



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**MECANISMO MOLECULAR DE REGULACIÓN DE LA CINASA SENSORA ArcB DE
*Haemophilus influenzae***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
EDER FLORES TAMAYO

TUTOR PRINCIPAL
DR. DIMITRIS GEORGELLIS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. XÓCHITL PÉREZ MARTÍNEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DR. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Noviembre 2016



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.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en el laboratorio 226 norte bajo la tutoría del Dr. Dimitris Georgellis, a quien agradezco su asesoría en el desarrollo de este proyecto.

Agradezco a mi comité tutorial integrado por la Dra. Xochitl Pérez Martínez, el Dr. José Luis Puente García y el Dr. Dimitris Georgellis, quienes en el transcurso del programa de Maestría me ayudaron a mejorar mi trabajo de investigación.

Agradezco la asesoría en el desarrollo de este trabajo y la revisión de este escrito al Dr. Adrián F. Alvarez.

Agradezco la asesoría y el apoyo técnico en el desarrollo de este trabajo de Tesis a la M. en C. Claudia Rodríguez Rangel.

Agradezco el apoyo económico brindado a los proyectos:

Bacterial Plasma Membrane Microdomains: Control of Two Component System Signaling and Beyond. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) #178033.

Control of Microbial Gene Expression by Extra-cellular Stimuli. De la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), # IN209215.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de Beca de Maestría (Becario No. 307996).

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico otorgado para asistir al IV Congreso de la Rama de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias celebrado del 4 al 8 de octubre de 2015 en Metepec Atlixco, Puebla.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Sistemas de dos componentes	3
1.2 Sistema ArcB/A de <i>Escherichia coli</i>	4
1.3 ArcB tipo I.....	5
1.4 Señalización y regulación del sistema ArcB/A de <i>Escherichia coli</i>	6
1.5 Sistema ArcB/A de <i>Haemophilus influenzae</i>	9
1.6 ArcB tipo II.....	10
1.7 Especies con ArcB tipo I vs especies con ArcB tipo II.....	11
2. HIPÓTESIS	13
3. OBJETIVOS.....	13
3. 1 Objetivo general.....	13
3. 2 Objetivos particulares.	13
4. JUSTIFICACIÓN	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1 Cepas y condiciones de crecimiento.....	15
5.2 Plásmidos y oligonucleótidos	15
5.3 Extracción y purificación de plásmidos	18
5.4 Preparación de células competentes	19
5.5 Transformación de células	20
5.6 Ensayos de β -galactosidasa.....	20
6. RESULTADOS.....	21
6.1 El remplazo de residuos de Cys 37, 268 y 472 en ArcB _{Hi} no afecta su activación	21
6.2 Los residuos de cisteína no están involucrados en la regulación de ArcB _{Hi}	22
6.3 La sustitución de aminoácidos en la región periplásmica de ArcB _{Hi} afecta su activación.	24

6.4 Ensayo de inactivación de ArcA-P por ArcB _{Hi}	27
6.5 La porción citosólica de ArcB _{Hi} no responde al cambio de condiciones redox	29
7. DISCUSIÓN.....	30
8. CONCLUSIONES	
9. PERSPECTIVAS.....	36
10. BIBLIOGRAFÍA.....	37

RESUMEN

Los sistemas de dos componentes (SDC) de transducción de señales es el mecanismo más común por el que las bacterias perciben las condiciones ambientales y adaptan su metabolismo a éstas. El sistema Arc, que detecta las condiciones redox del ambiente, se conforma por la cinasa sensora ArcB anclada a la membrana y ArcA, su regulador de respuesta citoplasmático. En condiciones reductoras, ArcB de *Escherichia coli* se autofosforila y transfosforila a ArcA vía His292→Asp576→His717→Asp54, ArcA fosforilado (ArcA-P) reprime la expresión de operones relacionados con el metabolismo aerobio y activa la expresión de otras proteínas involucradas con el metabolismo fermentativo. Por el contrario, bajo condiciones oxidantes las ubiquinonas oxidan los residuos citoplasmáticos cys180 y cys141 de ArcB de *E. coli*, inhibiendo su actividad cinasa y activándola como fosfatasa específica de ArcA-P, lo que le permite desfosforilar a ArcA vía Asp54→His717→Asp576→P_i. *Haemophilus influenzae* presenta un ArcB (ArcB_{Hi}) ortólogo al de *E. coli*, el cual es capaz de complementar mutantes en *arcB* a pesar de carecer de la porción citoplasmática en donde se encuentran los residuos de cisteína reguladores, sin embargo, a lo largo de su secuencia tiene cinco residuos de cisteína. En este trabajo se demostró *in vivo* que los residuos de cisteína no están involucrados en su regulación, descartando también que su mecanismo esté dado por una reacción de óxido-reducción. Además, se descartó que el pH y la fuerza protón motriz funcionen como señales activadoras de ArcB_{Hi}, pero se determinó que la porción periplásmica es necesaria para su regulación.

ABSTRACT

Signal transduction two component systems (TCS) are the main mechanism by which bacteria sense their environment and modulate their metabolism accordingly. The TCS Arc senses the redox growth conditions. This system comprises the cytoplasmic response regulator ArcA and the membrane-anchored sensor kinase ArcB. Under reducing growth conditions, *E. coli* ArcB autophosphorylates through an intramolecular reaction and transphosphorylates ArcA via His292→Asp576→His717→Asp54. Phosphorylated ArcA (ArcA-P), represses the expression of many operons involved in respiratory metabolism and activates others encoding proteins involved in fermentative metabolism. Under nonstimulating conditions, the electron carrier ubiquinone oxidates two ArcB cytosol-located redox-active cysteine residues, ArcB acts as a specific ArcA-P phosphatase that catalyzes the dephosphorylation of ArcA-P by a reverse Asp54→His717→Asp576→P_i phosphorelay. The ArcB orthologue in *Haemophilus influenzae* (ArcB_{Hi}) lacks the cytosol-located redox-active cysteine residues but it is able to complement an *E. coli arcB* mutant. However, ArcB_{Hi} possess five cysteine residues along its sequence. This work demonstrates *in vivo* that ArcB_{Hi} cysteine residues are not involved in its regulation, rejecting a redox mechanism. Moreover, pH and proton motriz force were rejected as an ArcB_{Hi} positive signal, but it was determined that an integral periplasmic domain is necessary for its correct regulation.

1. INTRODUCCIÓN

Los seres vivos habitan una gran diversidad de ambientes, para lograr esto, utilizan una variedad de sensores y mecanismos de transducción de señales que los adaptan a diferentes ambientes (Casino *et al.*, 2010). Estas adaptaciones se ven reflejadas en los patrones de expresión génica (Alm *et al.*, 2006) y por ejemplo, en procariontes, pueden ser resultado de la acción de diferentes proteínas señalizadoras, incluyendo las cinasas de histidina y sus reguladores de respuesta, proteínas de quimiotaxisceptoras de metilos, diguanilato y adenilato ciclasas y las serina/treonina/tirosina cinasas, así como factores individuales de transcripción o sistemas de un componente (Galperin, 2005; Ulrich *et al.*, 2005). De este tipo de proteínas, las cinasas de histidina son de las más abundantes y son consideradas como el mecanismo más utilizado de transducción de señales en bacterias (Wolanin *et al.*, 2002).

1.1 Sistemas de dos componentes

Para poder existir en un amplio rango de ambientes, las bacterias son capaces de regular su metabolismo en respuesta a estas fluctuaciones ambientales (West, 2001) y lo hacen principalmente mediante los sistemas de dos componentes (SDC), que en menor número también están presentes en hongos, protozoarios y plantas (Beier, 2006), resultando en una expresión genética adaptativa. El número de SDC por especie varía desde unos pocos hasta varios cientos en los diferentes organismos, dependiendo que tan variante sea el ambiente donde viven, ya que tienen la capacidad de percibir señales exógenas y transmitir esta información mediante un proceso de transducción de señales basado en fosforilaciones (Olivera, 2010). Entre las señales que se cree que los SDC son capaces de detectar están parámetros físicos y químicos, como iones, temperatura, pH, oxígeno, osmolaridad, componentes autoinductores y el contacto con otras células (Beier, 2006). Mientras que los cambios ambientales que pueden percibir los SDC y a los cuales se adaptan los microorganismos son muy variados. Entre otras cosas, regulan la resistencia a antibióticos, virulencia, presión osmótica y el metabolismo aerobio/anaerobio (Hoch, 2000). Aunque se conocen muchas de las proteínas específicas que responden a cada estímulo, poco es lo que se sabe del mecanismo de regulación de éstas.

El primer componente de un SDC es una proteína llamada cinasa de histidina o cinasa sensora (CS) (figura 1) que por lo general se encuentran anclada a la membrana hasta por 13 dominios transmembranales (TM) (Capra, 2011) y es la encargada de recibir el estímulo ambiental y transmitirlo al segundo componente llamado regulador de respuesta (RR) (figura 1). Una vez que la CS percibe su estímulo específico se autofosforila, en una reacción dependiente de ATP, en un residuo de histidina (His) conservado y transfosforila al RR en un residuo de aspartato (Asp) conservado (Hoch, 2000; West, 2001; Olivera, 2010). Fosforilado el RR es capaz de desencadenar una respuesta y muchos lo hacen mediante su unión al DNA para regular la expresión de genes blanco (Capra, 2011; West, 2001; Olivera, 2010).

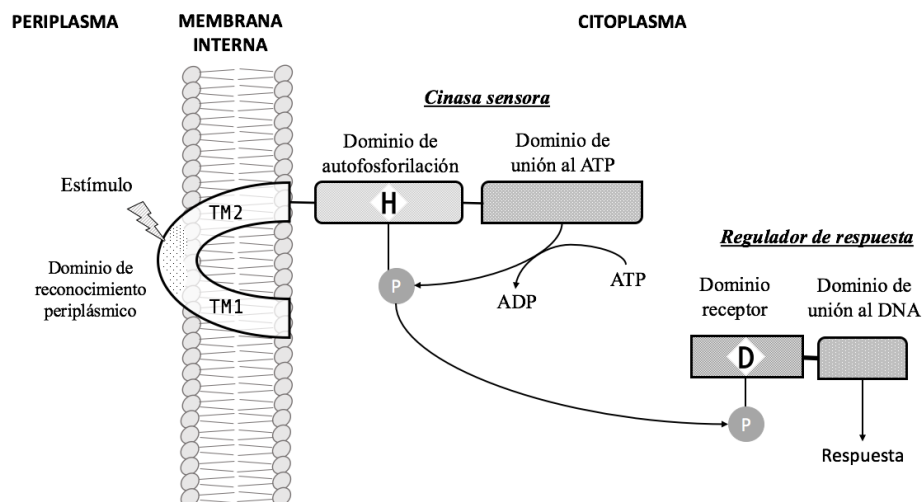


Figura 1. Sistema de dos componentes. Un SDC típico consta de una CS anclada a la membrana por dos dominios transmembranales (TM), la cual recibe el estímulo a través de su dominio periplásmico provocando su activación, es decir, se autofosforila en un residuo de His conservado y transfosforila al segundo componente del sistema, un RR citosólico, en un residuo conservado de Asp lo que, por lo general, permite que éste se una al DNA regulando la expresión génica.

1.2 Sistema ArcB/A de *Escherichia coli*

El sistema de dos componentes Arc (*anoxic redox control*) de transducción de señales permite a las bacterias anaerobias facultativas percibir las condiciones de respiración en su medio de crecimiento y de acuerdo a éstas, regular su expresión genética para adaptarse a esas condiciones. El sistema Arc de *Escherichia coli* regula directa e

indirectamente la expresión de más de 300 operones (Liu, 2004; Salmon *et al.*, 2005), incluyendo aquellos que codifican para los factores del transporte de electrones, enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y del ciclo del glioxilato, así como del metabolismo de lípidos (Unden, 1997). Este sistema está compuesto por la CS ArcB (Iuchi *et al.*, 1989a), de 778 aminoácidos (88 KDa), y el RR ArcA, de 238 aminoácidos (27 KDa) (Iuchi, 1988).

1.3 ArcB tipo I

La CS ArcB es atípica a la gran mayoría de las que se encuentran en *E. coli*, ya que ésta es una cinasa híbrida que tiene 3 dominios catalíticos (figura 2) (Ishige *et al.*, 1994; Iuchi *et al.*, 1990a; Parkinson, 1992). Al hacer un alineamiento entre diversos ortólogos de ArcB, se identificaron dos grupos, el tipo I y el tipo II (Jung *et al.*, 2008). El tipo I incluyó los ArcB de *E. coli*, *Shigella boydii*, *Salmonella enterica*, *Photobacterium luminescens*, *Yersinia pestis*, *Erwinia carotovora*, *Vibrio cholerae* y *Photobacterium profundum*, mientras que el tipo II incluyó los de *Mannheimia succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus influenzae* (Jung *et al.*, 2008).

El ArcB de *E. coli* (ArcB_{Eco}) de tipo I presenta dos fragmentos transmembranales (Matsushika, 2000) con los que se ancla a la membrana celular, correspondientes a los residuos 23-42 y 58-77 (Kwon *et al.*, 2000b), ambos separados por un fragmento periplásmico de apenas 15 residuos (figura 2), que en la mayoría de CS suele ser más largo ya que es en donde se encuentra el dominio sensor que recibe el estímulo ambiental. Después del segundo fragmento transmembranal se encuentra una región conectora, la cual une los fragmentos transmembranales con los dominios catalíticos, en ella se encuentra un cierre de leucinas esencial para una correcta orientación y señalización de la proteína (Matsushika, 2000; Nuñez-Oreza *et al.*, 2012) y un dominio PAS (figura 2) necesario para percibir los cambios redox del ambiente y regular su actividad cinasa/fosfatasa (Malpica *et al.*, 2004; Matsushika, 2000; Taylor, 1999). Posteriormente se encuentran los dominios catalíticos: el primero es un dominio transmisor primario (H1) con un residuo His292 conservado; el segundo es un dominio receptor (D1), con un residuo Asp576 conservado; el último es un dominio transmisor

secundario (H2) o de fosfotransferencia (HPt), con un residuo His717 conservado (figura 2) (Ishige *et al.*, 1994; Matsushika, 1998). Dentro del dominio H1 se encuentran las cajas G1 y G2, denominadas así por su alto contenido de glicinas, las cuales son el sitio de unión de ATP (Parkinson, 1992; Swanson *et al.*, 1994).

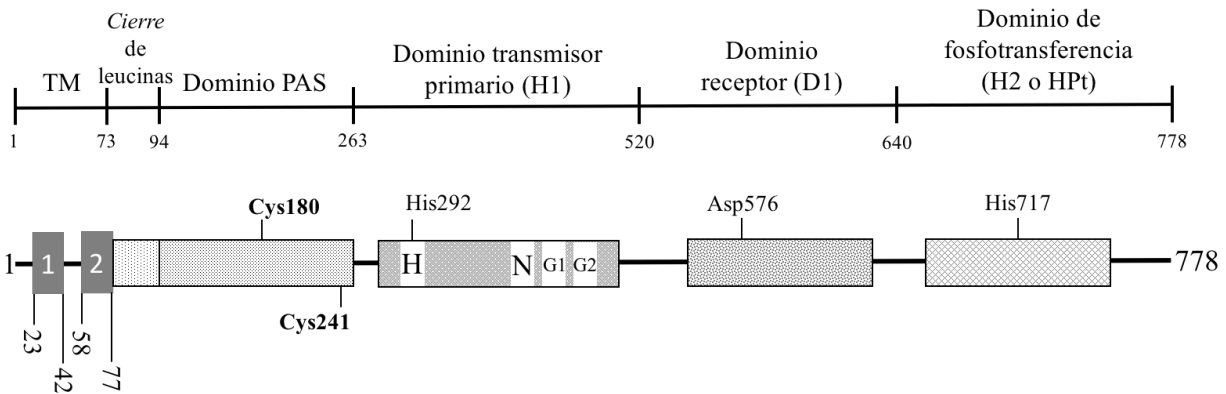


Figura 2. ArcB de *E. coli*. El ArcB_{Eco}, de tipo I, presenta dos fragmentos transmembranales (TM) separados por un fragmento de apenas 16 aminoácidos, seguido a éstos se encuentra un dominio conector el cual contiene un cierre de leucinas y un dominio PAS en el cual se encuentran dos residuos de cisteína regulatorios. A diferencia de las CS típicas, ArcB es tripartita, ya que tiene tres dominios catalíticos, un dominio transmisor con un residuo His conservado (H1) y los determinantes catalíticos N, G1 y G2, un dominio receptor con un residuo Asp conservado (D1) y un dominio de fosfotransferencia con un residuo His conservado (H2 o HPt). Modificado de Georgellis *et al.*, 2001.

1.4 Señalización y regulación del sistema ArcB/A de *Escherichia coli*

Cuando *E. coli* se encuentra en condiciones de crecimiento anaerobias, el sistema ArcB/A está activo, lo que lleva a la autofosforilación de ArcB_{Eco}, a través de una reacción intramolecular (Peña-Sandoval *et al.*, 2010) con el fosfato-γ de un ATP (Iuchi & Lin, 1992a) en su residuo conservado His292 (Georgellis *et al.*, 1997; Iuchi & Lin, 1992a; Iuchi, 1993). Esta autofosforilación es potenciada por los metabolitos anaerobios acetato, piruvato y D-lactato (Georgellis *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2004). Posteriormente, ocurre una reacción de fosforelevo vía His292→Asp576→His717→Asp54 (figura 3) (Iuchi, 1993; Tsuzuki *et al.*, 1995; Georgellis *et al.*, 1997; Matsushika, 1998; Kwon *et al.*, 2000a). La fosforilación de ArcA (ArcA-P) en el dominio receptor de su región amino terminal provoca su multimerización a un tetrámero de

dímeros en una relación 1:1 de ArcA:ArcA-P, esta configuración induce su unión a regiones blanco en el DNA (Jeon *et al.*, 2001) mediante el dominio hélice-vuelta-hélice que tiene en su región carboxilo terminal, de esta manera actúa como un regulador transcripcional de distintos genes (Lynch, 1996). Al cambiar las condiciones de crecimiento de anaeróbicas a aeróbicas, ArcB_{Eco} pierde su actividad cinasa y adquiere actividad fosfatasa con la cual es capaz de defosforilar a ArcA-P vía Asp54→His717→Asp576→P_i (figura 3) (Iuchi, 1993; Georgellis *et al.*, 1998; Peña-Sandoval *et al.*, 2005).

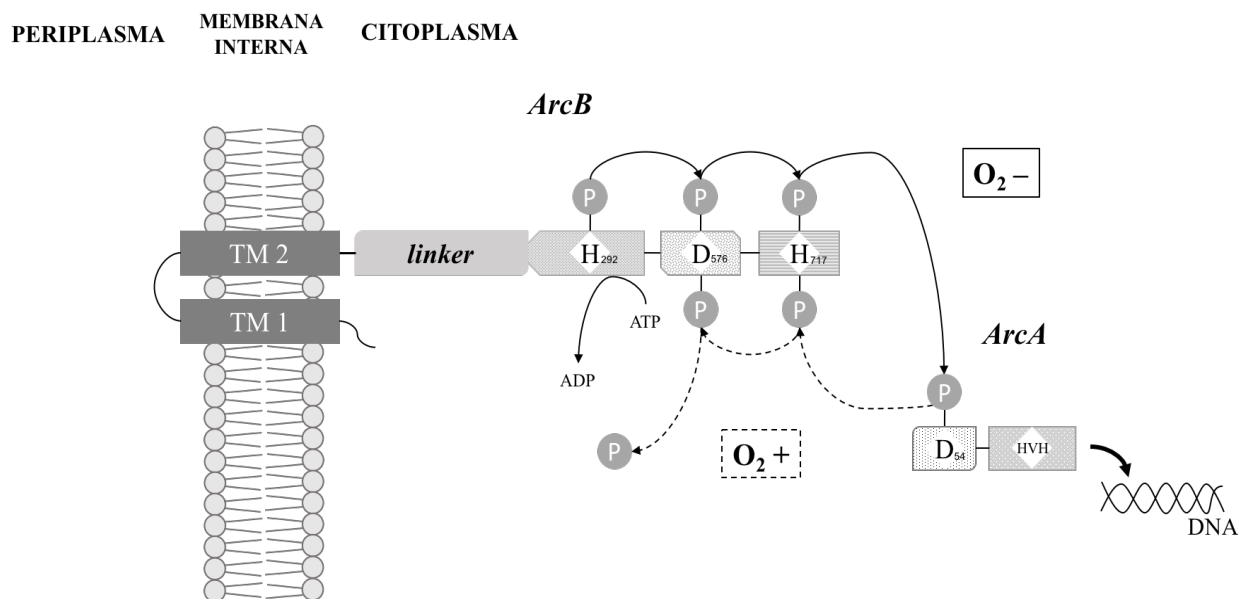


Figura 3. Mecanismo de señalización del sistema ArcB/A. En condiciones reductoras (flechas continuas) el sistema Arc es activado, ArcB se autofosforila intramolecularmente por una reacción dependiente de ATP promoviendo una reacción de fosforelevo vía His292→Asp576→His717→Asp54 para que ArcA-P se una al DNA mediante su dominio hélice-vuelta-hélice (HVH), active la expresión de genes relacionados con el metabolismo anaerobio y apague la expresión de genes del metabolismo aeróbico. Cuando las condiciones de crecimiento cambian a oxidantes, ArcB actúa como fosfatasa específica de ArcA-P (flechas punteadas), defosforilandola mediante la vía inversa Asp54→His717 →Asp576→P_i.

En condiciones aeróbicas, el acarreador de electrones ubiquinona en su estado oxidado es la señal negativa específica para silenciar a ArcB_{Eco} (Alvarez *et al.*, 2013; Georgellis *et al.*, 2001a) al oxidar sus dos únicos residuos de cisteína (cys180 y cys241) (figura 4), los cuales se encuentran dentro del dominio PAS, y promover la formación de puentes

disulfuro intermoleculares, provocando su dimerización y por lo tanto la pérdida de su actividad cinasa (Malpica *et al.*, 2004). Cuando las condiciones de crecimiento cambian de aeróbicas a anaeróbicas, la poza de ubiquinonas disminuye y el de las menaquinonas aumenta (Simon *et al.*, 2008; Portnoy *et al.*, 2010), funcionando estas últimas como donadoras de electrones a ArcB_{Eco}, lo que resulta en la reducción de los puentes disulfuro y la consiguiente activación de ArcB_{Eco} (figura 4) (Alvarez *et al.*, 2013). El hecho de que la regulación de ArcB_{Eco} implique la oxidación/reducción de sus residuos de cisteína por acarreadores de electrones, está relacionado con el potencial redox de cada una de estas moléculas, los cuales están por debajo y por arriba del potencial redox de ArcB_{Eco} ($E'^0 = -41$ mV) lo que permite a las menaquinonas ($E'^0 = -74$ mV) reducir las cisteínas y a las ubiquinonas ($E'^0 = +100$ mV) oxidarlas (Alvarez *et al.*, 2013).

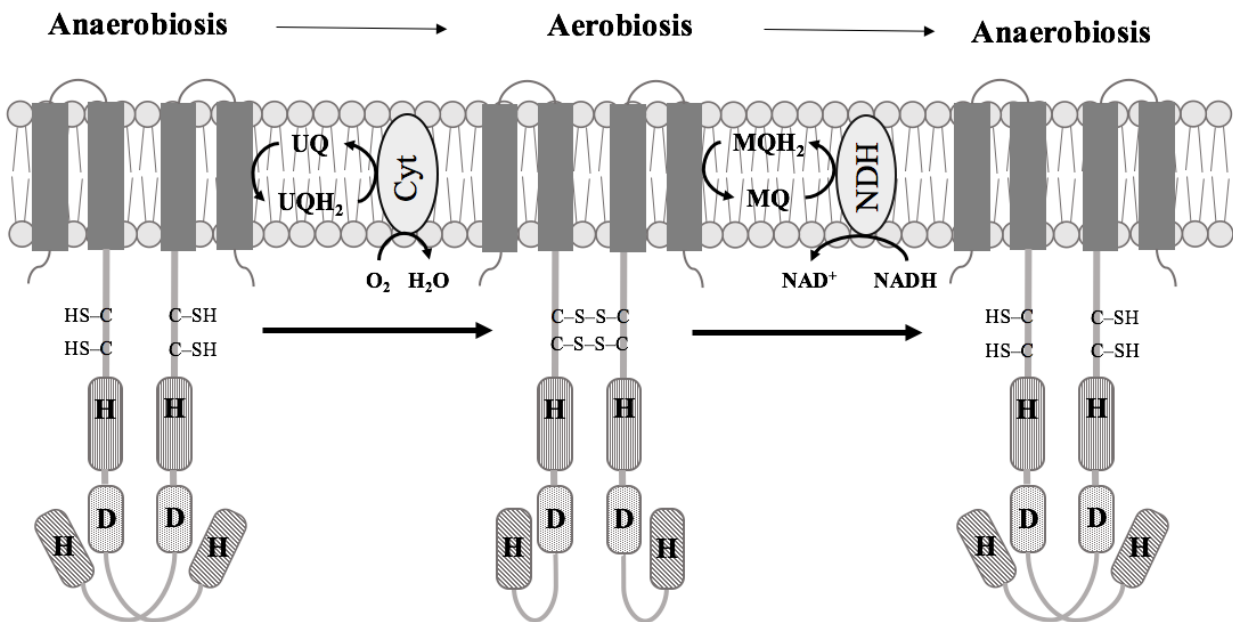


Figura 4. Mecanismo de regulación de ArcB_{Eco}. En condiciones de anaerobiosis, ArcB_{Eco} se encuentra activa formando homodímeros y sus residuos de cisteína se encuentran reducidos. Cuando las condiciones de crecimiento pasan a aeróbicas, el acarreador de electrones ubiquinona oxida los residuos de Cys promoviendo la formación de dos puentes disulfuro intermoleculares e inactivando a ArcB_{Eco}. Al volver las condiciones a anaeróbicas, los puentes disulfuro son reducidos por el acarreador de electrones menaquinona, el cual ahora supera la poza de ubiquinonas reactivando a ArcB_{Eco}. Modificado de Alvarez *et al.*, 2013.

A diferencia de la mayoría de las cinasas sensoras, en las que el dominio sensor se encuentra en la región periplásmica, en ArcB_{Eco} se encuentra en el citoplasma (Matsushika, 2000). Sin embargo, debido a su mecanismo molecular de regulación, sus fragmentos transmembranales aunque no tienen una función directa en la recepción de las moléculas señal, son importantes para mantenerla anclada cerca de éstas (Kwon *et al.*, 2000b).

1.5 Sistema ArcB/A de *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae es una bacteria Gram negativa no motil, anaerobia facultativa (Strausbaugh, 2002) y comensal de la nasofaringe del humano (Harrison *et al.*, 2012) en donde permanece siempre. Sin embargo, en algunas ocasiones es capaz de colonizar otras regiones del cuerpo como la superficie de las mucosas sobre las que forma biofilms. Fuera de su nicho natural provoca patologías como otitis media, infecciones de vías respiratorias superiores e inferiores, septicemia, meningitis, conjuntivitis, entre otras (Harrison *et al.*, 2012). Sólo en estas ocasiones, *H. influenzae* está expuesta a un amplio rango de niveles de oxígeno.

Su genoma relativamente pequeño facilitó que fuera el primero en ser secuenciado por completo, en él se identificaron cinco RR y cuatro CS, incluyendo los componentes del sistema Arc (Fleischmann *et al.*, 1995). Este número tan reducido de sistemas de dos componentes es característico de organismos que viven en ambientes poco fluctuantes, como el caso de *H. influenzae*. La longitud reportada para *arcB* de *H. influenzae* (*arcB_{Hi}*) fue de 200 pares de bases (Fleischmann *et al.*, 1995). Posteriormente, esta secuencia fue corregida, identificándose un dominio receptor y un dominio transmisor secundario adicionales (Manukhov *et al.*, 2000). Este nuevo marco abierto de lectura para *arcB_{Hi}*, así como el de su RR, *arcA_{Hi}*, fueron probados para confirmar que integran un sistema de dos componentes. Mediante fosforilaciones *in vitro* se demostró que ArcB_{Hi} es capaz de autofosforilarse y transfosforilar a ArcA_{Hi}, y que tanto ArcB_{Eco} como ArcB_{Hi} son capaces de catalizar la fosforilación heteróloga de sus reguladores de respuesta (Georgellis *et al.*, 2001b).

Por otro lado, mediante la fusión transcripcional de *lacZ* con el promotor del operón *lldPRD*, involucrado en el metabolismo de L-lactato, se construyó el reportero $\Phi(lldP-$

lacZ), el cual es reprimido por ArcA_{Eco}-P, con éste se observó que ArcA_{Hi} y ArcB_{Hi} complementan a mutantes en *arcB* de *E. coli* y responden a cambios redox del ambiente (Georgellis *et al.*, 2001b). En *E. coli* se conocen bien los genes blancos de ArcA_{Eco}, pero en *H. influenzae* sólo se sabe que regula de forma directa o indirecta más de 40 genes (Souza-Hart *et al.*, 2003) dentro de los que se encuentran algunos que codifican para enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, reductasas y otras relacionadas con virulencia y estrés oxidativo (Souza-Hart *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2007; Wong, 2012).

1.6 ArcB tipo II

Una búsqueda bioinformática de las secuencias de genomas bacterianos disponibles, permitió identificar con alto grado de identidad homólogos de ArcB_{Hi} que en conjunto conforman el tipo II de ArcB (Jung *et al.*, 2008). La principal diferencia entre los ArcB tipo I y tipo II es la presencia y ausencia, respectivamente, de un dominio PAS (figura 5) (Georgellis *et al.*, 2001b; Jung *et al.*, 2008).

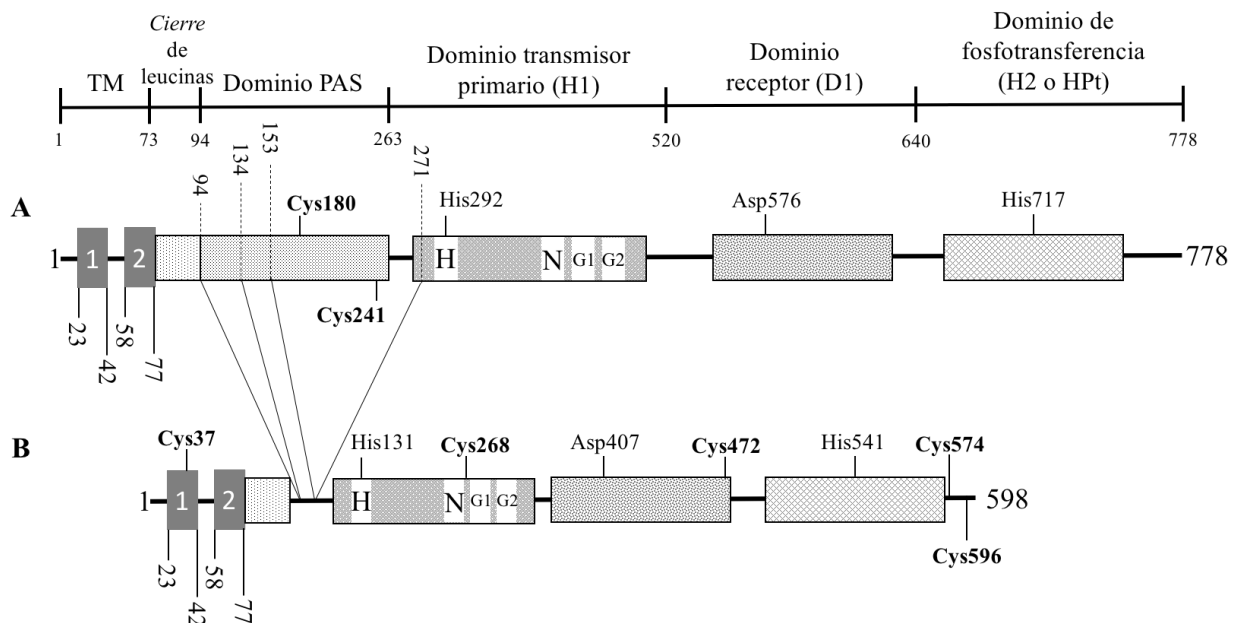


Figura 5. Diferencias entre ArcB_{Eco} y ArcB_{Hi}. A) ArcB_{Eco}, dominios estructurales de ArcB_{Eco}, señalando los residuos conservados de cada dominio catalítico y los residuos Cys regulatorios. B) ArcB_{Hi} presenta dos fragmentos transmembranales (TM), seguidos de un cierre de leucinas pero no de un dominio PAS, el cual está ausente y por consiguiente no presenta las Cys

regulatorias de ArcB_{Eco}. Sin embargo, tiene cinco residuos Cys en las posiciones 37, 268, 472, 574 y 596. Presenta tres dominios catalíticos, un dominio transmisor con un residuo His conservado (H1) y los determinantes catalíticos N, G1 y G2, un dominio receptor con un residuo Asp conservado (D1) y un dominio de fosfotransferencia con un residuo His conservado (H2 o HPt). Modificado de Georgellis *et al.*, 2001.

Al comparar la secuencia de aminoácidos entre ArcB_{Hi} y ArcB_{Eco} existe un grado de identidad del 34.8%. ArcB_{Hi} carece de 163 residuos entre la región transmembranal y el dominio transmisor primario, correspondientes a los residuos 93-134 y 153-271 de ArcB_{Eco}, región en donde se localiza el dominio PAS (Manukhov *et al.*, 2000; Georgellis *et al.*, 2001b). A esta región le sigue un dominio transmisor primario (H1) con el residuo His131 conservado, un dominio receptor (D1) con el residuo Asp407 conservado y finalmente un dominio transmisor secundario (H2) o de fosfotransferencia (HPt) con el residuo His541 conservado (Georgellis *et al.*, 2001b). Debido a la ausencia del dominio PAS, se ha sugerido que para los ArcB de tipo II este dominio no es requerido para la regulación de su actividad cinasa/fosfatasa (Manukhov *et al.*, 2000), esto debido al nicho tan restringido en el que habitan las especies que lo portan (Harrison *et al.*, 2012) y que probablemente perciben diferentes moléculas señal y utilizan diferentes mecanismos de regulación para su actividad cinasa a los utilizados por el tipo I (Georgellis *et al.*, 2001b; Jung *et al.*, 2008).

1.7 Especies con ArcB tipo I vs especies con ArcB tipo II

Entre las especies que tienen ArcB tipo I y las que tienen ArcB tipo II existen algunas diferencias. En el caso particular de *H. influenzae*, en comparación con *E. coli*, la mayoría de enzimas de la cadena transportadora de electrones que se conocen por funcionar en condiciones aeróbicas están ausentes, no existen homólogos del citocromo O ni de los genes para la biosíntesis de ubiquinonas, aunque la vía de síntesis de menaquinonas se mantiene intacta (Tatusov *et al.*, 1996; Challacombe *et al.*, 2007). Además, su ciclo de los ácidos tricarbónicos está incompleto ya que están ausentes las enzimas citrato sintasa, aconitasa, isocitrato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa (Tatusov *et al.*, 1996), lo que sugiere que este ciclo es utilizado más para la asimilación de carbono y la generación de metabolitos precursores para

biosíntesis, que para generación de energía (Challacombe *et al.*, 2007). En términos de fermentación, *H. influenzae* tiene los genes para la conversión de piruvato a lactato, formato y acetato, pero no a etanol (Challacombe *et al.*, 2007). Por todas estas características, se ha sugerido que el metabolismo de *H. influenzae* es principalmente anaeróbico (Tatusov *et al.*, 1996).

A pesar de estas importantes diferencias bioquímicas, los ArcB del tipo II son capaces de complementar cepas de *E. coli* mutantes en *arcB*, como el ArcB_{Hi} y el ArcB de *Mannheimia succiniciproducens* (ArcB_{Ms}) que también tiene un metabolismo adaptado para vivir en condiciones principalmente anaeróbicas (Hong *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2008). El hecho de que sean capaces de complementar a *E. coli* se vuelve interesante ya que al no tener el dominio PAS, tampoco tienen los dos residuos de cisteína que regulan la actividad cinasa y, a pesar de esto, al menos en ArcB_{Hi} se ha observado regulación al cambiar las condiciones del ambiente a aeróbicas o anaeróbicas (Georgellis *et al.*, 2001b). Sin embargo, todos los ArcB tipo II tienen más de dos residuos de cisteína a lo largo de su secuencia. ArcB_{Hi} por ejemplo, tiene cinco residuos de cisteína en las posiciones 37, 268, 472, 574 y 596, dos de estos residuos están conservados entre los ArcB tipo II, el residuo 37 y el 472, por lo que alguno de estos residuos podría estar regulando la actividad cinasa de ArcB_{Hi} como lo hacen sus contrapartes en ArcB_{Eco} sin la presencia necesaria de un dominio PAS y siendo los acarreadores de electrones menaquinonas y demetilmenaquinonas quienes reducirían y oxidarían, respectivamente, estos residuos Cys. Además, ArcB_{Hi} presenta en su porción periplásmica un residuo His, que en ArcB_{Eco} se pensó que podría detectar la fuerza protón motriz (FPM) (Kwon *et al.*, 2000b), un residuo Asp que en otras proteínas está reportado como sensor de pH (Haneburger *et al.*, 2011) y un residuo Trp conservado entre los ArcB de tipo II, los cuales también podrían estar relacionados con su regulación.

2. HIPÓTESIS

En el mecanismo molecular de regulación de la actividad cinasa de ArcB de *H. influenzae*, está involucrada la formación de puentes disulfuro intermoleculares bajo condiciones oxidantes, en los que podrían participar los residuos de cisteína 37 y 472, por su grado de conservación y en el caso del primero, además, por su localización dentro de la membrana.

3. OBJETIVOS

3. 1 Objetivo general.

Determinar el mecanismo molecular de regulación redox de la cinasa sensora ArcB de *Haemophilus influenzae*.

3. 2 Objetivos particulares.

- Probar la regulación de la actividad de ArcB_{Hi} *in vivo* al cambio de condiciones redox.
- Comprobar *in vivo* si los residuos Cys de ArcB_{Hi} están involucrados en la regulación de su actividad.
- Probar la activación de ArcB_{Hi} *in vivo* bajo condiciones aeróbicas en presencia de un agente reductor.

4. JUSTIFICACIÓN

El mecanismo de regulación de la cinasa sensora ArcB de *E. coli* ha sido ampliamente estudiado y se ha descrito que involucra la oxidación/reducción de dos residuos de cisteína en la región conectora de la proteína. Su proteína ortóloga ArcB de *H. influenzae* presenta diferencias importantes en su secuencia con respecto a la cinasa de *E. coli*, entre la que destaca la ausencia de la región conectora y por tanto, los residuos de cisteína regulatorios. Ya que ArcB_{Hi} es capaz de complementar funcionalmente a mutantes de *E. coli* en *arcB*, resulta importante investigar el mecanismo molecular por el cual se regula la actividad de ArcB_{Hi} y compararlo con el ya conocido de ArcB_{Eco}.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas y condiciones de crecimiento

Las cepas de *E. coli* (tabla 1) ECL 5003 (*arcB wt*), ECL 5004 ($\Delta arcB$) y sus transformantes se cultivaron de forma rutinaria a 37 °C en medio LB con agitación. En ensayos de actividad β -galactosidasa, las cepas con el reportero $\Phi(cydA'-lacZ)$ se cultivaron en medio LB adicionado con D-xilosa 20 mM y 0.1 M MOPS (ácido morfolino propanosulfónico; pH 7.0 o 7.4), 0.1 M MES (ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico; pH 5 o 6) o 0.1 M TAPS (ácido metil-amonimo propanosulfónico; pH 8 o 9) y cuando era necesario DTT (ditiotreitolo) 25 mM. Los cultivos anaerobios se hicieron llenando pequeños frascos de vidrio de 5 ml hasta el borde con medio LB preparado, evitando gotas de aire y colocando un pequeño agitador magnético dentro para evitar que las células sedimentaran, finalmente el frasco se cerraba herméticamente y se incubaba a 37 °C. Para medir actividad fosfatasa, las células se cultivaron en medio mínimo de sales M9 (12.8 g/l $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 3 g/l KH_2PO_4 , 0.5 g/l NaCl, 1 g/l NH_4Cl_2 , $MgSO_4$ 2mM y $CaCl_2$ 0.1mM) utilizando piruvato 20 mM como única fuente de carbono y se incubaron a 37 °C en matraces con agitación. Cuando era requerido se utilizó ampicilina, tetraciclina, kanamicina, y cloranfenicol a una concentración final de 50, 10, 40 y 12 $\mu g/ml$ respectivamente.

Tabla 1. Lista de cepas utilizadas en este estudio.

Cepas	Características principales	Referencia
ECL5003	MC4100 $\Delta fnr::Tn9(Cm^r)$ $\Phi(cydA'-lacZ)$	Kwon <i>et al.</i> , 2000b
ECL5004	MC4100 $\Delta arcB::Tet^r$ $\Delta fnr::Tn9(Cm^r)$ $\Phi(cydA'-lacZ)$	Kwon <i>et al.</i> , 2000b
	F' <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi80lacZ\Delta M15$	
TOP10	$\Delta lacX74$ <i>nupG</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara-leu)7697$ <i>galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ^-</i>	Invitrogen

5.2 Plásmidos y oligonucleótidos

El *arcB_{Hi}* junto con su promotor proviene de *H. influenzae* Rd cepa KW20, con el cual se construyó el plásmido pArcB_{Hi} (Georgellis *et al.*, 2001b). El vector pE22ArcB_{Hi} se

construyó al digerir con *EcoRI-BamHI* el plásmido pArcB_{Hi} y clonar el fragmento liberado de 2.2 kb en el vector de bajo número de copias (una por célula) pEXT22 (Dykxhoorn, *et al.*, 1996) digerido con las mismas enzimas. Los plásmidos pE22ArcB_{Hi}^{C37A}, pE22ArcB_{Hi}^{C268A}, pE22ArcB_{Hi}^{C472A}, pBRArcB_{Hi}^{H48A}, pBRArcB_{Hi}^{D54A} y pBRArcB_{Hi}^{W52A-D54A} se construyeron por mutagénesis sitio dirigida de los plásmidos pE22ArcB_{Hi} y pArcB_{Hi} respectivamente, sustituyendo los residuos de cisteína 37, 268 y 472, histidina (His) 48, aspartato (Asp) 54 y triptófano (Trp) 52 por alanina. Para estas mutagénesis se utilizó la enzima *Pfu Turbo* de Agilent Technologies y se siguió el protocolo del kit Quick change Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene. Mientras que los plásmidos pE22ArcB_{Hi}^{C37A-C268A} y pE22ArcB_{Hi}^{C37A-C472A} se obtuvieron al digerir pE22ArcB_{Hi}^{C268A} y pE22ArcB_{Hi}^{C472A} con las enzimas *EcoRI-ClaI* y sustituir los fragmentos liberados de 707 pb con el fragmento liberado del mismo tamaño del plásmido pE22ArcB_{Hi}^{C37A} cortado con las mismas enzimas.

Los marcos abiertos de lectura de *arcB*_{Hi} *wt* (1.8 kb) y la mutante *arcB*_{Hi}⁷⁸⁻⁵⁹⁸ (1.5 kb) que contiene sólo la porción citosólica, se obtuvieron amplificando mediante PCR el vector pArcB_{Hi} con los oligonucleótidos HIBtr5 y ArcB_{Hi}-Rv, y HIB5'cyt y ArcB_{Hi}-Rv, respectivamente. Los productos de PCR se digirieron con *NdeI-HindIII* y se clonaron en los mismos sitios de restricción del pMX732 (Nuñez-Oreza *et al.*, 2012) para sustituir el marco abierto de lectura de ArcB_{Eco} (2.3 kb) y quedar bajo el promotor de ArcB_{Eco}, pE22P_{Eco}ArcB_{Hi} y pE22P_{Eco}ArcB_{Hi}⁷⁸⁻⁵⁹⁸ respectivamente. Los plásmidos construidos y los oligonucleótidos utilizados se enlistan en la tabla 2 y 3 respectivamente.

Tabla 2. Lista de plásmidos utilizados en este estudio.

Plásmido	Características principales	Referencia
pArcB _{Hi}	<i>arcB</i> _{Hi} con su propio promotor en pBR322, Amp ^r	Georgellis <i>et al.</i> , 2001
pEXT22	Vector de bajo número de copias, Kan ^r	Dykxhoorn <i>et al.</i> , 1996
pE22ArcB _{Hi}	<i>arcB</i> _{Hi} con su propio promotor en pEXT22	Este estudio
pE22ArcB _{Hi} ^{C37A}	<i>arcB</i> _{Hi} ^{C37A} con su propio promotor en pEXT22	Este estudio
pE22ArcB _{Hi} ^{C268A}	<i>arcB</i> _{Hi} ^{C268A} con su propio promotor en pEXT22	Este estudio
pE22ArcB _{Hi} ^{C472A}	<i>arcB</i> _{Hi} ^{C472A} con su propio promotor en pEXT22	Este estudio
pE22ArcB _{Hi} ^{C37A-C268A}	<i>arcB</i> _{Hi} ^{C37A-C268A} con su propio promotor en pEXT22	Este estudio
pE22ArcB _{Hi} ^{C37A-C472A}	<i>arcB</i> _{Hi} ^{C37A-C472A} con su propio promotor en pEXT22	Este estudio
pBRArcB _{Hi} ^{H48A}	Mutante citosólica <i>arcB</i> _{Hi} ^{H48A} con su propio promotor en pBR322	Este estudio
pBRArcB _{Hi} ^{D54A}	Mutante citosólica <i>arcB</i> _{Hi} ^{D54A} con su propio promotor en pBR322	Este estudio
pBRArcB _{Hi} ^{W52A-D54A}	Mutante citosólica <i>arcB</i> _{Hi} ^{W52A-D54A} con su propio promotor en pBR322	Este estudio
pMX732	<i>arcB</i> _{Eco} con su propio promotor en pEXT22	Núñez-Oreza <i>et al.</i> , 2012
pE22P _{Eco} ArcB _{Hi}	<i>arcB</i> _{Hi} con el promotor de ArcB _{Eco} en pEXT22	Este estudio
pE22P _{Eco} ArcB _{Hi} ⁷⁸⁻⁵⁹⁸	<i>arcB</i> _{Hi} ⁷⁸⁻⁵⁹⁸ con el promotor de ArcB _{Eco} en pEXT22	Este estudio

Tabla 3. Lista de oligonucleótidos con los que se construyeron las mutantes de *arcB_{Hi}*. Para la mutante *arcB_{Hi}^{C472A}* se utilizaron los oligos HIB'C472A-Fw y HIAB-3' para obtener un megaprimer que con el oligo ArcBHi-Rv amplificaron el gen mutante de *arcB_{Hi}*. En negritas se muestra el codón mutado y subrayada la secuencia no homóloga a *arcB_{Hi}*.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Característica
HiC37A-Fw HiC37A-Rv	CTCGCGGTTTTAGCTCTT GCT ACTCAGATTTTATTTAGTC GACTAAATAAAATCTGAGT AGCA AGAGCTAAAACCGCGAG	<i>arcB_{Hi}^{C37A}</i>
HiC268A-Fw HiC268A-Rv	ATGAGAAATCAGGAT GCG TACCATTTTATTGTG CACAATAAAATGGTAC CGC ATCCTGATTTCTCAT	<i>arcB_{Hi}^{C268A}</i>
HIB'C472A-Fw HIAB-3' ArcBHi-Rv	GGATTTACACCAT GCT CTACAGCAATTTTTGCG <u>CCCGGATCCATGCACCCATTTAAGCCTC</u> <u>CCCAAGCTTAATAATCTTTACACA</u> ACTACC	<i>arcB_{Hi}^{C472A}</i>
HIBH48A-Fw HIBH48A-Rv	TAGTCTATTTATTGTT GCT CAGATATCTGGGTAG CTACCCAAGATATCT AGCA ACAATAAATAGACTA	<i>arcB_{Hi}^{H48A}</i>
HIBD54A Fw HIBD54A RV	CATCAGATATCTTGGGT AGCT ATTTTTCGTTCGGTAAC GTTACCGAACGAAAAAT AGCT ACCCAAGATATCTGATG	<i>arcB_{Hi}^{D54A}</i>
HIBW52A-D54A Fw HIBW52A-D54A Rv	GTTTCATCAGATATCT GCGGTAGCT ATTTTTCGTTCGGTAAC GTTACCGAACGAAAAAT AGCTACCGC AGATATCTGATGAAC	<i>arcB_{Hi}^{W52A-D54A}</i>
HIB5tr ArcBHi-Rv	<u>CCCGGATCCCATATGAAAAATTTCAAATATTTTGCTCAGAGTT</u> ATGTGG <u>CCCAAGCTTAATAATCTTTACACA</u> ACTACC	<i>arB_{Hi} wt</i>
HIB5'cyt ArcBHi-Rv	<u>CCCGGATCCCATATGCTTGAACATTCTCGTCTTG</u> <u>CCCAAGCTTAATAATCTTTACACA</u> ACTACC	<i>arB_{Hi}⁷⁸⁻⁵⁹⁸</i>

5.3 Extracción y purificación de plásmidos

La purificación de DNA plasmídico se realizó mediante dos métodos diferentes dependiendo el objetivo para el que se iban a utilizar. Cuando se necesitaba comprobar las construcciones hechas, la purificación se hizo mediante lisis alcalina (Ehrt, 2003). Con este método, se inoculaban las colonias bacterianas de las que se quiere purificar plásmido en 5 ml de medio LB con sus respectivos antibióticos y se incubaban de 14-16 horas a 37 °C con agitación. Del cultivo crecido se centrifugaban 1.5-5 ml a máxima velocidad para obtener una pastilla bacteriana, la cual se resuspendió con 100 µl de solución GTE (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM pH 8.0; se

esterilizó con autoclave y se almacenó a 4 °C), las células se lisan al agregar 200 µl de solución alcalina-SDS (NaOH 0.2M y SDS 1% m/v) y mezclan por inversión cinco veces. Para neutralizar la mezcla se agregaron 150 µl de la solución de alta salinidad (acetato de potasio 3 M y ácido acético glacial 2 M) y se mezcló con el vórtex para centrifugar nuevamente a máxima velocidad por cinco minutos para obtener dos fases. La fase superior se pasó a un tubo nuevo, se le agregaron dos volúmenes de la fase superior de etanol frío para precipitar el DNA. Después de mezclar bien, se dejó reposar por dos minutos para posteriormente centrifugar a máxima velocidad por diez minutos. Finalmente, se tiró el sobrenadante y se le hizo un lavado con 1 ml de etanol frío al 70%. Se dejó secar la pastilla de DNA plasmídico a temperatura ambiente y se resuspendió con 30-50 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 0.1 M pH 8, esterilizada por autoclave y RNAasa A 1%).

En el caso de los plásmidos que se transformaron o digirieron con enzimas de restricción, éstos se purificaron con el kit QIAprep® Miniprep de QIAGEN.

5.4 Preparación de células competentes

Para poder transformar los plásmidos con las mutantes de *arcB_{Hi}*, se prepararon de células quimiocompetentes (Hanahan, 1983) las cuales se transformaron con éstas. Se utilizó la cepa TOP10 de *E. coli*, la cual se cultivó en 50 ml de medio LB y se dejó crecer hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.3-0.5 para luego incubar el cultivo en hielo por 15 minutos. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 4000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para obtener una pastilla bacteriana, ésta se resuspendió con 18 ml de la solución RF1 (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM y acetato de potasio 30 mM; ajustada a pH 5.8 con ácido acético y esterilizada por filtración) fría y se incubó nuevamente en hielo por 30 minutos. Las células se recuperaron por centrifugación de la misma manera que en el paso anterior y se resuspendieron en 4 ml de la solución RF2 (RbCl 10 mM, MOPS 10 mM, CaCl₂×6H₂O y glicerol 15% v/v; ajustada a pH 6.5 con NaOH y esterilizada por filtración) fría para hacer alícuotas de 200 µl en tubos eppendorf, las cuales se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron hasta por meses a -70 °C.

La cepa de *E. coli* que se utilizó para realizar los experimentos (ECL5004) se hizo electrocompetente para ser transformada. Esto consistió en centrifugar 1.5 ml de un

cultivo saturado por dos minutos a 8000 rpm para formar una pastilla bacteriana, la cual se lavó 3 veces con agua destilada estéril y fría, para finalmente resuspenderla en 100 μ l de la misma e incubarla en hielo hasta su uso.

5.5 Transformación de células

Para transformar las células quimiocompetentes se descongeló una alícuota de éstas en hielo y una vez descongelada se mezcló con 1-20 μ g de DNA, se incubó en hielo por 30 minutos y se le dio un choque térmico, el cual consistió en pasar las células a 42 °C por 90 segundos y posteriormente regresarlas a hielo por un minuto. Inmediatamente después se le agregaron 600 μ l de medio LB y se incubaron a 37 °C por una hora.

Las células electrocompetentes se mezclaron también con 1-20 μ g de DNA, la mezcla se transfirió a una celda de electroporación fría y se le dio un pulso eléctrico de 1.8 kV en un electroporador marca Bio-Rad. Inmediatamente después, a la celda se le agregó 1 ml de medio LB y se mezcló con las células, la mezcla se pasó a un tubo eppendorf y se incubó por una hora a 37 °C.

Después del tiempo de recuperación, tanto las células quimiocompetentes como las electrocompetentes transformadas, se sembraron en cajas Petri con medio LB-agar (1.5% m/v) con su respectivo antibiótico y se incubaron de 14 a 16 horas a 37 °C.

5.6 Ensayos de β -galactosidasa

La regulación y activación de las mutantes de ArcB_{Hi}, así como el efecto de pH y de DTT se probó *in vivo* mediante ensayos de actividad β -galactosidasa utilizando como reportero la fusión transcripcional de *lacZ* al promotor activable por ArcA-P del operon *cydAB* de *E. coli*, Φ (*cydA'*-*lacZ*).

Para probar lo anterior se realizaron cinéticas, las cuales se iniciaron en cultivos cuyo inóculo, en medio LB preparado, alcanzara una absorbancia DO₆₀₀ = 0.01 y posteriormente se incubaron en condiciones aeróbicas. La toma de muestras se empezó cuando cada cultivo llegó a una DO₆₀₀ = 0.2 y consistió en agregar 100 μ l de éste a 900 μ l de buffer Z (Na₂HPO₄ 57.7 mM, NaH₂PO₄ 42.3 mM, KCl 0.246 g/l, MgSO₄×7H₂O 0.246 g/l, β -mercaptoetanol 2.7 μ l/ml, SDS 0.1% m/v 11 μ l/l, cloroformo 25 μ l/ml) en tubos de ensayo para mezclarlos con el vortex por 10 segundos (Miller,

1972). Después de la primera muestra (tiempo 0), el cultivo inicial se cambió de condiciones a anaerobiosis, de pH, o bien, se le agregó DTT. La toma de muestras continuó en cada condición hasta los 100 o 180 minutos, a cada muestra de cultivo se le midió la DO_{600} .

Cada una de las muestras mezcladas con buffer Z se incubó con 200 μ l de ONPG (orto-nitrofenil- β -galactopiranosido) 4 mg/ml, la reacción se dejó por diez minutos y se detuvo agregando 500 μ l de $NaCO_3$ 1M. Una vez ocurrida la reacción, fueron medidas en un espectrofotómetro a dos longitudes de onda, DO_{420} y DO_{550} . Con los valores registrados, se obtuvieron las unidades de actividad β -galactosidasa o unidades Miller utilizando la siguiente formula:

$$Unidades\ Miller = 1000 \times \frac{DO_{420} - 1.75 \times DO_{550}}{t \times v \times DO_{600}}$$

En donde:

t = tiempo de la reacción en minutos

v = volumen de cultivo de muestra en mililitros

6. RESULTADOS

6.1 El remplazo de residuos de Cys 37, 268 y 472 en $ArcB_{Hi}$ no afecta su activación

El efecto de algunos residuos de cisteína de $ArcB_{Hi}$ se probó al construir una serie de plásmidos de bajo número de copias expresando proteínas $ArcB_{Hi}$ en las cuales uno o dos residuos de cisteína se sustituyeron por alaninas ($pE22ArcB_{Hi}^{C37A}$, $pE22ArcB_{Hi}^{C268A}$, $pE22ArcB_{Hi}^{C472A}$, $pE22ArcB_{Hi}^{C37A-C268A}$ y $pE22ArcB_{Hi}^{C37A-C472A}$). Alanina fue elegida porque provee una sustitución moderada al únicamente carecer del grupo tiol de la cisteína.

Las modificaciones de $ArcB_{Hi}$ se analizaron *in vivo* monitoreando los niveles de expresión de la fusión transcripcional $\Phi(cydA'-lacZ)$, la cual es controlada positivamente por $ArcA-P$. La cepa ECL 5004 $\Delta arcB$, que tiene en el cromosoma la fusión transcripcional $\Phi(cydA'-lacZ)$, se transformó con los plásmidos que contienen las mutantes de cisteína por alanina. Estas transformantes se cultivaron aeróbicamente, al

llegar a una $DO_{600} \approx 0.2$ parte del cultivo se cambió a condiciones anaeróbicas y se determinó su actividad β -galactosidasa (figura 6). Como se esperaba, la cepa transformada con el plásmido vacío no expresó al reportero cuando se cambió a condiciones anaeróbicas, caso contrario sucedió con las cepas complementadas con ArcB_{Eco} y ArcB_{Hi} que sí expresaron al reportero cuando se cambiaron de condiciones, lo que sugiere que ambas presentaron actividad cinasa, con la diferencia que la activación con ArcB_{Eco} fue detectada desde los 20 minutos y con ArcB_{Hi} hasta los 90 minutos. Contrario a lo esperado, las mutantes en Cys37, Cys472 y Cys268 de ArcB_{Hi}, expresaron al reportero de forma similar al ArcB_{Hi} silvestre. Pensando que tal vez un residuo de cisteína podría suplir la función de otro, se crearon dos dobles mutantes Cys37Ala-Cys268Ala y Cys37Ala-Cys472A las cuales también presentaron activación del reportero al cambiar de condiciones aeróbicas a anaeróbicas.

6.2 Los residuos de cisteína no están involucrados en la regulación de ArcB_{Hi}

Para ArcB_{Eco} los residuos de cisteína son los que se reducen y se oxidan para activarla e inactivarla y se ha demostrado que bajo condiciones oxidantes, en presencia del agente reductor permeable a la membrana, DTT, estos residuos son reducidos activando a la proteína (Malpica *et al.*, 2004). Para probar si lo mismo ocurre en ArcB_{Hi} con sus residuos de cisteína, se cultivó la cepa ECL5004 $\Delta arcB$ complementada con ArcB_{Hi} o ArcB_{Eco} en condiciones aeróbicas en presencia o ausencia de DTT y se determinó la actividad β -galactosidasa. En condiciones aeróbicas, como se esperaba, no hubo activación del reportero, contrario a lo que pasó al cambiar parte de los cultivos a condiciones anaeróbicas en donde sí hubo activación del reportero para ambas proteínas. Sin embargo, al agregar DTT, sólo se activó el reportero de la cepa complementada con ArcB_{Eco}, mientras que la complementada con ArcB_{Hi} no se activó y se mantuvo en los mismos niveles que su control (figura 7). Lo que significa que independientemente si hay o no un cambio en el estado redox de ArcB_{Hi}, esto no afecta su activación.

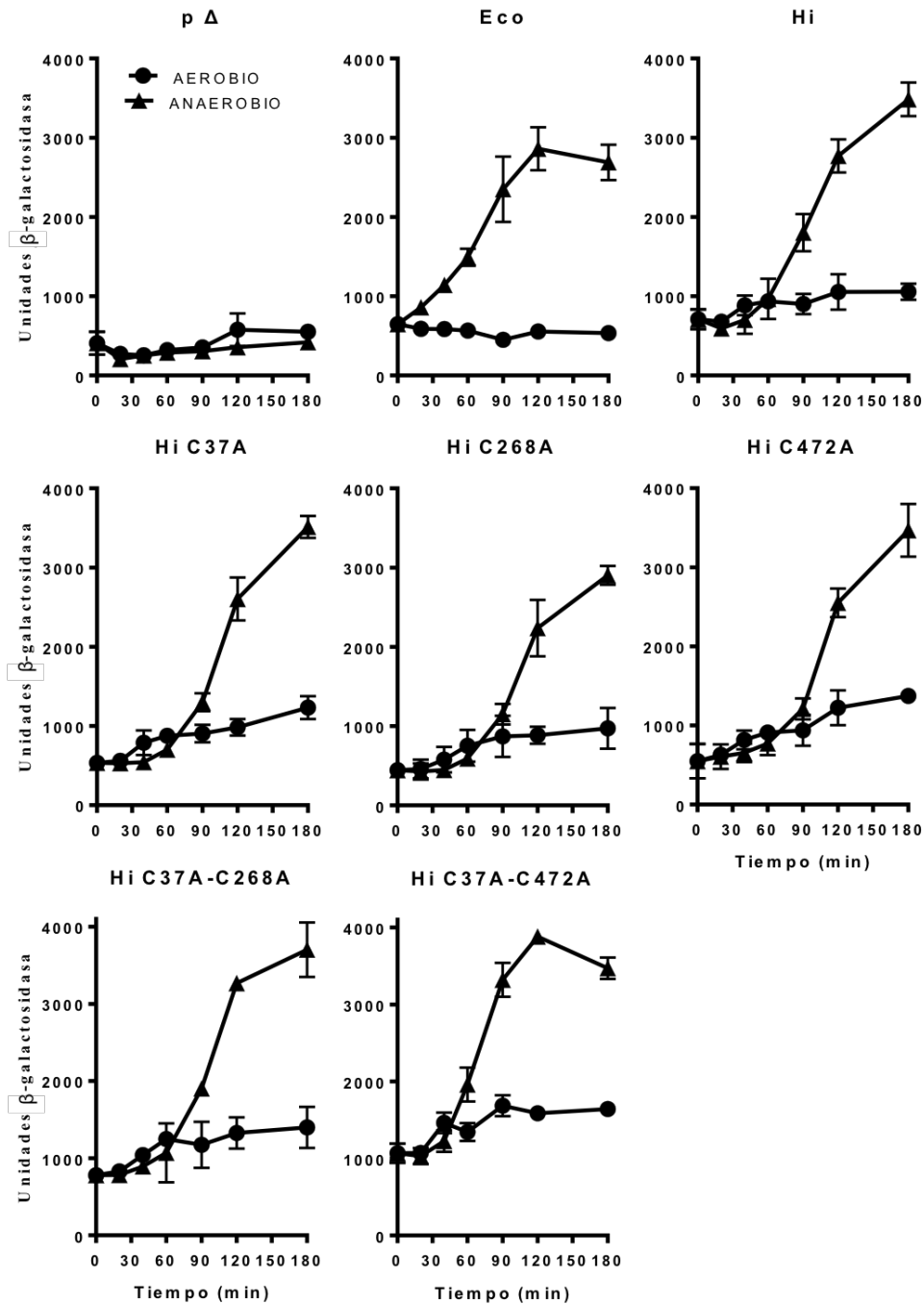


Figura 6. Efecto de los residuos de cisteína en la regulación de $ArcB_{Hi}$. Cultivos de la cepa ECL5004 con el reportero activable $\Phi(cydA'-lacZ)$ transformada con pEXT22 (p Δ), pMX732 (Eco), pE22ArcB $_{Hi}$ (Hi), pE22ArcB $_{Hi}^{C37A}$ (Hi C37A), pE22ArcB $_{Hi}^{C268A}$ (Hi C268A), pE22ArcB $_{Hi}^{C472A}$ (Hi C472A), pE22ArcB $_{Hi}^{C37A-C268A}$ (Hi C37A-C268A) o pE22ArcB $_{Hi}^{C37A-C472A}$ (Hi C37A-C472A) se cultivaron aeróbicamente. A una DO_{600} de 0.2, se tomó una alícuota para medir su actividad β -galactosidasa (tiempo 0) y el resto del cultivo se dividió en dos partes, una se mantuvo en condiciones aeróbicas mientras que la otra se pasó a condiciones anaeróbicas, la actividad β -

galactosidasa se tomó con respecto al tiempo. Todas las mutantes presentaron un efecto similar en la expresión del reportero a la cepa silvestre al cambiarlas de condiciones. Los datos representan los promedios de tres experimentos independientes con su desviación estándar.

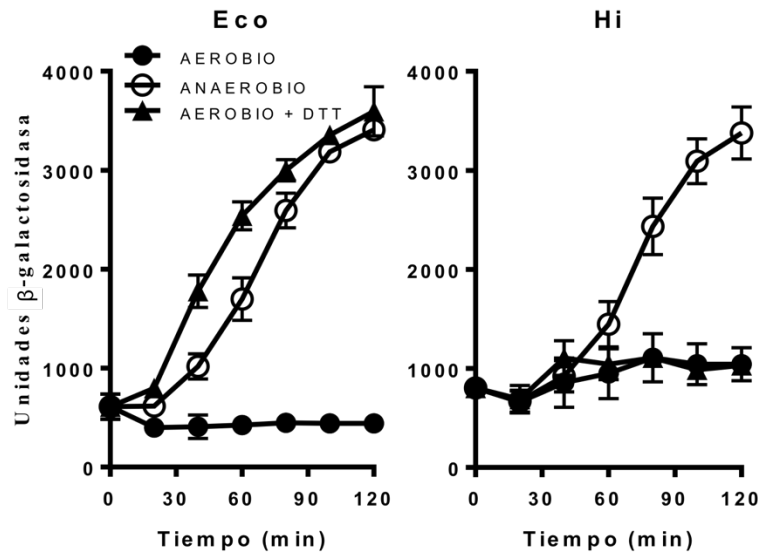


Figura 7. Efecto de DTT en la expresión aeróbica del reportero $\Phi(cydA'-lacZ)$. Cultivos de la cepa ECL 5004 transformada con el plásmido pMX732 (Eco) o pE22ArcB_{Hi} (Hi) se cultivaron aeróbicamente hasta una $DO_{600}=0.2$ para tomar la primera muestra (tiempo 0), el cultivo inicial se dividió en tres porciones, una se mantuvo como control, otra se pasó a condiciones anaeróbicas y la última se mantuvo en condiciones aeróbicas con 25 mM de DTT, la actividad β -galactosidasa se midió a los 20, 40, 60, 80 y 100 minutos. Los datos representan los promedios de tres experimentos independientes con su desviación estándar

6.3 La sustitución de aminoácidos en la región periplásmica de ArcB_{Hi} afecta su activación.

Pensando que ArcB_{Hi} podría funcionar como un sensor de la fuerza protón motriz (FPM), lo que involucra un cambio de pH, se construyó una mutante en la que se sustituyó el residuo de His48 por alanina (H48A). La histidina se eligió como probable sensor debido a que es el único residuo en la región periplásmica cuyo valor de pK se encuentra dentro del rango fisiológico. También se ha reportado que los residuos de aspartato que se encuentran en el periplasma pueden formar conglomerados para detectar pH (Haneburger *et al.*, 2011), por lo que al residuo Asp54 que se localiza en el

periplasma de ArcB_{Hi} también fue mutagenizado. Al analizar la secuencia de la región periplásmica de ArcB_{Hi} se observó que el residuo de triptófano 52 (W52) se encuentra conservado entre las ArcB de tipo II, por lo que éste también fue sustituido por alanina. Se obtuvieron las mutantes ArcB_{Hi}^{D54A} y ArcB_{Hi}^{W52A-D54A}.

De la misma manera que en los experimentos anteriores, se hizo un cambio de condiciones aeróbicas a anaeróbicas con el fin de observar la activación del gen reportero en las mutantes al cambio de condiciones redox mediante ensayos de actividad β-galactosidasa. Sin embargo, la sustitución H48A no tuvo efecto con respecto al control (figura 8). Para corroborar este resultado, se cultivó aeróbicamente la cepa complementada con ArcB_{Hi} silvestre a pH 5, 6, 7, 8 y 9 en medio mínimo de sales M9 y en medio LB, la expresión del reportero reveló que en ninguna de estas condiciones se activa el sistema Arc (figura 9). Por el otro lado, la mutante ArcB_{Hi}^{W52A-D54A} no activó la expresión del reportero, mientras que ArcB_{Hi}^{D54A} lo expresó de forma muy baja después de una hora de haber cambiado las condiciones de oxidantes a reductoras en medio LB (Figura 8). Estos resultados indican que de esta forma, ArcB_{Hi} no estaría activándose a los cambios en el pH del medio.

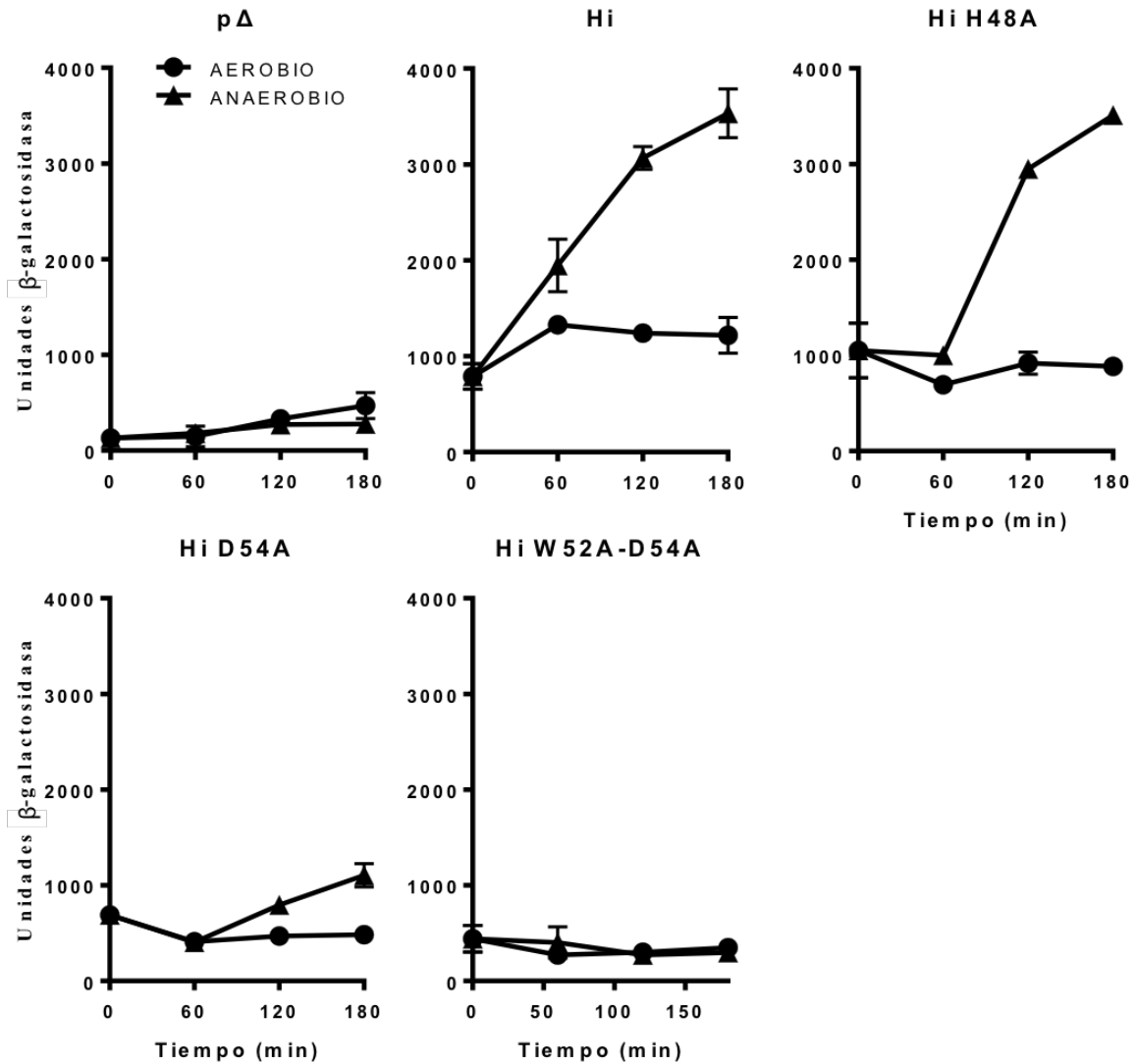


Figura 8. Efecto de mutantes en el periplasma de $ArcB_{Hi}$. Cultivos de la cepa ECL 5004 transformada con los plásmidos pBR322 ($p\Delta$), $pArcB_{Hi}$ (Hi), $pBR_{ArcB_{Hi}^{H48A}}$ (Hi H48A), $pBR_{ArcB_{Hi}^{D54A}}$ (Hi D54A) o $pBR_{ArcB_{Hi}^{W52A-D54A}}$ (Hi W52A-D54A) se cultivaron aeróbicamente. A una DO_{600} de 0.2, parte del cultivo aeróbico se cambió a condiciones anaeróbicas y la actividad β -galactosidasa se determinó con respecto al tiempo. Los datos representan los promedios de tres experimentos independientes con su desviación estándar.

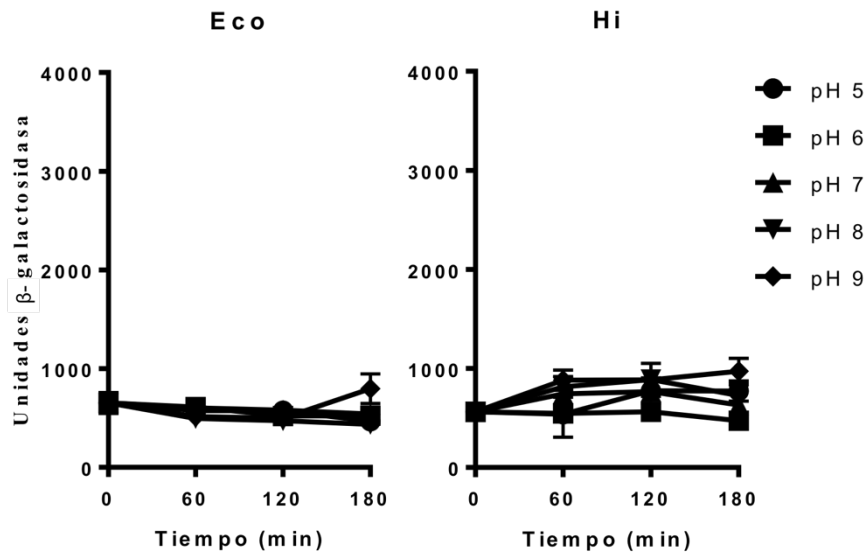


Figura 9. Efecto del pH en la activación de ArcB_{Hi}. Cultivos de la cepa ECL 5004 transformada con el plásmido pMX732 (Eco) o pE22Hi (Hi) se cultivaron aeróbicamente en medio LB. A una DO₆₀₀ de 0.2, parte del cultivo aeróbico a pH 7 se cambió a distintos pH, 5, 6, 7, 8 y 9 y la actividad β-galactosidasa se tomó durante 180 minutos sin que se observara alguna activación del sistema. Los datos representan los promedios de tres experimentos independientes con su desviación estándar.

6.4 Ensayo de inactivación de ArcA-P por ArcB_{Hi}.

Con el objetivo de determinar si las mutantes ArcB_{Hi}^{D54A} y ArcB_{Hi}^{W52A-D54A} habían perdido toda actividad catalítica o sólo su aparente actividad cinasa, se realizaron ensayos *in vivo* de inactivación de ArcA-P como ya está reportado (Peña-Sandoval *et al.*, 2005; Nuñez-Oreza *et al.*, 2012). Este ensayo consistió en crecer aeróbicamente las cepas complementadas con estas mutantes en medio mínimo de sales M9, adicionando piruvato como única fuente de carbono debido a que está reportado que bajo estas condiciones la concentración intracelular de acetil fosfato es 10 veces mayor a que si se cultivaran en glicerol (McCleary, 1994), y se ha demostrado que en ausencia de CS, muchos RR, incluyendo a ArcA_{Eco} (Liu, X. *et al.* 2009), son autofosforilados a expensas de acetil fosfato (Lee *et al.*, 1990; Wanner, 1992; Dailey, 1993; Freng, 1992). De acuerdo a lo ya reportado (Peña-Sandoval *et al.*, 2005), cuando una cepa $\Delta arcB$ con el reportero $\Phi(cydA'-lacZ)$ se cultiva con piruvato como única fuente de carbono, se expresa el reportero indicando la fosforilación de ArcA, mientras que en una cepa con

ArcB y ArcA, la expresión del reportero es muy baja. Cuando se realizó esto con ArcB_{Hi} y sus mutantes periplásmicas, se observó que la cepa $\Delta arcB$ expresó al reportero, mientras que la cepa complementada con ArcB_{Eco}, la expresión del reportero fue más de dos veces menor (figura 10). Inesperadamente, la expresión del reportero en la cepa con ArcB_{Hi} silvestre fue 6 veces mayor que la de ArcB_{Eco} y casi el doble de la cepa $\Delta arcB$, haciendo parecer que la capacidad de ArcB_{Hi} por inactivar a ArcA-P es nula, y que por el contrario, promueve la expresión del reportero en estas condiciones de cultivo (figura 10). Algo similar pasó con las mutantes ArcB_{Hi}^{D54A} y ArcB_{Hi}^{W52A-D54A}, en donde la expresión del reportero fue ligeramente menor a la de la cepa con ArcB_{Hi} (figura 10).

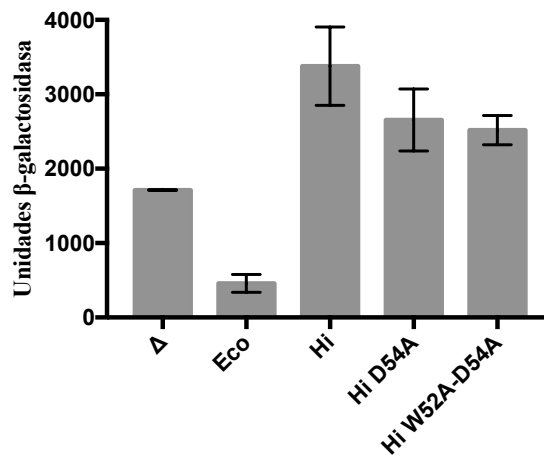


Figura 10. Ensayo de inactivación de ArcA-P por ArcB_{Hi}. Cultivos de la cepa ECL 5004 transformada con el vector pBR322 vacío (pΔ), ArcB_{Eco} (Eco), ArcB_{Hi} (Hi), ArcB_{Hi}^{D54A} (Hi D54A) o ArcB_{Hi}^{W52A-D54A} (HiW52A-D54A) se cultivaron aeróbicamente en medio mínimo de sales M9 con piruvato como única fuente de carbono y se determinó su actividad β-galactosidasa. Los datos representan los promedios de tres experimentos independientes con su desviación estándar.

Para determinar si ArcB_{Hi} apagaba la expresión del gen reportero en condiciones aeróbicas, se cultivó la cepa con ArcB_{Hi} y ArcB_{Eco} en condiciones anaeróbicas, en donde el reportero se expresa, posteriormente se cambió a condiciones aeróbicas para observar si la expresión del reportero se veía afectada. La cepa con el ArcB_{Eco} disminuyó la expresión de éste inmediatamente después del cambio de condiciones, a diferencia de la que portaba el ArcB_{Hi}, que tardó 30 minutos en empezar a disminuir la expresión del reportero. Además, la disminución de éste no fue tan pronunciada como

la observada en ArcB_{Eco} (figura 11). Este resultado sugiere que ArcB_{Hi} es capaz de apagar la expresión del reportero cuando se cambia a condiciones oxidantes, pero no de forma tan eficiente como la que presenta ArcB_{Eco}, ya que se ha observado que al menos *in vitro*, el tiempo de vida de ArcA-P es de más de una hora (Peña-Sandoval *et al.*, 2005).

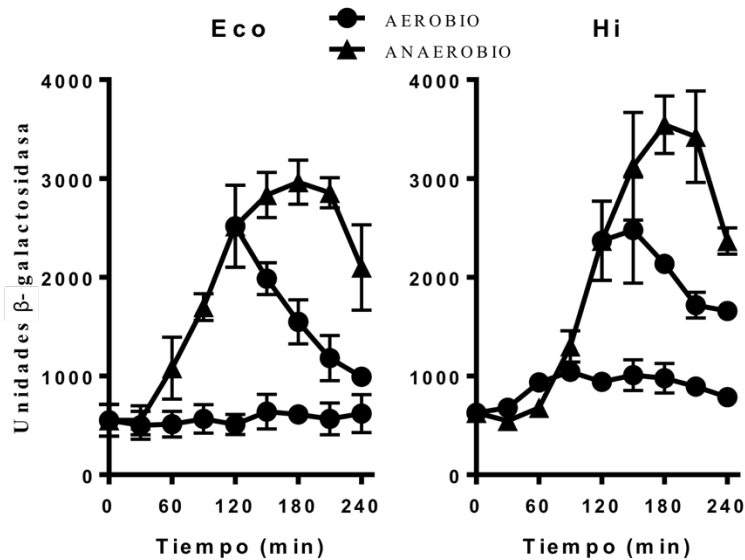


Figura 11. Inactivación aeróbica de *cydA'*-*lacZ* por ArcB_{Hi}. Cultivos de la cepa ECL 5004 transformada con el plásmido pMX732 (Eco) o pE22Hi (Hi) se cultivaron aeróbicamente. A una DO₆₀₀ de 0.2 (tiempo 0) cada cultivo se dividió en dos partes, una porción se mantuvo en condiciones aeróbicas y la otra se cambió a condiciones anaeróbicas, se incubaron durante dos horas midiendo la actividad β-galactosidasa. A las dos horas de incubación, parte del cultivo anaeróbico se regresó a condiciones aeróbicas y se incubó dos horas más continuando la medición de la actividad β-galactosidasa. Los datos representan los promedios de tres experimentos independientes con su desviación estándar.

6.5 La porción citosólica de ArcB_{Hi} no responde al cambio de condiciones redox

Después de haber observado que mutaciones en la región periplásmica de ArcB_{Hi} provocan la pérdida de su capacidad por apagar la expresión del reportero *cydA'*-*lacZ* en condiciones oxidantes, reflejado en la casi nula expresión del reportero, se quiso evaluar qué tan necesario es que la proteína esté anclada a la membrana para que tenga una regulación adecuada *in vivo*. Para ello se construyó una mutante en un

vector de bajo número de copias a la que se le eliminaron los primeros 77 aminoácidos ($\text{Prom}_{\text{Eco}} + \text{arcB}_{\text{Hi}}^{78-598}$), incluyendo los dos fragmentos transmembranales y la región periplásmica. Tanto la mutante citosólica como el gen completo, se clonaron bajo el promotor de ArcB_{Eco} . La expresión del reportero $\text{cydA}'\text{-lacZ}$ fue casi la misma tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas en la mutante citosólica de ArcB_{Hi} , lo que sugiere una pérdida para detectar el cambio de condiciones redox.

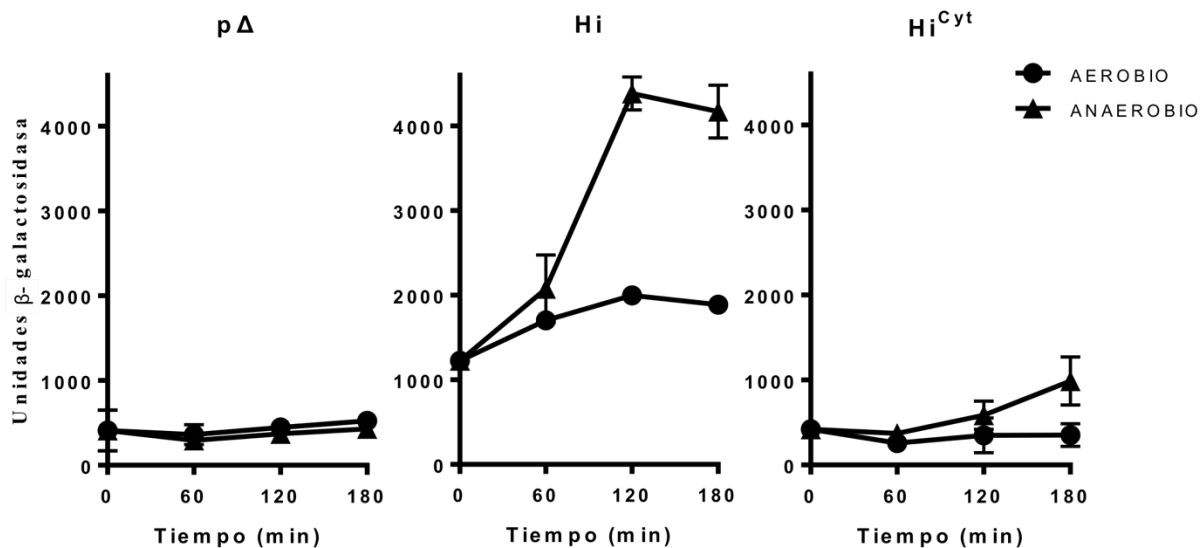


Figura 12. Regulación de la activación de ArcB_{Hi} citosólico. Cultivos de la cepa ECL 5004 transformada con el $p\text{EXT}22$ ($p\Delta$), $p\text{E}22\text{P}_{\text{Eco}}\text{ArcB}_{\text{Hi}}$ (Hi) o $p\text{E}22\text{P}_{\text{Eco}}\text{ArcB}_{\text{Hi}}^{78-598}$ se cultivaron aeróbicamente en medio LB. A una DO_{600} de 0.2, parte del cultivo aeróbico se cambió a condiciones anaeróbicas y la actividad β -galactosidasa se hasta los 180 minutos. Los datos representan los promedios de tres experimentos independientes con su desviación estándar.

7. DISCUSIÓN

E. coli tiene la capacidad de adaptar su metabolismo a las distintas condiciones de crecimiento, una de éstas es la presencia/ausencia de oxígeno, condición a la que se adapta mediante el SDC ArcB/A a través una reacción de oxidoreducción, la cual tiene lugar en los residuos de Cys de ArcB , que regulan su actividad cinasa (Peña-Sandoval *et al.*, 2010).

Se sabe que *E. coli* tiene tres tipos de quinonas, ubiquinona ($E^\circ = +100$ mV), demetilmenaquinona ($E^\circ = +36$ mV) y menaquinona ($E^\circ = -74$ mV), las dos primeras

están presentes en condiciones aeróbicas, siendo más abundante la ubiquinona, la cual es reemplazada por menaquinona al cambiar las condiciones de cultivo a anaerobias (Wallace, 1977; Zhu *et al.*, 20011; Shetopalov *et al.*, 1997). Por el contrario, *H. influenzae* sólo presenta demetilmenaquinona y menaquinona, ya que carece por completo de la vía de síntesis de ubiquinonas (Tatusov *et al.*, 1996) al igual que otras especies que presentan un ArcB tipo II. A pesar de esto, se ha observado que ArcB_{Hi} responde a los cambios redox del ambiente de la misma manera en que lo hace ArcB_{Eco} (Georgellis *et al.*, 2001b). Por esta razón, en *H. influenzae* las demetilmenaquinonas podrían reemplazar la función de las ubiquinonas en la regulación de ArcB_{Hi} si el potencial redox de ésta fuera similar al de ArcB_{Eco}, y debido a la presencia de un residuo de cisteína altamente conservado en un fragmento transmembranal, se propuso que su mecanismo molecular de regulación podría ser similar al de ArcB_{Eco}, involucrando la oxidación/reducción de la Cys37 (u otros residuos de Cys) con la diferencia de que las quinonas no tendrían que desplazarse hasta el citoplasma para hacerlo. Sin embargo, la sustitución por alanina de los residuos Cys37, Cys268 y Cys472, este último también conservado entre los ArcB tipo II, no mostró un cambio significativo en los niveles de ArcA-P, obtenidos por la expresión del reportero activable por ArcA-P, $\Phi(\text{cydA}'\text{-lacZ})$, en comparación con ArcB_{Hi} silvestre. A diferencia de ArcB_{Eco} que sólo tiene dos residuos de cisteína, ArcB_{Hi} tiene cinco, por lo que más de un residuo podría estar involucrado en su regulación. Para probar esta posibilidad, se construyeron dos dobles mutantes, ArcB_{Hi}^{C37A-C268A} y ArcB_{Hi}^{C37A-C472A}, en la primera se mutaron el residuo Cys transmembranal y el segundo más cercano a la membrana de acuerdo a la estructura primaria de la proteína, en la segunda mutante se sustituyeron los dos residuos de Cys conservados entre los ArcB tipo II. Ninguna de las dos dobles mutantes tuvo un efecto en la expresión del reportero al cambiar las condiciones aeróbicas a anaeróbicas, lo que sugiere que los residuos de Cys mutados no están involucrados en la regulación de ArcB_{Hi}.

Si los residuos de Cys en ArcB_{Hi}, incluidos los que no fueron mutados, estuvieran involucrados en su regulación de la misma forma que en ArcB_{Eco}, debería observarse algún efecto en la expresión del reportero $\Phi(\text{cydA}'\text{-lacZ})$ cuando el agente reductor DTT los reduce en condiciones aeróbicas como se demostró con ArcB_{Eco} (Malpica *et al.*,

2004). Por ello, se probó en ArcB_{Hi} el agente reductor permeable a la membrana DTT en condiciones aeróbicas, sin que éste provocara algún efecto en la expresión del reportero, lo que, en congruencia con los resultados previos demuestra que los residuos de cisteína no están involucrados en la regulación de ArcB_{Hi} e incluso que en su mecanismo de regulación no está involucrada una reacción de óxido-reducción. Estos resultados coinciden con los obtenidos *in vitro* con la porción citosólica de ArcB_{MS}, también de tipo II, que aún en presencia de ubiquinona es capaz de autofosforilarse (Jung *et al.*, 2008), y demuestran que el mecanismo molecular de regulación de los ArcB tipo II difiere del de los de tipo I.

Ha sido ampliamente documentado que el pH funciona como señal activadora de algunas CS. En *Helicobacter pylori* la CS ArsS, la cual está involucrada en la adaptación a condiciones ácidas, el residuo His94 periplásmico está involucrado en la percepción de pH (Müller *et al.*, 2009). También, en la CS PmrB de *Salmonella enterica* se ha observado que además del residuo periplásmico His35, cuatro residuos de ácido glutámico (Glu) están implicados en la respuesta a pH ácidos del medio (Perez, 2007). Cuando aún se desconocía la señal que activaba a ArcB_{Eco}, se propuso que podría ser la FPM, la cual tiene un componente químico (ΔpH) y un componente eléctrico ($\Delta\psi$), hipótesis que fue descartada (Kwon *et al.*, 2000b). Sin embargo, al descartar un mecanismo redox en la regulación de ArcB_{Hi} y conociendo que en condiciones anaeróbicas se producen distintos ácidos, producto de la fermentación, se probó esta misma hipótesis para ArcB_{Hi}. Para que ArcB_{Hi} sea capaz de detectar la FPM, al menos un aminoácido en cada lado de la membrana debe de tener un pK en el rango fisiológico que le permita percibir cualquier cambio intra y extracelular, el residuo His48 es el único residuo en el periplasma que cumple con esto, por lo que se sustituyó por un residuo de Ala. Además de los residuos de histidina, se ha reportado que en la proteína CadC de *E. coli*, la cual está involucrada también en la adaptación a pHs ácidos, un conglomerado de aminoácidos cargados negativamente (tres Asp y dos Glu) localizados en la región periplásmica de la membrana son cruciales para la detección de pH (Haneburger *et al.*, 2011). Se propuso que estos residuos forman un parche con carga negativa en la región periplásmica de la proteína, los cuales son protonados a pHs bajos desencadenando un proceso de transducción (Haneburger *et al.*, 2011).

Entre los ArcB tipo II, el residuo periplásmico Asp54 está presente sólo en algunas especies, incluyendo a *H. influenzae*, mientras que el residuo Trp52 está conservado en este grupo. Debido a esto se crearon dos mutantes, en una se sustituyó el residuo Asp54 por Ala y en la segunda se sustituyeron los residuos Trp52 y Asp54 por Ala. Al probar la activación de estas mutantes con el reportero *cydA'-lacZ*, la mutante ArcB_{Hi}^{H48A} no mostró diferencia con respecto al control, lo que descarta que la FPM sea su señal, además del hecho de que teóricamente los niveles de la FPM parecen ser controlados homeostáticamente por la ATPasa F₀F₁ (Kwon, *et al.*, 2000b). Por otro lado, las otras dos mutantes descritas no activaron la expresión del reportero cuando se cambiaron a condiciones anaeróbicas, lo que sugiere dos cosas: 1) las mutaciones impiden a ArcB_{Hi} detectar cambios de pH, si es que esto fuera la señal activadora y 2) las mutaciones provocaron un cambio en la estructura tridimensional de la proteína que ocasionó la pérdida de su actividad catalítica. Para descartar la primera opción se cultivó la cepa complementada con ArcB_{Hi} silvestre a distintos pH (5, 6, 7, 8, y 9) aeróbicamente, si el pH es la señal que activa a ArcB_{Hi}, el reportero se expresaría en estas condiciones e indicaría que las mutantes no se activaron porque son incapaces de detectar cambios de pH. Sin embargo, después de tres horas de cultivo bajo estas condiciones, el reportero no se expresó, lo que excluye al pH como señal activadora de ArcB_{Hi}, pero no descarta que otras moléculas lo sean, si es que estos residuos son importantes en la recepción del estímulo. Para probar la segunda opción, se hizo un ensayo de inactivación de ArcA-P, el cual consiste en fosforilar aeróbicamente a ArcA mediante la formación de acetil fosfato independientemente de ArcB (Liu *et al.*, 2009). Existe la probabilidad de que la sustitución de los residuos Trp52 y Asp54 hayan provocado sólo la pérdida de la actividad cinasa de ArcB_{Hi}. Entonces, en condiciones aeróbicas ArcB_{Hi} y sus mutantes periplásmicas deberían ser capaces de defosforilar a ArcA-P, de la misma forma en la que lo hace ArcB_{Eco}. Sorpresivamente, por los altos niveles de actividad β-galactosidasa observados, ni ArcB_{Hi}^{D54A}, ArcB_{Hi}^{W52A-D54A} ni ArcB_{Hi} fueron capaces de defosforilar a ArcA-P, lo que complica determinar si estas mutantes periplásmicas conservan alguna actividad catalítica y cuestiona si ArcB_{Hi} presenta también actividad fosfatasa. Una posible explicación a la falta de actividad fosfatasa en ArcB_{Hi}, es que al cultivar las células con piruvato como única fuente de

carbono, se produce y/o acumula algún metabolito que funciona como señal positiva para ArcB_{Hi}, lo que la mantiene activa como cinasa. Y si las mutantes periplásmicas perdieron toda actividad catalítica, esto también explicaría porque se expresó el reportero, ya que, al no tener fosfatasa, el acetil fosfato mantendría a ArcA-P.

Debido a que las mutantes ArcB_{Hi}^{D54A} y ArcB_{Hi}^{W52A-D54A} no se activaron al cambio de condiciones redox, se intentó comprobar que estas (y todas las otras mutantes construidas) proteínas realmente se expresaran mediante ensayos de Western Blot, utilizando anticuerpos policlonales de la región citosólica de ArcB_{Eco}, sin embargo, este anticuerpo no funcionó para ArcB_{Hi} por lo que no se pudo comprobar la expresión de las proteínas mutantes.

En este estudio se demuestra que ArcB_{Hi} presenta activación al cambiar las condiciones del ambiente de oxidantes a reductoras. Sin embargo, esta actividad catalítica se observa tardíamente en comparación a la que presenta ArcB_{Eco}, tal vez porque es necesario que se acumule algún metabolito que funcione como señal activadora o bien, porque su actividad catalítica simplemente es más lenta. Ahora bien, si tiene actividad cinasa, sugerida por la expresión del reportero, es poco probable que no presente actividad fosfatasa. Para comprobar ambas actividades catalíticas, se cultivó la cepa complementada con ArcB_{Hi} en condiciones aeróbicas, condiciones en las cuales la expresión del reportero esta inactiva, para posteriormente cambiar las condiciones a reductoras y observar mediante la expresión de $\Phi(\text{cydA}'\text{-lacZ})$ la activación del sistema, finalmente se regresó el cultivo anaeróbico a condiciones oxidantes para observar su la disminución de la expresión del reportero y compararla con su control. ArcB_{Hi}, con respecto a ArcB_{Eco}, parece tener una actividad fosfatasa tardía, reflejada en la lenta disminución de la expresión del reportero, y una velocidad catalítica más lenta, la posibilidad de que lo que se observa sea una defosforilación por la inestabilidad de ArcA-P parece poco probable ya que se ha observado que *in vitro* es estable hasta por más de una hora (Georgellis *et al.*, 1998; Peña-Sandoval *et al.*, 2005). Esto vuelve los resultados de las defosforilaciones *in vivo* más interesantes, al encontrarse una condición en la cual parece ser que ArcB_{Hi} se encuentra activa aeróbicamente. No obstante, se requerirá realizar más experimentos con el objetivo de corroborar los resultados de las mutantes periplásmicas y los ensayos de defosforilación.

La gran mayoría de las CS tienen sus dominios sensores en la región periplásmica, los cuales suelen ser grandes en comparación con el de ArcB. Al observar un efecto al sustituir residuos de la región periplásmica de ArcB_{Hi}, se quiso conocer la importancia de este fragmento en su funcionamiento y regulación, ya que está extensamente estudiado que las porciones citosólicas de las CS presentan una actividad constitutiva o semiconstitutiva, como la de ArcB_{Eco} (Rodríguez *et al.*, 2004). Pero contrario a lo reportado para la porción citosólica de ArcB_{Eco}, ArcB_{Hi}⁷⁸⁻⁵⁹⁸ no se activó en condiciones anaerobias. Es importante mencionar que los experimentos con ArcB_{Eco} contenían los primeros 22 residuos, también citosólicos, por lo que sería importante crear una mutante de ArcB_{Hi} con esos residuos y evaluar su efecto para determinar si realmente, y a diferencia de su homólogo en *E. coli*, es necesario que conserve la región periplásmica y esté anclada a la membrana para su activación.

Los resultados obtenidos prueban que el mecanismo molecular de regulación de la cinasa sensora ArcB_{Hi} difiere de su contraparte en *E. coli* al descartar un mecanismo redox en el que estén involucrados residuos de cisteína, demostrando que aunque las proteínas ortólogas son muy abundantes, no siempre funcionan de la misma manera e incluso se adaptan a los nichos de los organismos que las poseen. Además, los resultados dan pauta para investigar a mayor profundidad la región periplásmica y citosólica de la proteína ArcB_{Hi}.

8. CONCLUSIONES

- El mecanismo por el que se regula ArcB_{Hi} es diferente al utilizado por ArcB_{Eco} ya que no involucra la oxidación/reducción de los residuos de cisteína.
- ArcB_{Hi} presenta actividad cinasa y fosfatasa, aunque la activación de ambas actividades es tardía en comparación con la que presenta ArcB_{Eco}.
- En medio mínimo con piruvato como única fuente de carbono, ArcB_{Hi} no presenta actividad fosfatasa.
- ArcB_{Hi} necesita estar anclada a la membrana para detectar un cambio redox ambiental y activarse.

- El residuo periplásmico D54 y probablemente también el W52 son importantes para la activación de ArcB_{Hi} en condiciones anaeróbicas.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar la cantidad de proteína sintetizada por las mutantes construidas de ArcB_{Hi}.
- Evaluar la actividad cinasa *in vitro* de las mutantes en Cys de ArcB_{Hi}.
- Probar la regulación de otras mutantes de ArcB_{Hi} con la porción periplásmica (incluyendo los primeros 22 residuos) y fragmentos transmembranales.
- Evaluar la actividad fosfatasa *in vitro* de ArcB_{Hi} y sus mutantes periplásmicas.
- Evaluar la regulación redox de la mutante ArcB_{Hi}^{W52A}.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Alm E, Huang K, Arkin A. 2006. The evolution of two-component systems in bacteria reveals different strategies for niche adaptation. *PLoS Comput Biol* 2:e143.
2. Alvarez AF, Rodriguez C, Georgellis D. 2013. Ubiquinone and menaquinone electron carriers represent the yin and yang in the redox regulation of the ArcB sensor kinase. *J Bacteriol* 195:3054–61.
3. Beier D, Gross R. 2006. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol* 9:143–52.
4. Bekker M, Alexeeva S, Laan W, Sawers G, Teixeira de Mattos J, Hellingwerf K. 2010. The ArcBA two-component system of *Escherichia coli* is regulated by the redox state of both the ubiquinone and the menaquinone pool. *J Bacteriol* 192:746–54.
5. Capra EJ, Laub MT. 2012. Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annu Rev Microbiol* 66:325–347.
6. Casino P, Rubio V, Marina A. 2010. The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Curr Opin Struct Biol* 20:763–71.
7. Challacombe JF, Duncan AJ, Brettin TS, Bruce D, Chertkov O, Detter JC, Han CS, Misra M, Richardson P, Tapia R, Thayer N, Xie G, Inzana TJ. 2007. Complete genome sequence of *Haemophilus somnus* (*Histophilus somni*) strain 129Pt and comparison to *Haemophilus ducreyi* 35000HP and *Haemophilus influenzae* Rd. *J Bacteriol* 189:1890–8.
8. Dailey FE, Berg HC. 1993. Change in direction of flagellar rotation in *Escherichia coli* mediated by acetate kinase. *J Bacteriol* 175:3236–9.

9. De Souza-Hart JA, Blackstock W, Di Modugno V, Holland IB, Kok M. 2003. Two-Component Systems in *Haemophilus influenzae*: a Regulatory Role for ArcA in Serum Resistance. *Infect Immun* 71:163–172.
10. Dykxhoorn DM, St. Pierre R, Linn T. 1996. A set of compatible tac promoter expression vectors. *Gene* 177:133–136.
11. Ehrt S, Schnappinger D. 2003. Isolation of plasmids from *E. coli* by alkaline lysis., p. 75–8. *In* *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.).
12. Feng J, Atkinson MR, McCleary W, Stock JB, Wanner BL, Ninfa AJ. 1992. Role of phosphorylated metabolic intermediates in the regulation of glutamine synthetase synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174:6061–70.
13. Fleischmann R, Adams M, White O, Clayton R, Kirkness E, Kerlavage A, Bult C, Tomb J, Dougherty B, Merrick J, al. e. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* (80-) 269:496–512.
14. Galperin MY. 2005. A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol* 5:35.
15. Georgellis D, Kwon O, Lin EC. 2001. Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science* 292:2314–6.
16. Georgellis D, Kwon O, Lin EC, Wong SM, Akerley BJ. 2001. Redox signal transduction by the ArcB sensor kinase of *Haemophilus influenzae* lacking the PAS domain. *J Bacteriol* 183:7206–12.
17. Georgellis D, Lynch A, Lin E. 1997. In vitro phosphorylation study of the arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:5429–5435.

18. Georgellis D. 1998. Signal Decay through a Reverse Phosphorelay in the Arc Two-component Signal Transduction System. *J Biol Chem* 273:32864–32869.
19. Georgellis D, Kwon O, Lin ECC. 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.
20. Green J, Paget MS. 2004. Bacterial redox sensors. *Nat Rev Microbiol* 2:954–66.
21. Hanahan D, Harbor CS. 1983. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Department of Biochemistry and Molecular Biology* 0:557–580.
22. Haneburger I, Eichinger A, Skerra A, Jung K. 2011. New insights into the signaling mechanism of the pH-responsive, membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 286:10681–9.
23. Harrison A, Bakaletz LO, Munson RS. 2012. *Haemophilus influenzae* and oxidative stress. *Front Cell Infect Microbiol* 2:40.
24. Harrison A, Bakaletz LO, Munson RS. 2012. *Haemophilus influenzae* and oxidative stress. *Front Cell Infect Microbiol* 2:40.
25. Hoch J a. 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* 3:165–70.
26. Hong SH, Kim JS, Lee SY, In YH, Choi SS, Rih J-K, Kim CH, Jeong H, Hur CG, Kim JJ. 2004. The genome sequence of the capnophilic rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens*. *Nat Biotechnol* 22:1275–81.
27. Ishige K, Nagasawa S, Tokishita S, Mizuno T. 1994. A novel device of bacterial signal transducers. *EMBO J* 13:5195–202.

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* 268:23972–80.
29. 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* 171:868–73.
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* 174:3972–80.
31. 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* 85:1888–92.
32. Iuchi S, Lin EC. 1992. Purification and phosphorylation of the Arc regulatory components of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174:5617–23.
33. Iuchi S, Matsuda Z, Fujiwara T, Lin EC. 1990. The *arcB* gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the *arc* modulon. *Mol Microbiol* 4:715–27.
34. Jeon Y, Lee YS, Han JS, Kim JB, Hwang DS. 2001. Multimerization of phosphorylated and non-phosphorylated ArcA is necessary for the response regulator function of the Arc two-component signal transduction system. *J Biol Chem* 276:40873–9.
35. Jung WS, Jung YR, Oh D-B, Kang HA, Lee SY, Chavez-Canales M, Georgellis D, Kwon O. 2008. Characterization of the Arc two-component signal transduction system of the capnophilic rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens*. *FEMS Microbiol Lett* 284:109–19.

36. 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 182:3858–62.
37. Kwon O, Georgellis D, Lynch a S, Boyd D, Lin EC. 2000. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region. J Bacteriol 182:2960–6.
38. Lee TY, Makino K, Shinagawa H, Nakata A. 1990. Overproduction of acetate kinase activates the phosphate regulon in the absence of the phoR and phoM functions in *Escherichia coli*. J Bacteriol 172:2245–9.
39. Liu X, De Wulf P. 2004. Probing the ArcA-P modulon of *Escherichia coli* by whole genome transcriptional analysis and sequence recognition profiling. J Biol Chem 279:12588–97.
40. 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 47:657–62.
41. 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.
42. Lynch AS, Lin EC. 1996. Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters. J Bacteriol 21
43. 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 101:13318–23.
44. Manukhov I V, Bertsova Y V, Trofimov DY, Bogachev A V, Skulachev VP. 2000. Analysis of HI0220 protein from *Haemophilus influenzae*, a novel structural and

functional analog of ArcB protein from *Escherichia coli*. *Biochem Biokhimiia* 65:1321–6.

45. Matsushika A, Mizuno T. 1998. The structure and function of the histidine-containing phosphotransfer (HPT) signaling domain of the *Escherichia coli* ArcB sensor. *J Biochem* 124:440–5.
46. Matsushika A, Mizuno T. 2000. Characterization of three putative sub-domains in the signal-input domain of the ArcB hybrid sensor in *Escherichia coli*. *J Biochem* 127:855–60.
47. Matsushika A, Mizuno T. 2000. Characterization of Three Putative Sub-Domains in the Signal-Input Domain of the ArcB Hybrid Sensor in *Escherichia coli*. *J Biochem* 127:855–860.
48. McCleary WR, Stock JB. 1994. Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J Biol Chem* 269:31567–72.
49. Miller J. 1972. Experiments in Molecular Genetics, p. 352–355. *In* Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, NY.
50. Müller S, Götz M, Beier D. 2009. Histidine residue 94 is involved in pH sensing by histidine kinase ArsS of *Helicobacter pylori*. *PLoS One* 4:e6930.
51. Nuñez Oreza LA, Alvarez AF, Arias-Olguín II, Torres Larios A, Georgellis D. 2012. The ArcB leucine zipper domain is required for proper ArcB signaling. *PLoS One* 7:e38187.
52. Olivera BCL, Ugalde E, Martínez-Antonio A. 2010. Regulatory dynamics of standard two-component systems in bacteria. *J Theor Biol* 264:560–9.
53. Park DM, Akhtar MS, Ansari AZ, Landick R, Kiley PJ. 2013. The bacterial response regulator ArcA uses a diverse binding site architecture to regulate carbon oxidation globally. *PLoS Genet* 9:e1003839.

54. Parkinson JS, Kofoed EC. 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet* 26:71–112.
55. Peña-Sandoval GR, Georgellis D. 2010. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli* autophosphorylates by an intramolecular reaction. *J Bacteriol* 192:1735–9.
56. 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* 187:3267–72.
57. Perez JC, Groisman EA. 2007. Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 63:283–93.
58. Portnoy VA, Scott DA, Lewis NE, Tarasova Y, Osterman AL, Palsson BØ. 2010. Deletion of genes encoding cytochrome oxidases and quinol monooxygenase blocks the aerobic-anaerobic shift in *Escherichia coli* K-12 MG1655. *Appl Environ Microbiol* 76:6529–40.
59. 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* 186:2085–90.
60. Salmon KA, Hung S, 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* 280:15084–96.
61. Shestopalov AI, Bogachev A V, Murtazina RA, Viryasov MB, Skulachev VP. 1997. Aeration-dependent changes in composition of the quinone pool in *Escherichia coli*. Evidence of post-transcriptional regulation of the quinone biosynthesis. *FEBS Lett* 404:272–4.
62. Simon J, van Spanning RJM, Richardson DJ. 2008. The organisation of proton motive and non-proton motive redox loops in prokaryotic respiratory systems. *Biochim Biophys Acta* 1777:1480–90.

63. Swanson R V, Alex LA, Simon MI. 1994. Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. *Trends Biochem Sci* 19:485–90.
64. Swanson R V., Alex LA, Simon MI. 1994. Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. *Trends Biochem Sci* 19:485–490.
65. Tatusov RL, Mushegian AR, Bork P, Brown NP, Hayes WS, Borodovsky M, Rudd KE, Koonin E V. 1996. Metabolism and evolution of *Haemophilus influenzae* deduced from a whole-genome comparison with *Escherichia coli*. *Curr Biol* 6:279–291.
66. Taylor BL, Zhulin IB. 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:479–506.
67. Tsuzuki M, Ishige K, Mizuno T. 1995. Phosphotransfer circuitry of the putative multi-signal transducer, ArcB, of *Escherichia coli*: in vitro studies with mutants. *Mol Microbiol* 18:953–62.
68. Ulrich LE, Koonin E V, Zhulin IB. 2005. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol* 13:52–6.
69. Uden G, Bongaerts J. 1997. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta* 1320:217–34.
70. Wallace BJ, Young IG. 1977. Role of quinones in electron transport to oxygen and nitrate in *Escherichia coli*. Studies with a ubiA- menA- double quinone mutant. *Biochim Biophys Acta* 461:84–100.
71. Wanner BL, Wilmes-Riesenberg MR. 1992. Involvement of phosphotransacetylase, acetate kinase, and acetyl phosphate synthesis in control of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174:2124–30.

72. West AH, Stock AM. 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* 26:369–76.
73. Wolanin PM, Thomason PA, Stock JB. 2002. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol* 3.
74. Wong SMS, Akerley BJ. 2012. Genome-scale approaches to identify genes essential for *Haemophilus influenzae* pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* 2:23.
75. Wong SMS, Alugupalli KR, Ram S, Akerley BJ. 2007. The ArcA regulon and oxidative stress resistance in *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* 64:1375–90.
76. Zhu J, Sánchez A, Bennett GN, San K-Y. 2011. Manipulating respiratory levels in *Escherichia coli* for aerobic formation of reduced chemical products. *Metab Eng* 13:704–12.