



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Análisis del mecanismo de regulación de la histidina-
cinasa ArcB de *Haemophilus influenzae***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

MARIANA LÓPEZ VALDEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ADRIÁN FERNANDO ÁLVAREZ**

CIUDAD UNIVERSITARIA CD. MX., 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

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. Adrián F. Álvarez.

Agradezco la asesoría del Dr. Dimitris Georgellis, Investigador Titular del laboratorio 226 norte

Agradezco 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:

“Control de la expresión génica microbiana por estímulos extracelulares”. De la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), # IN209918.

“Organización y función de microdominios membranales bacterianos”. De la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), # IN208718.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de Beca de Licenciatura (número de registro 26061)

Agradecimientos Personales

A mi tutor Adrián, por todas las enseñanzas y su paciencia en el tiempo que trabajé en este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio por sus enseñanzas y su apoyo durante el tiempo que estuve desarrollando mi proyecto.

A mis padres, Alejandra y Sergio por su apoyo moral, psicológico y económico, y por todo el cariño brindado en mis años de vida. Gracias por haberme iniciado en este camino de la ciencia y la academia.

Índice.....	4
Resumen.....	5
Introducción.....	6
<i>Sistemas de dos componentes.....</i>	<i>6</i>
<i>El sistema ArcB/ArcA.....</i>	<i>7</i>
<i>Sistemas Arc homólogos en bacterias</i>	<i>9</i>
<i>Haemophilus influenzae y el sistema Arc.....</i>	<i>10</i>
<i>Antecedentes recientes.....</i>	<i>11</i>
Justificación.....	15
Hipótesis.....	15
Objetivos.....	16
Materiales y metodología.....	16
Resultados.....	20
<i>Ensayos de complementación in vivo.....</i>	<i>20</i>
<i>Determinación de la actividad fosfatasa de ArcB_{H.i.}.....</i>	<i>25</i>
<i>Análisis del efecto del piruvato y otras fuentes de carbono en la activación de ArcB_{H.i.}.....</i>	<i>27</i>
<i>Análisis de metabolitos del piruvato como posibles estímulos de ArcB_{H.i.}.....</i>	<i>31</i>
<i>El lactato como posible estímulo de ArcB_{H.i.}.....</i>	<i>39</i>
Discusión.....	41
Conclusiones	44
Perspectivas.	44
Bibliografía.....	45

Resumen

Las bacterias viven expuestas a diferentes factores ambientales que pueden cambiar de manera inesperada, para sobrevivir diversas bacterias han desarrollado sistemas que les permiten monitorear y responder a estos cambios. El sistema de Dos componentes ArcB/A es un sistema que permite a la bacteria detectar cambios de oxido-reducción en el ambiente por medio del sensor cinasa ArcB, y responder activando y silenciando la transcripción de diferentes genes por medio del regulador de respuesta ArcA. La regulación de la actividad cinasa reportada en *Escherichia coli* y proteínas homólogas de ArcB en diferentes organismos se da a por medio del estado de oxido-reducción de dos cisteínas conservadas (cys180 y cys241), este tipo de proteínas ArcB se denomina ArcB de tipo I, sin embargo existen organismos que poseen ArcB de tipo II, como en el caso de *Haemophilus influenzae*, el cual carece de ambas cisteínas conservadas y en el cual además la regulación de la actividad cinasa no depende de ninguna de las cisteínas que la proteína posee, esto resulta llamativo ya que el sistema ArcA/B de *E. coli* y *H. influenzae* responde a los cambios de oxido-reducción en el ambiente de manera similar. En este trabajo se encontró que productos del metabolismo de la glucosa y el piruvato así como el D-Lactato podrían estar involucrados en la activación de ArcB de *H. influenzae*.

Introducción

Sistemas de dos componentes

Las bacterias habitan ambientes variados donde distintos factores ambientales pueden cambiar de manera rápida e inesperada. Para sobrevivir, es necesario que las células monitoreen constantemente las condiciones ambientales externas y así ajustar su fisiología y comportamiento de acuerdo con estas. A menudo, esta respuesta adaptativa está mediada por pares de proteínas conocidas como sistemas de dos componentes (SDC). Estos están conformados por una cinasa sensora (CS) que tiene función de sensor ambiental y esta encargada de interactuar de forma primaria con la señal, y por una proteína reguladora de respuesta (RR), cuya función es la de regulación de la transcripción (Parkinson & Kofoid, 1992; Barrett & Hoch, 1998). En los sistemas de transducción de señales de dos componentes, cuando la CS percibe una señal específica se activa como cinasa, autofosforilándose en un residuo de histidina. Posteriormente, transfiere el grupo fosfato al RR, el cual, en su estado fosforilado, efectúa la regulación transcripcional (Barrett & Hoch, 1998). Este tipo de proteínas de señalización se comunican generalmente por medio de dos dominios catalíticos distintivos denominados transmisores y receptores los cuales son los encargados de propagar señales por medio de reacciones de fosforilación y desfosforilación (Parkinson & Kofoid, 1992).

El sistema ArcB/ArcA

Uno de estos sistemas es el SDC Arc (por sus siglas en inglés: *anoxic redox control*), cuyos componentes CS y RR son las proteínas ArcB y ArcA, respectivamente (Iuchi & Lin, 1988; Iuchi *et al.*, 1989; Iuchi *et al.*, 1990). En *Escherichia coli*, primer organismo en el cual se reportó este sistema, la CS ArcB posee tres dominios catalíticos responsables de la autofosforilación y transfosforilación del RR (Iuchi *et al.* 1990; Iuchi & Lin, 1992a; Ishige *et al.* 1994). Estos dominios están regulados por dos residuos de cisteínas que están conservados en distintos ArcB homólogos de diferentes especies de bacterias, entre ellas *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Yersinia pestis*, *Erwinia carotovora*, y *Photobacterium luminescens*, y de manera general se encuentran en una región dentro de ArcB denominada región *linker* (Malpica *et al.* 2004) la cual está situada entre un dominio transmembranal, que une la proteína a la membrana, y los dominios catalíticos. Dentro de esta región hay un dominio denominado PAS, el cual se ha postulado que es requerido para detectar las condiciones oxido-reducción celulares (Zhulin & Taylor, 1997; Matsushika & Mizuno, 2000; Georgellis *et al.* 2001a). En ArcB de *E. coli*, esta región va del aminoácido 94 al 263 y es la región donde se encuentran las cisteínas, cys180 y cys241. Estas cisteínas se regulan mediante una poza de quinonas (Fig. 1) que cambia su estado de oxido-reducción en respuesta a las variaciones de las condiciones externas (Malpica *et al.* 2006). Bajo condiciones de crecimiento aerobio, las cisteínas, cys180 y cys241, experimentan una oxidación dependiente de

ubiquinonas. Las cisteínas oxidadas forman puentes disulfuro lo cual da paso a la formación de dímeros de ArcB, silenciando así la actividad cinasa. Por el contrario, en condiciones de crecimiento anaerobio, las menaquinonas causan la reducción de las cisteínas (Georgellis *et al.* 2001b; Alvarez *et al.* 2013) lo cual induce la reacción de autofosforilación de ArcB para posteriormente transfosforilar al RR ArcA, el cual, al estar en su forma activa fosforilada, se une a sitios de regulación transcripcional (Iuchi & Lin 1992a; Iuchi & Lin 1992b; Iuchi 1993; Lynch & Lin, 1996; Barret & Hoch, 1998, Malpica *et al.* 2004).

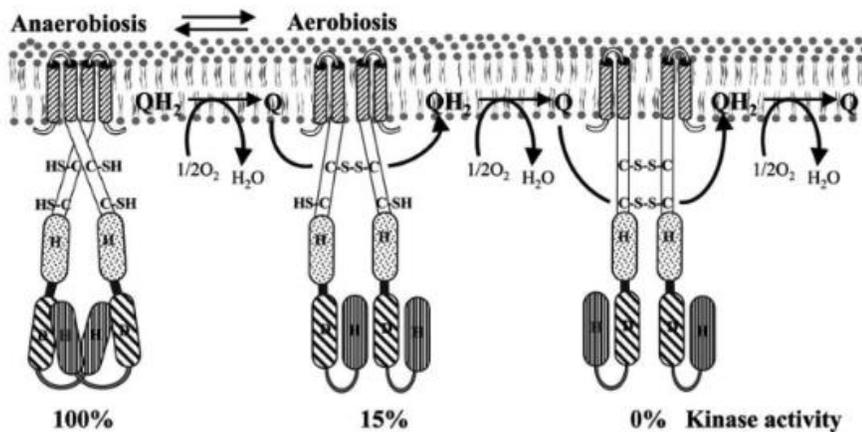


Fig.1 Modelo de la regulación oxido-reducción de la proteína sensora cinasa ArcB en *Escherichia coli*. Modelo de inactivación de ArcB a partir del cambio de condiciones anaerobias a aerobias de crecimiento, la poza de quinonas cambia a su estado oxidado, permitiendo de este modo la transferencia de electrones de la cisteína 180 de ArcB a las quinonas para la formación del puente disulfuro entre los residuos de cisteína 180 de dos monómeros y lo cual resulta en una reducción significativa de la actividad cinasa de ArcB.

Sistemas Arc homólogos en bacterias

En un análisis de secuencias de homólogos de ArcB en los genomas de *Vibrio*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Erwinia*, *Photobacterium*, *Photorhabdus*, *Mannheimia*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, y *Actinobacillus* se han identificado dos grupos de ArcB, el grupo I representado por el de *E. coli*, en el cual ArcB posee región *linker*; y el tipo II que se caracteriza porque las proteínas ArcB homólogas no poseen parte de dicha región. Dentro de este grupo se encuentra el ArcB de *Haemophilus influenzae* (ArcB_{Hi}) (Fig. 2) (Jung *et al.* 2008), en el cual la región correspondiente a los aminoácidos 93-134 y 153-271 de ArcB de *E. coli* (ArcB_{Eco}), incluyendo los residuos de cisteínas regulatorias, no están presentes. A pesar de la ausencia de las cisteínas regulatorias, ArcB_{Hi} es capaz de complementar funcionalmente una cepa $\Delta arcB$ de *E. coli* por lo que se asumía que ambas proteínas se regulan de manera similar en respuesta a los cambios de oxidoreducción causados por las variaciones de las condiciones externas (Georgellis *et al.* 2001a).

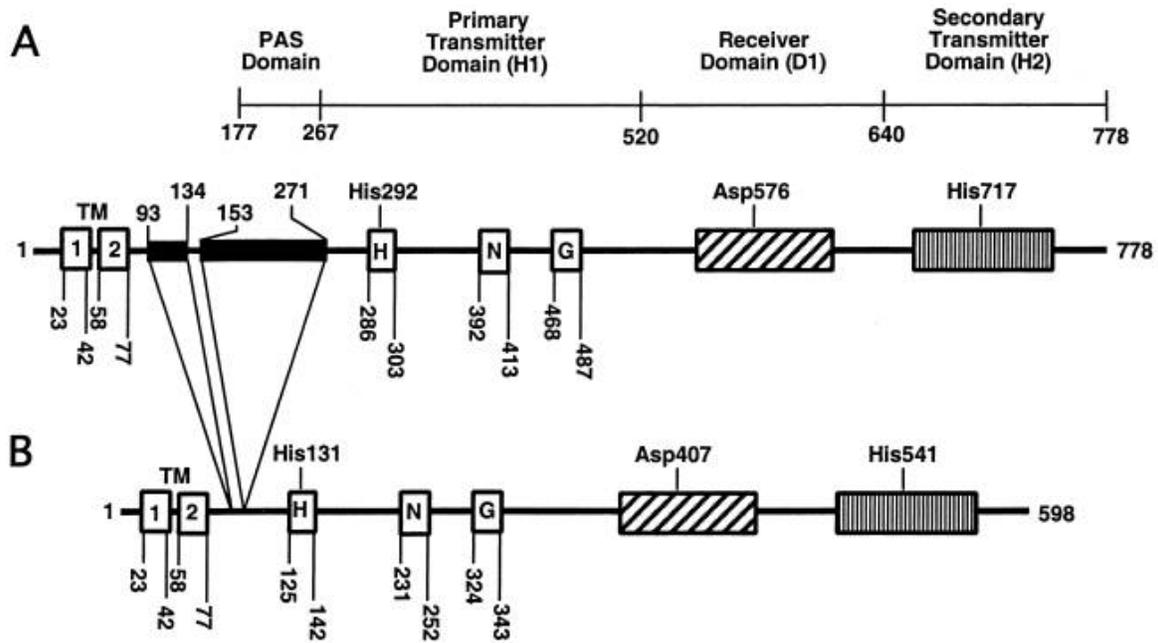


Fig. 2 Representación esquemática del sensor cinasa de ArcB. (A) Proteína de *E. coli*; (B) proteína de *H. influenzae*

***Haemphillus influenzae* y el sistema Arc**

H. influenzae es una bacteria Gram negativa, no móvil, anaerobia facultativa, que es capaz de colonizar partes del cuerpo humano con superficies mucosas, en donde forma biopelículas y provoca patologías como otitis media, infecciones de vías respiratoria superiores e inferiores, septicemia, meningitis, entre otras (Harrison *et al.*, 2012). El genoma de esta bacteria codifica para cinco RR y cuatro CS, entre los cuales se identifican los componentes del sistema Arc (Fleischman *et al.*, 1995). Estudios previos demostraron que la proteína ArcB_{H.i} es una cinasa activa *in vitro*, y es capaz de autofosforilarse y transfosforilar a la proteína ArcA_{H.i} (Georgellis *et al.*,

2001b). Además, se observó que ArcB_{Eco}, y ArcB_{H.i} pueden catalizar la fosforilación heteróloga *in vitro* de sus reguladores de respuesta (Georgellis et al., 2001b), lo que reforzó la idea de que se trata de sistemas homólogos. Asimismo, se ha reportado que la expresión heteróloga de *arcA_{H.i}* y *arcB_{H.i}* complementan cepas de *E. coli* mutantes en los genes homólogos correspondientes, respondiendo aparentemente a cambios en las condiciones de aerobiosis o anaerobiosis de manera muy similar a como lo hace una cepa de *E. coli* silvestre (Georgellis et al., 2001b). Por lo tanto, la proteína ArcB_{H.i} debe poder regular su actividad cinasa por un mecanismo similar al de su contraparte de *E. coli*, a pesar de carecer de la región *linker* reguladora.

Antecedentes recientes

El análisis de alineamiento de secuencias de homólogos de ArcB permite observar que todos los ArcB de tipo II carecen de la región *linker* reguladora (Fig.3). Sin embargo, todos estos homólogos de ArcB, incluyendo el de *H. influenzae*, poseen más de dos residuos de cisteínas a lo largo de su secuencia. En particular, la proteína ArcB_{H.i} contiene cinco residuos de cisteína, dos de los cuales están altamente conservados dentro de la familia ArcB de tipo II, por lo que se sugirió que dichos residuos podían estar involucrados en un mecanismo de regulación del sistema Arc en *H. influenzae* de manera similar que en ArcB_{Eco}. Sin embargo, experimentos realizados recientemente en el laboratorio demostraron que la activación de ArcB_{H.i} (expresado en *E. coli*) es independiente del estado oxidoreducción en el ambiente, dado que no hay activación del sistema bajo condiciones aerobias al agregar un agente reductor permeable a la membrana, como el DTT

(Fig.4), como sí ocurre en el sistema Arc de *E. coli* (Malpica et al., 2004). Por otro lado, el remplazo de residuos de cisteínas (Fig.5) en ArcB_{H.i} no afecta la activación del sistema (Tamayo, 2016), por lo que se concluyó que la regulación ArcB_{H.i} no involucra la oxido-reducción de residuos de cisteína.

```

EC      1  KRQIRDLAQYYVDLNRKGLVRFSSLLALALVVDLAVVQMAVTWVLRQVESSDVFRRSIF
ST      1  KRQIRDLAQYYVDLNRKGLVRFSSLLALALVVDLAVVQMAVTWVLRQVESSDVFRRSIF
YP      1  KRQIRDLAQYYVDLNRKGLVRFSSLLALALVVDLAVVQMAVTWVLRQVESSDVFRRSIF
VC      1  KRQIRDLAQYYVDLNRKGLVRFSSLLALALVVDLAVVQMAVTWVLRQVESSDVFRRSIF
HI      1  KRQIRDLAQYYVDLNRKGLVRFSSLLALALVVDLAVVQMAVTWVLRQVESSDVFRRSIF

EC      61  FGLLITPWAYVFLSVVVEQLESRQLSRLVOKLEERRRRDLKLNVLKDNIAQLNQEIA
ST      61  FGLLITPWAYVFLSVVVEQLESRQLSRLVOKLEERRRRDLKLNVLKDNIAQLNQEIA
YP      61  FGLLITPWAYVFLSVVVEQLESRQLSRLVOKLEERRRRDLKLNVLKDNIAQLNQEIA
VC      61  FGLLITPWAYVFLSVVVEQLESRQLSRLVOKLEERRRRDLKLNVLKDNIAQLNQEIA
HI      61  FGLLITPWAYVFLSVVVEQLESRQLSRLVOKLEERRRRDLKLNVLKDNIAQLNQEIA

EC      121  VREKAEKALQVDFQQLNFKKEREKNOIQHQQSSYFRSFLDASPDLVYRNEDKRFSGC
ST      121  VREKAEKALQVDFQQLNFKKEREKNOIQHQQSSYFRSFLDASPDLVYRNEDKRFSGC
YP      121  VREKAEKALQVDFQQLNFKKEREKNOIQHQQSSYFRSFLDASPDLVYRNEDKRFSGC
VC      121  VREKAEKALQVDFQQLNFKKEREKNOIQHQQSSYFRSFLDASPDLVYRNEDKRFSGC
HI      89  -----R-----VAERTIAQKKLQ-----

EC      181  NRAMELLTGKSEKQLVLRKEDVYSPEAAKVIETDEKVFRRHNSLTYEQWLDYFDGRKA
ST      181  NRAMELLTGKSEKQLVLRKEDVYSPEAAKVIETDEKVFRRHNSLTYEQWLDYFDGRKA
YP      181  NRAMELLTGKSEKQLVLRKEDVYSPEAAKVIETDEKVFRRHNSLTYEQWLDYFDGRKA
VC      181  NRAMELLTGKSEKQLVLRKEDVYSPEAAKVIETDEKVFRRHNSLTYEQWLDYFDGRKA
HI      110  -----

EC      241  CFEIRKRVFVYDRVGKRRHGLMGFGRDITERKRYQDALEASRDRTTTFISTISHELRTPLNG
ST      241  CFEIRKRVFVYDRVGKRRHGLMGFGRDITERKRYQDALEASRDRTTTFISTISHELRTPLNG
YP      241  CFEIRKRVFVYDRVGKRRHGLMGFGRDITERKRYQDALEASRDRTTTFISTISHELRTPLNG
VC      241  CFEIRKRVFVYDRVGKRRHGLMGFGRDITERKRYQDALEASRDRTTTFISTISHELRTPLNG
HI      110  -----ALEKKLEKNSRDRTTTFISTISHELRTPLNG

```

Fig. 3. Proteínas ArcB predichas en otras especies bacterianas. Alineamiento parcial de homólogos de ArcB de *E. coli* (EC) en *S. enterica* serovar Typhimurium (ST), *Y. pestis* (YP), *V. cholerae* (VC), y *H. influenzae* (HI). Las regiones correspondientes a los aminoácidos 93 a 134 y 153 a 271 en *E. coli* están ausentes en *H. influenzae* pero presentes en las otras cuatro bacterias.

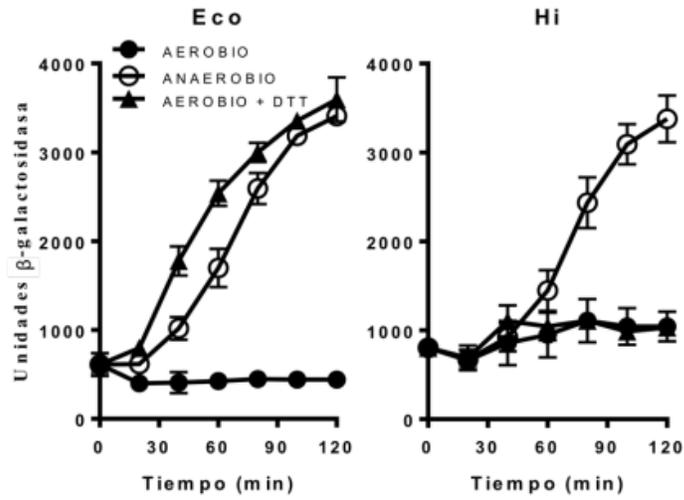


Fig. 4. Efecto del DTT en la activación aerobia de $ArcB_{Eco}$ (izquierda) y $ArcB_{Hi}$ (derecha). Ensayos de β -galactosidasa de cultivos de cepas de *E. coli* portando el gen reportero *cyd-lacZ*.

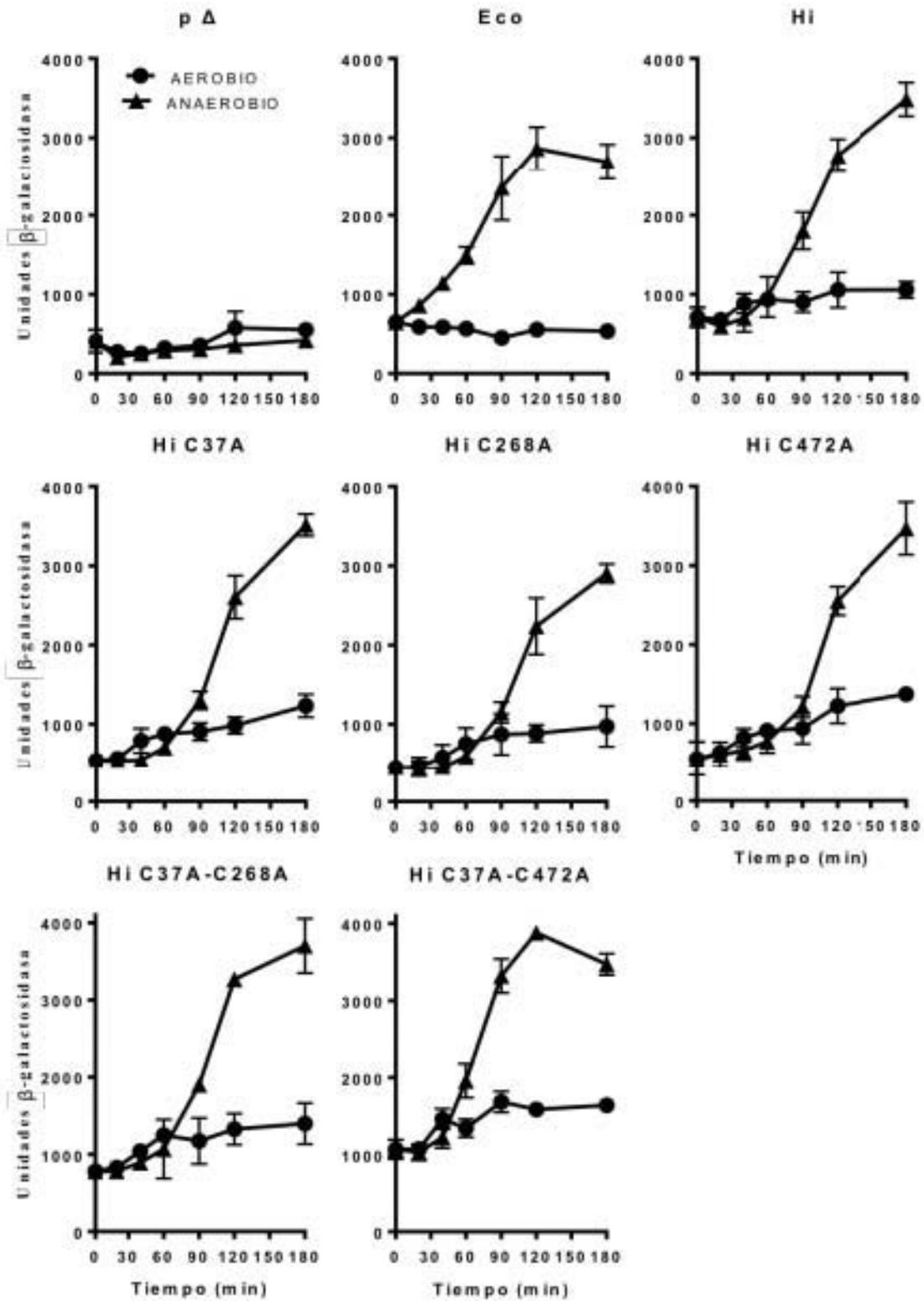


Fig. 5. Efecto del remplazo de residuos de cisteína en ArcB_{Hi} en la activación de la expresión del gen reportero *cyd-lacZ* en *E. coli*.

Justificación

El mecanismo de regulación del SDC ArcB/A en *E. coli* ha sido ampliamente estudiado y caracterizado. La expresión de la proteína homóloga ArcB_{H.i} puede complementar de forma funcional este sistema en *E. coli*, al menos bajo las condiciones de crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis. Ya que ArcB_{H.i} carece de la región reguladora de ArcB_{Eco}, debe tener un mecanismo de regulación diferente que puede servir de modelo para otros ArcB de tipo II. *H. influenzae* es un organismo comensal en el humano, pero también un patógeno oportunista asociado a enfermedades como conjuntivitis y sinusitis. A menudo, los SDC están asociados a la regulación de genes que afectan la virulencia de algunas bacterias y el SDC ArcB/A es uno de los cuatro que se han identificado en *H. influenzae*. Por lo tanto, caracterizar el mecanismo regulatorio de ArcB_{H.i} puede servir de base para posteriores estudios sobre el desarrollo de nuevos compuestos antibióticos contra *H. influenzae*.

Hipótesis

La proteína ArcB_{H.i} tiene un mecanismo de regulación diferente al de la oxidoreducción de cisteínas, que le permite activarse en condiciones de anaerobiosis. Metabolitos anaerobios como el acetato, piruvato o lactato podrían participar en la activación de ArcB_{H.i} en *E. coli*.

Objetivos

Generales:

Determinar las condiciones de activación, identificar metabolitos que la promuevan y proponer un mecanismo de regulación de ArcB de *H. influenzae* expresada heterológamente en *E. coli*

Específicos:

- Clonar los genes *arcB* silvestres tanto de *H. influenzae* como de *E. coli* en el plásmido de bajo número de copias pEXT21, y transformarlos en una cepa *E. coli* $\Delta arcB$ para evaluar la complementación en diferentes condiciones de cultivo.
- Monitorear la actividad del sistema Arc por medio de la actividad β -galactosidasa del gen reportero *cydA'*-*lacZ* dentro de la cepa de *E. coli* $\Delta arcB$ complementada con el *arcB*_{H.i} y con su propio *arcB* (*arcB*_{Eco}), en diferentes condiciones de cultivo, como aerobiosis, anaerobiosis y presencia de metabolitos anaerobios.
- Identificar la o las señales específicas que activan a ArcB_{H.i} en condiciones anaerobias y proponer un mecanismo de regulación.

Materiales y Metodología:

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo son listadas en la tabla 1.

Construcción de cepas y plásmidos

Para este trabajo se utilizó el plásmido pEXT21 el cual alberga el fragmento *arcB_{Eco}*. Esta construcción se transformó en la cepa de *E. coli* ECL5005 con resistencia a kanamicina ($\Delta arcB::Km$) $\Delta fnr::Tn9(Cm')$ Φ (*cydA'*-*lacZ*) (Kwon et al 2000) . Adicionalmente se construyó una cepa que expresara *arcB_{H.i}*, para ello el fragmento de *arcB_{H.i}* se obtuvo a partir de la digestión del plásmido pBR al cortar con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. El fragmento *arcB_{H.i}* obtenido de esta digestión con su propio promotor, se clonó en un plásmido pEXT21 de bajo número de copias, posteriormente se procedió a transformar dicho plásmido en la cepa ECL5005 $\Delta arcB::Km$ $\Delta fnr::Tn9(Cm')$ Φ (*cydA'*-*lacZ*) (Kwon et al 2000).

Construcción de cepas mutantes Δpta $\Delta acka$ y Δdld $\Delta ldhA$

La construcción de las cepas mutantes Δpta $\Delta acka$ y Δdld $\Delta ldhA$ se realizó a través del método de transducción y recombinación homóloga descritas por Miller (1992) haciendo uso del fago de P1, para inactivar los genes blanco *pta*, *acka*, *dld* y *ldhA* en el cromosoma de la cepa ECL5005 *ArcB_{E.coli}* y *ArcB_{H.i}*.

Tabla 1. Lista de cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Características	Referencia
ECL5005	$\Delta arcB::Km$ MC4100 $\Delta fnr::Tn9(Cm')$ Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Kwon et al 2000

ArcB _{Eco} WT	ΔarcB::Km MC4100 Δfnr::Tn9(Cm') Φ (cydA'-lacZ) + pEXT21 con arcB E. coli::sp	Este trabajo
ArcB _{H.i} WT	ΔarcB::Km MC4100 Δfnr::Tn9(Cm') Φ (cydA'-lacZ) + pEXT21 con arcB H. influenzae::sp	Este trabajo
ArcB _{Eco} Δpta Δacka	ΔarcB::Km MC4100 Δfnr::Tn9(Cm') Φ (cydA'-lacZ) Δpta Δacka:: Tet + pEXT21 con arcB E.coli::sp	
ArcB _{H.i} Δpta Δacka	ΔarcB::Km MC4100 Δfnr::Tn9(Cm') Φ (cydA'-lacZ) Δpta Δacka:: Tet + pEXT21 con arcB H. influenzae::sp	Este trabajo
ArcB _{Eco} Δdld ΔldhA	ΔarcB::Km Δdld ΔldhA Φ(cydA'-lacZ) Δfnr::Tn9(Cm)+ pEXT21 con arcB E.coli::sp	Rodriguez C. et al 2004
ArcB _{H.i} Δdld ΔldhA	ΔarcB::Km Δdld ΔldhA Φ(cydA'-lacZ) Δfnr::Tn9(Cm)+ pEXT21 con arcB H. influenzae::sp	Este trabajo
ArcB _{Eco} Δpta Δacka Δdld ΔldhA	ΔarcB::Km Δpta Δacka::Tet Δdld ΔldhA Φ(cydA'-lacZ) Δfnr::Tn9(Cm)+ pEXT21 con arcB E. coli::sp	Este trabajo

ArcB _{H.i}	$\Delta arcB::Km \Delta pta \Delta acka::Tet$	Este trabajo
$\Delta pta \Delta acka$	$\Delta dld \Delta ldhA \Phi(cydA'-lacZ) \Delta fnr::Tn9(Cm)+$	
$\Delta dld \Delta ldhA$	pEXT21 con <i>arcB H. influenzae::sp</i>	

Condiciones de cultivo

Las cepas de *Escherichia coli* fueron incubadas de manera rutinaria en medio LB (*lysogenic broth*) a 37° C y adicionado, dependiendo del caso, con alguno de los siguientes compuestos 0.02M xilosa, 0.02M glucosa, 0.02M piruvato, 0.02M Succinato, 0.02M lactato, así como con los antibióticos ampicilina, kanamicina, tetraciclina o cloranfenicol en concentraciones finales de 100, 50, 12.5 o 34 mg ml⁻¹, respectivamente.

Para las condiciones de aerobiosis se incubaron los cultivos en matraces de un volumen 5 veces mayor al del medio de cultivo, a 37 °C, con agitación rotatoria (250 RPM). Para simular las condiciones de anaerobiosis se llenaron frascos pequeños de 5mL con medio LB inoculado evitando burbujas de aire y colocando un agitador magnético que evitará que las células se sedimenten y se incubaron a 37 °C.

Determinación de la actividad β -galactosidasa

La actividad de ArcB bajo diferentes condiciones se evaluó por medio de la actividad β -galactosidasa expresada por el reportero *lacZ* fusionado al promotor de *cydA* que es activado por el regulador de respuesta ArcA-P.

Para la cuantificación de la actividad β -galactosidasa se realizó el cálculo de las unidades Miller, para ello se tomaron 100 μ L de muestra del cultivo a evaluar a los cuales se adicionaron 900 μ L de solución amortiguadora Z (Na₂HPO₄ 57.7 mM, NaH₂PO₄ 42.3 mM, KCL 0,246 g/L, MgSO₄x7H₂O 0.246 g/L, β mercaptoetanol 2.7 μ L/ml, SDS 0.1% m/v, cloroformo 25 μ L/mL) y ONPG (Ortonitrofenil- β galactopiranosido) 4 mg/ml, substrato que en la presencia de β -galactosidasa es hidrolizado causando una coloración amarilla cuya intensidad varía de acuerdo a la cantidad de β -galactosidasa y permite que la reacción sea leída en un espectrofotómetro a D.O 420nm y D.O 550nm, que junto con las D.O a 600nm de cada muestra permitieron el cálculo de unidades Milller con la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades Miller} = 1000 \times [(D.O_{420} - 1.75 \times D.O_{550})] / (T \times V \times D.O_{600})$$

Donde:

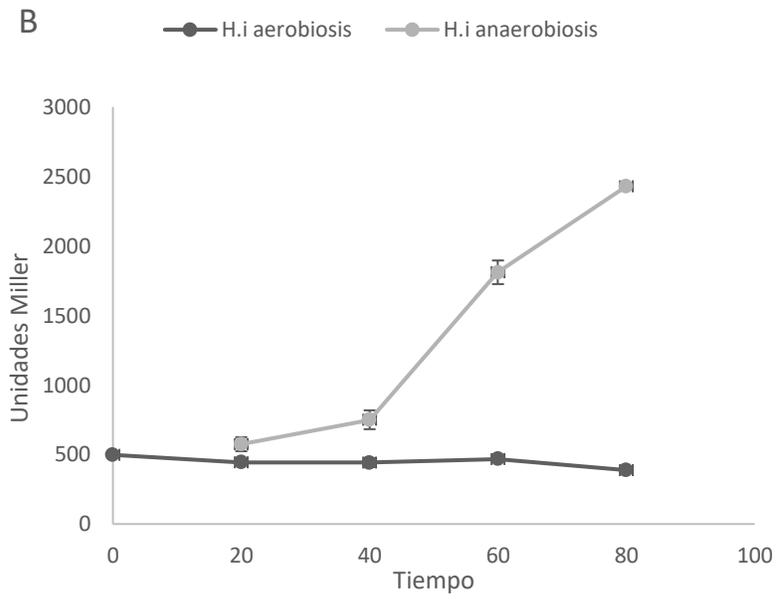
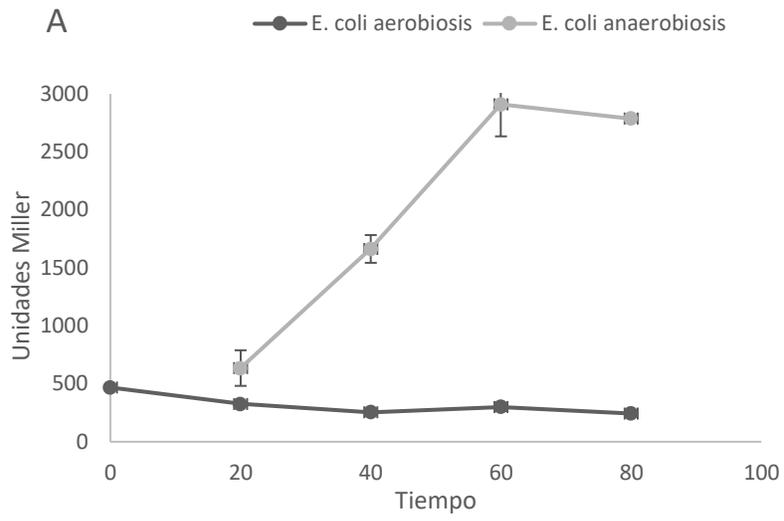
- T = tiempo de la reacción en minutos.
- V = el volumen del cultivo usa en ml.

Resultados

Ensayos de complementación in vivo

En estudios previos se observó que la proteína ArcB homóloga de *H. influenzae* complementa funcionalmente al sistema ArcB/A de *E. coli*, tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, resultados recientes demostraron que el mecanismo de regulación de ArcB_{H.i} no involucra la oxidación/reducción de residuos de cisteína, como ocurre en la proteína ArcB de *E. coli*. Por lo tanto, en este trabajo nos propusimos analizar con mayor detalle la capacidad de ArcB_{H.i} de complementar las funciones de su contraparte de *E. coli*. Para ello, se construyó un plásmido de bajo número de copias (3 copias por célula) que contiene el gen *arcB_{H.i}* bajo el control de su propio promotor. Como control, se construyó un plásmido similar, pero conteniendo el gen que codifica para ArcB_{Eco}. En ensayos de complementación anteriores se usó el plásmido pBR322, que resulta en alrededor de 30 copias por célula. En esta ocasión, se eligió el plásmido pEXT21 como vector, de muy bajo número de copias, para evitar efectos a causa de la sobreexpresión de la cinasa de histidina (ArcB) como resultado del mayor número de copias del vector. Ambos plásmidos, expresando ArcB_{H.i} o ArcB_{Eco}, se transformaron en la cepa de *E. coli* ECL5005 (Kwon O. et al, 2000), que contiene el gen reportero *cydA-lacZ*, que es activado por el sistema Arc en *E. coli*. Con las cepas resultantes se realizaron ensayos de determinación de la actividad β -galactosidasa para comparar la activación de la expresión del reportero al pasar las células de condiciones aerobias, en donde el sistema ArcB/A se encuentra inactivo, a anaerobias (Fig.6A y B). Para ello, se crecieron las células en medio LB, regulado a pH 7.4 con MOPS y adicionado con xilosa, con agitación a 37°C hasta una D.O 600 de 0.2, en donde se pasó el cultivo a frascos con tapa hermética para seguir con una incubación a la misma temperatura, pero en anaerobiosis. Antes del cambio de condiciones y

después de lapsos regulares, se tomaron muestras de cultivo para la determinación de la actividad β -galactosidasa. Se observó que la activación del sistema tras el cambio de condiciones es similar para las dos cepas, lo que confirma que ArcB_{H.i} es capaz de activarse en condiciones anaerobias y complementar a una cepa de *E. coli* mutante en *arcB* (Fig.6A y B). Posteriormente, se evaluó la capacidad de ArcB_{H.i} de apagar el sistema, evidenciado por una disminución en la expresión del reportero, al pasar las células de condiciones anaerobias a aerobias. En el sistema ArcB/A de *E. coli*, como en muchos otros, está demostrado que la misma cinasa ArcB actúa como fosfatasa de su regulador de respuesta fosforilado en condiciones no estimulantes. En este caso, las células de ambas cepas se crecieron en condiciones anaerobias hasta una D.O 600 de 0.2, en donde se pasaron los cultivos a matraces para realizar una incubación aerobia. Los resultados mostraron que la expresión del reportero disminuye rápidamente al pasar las células a condiciones aerobias en la cepa complementada con *arcB_{Eco}* (Fig. 6C). Interesantemente, en la cepa que expresa el ArcB_{H.i} se observó una disminución similar en la expresión del reportero (Fig. 6D), lo que sugiere que ArcB_{H.i} es capaz de desfosforilar a ArcA de *E. coli in vivo*. Además, esto muestra también que ArcB_{H.i} se encuentra inactivo en aerobiosis y activo en anaerobiosis en las condiciones de cultivo ensayadas, a pesar de no tener un mecanismo de regulación de reducción-oxidación.



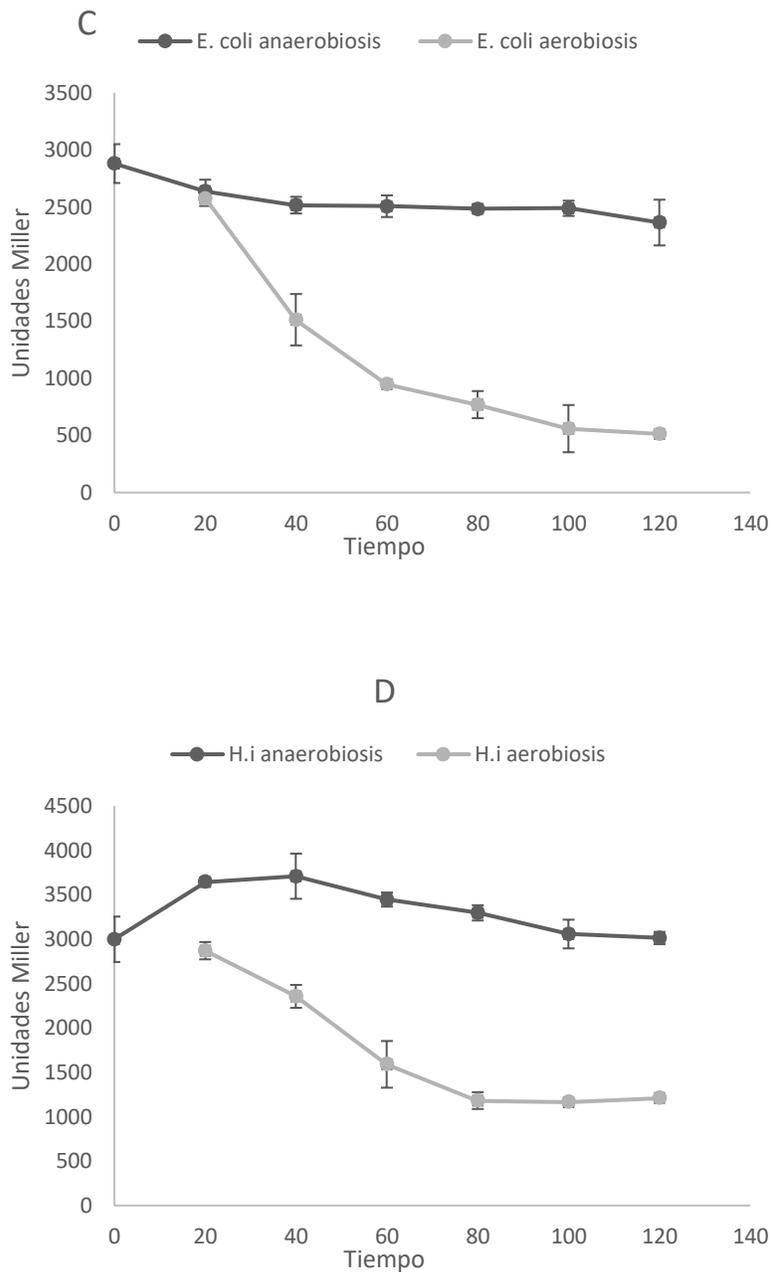


Fig.6. Ensayos de actividad β -galactosidasa para medir la expresi3n de *cyd-lacZ* dependiente de la activaci3n del sistema Arc en las cepas que expresan ArcB_{Eco} o ArcB_{H.i} (A) ArcB_{Eco} en cambio de condiciones de aerobiosis a anaerobiosis. (B) ArcB_{H.i} en cambio de condiciones de aerobiosis a anaerobiosis. (C) *E. coli* en

cambio de condiciones de anaerobiosis a aerobiosis. (D) *H. influenzae* en cambio de condiciones de anaerobiosis a aerobiosis.

Determinación de la actividad fosfatasa de ArcB_{H.i}

Se ha reportado que, en ausencia de su CS cognada, varios RR, incluyendo ArcA, son fosforilados a expensas de acetil fosfato (acetil-P). Cuando una cepa $\Delta arcB$ con el reportero *cydA-lacZ* se crece en medio mínimo con piruvato como única fuente de carbono, se activa la expresión del reportero, lo cual indica que ArcA está siendo fosforilado. Esto se debe a que cuando las células se crecen con piruvato como una fuente de carbono, la concentración intracelular de acetil-P aumenta hasta un orden de magnitud en comparación con células creciendo en glicerol o en medios nutritivos (McCleary *et al.*1994) y el acetil-P puede fosforilar al RR de manera independiente de la CS. Con el fin de medir la actividad fosfatasa de ArcB_{H.i} se creció la cepa ECL5005 portando el gen *arcB_{H.i}* en medio M9 adicionado con piruvato como única fuente de carbono. Como control para este experimento se utilizaron también las cepas ECL5005 ($\Delta arcB$) y la ECL5005 pEXT21::*arcB_{Eco}* (Fig.7).

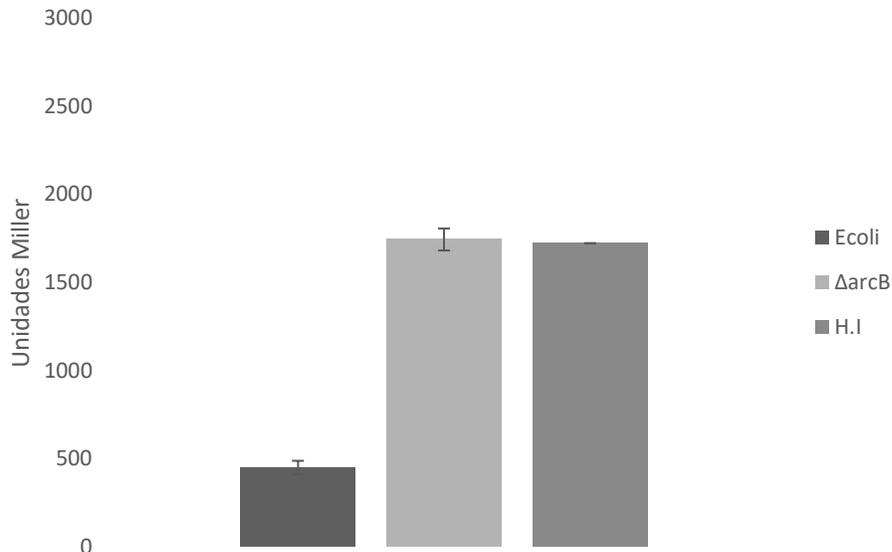


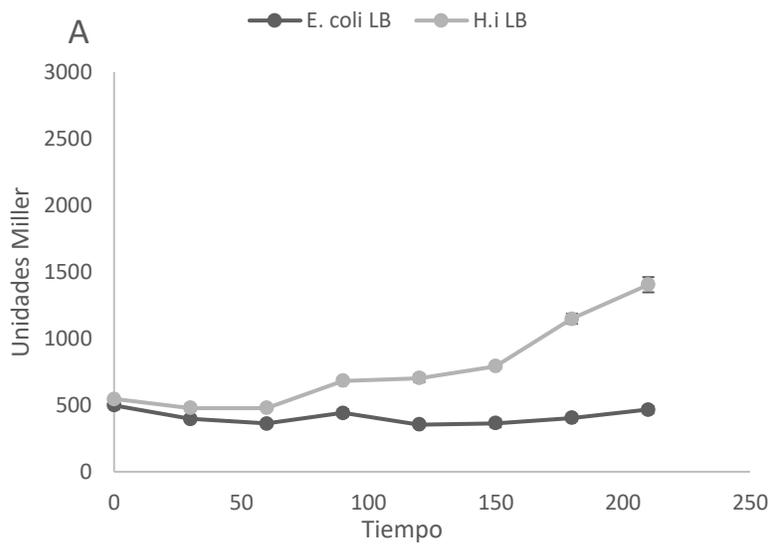
Fig.7. Expresión de *cyd-lacZ* dependiente de la fosforilación del RR en las cepas que expresan $ArcB_{Eco}$, $ArcB_{H.i}$ y $\Delta arcB$ crecidas en medio mínimo de sales M9 con piruvato como fuente de carbono.

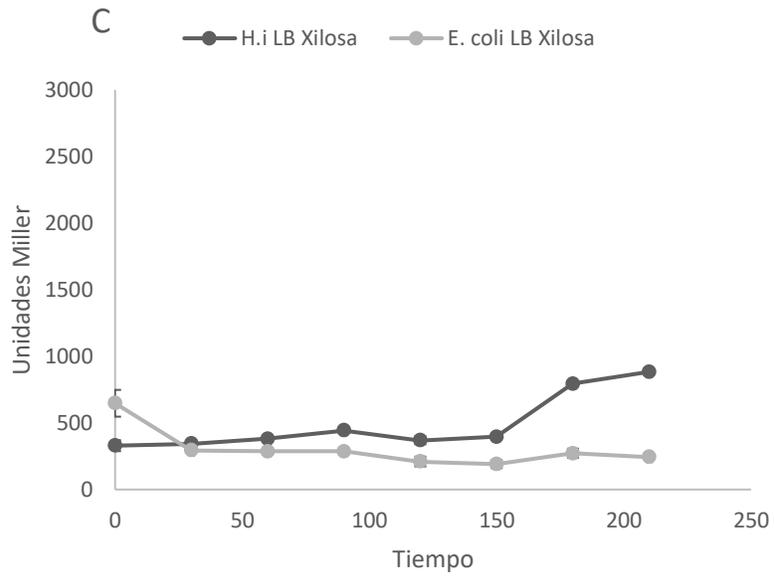
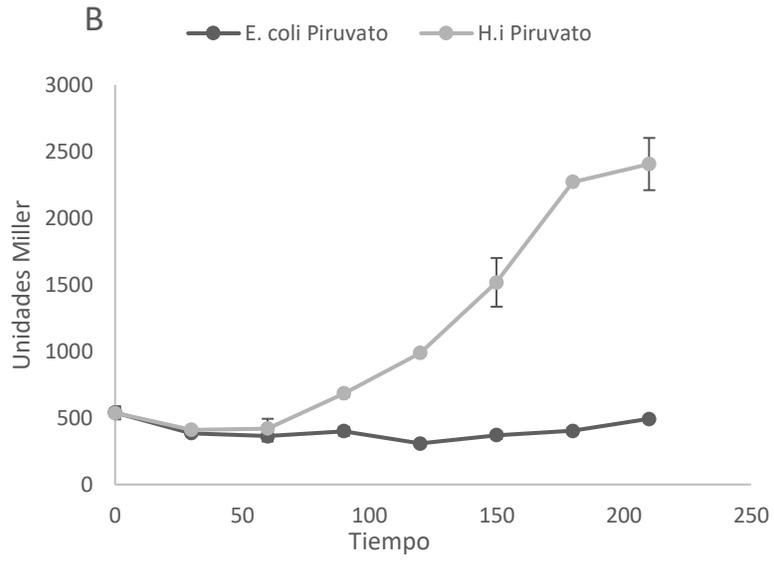
Por los resultados mostrados en la fig. 6D, se esperaba que, debido a la actividad fosfatasa de ArcB tanto de *E. coli* como de *H. influenzae*, la expresión del reportero se mantuviera baja en ambas cepas. Sin embargo, se encontró que en la cepa que contenía el gen $arcB_{H.i}$ la expresión del reportero era similar a la de una cepa $\Delta arcB$, mientras que, como se esperaba, en la cepa que expresa el gen $arcB_{Eco}$ la baja expresión del reportero refleja la actividad fosfatasa de $ArcB_{Eco}$. Dado que con los experimentos anteriores (Fig. 6D) demostramos la actividad fosfatasa de $ArcB_{H.i}$, la activación observada en medio M9 sugiere que esta puede deberse a algún metabolito derivado del metabolismo del piruvato o al piruvato mismo.

Análisis del efecto del piruvato y otras fuentes de carbono en la activación de ArcB_{H.i}

Para averiguar si ArcB_{H.i} responde al piruvato o a algún producto de su metabolismo, se realizaron experimentos para monitorear la activación del sistema en presencia de piruvato. Para ello se crecieron células expresando ArcB_{H.i} o ArcB_{Eco} en medio LB y en LB adicionado con piruvato (0.02M) (Fig.8). Lo que se esperaba observar es que al adicionar piruvato al medio, si este era la señal de activación del sistema, se observaría un patrón de activación y expresión de reportero en condiciones de aerobiosis parecido al observado en anaerobiosis (Fig.6B). En efecto, la expresión del reportero aumentó en presencia de piruvato en la cepa que expresaba ArcB_{H.i}, y se mantuvo baja en la cepa expresando ArcB_{Eco} (Fig 8B). En los ensayos control con las células creciendo en LB sin piruvato, la cepa con ArcB_{H.i} mostró un aumento en la expresión del reportero en tiempos largos de incubación, pero significativamente menor a lo observado en presencia de piruvato (Fig. 8A). Sin embargo, el aumento en la expresión del reportero en presencia de piruvato se observó después de los 90 minutos de incubación, lo que sugiere que el piruvato no es la señal que activa a ArcB_{H.i}. Por lo tanto, consideramos que metabolitos derivados del metabolismo del piruvato y/o del ciclo de los ácidos tricarbóxicos podrían activar el sistema. Por consiguiente, ensayamos el efecto de otras fuentes de carbono para analizar la posible intervención de metabolitos comunes, utilizando para los ensayos de β-galactosidasa xilosa (0.02M), glucosa (0.02M) y succinato (0.02M) (Fig. 8 C-F). De los metabolitos utilizados, solo con glucosa observamos un patrón de activación del sistema y expresión del reportero similar a lo observado

con piruvato, en la cepa expresando ArcB_{H.i} (Fig. 8B-F). Como control, se realizó una cinética bajo las mismas condiciones en una cepa Δ arcB para asegurar que el efecto observado era debido a que se está influyendo sobre ArcB_{H.i} (SC) y no sobre ArcA (RR) (Fig. 8). Tal como se puede observar en la Fig. 9 en una cepa Δ arcB en aerobiosis crecida en LB y LB con piruvato o glucosa, no hay activación del sistema sugiriendo que lo observado en la Fig. 8 es debido a que ArcB_{H.i} está siendo fosforilado.





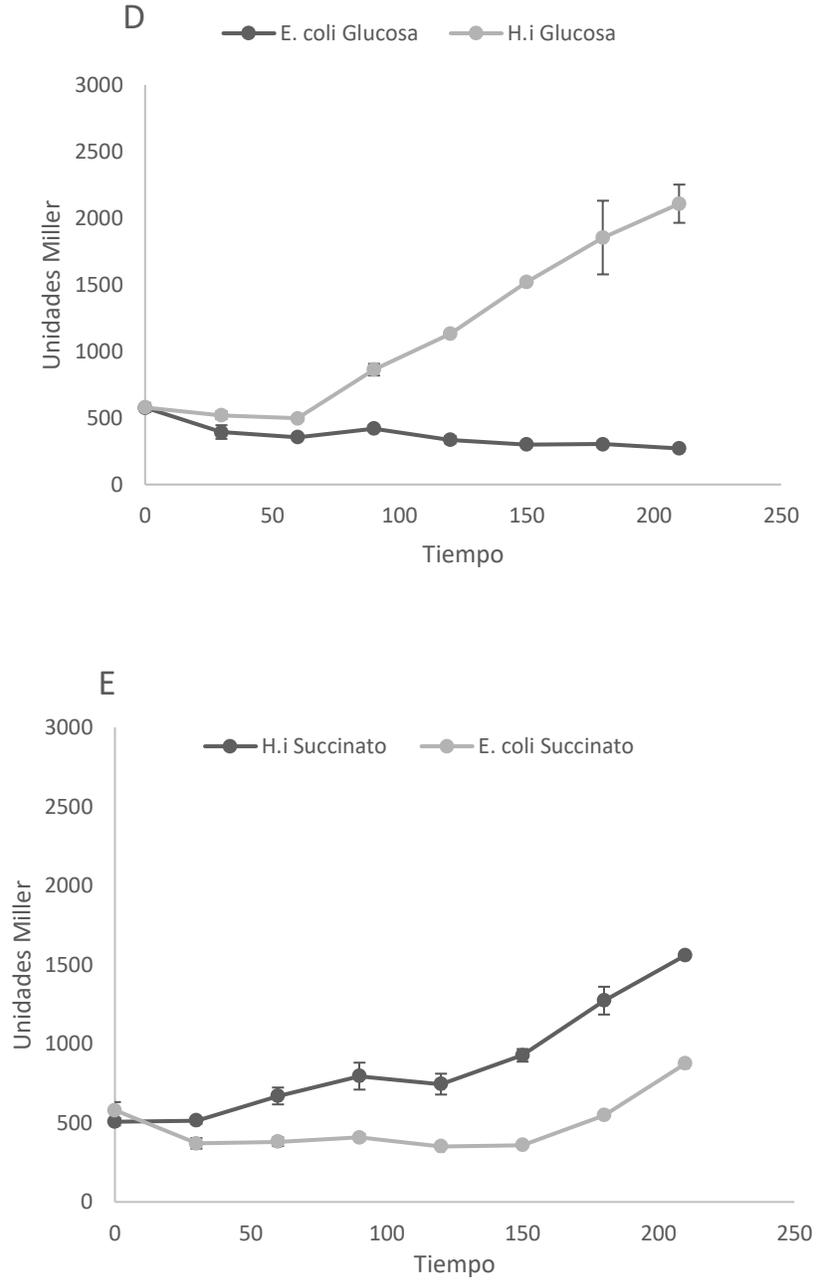


Fig.8. Ensayos de actividad β -galactosidasa para medir la expresi3n de *cyd-lacZ* dependiente de la activaci3n del sistema Arc en las cepas *ArcB_{Eco}* y *ArcB_{H.i}* en medio LB en condiciones de aerobiosis. (A) medio LB. (B) Medio LB adicionado

con piruvato 0.02M (C) Medio LB adicionado con xilosa 0.02M. (D) Medio LB adicionado con glucosa 0.02M. (E) Medio LB adicionado con succinato 0.02M.

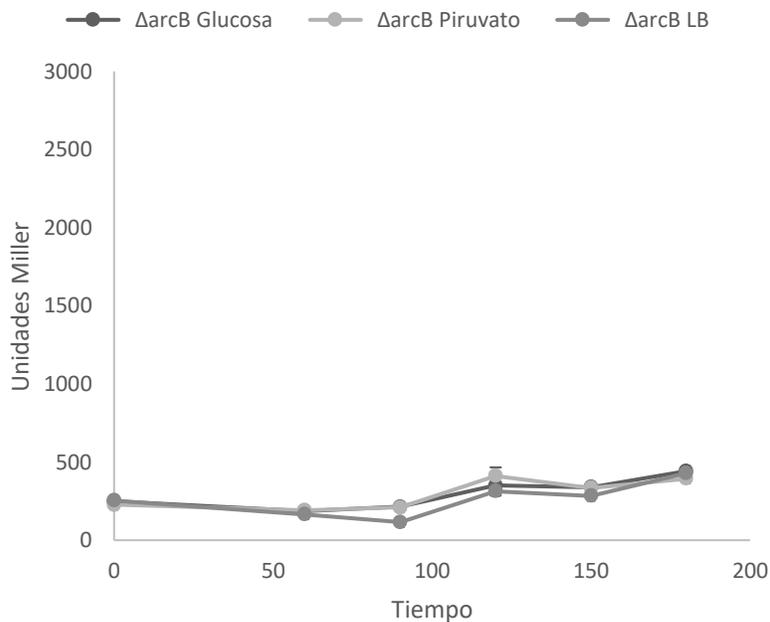
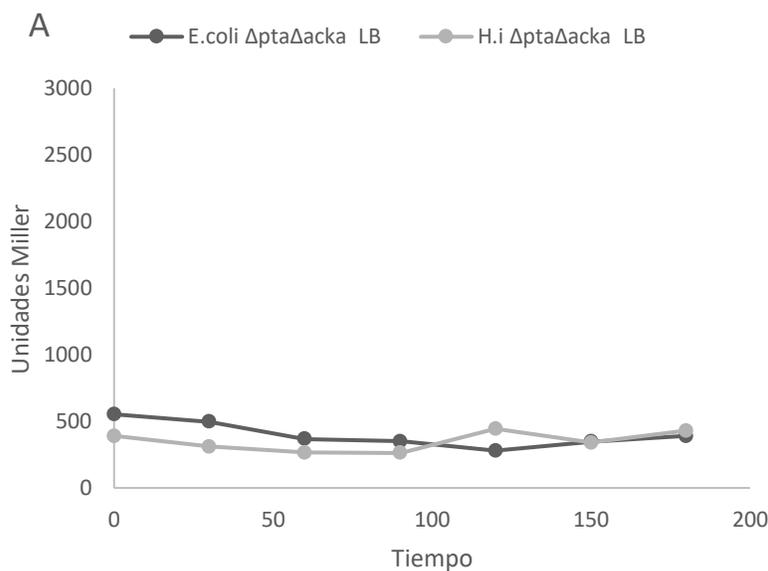


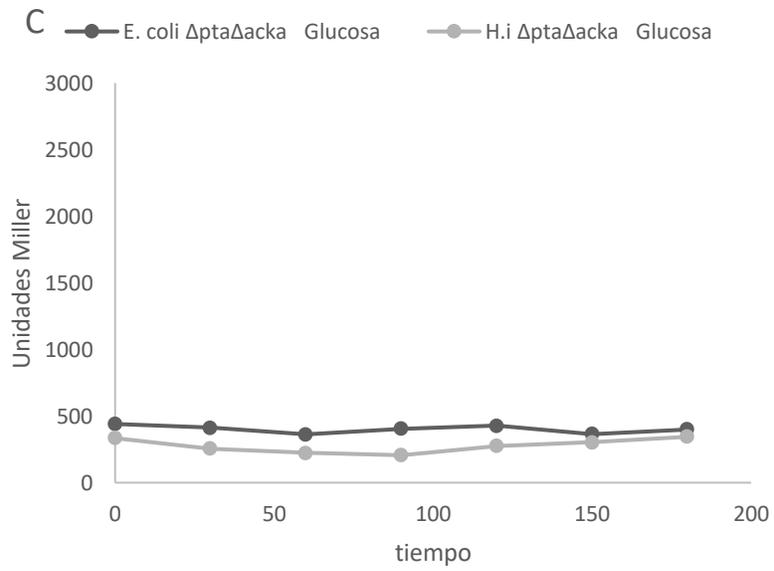
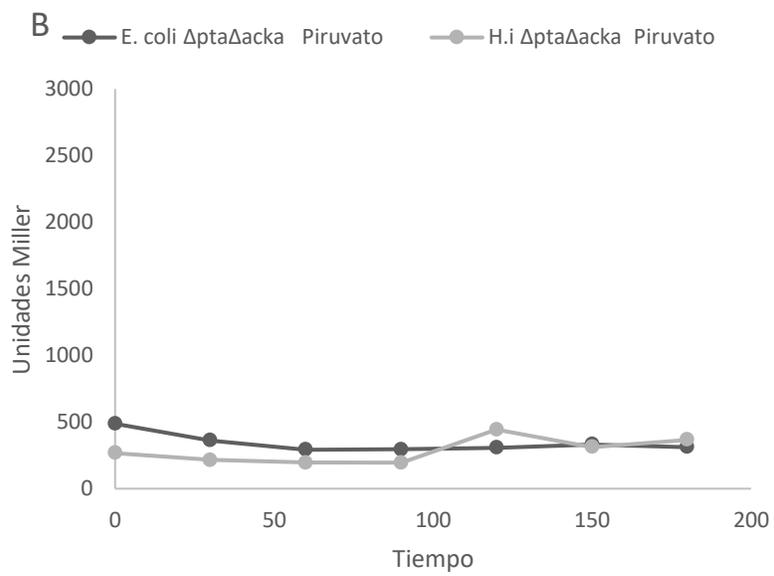
Fig.9. Ensayos de actividad β -galactosidasa para medir la expresión de *cyd-lacZ* dependiente de la activación de ArcB en la cepa $\Delta arcB$ en medio LB en condiciones de aerobiosis, medio LB. Medio LB adicionado con piruvato 0.02M y Medio LB adicionado con glucosa

Análisis de metabolitos del piruvato como posibles estímulos de ArcB_{H.i}

En *E. coli* el piruvato es metabolizado mediante la vía Pta-AckA, produciendo como metabolitos intermediarios acetil fosfato, acetil-CoA y acetato (Fig. 10), teniendo

esto en consideración se planteó la hipótesis de que el acetato o el acetyl fosfato de dicha vía podrían estar activando a ArcB_{H.i}. Además, en *E. coli* el exceso de glucosa produce acetato que, debido a la represión catabólica ejercida por la glucosa, metaboliza solo hasta que ésta, la glucosa, se ha consumido por completo (Enjalbert et al. 2017), lo cuál podría explicar la activación tardía del sistema por acetato. Para comprobar esta hipótesis se realizó la construcción de cepas expresando *arcB_{Eco}* y *arcB_{H.i}* mutantes para los genes *pta-ackA*, inactivando así la vía del acetato y a su vez la producción de los metabolitos intermediarios producidos en esta. Con estas cepas se realizaron ensayos bajo las condiciones de crecimiento en que se observó previamente activación del sistema (Fig 10). Lo que se observó en estos experimentos fue que al eliminar la vía *pta-ackA* se impedía la activación de sistema en la cepa que expresaba ArcB_{H.i}, lo cual sugiere que alguno de los metabolitos producidos mediante esta vía podrían ser la señal de activación.





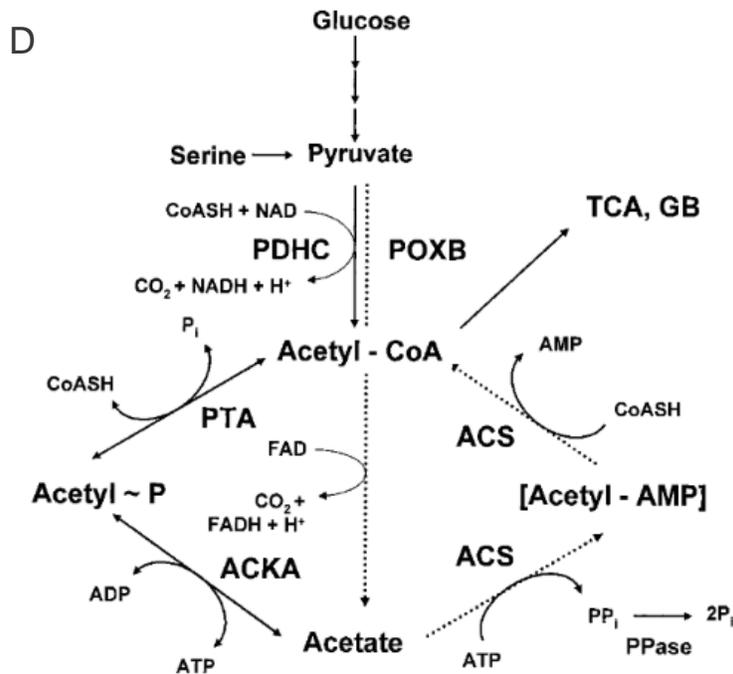
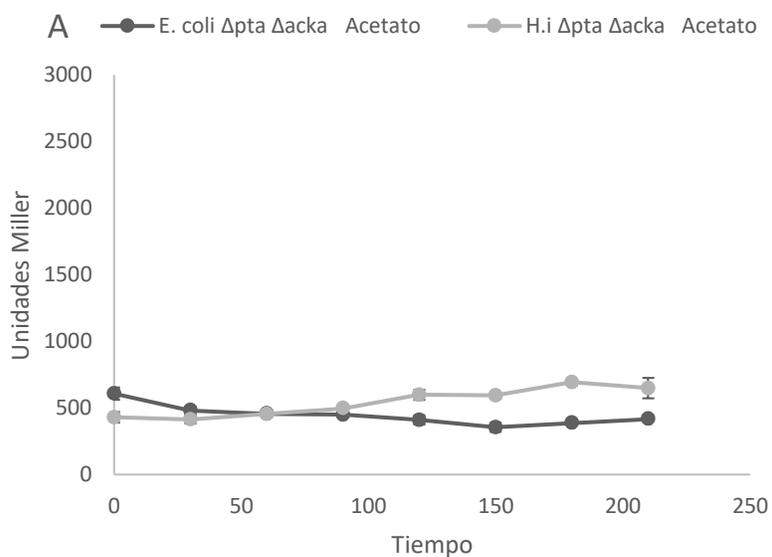


Fig. 10 Ensayos de actividad β -galactosidasa para medir la expresión de *cyd-lacZ* dependiente de la activación del sistema Arc en las cepas que expresan *ArcB_{E.coli}* Δ *pta* Δ *ackA* y *ArcB_{H.i}* Δ *pta* Δ *ackA* en medio LB en condiciones de aerobiosis. (A) medio LB. (B) Medio LB adicionado con piruvato 0.02M (C) Medio LB adicionado con glucosa 0.02M. (D) Metabolismo del acetato.

Como siguiente paso se realizó una cinética en medio LB-Acetato con las cepas Δ *pta* Δ *ackA* expresando *ArcB_{H.i}* o *ArcB_{Eco}*, a fin de probar si este metabolito era el activador del sistema. En la fig. 11A se observa que en condiciones de crecimiento de aerobiosis en medio LB-Acetato no hay activación del sistema cuando la vía *pta* *ackA* está inactiva, por lo cual descartamos al acetato como señal de activación.

Adicionalmente, como control, se realizaron cinéticas en condiciones similares con cepas expresando ArcB_{H.i} y ArcB_{Eco}, además de una cepa $\Delta arcB$. Interesantemente, la expresión del reportero aumentó en la cepa con ArcB_{H.i} en presencia de acetato de manera similar a lo observado con glucosa y con piruvato (Fig. 11B). Estos resultados sugieren que el acetyl fosfato podría ser el metabolito involucrado en la activación de ArcB_{H.i}.



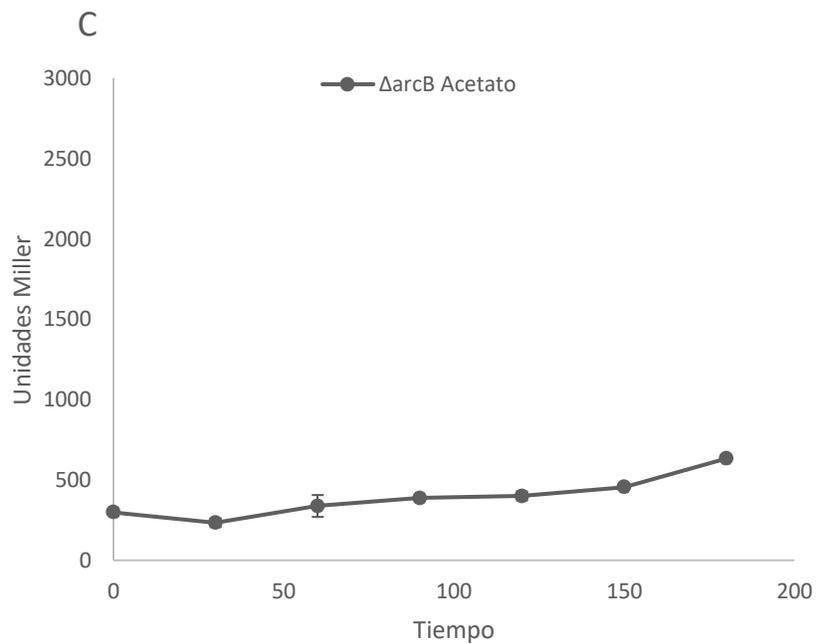
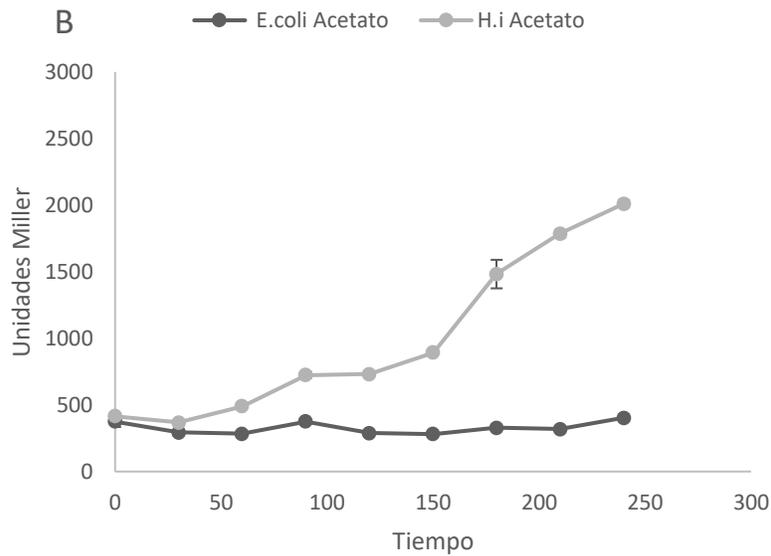
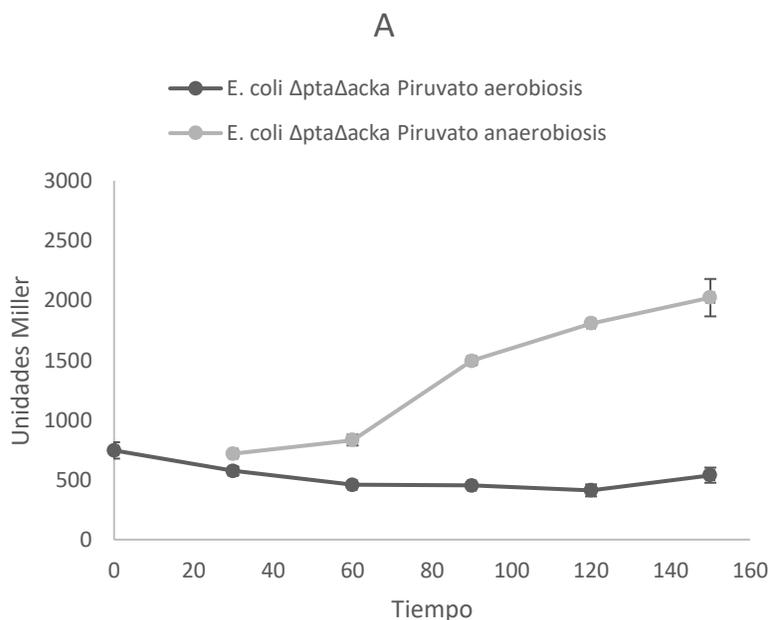


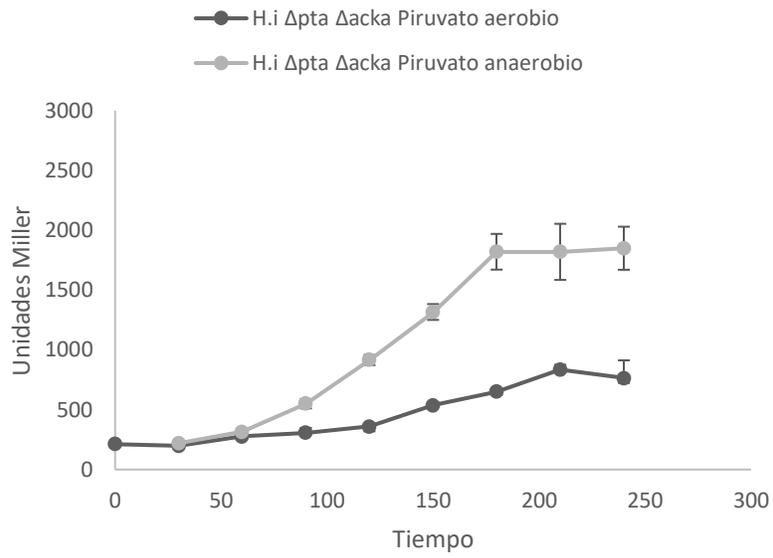
Fig. 11 Ensayos de actividad β -galactosidasa para medir la expresión de *cyd-lacZ* dependiente de la activación de ArcB en(A) cepas $ArcB_{Eco} \Delta pta \Delta acka$ y $ArcB_{H.i} \Delta pta \Delta acka$ en medio LB con acetato (0.02M) en condiciones de aerobiosis. (B) cepas $ArcB_{Eco}$ y $ArcB_{H.i}$ en medio LB con acetato (0.02M) en condiciones de

aerobiosis y (C) cepa Δarc en medio LB con acetato (0.02M) en condiciones de aerobiosis.

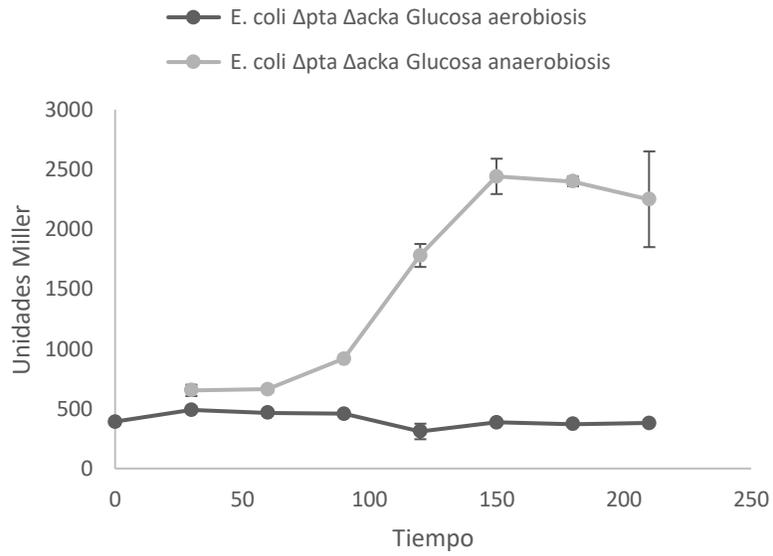
Para averiguar si el acetil-P está involucrado en la activación del sistema en anaerobiosis, se realizaron ensayos con la mismas cepas $\Delta pta\Delta acka$, incapaces de producir acetil-P, en aerobiosis y anaerobiosis en medio LB suplementado con glucosa (0.02M) y piruvato (0.02M) (Fig. 12). Se observó activación en la expresión del reportero en anaerobiosis en ambos medios tanto en la cepa que expresa $ArcB_{Eco}$ como la que expresa $ArcB_{H.i}$ (Fig 12A-D). Este resultado indica que el acetil-P no es responsable de la activación de $ArcB_{H.i}$ en anaerobiosis, abriendo la posibilidad de que otros metabolitos producidos durante el crecimiento anaerobio (como el lactato), permitan dicha activación.



B



C



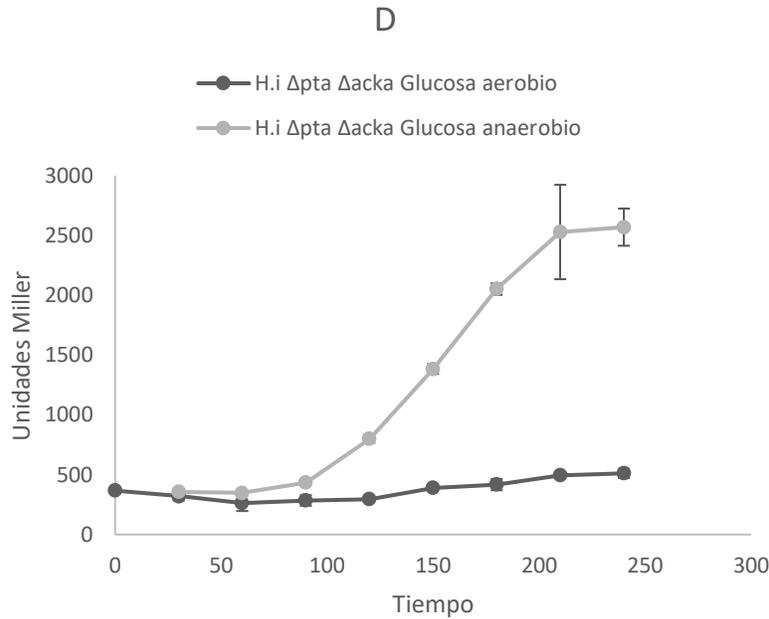
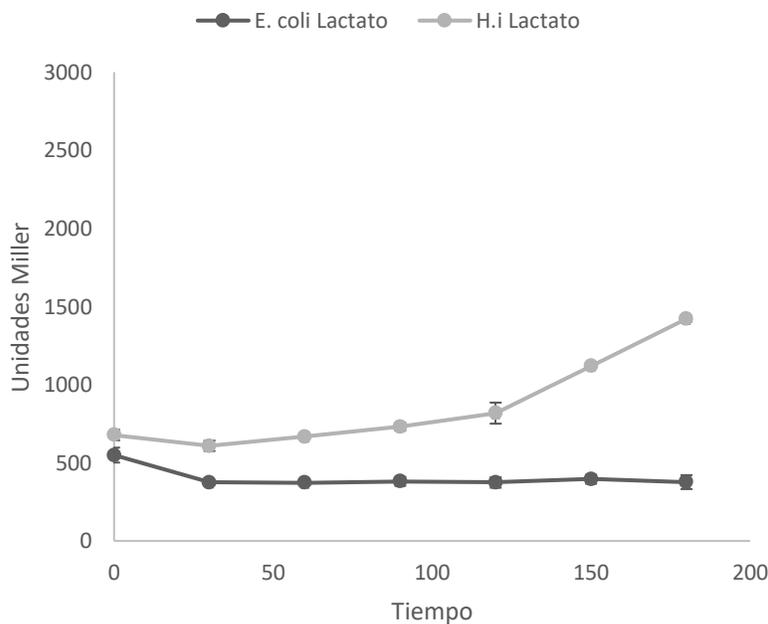


Fig. 12 Ensayos de actividad β -galactosidasa para medir la expresión de *cyd-lacZ* dependiente de la activación de ArcB en(A) cepa $ArcB_{Eco} \Delta pta \Delta ackA$ en medio LB con piruvato (0.02M) en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis (B) cepa $ArcB_{H.i} \Delta pta \Delta ackA$ en medio LB con piruvato (0.02M) en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, (C) cepa $ArcB_{Eco} \Delta pta \Delta ackA$ y en medio LB con glucosa(0.02M) en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, y D) cepa $ArcB_{H.i} \Delta pta \Delta ackA$ en medio LB con piruvato (0.02M) en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis

El lactato como posible estímulo de ArcB_{H.i}

Uno de los metabolitos producidos por *E. coli* durante el crecimiento anaerobio es al D-lactato, por lo que consideramos a este metabolito como posible activador de $ArcB_{H.i}$ expresado en *E. coli* en condiciones anaerobias. En este sentido, un

estudio reciente sugiere que el L-lactato podría servir de señal para la expresión de genes regulados por el sistema ArcB/A en *H. influenzae*. Sin embargo, *E. coli* no produce el enantiómero L del lactato. De todas maneras, decidimos evaluar el efecto de la adición de ambos enantiómeros juntos (D y L) del lactato en la activación de ArcB_{H.i} en *E. coli*. Para ello, se realizaron experimentos con células de *E. coli* expresando ArcB_{Eco} o ArcB_{H.i} creciendo en aerobiosis en medio LB adicionado con DL lactato. La cepa que expresa ArcB_{H.i} mostró activación en la expresión del reportero en presencia de DL-Lactato (Fig. 13), mientras que la cepa que expresa ArcB_{Eco}, mostró una activación remanente a largos tiempos de incubación. Este efecto puede atribuirse a que el D-Lactato es un efector que amplifica la actividad cinasa de ArcB_{Eco}. (Georgellis *et al.* 1999; Rodriguez *et al.* 2004). La activación de ArcB_{H.i} es significativa, pero, al igual que con glucosa y piruvato, se observa después de 90 minutos de incubación, sugiriendo que el lactato no sería la señal activadora de ArcB_{H.i}.



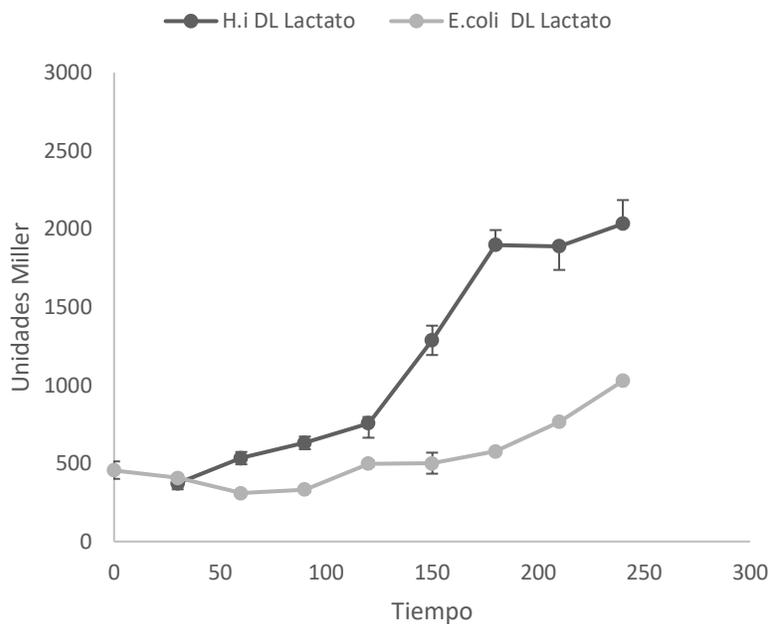


Fig. 13. Efecto de DL lactato en el reportero *cyd* de ArcB de *H. influenzae* silvestre y mutantes para la vía del acetato.

Discusión

E. coli tiene la capacidad de adaptar su metabolismo a distintas condiciones de crecimiento, como por ejemplo la presencia-ausencia de oxígeno, la cual está regulada mediante un mecanismo que involucra el SDC ArcB/A, activado por una reacción de oxido reducción que actúa sobre los residuos de Cys de ArcB (Malpica *et al*; 2004). Sin embargo, a pesar de que el homólogo de ArcB de *H. influenzae* carece de estas cisteínas reguladoras, responde a los cambios de oxido-reducción del ambiente de la misma manera en que lo hace ArcB_{Eco} aunque de manera tardía

en comparación con esta (Georgellis et Al., 2001b) mediante un mecanismo independiente de cisteínas o cambios de pH (Tamayo, 2016).

ArcB posee una topología en la cual esta proteína está unida a la membrana citoplasmática por medio de dos segmentos transmembranales separados por un, inusualmente corto, puente periplasmático de aproximadamente 15 aminoácidos. Otros sensores de cinasas con topologías similares a ArcB poseen un dominio periplasmático de una longitud mucho mayor a este, como en el caso de el sensor de cinasa DcuS y DctB capaces de detectar ácidos dicarboxílicos como el succinato. El dominio sensor de DctB tienen una longitud de 270 aminoácidos, aproximadamente dos veces más grande que el dominio sensor de DcuS (Cheung & Hendrickson, 2008). La longitud de estos dominios sensores se ha reportado que es importante ya que parece ser necesaria en la unión del ligando, debido a que se requieren diversos sitios para la unión de la molécula señal (Krämer et al. 2007). Por esto, es poco probable que el puente periplasmático de ArcB_{H.i} funcione como un dominio sensor, y el estímulo debería ser reconocido por la región citoplasmática de la proteína ArcB_{H.i} o por los dominios transmembranales. Esto es compatible con que algún metabolito producido por las células de *E. coli* en anaerobiosis se una y active a la proteína ArcB_{H.i} expresada heterológicamente.

Los resultados de este trabajo corroboran observaciones previas en las que se determinó que la proteína ArcB_{H.i} es capaz de complementar funcionalmente a una cepa de *E. coli* Δ *arcB* en condiciones anaeróbicas (Georgellis et al. 2001). Además, se observó que también complementa a esta mutante en condiciones aerobias,

apagando el sistema presumiblemente por la desfosforilación de ArcA. Sin embargo, al querer medir la actividad fosfatasa de ArcB_{H.i} encontramos que esta cinasa se activa 90 minutos después de la adición de piruvato al medio en condiciones aeróbicas. El retraso que se observa en la activación del sistema puede deberse a que es necesaria la acumulación de algún metabolito que funcione como señal activadora o debido a que su actividad catalítica es lenta. Evaluamos la activación tras la adición de algunos metabolitos anaeróbicos como son el acetato y el lactato. Para el caso del acetato, observamos que su adición produce una activación tardía del sistema en condiciones aerobias. Sin embargo, lo descartamos como estímulo específico para ArcB_{H.i} debido a que la activación del sistema seguía observándose en anaerobiosis en una cepa mutante en *pta-ackA*, incapaz de producir acetato. Por otro lado, observamos que la adición de lactato (mezcla de enantiómeros D y L) produce una activación similar en condiciones aerobias. Dicha activación también fue tardía (tras 90 minutos) y resta evaluar el comportamiento de una cepa incapaz de producir D-lactato en anaerobiosis para determinar si la acumulación este metabolito es el que produce la activación del ArcB_{H.i} en *E. coli* en condiciones anaerobias.

En *H. influenzae* se ha observado que el L-lactato inhibe la transcripción del gen *ictP* mediante un mecanismo que involucra al RR ArcA (Lichtenegger *et al* 2014). En dicho trabajo se sugiere que el L-lactato podría ser un estímulo para el sistema ArcB/A en esta bacteria. *E. coli* no produce L-lactato, por lo que la activación observada en anaerobiosis al expresar heterológamente ArcB_{H.i} en *E. coli* no es debido a L-lactato. Sin embargo, el D- lactato sí podría estar involucrado en la activación de ArcB_{H.i}, ya que se conoce que se produce y acumula en las células en

condiciones de anaerobiosis. Sin embargo, a pesar de que la adición de lactato al medio resulta en un incremento en la expresión del reportero *cyd-lacZ* en una cepa de *E. coli* complementada con *ArcB_{H.i}*, los resultados obtenidos no nos permiten determinar que el lactato, (D o L) sea la señal activadora de este sistema.

Conclusiones

- *ArcB_{H.i}* complementa funcionalmente a una *E. coli* mutante en *arcB* en condiciones de crecimiento anaerobio y aerobio.
- Productos anaerobios del metabolismo de la glucosa y el piruvato estarían involucrados en la activación de *ArcB_{H.i}*.
- El D-lactato podría funcionar como estímulo para la activación de *ArcB_{H.i}* expresado heterológamente en *E. coli*

Perspectivas

- Determinar si la producción de D-lactato en anaerobiosis se correlaciona con la activación de *ArcB_{H.i}* en *E. coli*.
- Explorar qué región de la proteína *ArcB_{H.i}* percibe el estímulo metabólico en *E. coli*.

Bibliografía:

- Alvarez, A. F., Rodriguez, C., & Georgellis, D. (2013). Ubiquinone and Menaquinone Electron Carriers Represent the Yin and Yang in the Redox Regulation of the ArcB Sensor Kinase. *Journal of Bacteriology*, 195(13), 3054–3061. <http://doi.org/10.1128/JB.00406-13>
- Barrett, J. F., & Hoch, J. A. (1998). Two-Component Signal Transduction as a Target for Microbial Anti-Infective Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(7), 1529–1536.
- Flores Tamayo Eder (2016) Mecanismo molecular de regulación de la cinasa sensora de ArcB de *Haemophilus influenzae* (Tesis de maestría) Universidad nacional Autónoma de México.
- Fleischmann RD1, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, et al Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*. 1995 Jul 28;269(5223):496-512.
- Georgellis, D., Kwon, O., Lin, E. C. C., Wong, S. M., & Akerley, B. J. (2001a). Redox Signal Transduction by the ArcB Sensor Kinase of *Haemophilus influenzae* Lacking the PAS Domain. *Journal of Bacteriology*, 183(24), 7206–7212. <http://doi.org/10.1128/JB.183.24.7206-7212.2001>
- Georgellis Dimitris, Kwon, Ohsuk & C. C. Lin, Edmund. (2001b). Quinones as the Redox Signal for the Arc Two-Component System of Bacteria. *Science* (New York, N.Y.). 292. 2314-6. [10.1126/science.1059361](http://doi.org/10.1126/science.1059361).

- Georgellis D, Kwon O, Lin EC. (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. Department of Microbiology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA.
- Harrison, A., Bakaletz, L. O., & Munson, R. S. (2012). Haemophilus influenzae and oxidative stress. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 40. doi:10.3389/fcimb.2012.00040
- Iuchi, S., & Lin, E. C. (1988). arcA (dye), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(6), 1888–1892.
- Iuchi, S., Cameron, D. C., & Lin, E. C. (1989). A second global regulator gene (arcB) mediating repression of enzymes in aerobic pathways of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 171(2), 868–873.
- Iuchi, S., Matsuda, Z., Fujiwara, T. and Lin, E. C. C. (1990), The arcB gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the arc modulon. *Molecular Microbiology*, 4: 715–727. doi:10.1111/j.1365-2958.1990.tb00642.x
- Iuchi, S., & Lin, E. C. (a) (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*. *Journal of Bacteriology*, 174(12), 3972–3980.

- Iuchi, S., & Lin, E. C. (b) (1992). Purification and phosphorylation of the Arc regulatory components of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174(17), 5617–5623.
- Ishige, K., Nagasawa, S., Tokishita, S., & Mizuno, T. (1994). A novel device of bacterial signal transducers. *The EMBO Journal*, 13(21), 5195–5202.
- John S. Parkinson & Eric C. Kofoid (1992) Communication Modules in Bacterial Signaling Proteins. University of Utah. *Annual Review of Genetics* 1992 26:1, 71-112
- Jung, W. S., Jung, Y. R., Oh, D.-B., Kang, H. A., Lee, S. Y., Chavez-Canales, M., Georgellis, D. and Kwon, O. (2008), Characterization of the Arc two-component signal transduction system of the capnophilic rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens*. *FEMS Microbiology Letters*, 284: 109–119. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01187.
- Kwon O, georgellis D, Lynch aS, Boyd D, Lin EC. (2000) The ArcB sensor kinase os *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region. *J. Bacteriol* 182:2960-6
- Lynch, A. S., & Lin, E. C. (1996). Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters. *Journal of Bacteriology*, 178(21), 6238–6249.
- Malpica, R., Franco, B., Rodriguez, C., Kwon, O., & Georgellis, D. (2004). Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), 13318–13323. <http://doi.org/10.1073/pnas.0403064101>

- Malpica R., Gabriela R. Peña Sandoval, Claudia Rodríguez, Bernardo Franco, and Dimitris Georgellis. Antioxidants & Redox Signaling. June 2006, 8(5-6): 781-795. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.781>
- 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. (Tokyo) 127:855–860.
- McCleary WR, Stock JB (1994) Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. J Biol Chem 269: 31567–31572
- Rodriguez C., Kwon O & Georgellis D. (2004) Effect of D-lactate on the physiological activity of the ArcB sensor kinase in *Escherichia coli*.
- Zhulin, I. B., B. L. Taylor, and R. Dixon. (1997) PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. Trends Biochem. Sci. 22:331–333