YV, Trofimov DY, Bogachev AV, Skulachev VP. 2000. Analysis of HI0220 protein from *Haemophilus influenzae*, a novel structural and functional analog of ArcB protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc)* 65:1321-1326.
52. **Matsushika A**, Mizuno T. 2000. Characterization of three putative subdomains in the signal-input domain of the ArcB hybrid sensor in *Escherichia coli*(1). *J. Biochem.* 127:855-860.
53. **McEwen J**, Silverman P. 1980. Mutations in genes *cpxA* and *cpxB* of *Escherichia coli* K-12 cause a defect in isoleucine and valine syntheses. *J Bacteriol* 144:68-73.
54. Miller, J. H. 1972. Experiments in Molecular Genetics p. 352-355. *In C. S. Harbor* (ed.), N. Y.
55. **Mizuno MT**. 1997. Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res* 4:161-168.
56. **Neiditch MB**, Federle MJ, Pompeani AJ, Kelly RC, Swem DL., Jeffrey PD, Bassler BL, Hughson FM. 2006. Ligand-induced asymmetry in histidine sensor kinase complex regulates quorum sensing. *Cell* 126:1095-1108.
57. **Ninfa AJ**, Magasanik B. 1986. Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:5909-5913.
58. **Ninfa EG**, Atkinson MR, Kamberov ES, Ninfa AJ. 1993. Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. *J Bacteriol* 175:7024-7032.
59. **Nixon BT**, Ronson CW, Ausubel F. 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.
60. **Parkinson JS**, Kofoed EC. 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* 26:71-112.
61. **Peña-Sandoval GR**, Georgellis D. 2010. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli* autophosphorylates by an intramolecular reaction. *J Bacteriol* 192.
62. **Peña-Sandoval GR**, Kwon O, Georgellis D. 2005. Requirement of the receiver and phosphotransfer domains of ArcB for efficient

- dephosphorylation of phosphorylated ArcA *in vivo*. *J. Bacteriol.* 187:3267-3272.
63. **Pernestig AK**, Melefors O, Georgellis D. 2001. Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276:225-231.
 64. **Perraud AL.**, Kimmel B, Weiss V, Gross R. 1998. Specificity of the BvgAS and EvgAS phosphorelay is mediated by the C-terminal HPT domains of the sensor proteins. *Mol Microbiol* 27:875-887.
 65. **Ponting CP**, Aravind L. 1997. PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr Biol* 7:R674-677.
 66. **Rabin RS**, Collins LA, Stewart V. 1992. In vivo requirement of integration host factor for nar (nitrate reductase) operon expression in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8701-8705.
 67. **Rodriguez C**, Kwon O, Georgellis D. 2004. Effect of D-lactate on the physiological activity of the ArcB sensor kinase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186:2085-2090.
 68. **Roeder W**, Somerville RL. 1979. Cloning the *trpR* gene. *Mol. Gen. Genet.* 176:361-368.
 69. **Ronson CW**, Nixon BT, Ausubel FM. 1987. Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. *Cell* 49:579-581.
 70. **Salmon K**, Hung SP, Mekjian K, Baldi P, Hatfield GW, Gunsalus RP. 2003. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR. *J Biol Chem* 278:29837-29855.
 71. **Salmon KA**, Hung SP, Steffen NR, Krupp R, Baldi P, Hatfield GW, Gunsalus RP. 2005. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: effects of oxygen availability and ArcA. *J Biol Chem* 280:15084-15096.
 72. **Sambrook J**, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
 73. **Shaulsky G**, Escalante R, Loomis WF. 1996. Developmental signal transduction pathways uncovered by genetic suppressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15260-15265.
 74. **Simms SA**, Keane MG, Stock J. 1985. Multiple forms of the CheB methylesterase in bacterial chemosensing. *J Biol Chem* 260:10161-10168.
 75. **Stewart V**. 2003. Biochemical Society Special Lecture. Nitrate- and nitrite-responsive sensors NarX and NarQ of proteobacteria. *Biochem Soc Trans* 31:1-10.
 76. **Stewart V**, Parales J Jr., Merkel SM. 1989. Structure of genes narL and narX of the nar (nitrate reductase) locus in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 171:2229-2234.
 77. **Stock AM**, Robinson VL, and Gourdeau PN. 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69:183-215.
 78. **Stock JB**, Ninfa AJ, Stock AM. 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* 53:450-490.
 79. **Surette MG**, Levit M, Liu Y, Lukat G, Ninfa EG, Ninfa A, Stock JB. 1996. Dimerization is required for the activity of the protein histidine kinase CheA that mediates signal transduction in bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 271:939-945.

80. **Swanson RV**, Bourret RB, Simon MI. 1993. Intermolecular complementation of the kinase activity of CheA. *Mol Microbiol* 8:435-441.
81. **Swem LR**, Kraft BJ, Swem DL, Setterdahl AT, Masuda S, Knaff DB, Zaleski JM, Bauer CE. 2003. Signal transduction by the global regulator RegB is mediated by a redox-active cysteine. *Embo J* 22:4699-4708.
82. **Tanaka T**, Saha SK, Tomomori C, Ishima R, Liu D, Tong KI, Park H, Dutta R, Qin L, Swindells MB, Yamazaki T, Ono AM, Kainosho M, Inouye M, Ikura M. 1998. NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. *Nature* 396:88-92.
83. **Tomenius H**, Pernestig AK, Mendez-Catala CF, Georgellis D, Normark S, Melefors O. 2005. Genetic and functional characterization of the *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system: point mutations in the HAMP linker of the BarA sensor give a dominant-negative phenotype. *J Bacteriol* 187:7317-7324.
84. **Uhl MA**, Miller JF. 1996. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *Embo J* 15:1028-1036.
85. **Uندن G**, Achebach S, Holighaus G, Tran HG, Wackwitz B, Zeuner Y. 2002. Control of FNR function of *Escherichia coli* by O₂ and reducing conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4:263-268.
86. **Uندن G**, Bongaerts J. 1997. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta* 1320:217-234.
87. **West AH**, Stock AM. 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* 26:369-376.
88. **Wolfe A.J**, Stewart RC. 1993. The short form of the CheA protein restores kinase activity and chemotactic ability to kinase-deficient mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1518-1522.
89. **Yaku H**, Mizuno T. 1997. The membrane-located osmosensory kinase, EnvZ, that contains a leucine zipper-like motif functions as a dimer in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 417:409-413.
90. **Yang Y**, Inouye M. 1991. Intermolecular complementation between two defective mutant signal-transducing receptors of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88:11057-11061.
91. **Yuk MH**, Cotter PA, Miller JF. 1996. Genetic regulation of airway colonization by *Bordetella* species. *Am J Respir Crit Care Med* 154:S150-154.
92. **Zhulin IB**, Taylor BL, Drapal R. 1997. PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem. Sci.* 22:331-333.