



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización funcional *in vivo* de la cinasa  
sensora ArcB de *Haemophilus influenzae*

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÓLOGO

P R E S E N T A :

Yael González Tinoco

Director de Tesis: Dr. Dimitris Georgellis

2006



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM



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.

## **Agradecimientos:**

A mi profesor, tutor y amigo el Dr. Dimitris Georgellis le agradezco haber abierto las puertas de su laboratorio a este estudiante de biología de 6º semestre quien llegó a este instituto con no mas que su curiosidad por el mundo de las bacterias.

A quienes dedicaron tiempo para la revisión concienzuda de estas hojas, el Dr. George Dreyfus, la Dra. Bertha González Pedrajo, el Dr. Victor Valdés y el M. en C. Julio Prieto, cuyas observaciones fueron de gran valor en la redacción final de este trabajo.

A todos aquellos quienes integran al personal académico y administrativo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por el apoyo brindado durante las largas horas de trabajo.

A la Unidad de Biología Molecular (Dra. Laura Ongay) y su personal por los servicios y herramientas ofrecidas en los experimentos adelante realizados.

Especialmente a los miembros del laboratorio 226 Norte del departamento de Genética Molecular:

A la M. en C. Claudia Rodríguez Rangel por el entrenamiento otorgado y la disposición constante para el desarrollo técnico de este proyecto.

A la Sra. Ivonne por su colaboración en el optimo mantenimiento del laboratorio.

A la H. H. Facultad de Ciencias de la UNAM por estos años de enseñanza, experiencias y preparación profesional.

Y finalmente a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de entrar en las filas de aquellos quienes hacen eso llamado Ciencia.

Enero 2006.

## **Agradecimientos personales:**

Principalmente quiero agradecer a mi madre, Maria del Rosario González Tinoco el haberme dado la oportunidad de estudiar esta carrera y apoyarme en todos los aspectos a lo largo de la misma. Ella me lo ha dado todo y quiero retribuirle ese esfuerzo con la culminación de mis estudios profesionales.

A mi familia, quienes han estado apoyándome todo este tiempo desde el principio y hasta este final.

A mi gran compañero y amigo Bernardo Franco quien ha estado a mi lado en momentos dolorosos y serenos por igual durante todo este tiempo y mas aun.

A todos mis compañeros del laboratorio 226 norte, con quienes compartí risas y llanto, dolor y júbilo: Gabriela Peña, Fabiola Méndez, Ana Elisa Martínez, Verónica Mondragón, Claudia Rodríguez, Roxana Malpica, Arturo Martínez y Luís Núñez, de quienes aprendí valiosas lecciones de vida y de conocimiento.

A mis compañeros de aventuras David y Rodrigo quienes me enseñaron a andar por mi mismo pero no solo.

A mis hermanos de armas del Haidong Gumdo y del Hapkido, todos son una inspiración para mi, para superarme cada día en cada batalla que deba librar. Es todo un honor caminar este sendero a su lado.

A toda la comunidad Metalera de la vieja Guardia, el destino llama y los días de grandeza aun no han terminado.

Y finalmente pero no por ello menos importante quiero agradecer a todos aquellos quienes de alguna u otra manera me ayudaron o empujaron a llegar a este momento, hoy.

No necesitan sus nombres en un gran listado, ellos saben quienes son.

Gracias a todos.

Este proyecto se realizo con el ayopo de DGPA (No. de proyecto IN218902-13)

## **Índice.**

<b>Resumen</b>	<b>2</b>		
<b>1. Introducción.</b>	<b>3</b>		
<b>1.1. ¿Qué es la transducción de señales?</b>		<b>3</b>	
<b>1.2. Sistemas de dos componentes.</b>		<b>4</b>	
<b>1.3. Estructura básica.</b>	<b>6</b>		
<b>1.4. Mecanismo de transducción de la señal.</b>		<b>7</b>	
<b>2. Antecedentes.</b>	<b>8</b>		
<b>2.1. El sistema Arc.</b>		<b>8</b>	
<b>2.2. Procesamiento de la señal en el sistema Arc.</b>			<b>10</b>
<b>2.3. Diferencias entre ArcB de <i>E. coli</i> y <i>H. influenzae</i>.</b>			<b>12</b>
<b>3. Hipótesis y Objetivos.</b>	<b>14</b>		
<b>4. Materiales y Métodos.</b>	<b>14</b>		
<b>5. Resultados.</b>	<b>16</b>		
<b>6. Discusión.</b>	<b>21</b>		
<b>7. Conclusión.</b>	<b>23</b>		
<b>Bibliografía.</b>	<b>24</b>		

## **Resumen.**

La supervivencia depende de la adaptación y ésta, a su vez, de las correctas respuestas que ofrezcan los organismos ante las diferentes situaciones ambientales. Los organismos procariontes han acoplado dichas respuestas con sistemas de señalización que monitorean continuamente las condiciones del medio, permitiendo reacciones rápidas y precisas. Los sistemas de señalización mas importantes en bacterias, son los Sistemas de Dos Componentes, los cuales conducen la señal de los estímulos ambientales desde una proteína cinasa sensora ubicada generalmente en la membrana, hasta una proteína citosólica reguladora de la respuesta mediante un evento de fosfotransferencia. Una vez fosforilado, el regulador de respuesta es capaz de inducir o reprimir la expresión de los genes necesarios para la respuesta adaptativa correspondiente con el estímulo detectado.

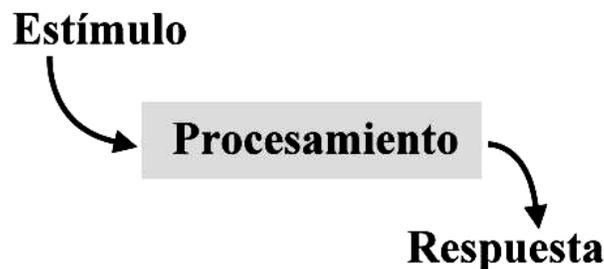
En *Escherichia coli* y otras bacterias Gram-negativas, el sistema Arc formado por la cinasa sensora ArcB y el regulador de respuesta ArcA, se encarga de monitorear la condición redox de crecimiento. Bajo condiciones anaeróbicas, el sistema está activo y regula negativamente genes asociados con el metabolismo de respiración aeróbica, para así dar paso al metabolismo fermentativo. Estudios de comparación de secuencias han mostrado que los componentes del sistema Arc están altamente conservados dentro de este grupo de bacterias, excepto en *Haemophilus influenzae* donde falta todo el dominio de unión de la cinasa sensora ArcB. Después de varios experimentos este estudio aporta evidencia que sugiere que el comportamiento de señalización de la cinasa sensora ArcB de *H. influenzae* es diferente al de su homólogo en *E. coli* y que incluso todo su mecanismo de monitoreo podría ser distinto.

## 1. Introducción.

### 1.1. ¿Qué es la Transducción de Señales?

En la naturaleza, las bacterias se enfrentan a cambios constantes de las condiciones de su medio ambiente, tales como alteraciones en el pH, la luz, la concentración de oxígeno o de sustancias nutritivas, los cuales constituyen una presión de selección que las comunidades bacterianas deben superar para sobrevivir. La manera de lograrlo es ofreciendo respuestas adaptativas de acuerdo a las condiciones ambientales alteradas.

Estas respuestas, que ocurren en forma de cambios en la regulación de la expresión génica o de la conducta celular, son iniciadas cuando la información obtenida de los estímulos del medio es capturada, transmitida y traducida. Por lo tanto, estas vías de procesamiento de información intracelulares que unen estímulos con respuestas adaptativas específicas, son las que se conocen como vías de **Transducción de Señales (Fig. 1)**.



**Fig.1.** Flujo de información en un circuito de transducción de señales. La información del estímulo es capturada, procesada (transmitida) y finalmente traducida en forma de una respuesta.

A lo largo de la evolución, las células bacterianas han desarrollado numerosos sistemas de transducción de señales que les permiten detectar las condiciones de su medio y ofrecer una respuesta precisa de acuerdo al estímulo que reciben.

Bajo esta definición, uno de los sistemas más sencillos para la transducción de información, es el modelo del **Operón Lac**; propuesto en 1961 por los científicos Francois Jacob y Jacques Monod (Jacob y Monod, 1961), es un ejemplo de inducción enzimática que muestra como la presencia de lactosa en el medio induce la transcripción de los genes contenidos dentro del operón lac, mientras que en su ausencia, dichos genes permanecen inactivos. En este caso, la señal inductora es la lactosa en el medio, que se une a la proteína represora (producto del gen *lac I*) para inactivarla, retirarla del operador y permitir a la RNA polimerasa comenzar con la transcripción de los genes *Z*, *Y* y *A* para posteriormente terminar con la síntesis de las enzimas correspondientes: la  $\beta$ -galactosidasa (gen *Z*), la permeasa (gen *Y*) y la transacetilasa (gen *A*). Una vez consumida la lactosa, no queda nada para unirse al represor; éste regresa

de nuevo a su forma activa y se une nuevamente al operador para apagar por completo al operón (Black, 2002). Para el operón lac, la proteína represora actúa como un regulador, estimando la cantidad de lactosa suficiente como para alcanzar un umbral de activación o inactivación.

Otra proteína reguladora involucrada en transducción de señales es el producto del gen *fnr* (por sus siglas en inglés fumarate nitrate reduction) de *E. coli*. La **proteína FNR** es un regulador transcripcional que bajo condiciones anaeróbicas activa la expresión de ciertos genes relacionados con el transporte de electrones anaeróbico. Enzimas como la nitrato reductasa (*nar*), fumarato reductasa (*frd*), y la dimetil sulfóxido reductasa (*dms*) son reguladas positivamente. Al mismo tiempo FNR puede reprimir la expresión de genes asociados con la vía aeróbica de transporte de electrones, esto incluye a la citocromo oxidasa *o* (*cyo*), citocromo oxidasa *d* (*cyd*) y la NADH deshidrogenasa (*ndh*) cuya síntesis es regulada negativamente (Melville y Gunsalus, 1996). La forma activa de FNR es un homodímero que interactúa con la subunidad  $\alpha$  de la RNA polimerasa y su mecanismo de monitoreo del estado redox se basa en su centro N-terminal de hierro coordinado por 4 residuos de cisteína. En condiciones anaeróbicas, la forma de un homodímero con centros activos [4Fe-4S] presenta una afinidad de unión a DNA alta. Por otro lado, la forma oxidada es de dos monómeros con centros desarmados [2Fe-2S] con una afinidad de unión a DNA baja. El análisis de mutantes ha demostrado que el núcleo de hierro-azufre es requerido para la dimerización y la unión a DNA, lo que deriva en la función de factor de transcripción de FNR (Popescu, 1998).

Los dos sistemas anteriores son ejemplos de cómo las células toman información del medio en forma de estímulos que pueden ser usados para desatar una respuesta de acuerdo a un repertorio genético.

Sin embargo el sistema de transducción de señales predominante en bacterias, es el Sistema de Dos Componentes.

## 1.2. Sistemas de Dos Componentes.

Los Sistemas de Dos Componentes (SDC) constituyen la vía principal y más ampliamente distribuida para la transducción de señales en bacterias. Están involucrados en el monitoreo de una gran cantidad de condiciones ambientales y estímulos diferentes incluyendo desde la detección del hospedero e invasión hasta la simbiosis o patogénesis; adaptación metabólica a cambios en las fuentes de carbono, nitrógeno o fosfato; respuestas fisiológicas a alteraciones osmóticas, redox y quimiotaxis; y diferenciación inducida por estrés, como la esporulación y la formación de cuerpos fructíferos (Parkinson y Kofoid, 1992; Hoch y Silhavy, 1995).

El sistema de regulación de nitrógeno de *E. coli* fue uno de los primeros en ser propuesto para modulación por un sistema de dos componentes. En ésta y en otras bacterias se observó que durante la escasez de nitrógeno, se inicia la transcripción del operón *glnALG*, el cual contiene al gen estructural de la glutamina sintasa (*glnA*), bajo control del promotor *glnAp2*. Para ello, es necesaria la presencia de la

proteína **NR<sub>I</sub>**, producto del gen *glnG* y la proteína **NR<sub>II</sub>**, producto del gen *glnL*. Análisis posteriores *in vitro* en presencia de ATP demostraron que la proteína **NR<sub>II</sub>** cataliza la transferencia del grupo fosfato  $\gamma$  del ATP hasta la proteína **NR<sub>I</sub>**, lo cual le confiere la habilidad a esta última, de iniciar la transcripción desde el promotor *glnAp2*.

Se sabe que las células son capaces de disminuir o incrementar muy rápidamente la tasa de transcripción en *glnAp2* si se adiciona o se remueve el amonio del medio. Experimentos con mutantes que carecían de **NR<sub>II</sub>** mostraron una pérdida en la habilidad para responder rápidamente a los cambios en la disponibilidad de amonio, aunque sin embargo aun presentaban una activación muy lenta e ineficiente de los genes regulados por escasez de nitrógeno (Ninfa y Magasanik, 1986).

En análisis posteriores se observó que los genes reguladores, *glnL* y *glnG* presentaban homología con otros genes involucrados en el metabolismo de nitrógeno en otras especies. Las bacterias entéricas *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Klebsiella pneumoniae* tienen secuencias muy similares para los productos de dichos genes. En particular las regiones C-terminales de los moduladores y los extremos N-terminales de los efectores resultaron altamente conservadas al resolver las secuencias de aminoácidos. Esta evidencia apoyó la idea de que los genes *glnL* y *glnG* constituían un sistema de transducción de señales de dos componentes en el que finalmente, el producto de *glnL* recibe el nombre de **NtrB** y corresponde con el elemento modulador y el producto del gen *glnG* nombrado **NtrC** corresponde con el elemento efector (Nixon et al., 1986).

En este ejemplo de señalización por escasez de nitrógeno, pueden observarse las características básicas de los sistemas de dos componentes para la transducción de señales (Magasanik, 1995), que son claves para el desarrollo del paradigma de su funcionamiento.

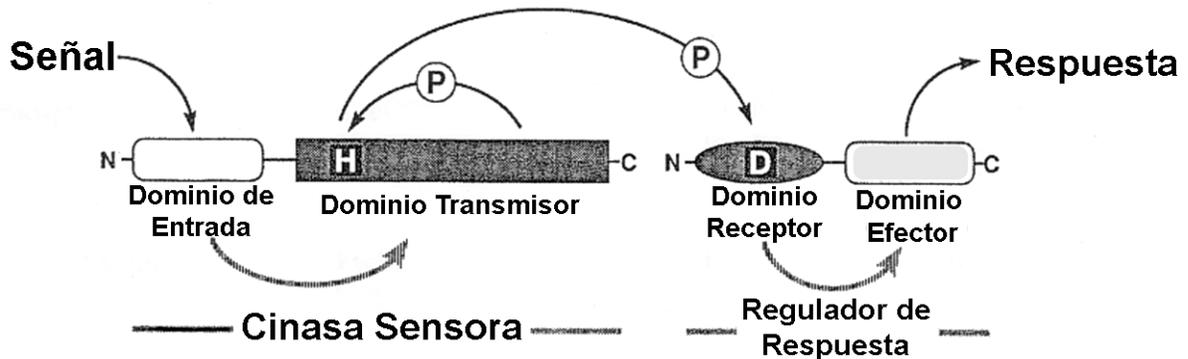
- La presencia de ambos componentes es necesaria para lograr la correcta transducción de la señal.
- El flujo de información se basa en la transferencia de grupos fosfato desde el modulador al efector.
- El mecanismo de activación es reversible para permitir una respuesta de regulación rápida.

Hasta ahora los sistemas de transducción de señales de dos componentes se han encontrado en un amplio número de especies bacterianas demostrando así su gran valor adaptativo. En *E. coli* se han reportado 30 proteínas reguladoras y 32 proteínas efectoras; 4 moduladores y 5 efectores en, *Haemophilus influenzae*; 4 moduladores y 7 efectores en, *Helicobacter pylori* y en archeas como *Methanobacterium thermoautotrophicum* se observan 15 moduladores y 9 efectores. A pesar de que hasta hace poco se pensaba que estos sistemas eran exclusivos de procariontes, se han hallado también en diversos grupos eucariontes incluyendo levaduras, hongos e incluso plantas superiores (Mizuno, 1998).

### 1.3. Estructura Básica.

El diseño clásico de un sistema de dos componentes consiste en: una proteína “cinasa sensora” (elemento modulador), generalmente transmembranal, encargada del monitoreo y recepción de señales; y en una proteína “reguladora de respuesta” (elemento efector) citoplásmico encargado de ejecutar los cambios en la expresión génica o en la conducta celular en respuesta a las señales detectadas (**Fig.2**).

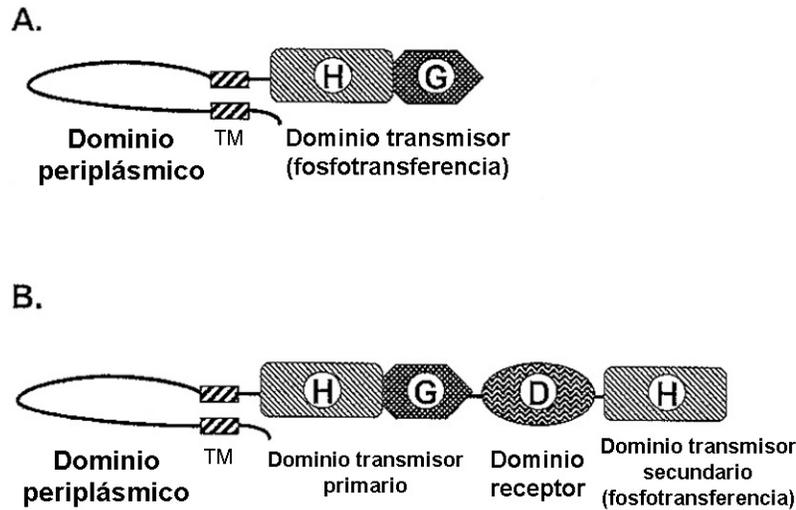
La **Cinasa Sensora (CS)** es una proteína generalmente transmembranal que presenta un arreglo de



**Fig. 2.** Diseño básico de un circuito de transducción de señales de dos componentes. Formado por el modulador o cinasa sensora y el efector o regulador de respuesta. Modificado de (Parkinson y Kofoid, 1992)

dos dominios principales, el dominio sensor o dominio de entrada N-terminal y un dominio transmisor C-terminal que contiene un residuo de histidina altamente conservado. La actividad completa de la cinasa es regulada mediante las señales capturadas por el dominio de entrada. Cabe mencionar que la secuencia de estos dominios es muy variada, lo que refleja la enorme cantidad de estímulos que pueden ser detectados, mientras que los dominios transmisores presentan secuencias con alto grado de conservación (West y Stock, 2001). Dentro del paradigma de los SDC se muestran sólo estos dominios típicos, sin embargo los diseños de cinasas sensoras pueden variar de acuerdo con los dominios extras que sean agregados, es por eso que se hace una distinción entre dos grupos de cinasas, las ortodoxas y las híbridas (Perraud et al., 1999) (**Fig.3**). Las cinasas de tipo **ortodoxo** presentan sólo un dominio de entrada y un dominio transmisor, pero pueden tener múltiples regiones transmembranales o ninguna. La cinasa sensora EnvZ de *E. coli* es un ejemplo de este grupo. Por otro lado, las cinasas sensoras del tipo **híbrido** contienen múltiples dominios de fosfotransferencia, lo que significa que además del dominio de entrada y el dominio transmisor, cuentan también con algún otro dominio accesorio que participa en eventos de fosforilación consecutivos (Fosforelevo). La cinasa sensora ArcB de *E. coli* es representante de este grupo (Iuchi et al., 1990).

El **Regulador de Respuesta (RR)** es el componente ejecutor citoplasmático formado por un dominio receptor N-terminal que contiene un residuo de aspartato altamente conservado y un dominio efector o dominio de salida C-terminal, generalmente este dominio cuenta con motivos hélice - vuelta - hélice (H-V-H) de unión a DNA, aunque también puede tener propiedades enzimáticas sobre proteínas. Igualmente los dominios receptores cuentan con alto grado de conservación, mientras que los dominios efectores varían de acuerdo con la secuencia de su sitio de unión (West y Stock, 2001).



**Fig. 3** .Comparación estructural de proteínas cinasas. **A.** Cinasa sensora ortodoxa; **B.** Cinasa sensora híbrida o tripartita. Esta última cuenta con dos dominios adicionales al transmisor: un dominio receptor con un Asp conservado similar al de los reguladores de respuesta y un dominio transmisor secundario con una His conservada. TM regiones transmembranales; G caja de unión a ATP; H histidina; D aspartato.

#### 1.4. Mecanismo de transducción de la señal.

El proceso de la transducción de señales comienza con la recepción del estímulo correspondiente en el dominio de entrada de la cinasa sensora. Estos dominios sensores son capaces de percibir una gran variedad de señales extracelulares por unión directa de ligando o por recepción de otros estímulos físicos que van desde la luz, hasta la concentración de iones. Igualmente otros esquemas distintos de monitoreo incluyen la detección indirecta de los estímulos mediante la interacción con otros componentes protéicos y no protéicos. Cada estímulo es capturado por una estructura receptora particular en el dominio de entrada (Goudreau y Stock, 1998).

Cuando un estímulo es detectado por el dominio de entrada de la CS, ésta cataliza una reacción de autofosforilación dependiente de ATP en un residuo de histidina conservado específico dentro del dominio transmisor. Una vez que este residuo se ha fosforilado debido a la presencia del estímulo, el RR cataliza la transferencia del grupo fosfato desde el residuo de histidina hasta su propio residuo de aspartato conservado en su dominio receptor, alcanzando así una conformación activa en la cual puede comenzar su acción de regulación génica, o de alteración de la conducta celular.

Una vez que el estímulo ha cesado, comienza el proceso de **decaimiento de la señal**. Este es el proceso de inhibición que desactiva el sistema, y que le brinda el carácter de regulación a toda la vía. En el principio de la desactivación se observa la pérdida del grupo fosfato por el RR, ya sea por la actividad autofosfatasa del mismo; por una actividad fosfatasa de parte de la CS; o por la actividad de una proteína fosfatasa auxiliar (Stock et al., 2000). Debido a estos mecanismos es que la vida media de los RR fosforilados puede variar desde unos pocos segundos hasta varias horas dependiendo del contexto fisiológico en el cual esté involucrado cada sistema. De esta manera se asegura un mecanismo con la tendencia a permanecer apagado esperando ser activado con la siguiente señalización.

## 2. Antecedentes.

### 2.1 El Sistema Arc.

El sistema conocido con el nombre de Control Anóxico Redox (por sus siglas en inglés Anoxic Redox Control: arc) es un sistema de transducción de señales que juega un papel clave en la regulación del metabolismo energético en bacterias, incluyendo a los patógenos *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Yersinia pestis* y *Haemophilus influenzae*. Basado en los componentes: ArcA y ArcB, está encargado del monitoreo de las condiciones redox de crecimiento de *E. coli*. Bajo su control está la regulación de hasta 150 operones (el modulón de Arc) (Liu y De Wulf, 2004). Principalmente su actividad reguladora consiste en la represión de genes en condiciones anaeróbicas que codifican para enzimas involucradas en la respiración aeróbica, como enzimas pertenecientes al ciclo de los ácidos tricarbónicos, la vía del glioxilato, la vía de degradación de ácidos grasos y la citocromo oxidasa *o* (Iuchi y Lin, 1992). Aunque también, el sistema Arc puede activar algunos genes de metabolismo anaeróbico en un ambiente microaerófilico, como el gen *cyd* que codifica para la citocromo oxidasa *d* o el gen *pfl* que codifica para la piruvato formato liasa (Sawers y Suppmann, 1992).

La vía de respiración aeróbica es la más eficiente para obtener energía a partir de fuentes de carbono reducidas. Las células que crecen aeróbicamente presentan niveles elevados en la expresión de enzimas asociadas con el metabolismo aeróbico, sin embargo, al cambiar las condiciones de crecimiento a un modo anaeróbico, los niveles de expresión de estas enzimas comienza a decaer.

Debido a que la expresión de todas estas enzimas parecía depender de un solo factor: el oxígeno, era posible suponer la existencia de un mecanismo de control global. Bajo el supuesto de que dicho regulador podría ser transcripcional, se decidió buscar mutantes que expresaran de manera elevada operones de función aeróbica durante condiciones de crecimiento anaeróbicas.

De este modo el sistema Arc fue descubierto en células mutantes de *E. coli* que presentaban una elevada expresión anaeróbica de la succinato deshidrogenasa (codificada por el gen *sdh*), enzima perteneciente al ciclo de los ácidos tricarbónicos, la cual es reprimida durante el crecimiento en anaerobiosis. La identidad de la mutación fue determinada cuando las cepas deficientes en esta región resultaron sensibles al colorante azul de toluidina adicionado en placas de agar, al igual que aquellas cepas deficientes del gen *dye*. La complementación de las mutantes desreprimidas con plásmidos conteniendo este gen, salvaron el fenotipo silvestre, tanto para la resistencia al colorante, como para la represión anaeróbica de la succinato deshidrogenasa. El primer elemento identificado a partir de esta caracterización fue nombrado como *arcA* (Iuchi y Lin, 1988).

Para determinar si el producto del gen *arcA* era el único elemento regulador presente para enzimas de metabolismo aeróbico, se realizaron otras búsquedas en mutantes que presentaran alta expresión

anaeróbica de *sdh* y sensibilidad al colorante azul de toluidina. Cada mutante fue complementada con el gen *arcA* mediante el transposón *thr43::Tn10* (94% relacionado con este gen), el cual fue transducido con fago P1 propagado en la cepa BW6164. Las transductantes complementadas fueron seleccionadas para resistencia a tetraciclina y ensayadas para buscar la represión anaeróbica de *sdh*. Se halló un grupo de mutantes resistentes al antibiótico que no restauraron la represión. La mutación en estas cepas no estaba en *arcA*.

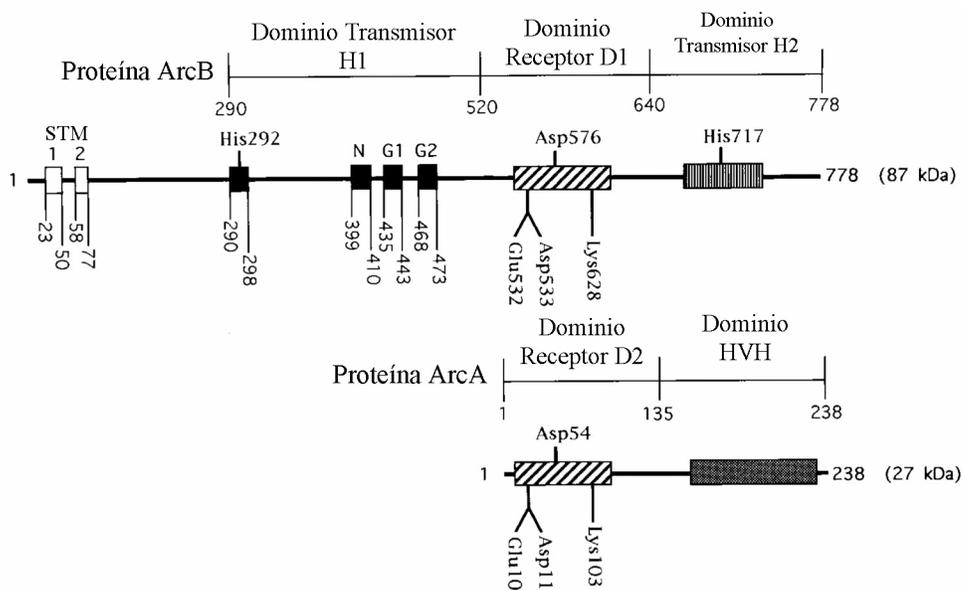
El mapeo de estas mutantes reveló una alteración en la región correspondiente al minuto 69.5 del cromosoma a la que se nombró como *arcB*. De igual modo que las mutantes complementadas con el gen *arcA*, aquellas células deficientes en *arcB* pero que recibieron un plásmido con dicho gen, recuperaron su fenotipo silvestre (Iuchi et al., 1989).

Estos experimentos demostraron que ambos elementos estaban involucrados de algún modo en la regulación negativa de genes aeróbicos durante condiciones de crecimiento anaeróbicas. La evidencia mostró que mutaciones en *arcA* afectan la respuesta al cambio en la condición redox de crecimiento y la sensibilidad a colorantes redox al igual que las mutaciones en *arcB*.

Estas características, junto con la comparación de secuencias de aminoácidos con otros componentes protéicos de procesamiento de señales (Iuchi et al., 1990) y los experimentos de transfosforilación *in vitro* (Iuchi y Lin, 1992) apuntaron a que ArcB y ArcA constituían un sistema de transducción de señales de dos componentes (**Fig. 4**).

**ArcA** es el componente citosólico que corresponde al regulador de respuesta, esta conformado por 238 residuos de aminoácidos con un peso molecular aproximado de 28-kDa. Su estructura clásica, presenta un dominio receptor (D2) N-terminal con un residuo conservado de aspartato en la posición 54 y un dominio efector C-terminal hélice - vuelta - hélice (H-V-H) de unión a DNA (Iuchi y Lin, 1988).

**ArcB** es una proteína transmembranal que tiene la función de cinasa sensora, contiene 778 residuos de aminoácidos y un peso molecular aproximado de 88-kDa. Su estructura comprende una secuencia periplásmica muy pequeña, de solo 16 residuos de aminoácidos delimitada por dos segmentos transmembranales canónicos. Como cinasa es atípica debido a que presenta 3 dominios catalíticos: un dominio transmisor (H1) N-terminal con un residuo de Histidina-292 conservado, un dominio receptor central (D1) con un residuo Aspartato-576 conservado y un dominio C-terminal de fosfotransferencia (H2) con un residuo de Histidina-717 conservado (Ishige et al., 1994). Finalmente dentro de la región de unión o región “Linker”, que conecta la sección catalítica con la transmembranal, hay un posible “zipper” de Leucina y un dominio PAS (Georgellis et al., 1998; Kwon et al., 2000). Esta arquitectura peculiar coloca a la cinasa sensora ArcB dentro del grupo de cinasas híbridas tripartitas, el cual incluye también a la cinasa BarA y TorS de *E. coli* (Iuchi et al., 1990; Georgellis et al., 1997).



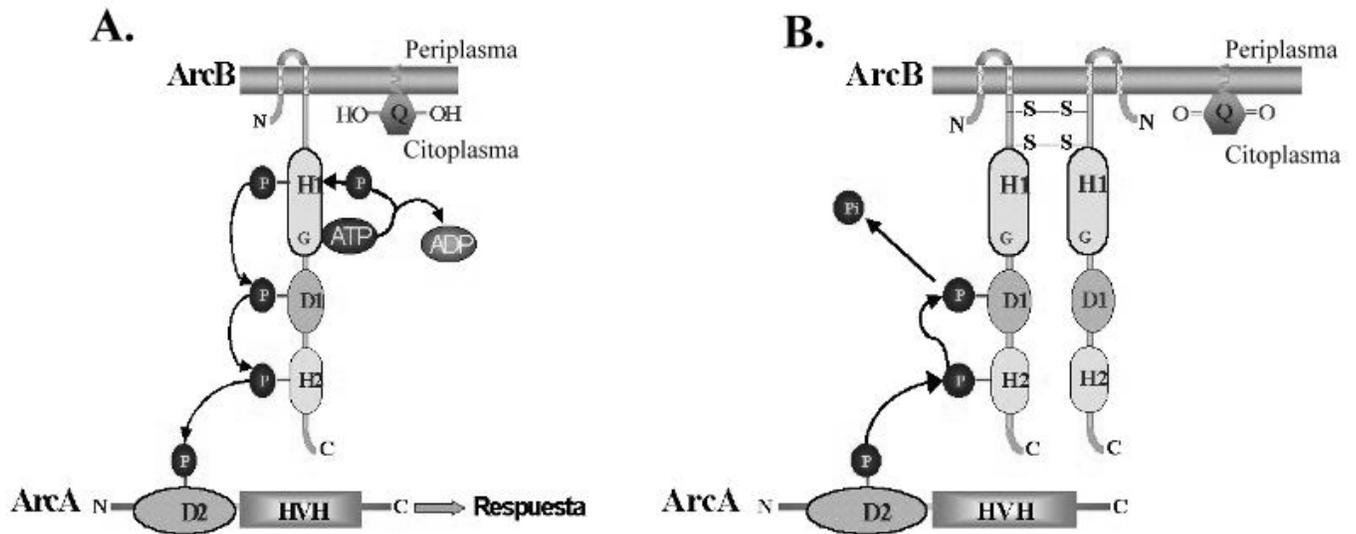
**Fig. 4 .** Componentes del sistema Arc. La cinasa sensora ArcB encargada de la detección de la señal presenta dos segmentos transmembranales (STM) N-terminales que rodean a la región periplásmica de 7 residuos; el dominio transmisor H1 con la His 292 conservada, y con la caja G de unión a ATP; el dominio receptor D1 con el Asp 576 conservado y el segundo dominio transmisor H2 con la His 717 conservada. El regulador de respuesta ArcA muestra su dominio receptor N-terminal con el Asp 54 conservado y el dominio C-terminal hélice - vuelta - hélice (H-V-H) de unión a DNA. (modificado de Georgellis, 1997)

## 2.2. Procesamiento de la señal en el sistema Arc.

La transducción de la señal bajo el estímulo de un cambio en la condición redox de crecimiento, se realiza en la dirección ArcB→ArcA mediante transferencia de grupos fosfato  $\gamma$  del ATP. Bajo condiciones anaeróbicas, ArcB inicia una autofosforilación dependiente de ATP y su función cinasa permite la transfosforilación de ArcA a través de la vía única del fosforelevo His-292→Asp-576→His-717→Asp-54. A su vez ArcA fosforilado (ArcA-P) reprime la expresión de muchos operones involucrados en el metabolismo de respiración y activa unos cuantos operones de metabolismo

fermentativo (Georgellis et al., 1997; Kwon et al., 2000), por otro lado, el decaimiento de la señal en el sistema, ocurre en condiciones aeróbicas. En presencia de oxígeno, ArcB actúa como una fosfatasa específica para ArcA-P catalizando la remoción del grupo fosfato mediante el fosforelevo reverso Asp-54→His-717→Asp-576→Pi (fósforo inorgánico liberado al citoplasma) (Georgellis et al., 1998; Peña-Sandoval et al., 2005). (Fig. 5).

Sin embargo, a pesar de que el cambio en la condición redox de crecimiento parece ser lo que activa al sistema Arc, el oxígeno fue descartado como señal inhibitoria de la función cinasa, debido a que la expresión de un operón anaeróticamente reprimible por el sistema arc (*sdh*), puede aumentar en presencia de otros aceptores alternativos de electrones. Esto significa que el sistema arc no está monitoreando la presencia o ausencia del oxígeno directamente, sino que mas bien está reaccionando al flujo de electrones en la cadena respiratoria, el cual puede ser afectado por el estado redox de las células (Iuchi y Lin, 1988). Se pensó que dentro de la cadena de transporte de electrones debía existir un elemento cuyo balance entre un estado oxidado y otro reducido pudiese ser diferenciado por el sistema Arc. Esta posibilidad quedó evidenciada cuando ambas citocromo oxidasas finales, Cyo y Cyd fueron eliminadas, y se observó una represión de genes aeróbicos aun en presencia de oxígeno (Iuchi et al., 1990). Con la eliminación de Cyo y Cyd, el flujo de electrones se detiene, y el balance redox de este elemento no autooxidable se desplaza hacia un estado reducido simulando anaerobiosis e induciendo así la represión. Un grupo de moléculas pertenecientes a la cadena de transporte de electrones que podía ser



**Fig. 5.** Mecanismo de transducción de señal del sistema Arc. **A.** condición anaeróbica de crecimiento. La actividad de ArcB es de cinasa sobre ArcA. El procesamiento de la señal ocurre mediante el fosforelevo His-292 → Asp-576 → His-717 → Asp-54. A su vez ArcA fosforilado (ArcA-P) reprime la expresión de muchos operones involucrados en metabolismo respiratorio y activa unos cuantos operones de metabolismo fermentativo. **B.** condición aeróbica, ArcB actúa como una fosfatasa específica para ArcA-P que cataliza su desfosforilación mediante el fosforelevo reverso Asp-54 → His-717 → Asp-576 → Pi (fósforo inorgánico liberado al citoplasma).

afectado de este modo por la condición redox de crecimiento, era el de las **quinonas**.

**Coenzima Q, CoQ o Q** son términos que denotan a una familia de componentes de la cadena de transporte de electrones llamados quinonas, estas moléculas están altamente distribuidas en las membranas transductoras de energía de procariontes y eucariontes. Las ubiquinonas, son el principal grupo de quinonas presente en eucariontes y bacterias Gram-negativas cuya función es la de transportar protones a través de la membrana desde el citoplasma hasta el periplasma, en el caso de bacterias, mientras que al mismo tiempo mantienen un flujo de electrones hacia el citocromo *bc* (Perry et al., 2002).

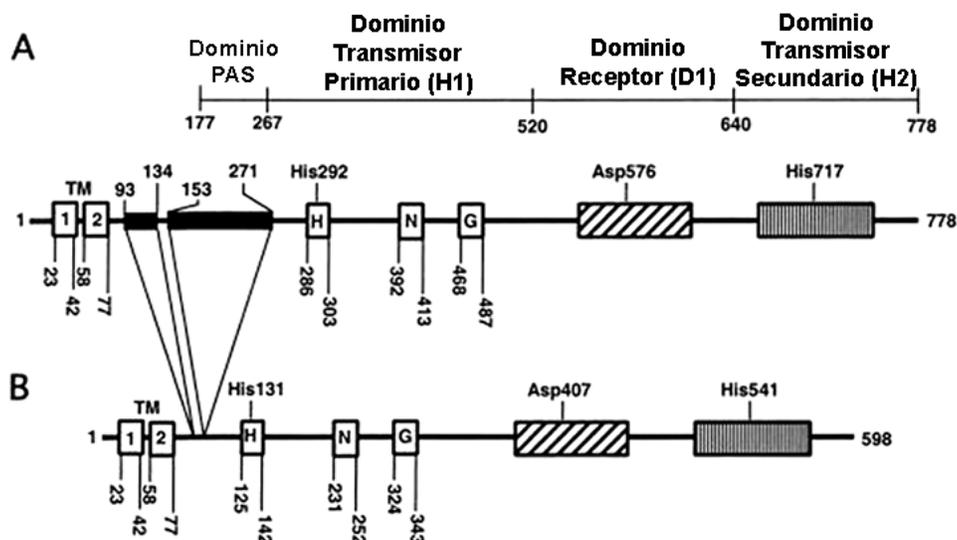
Evidencia experimental mostró que las ubiquinonas en su estado oxidado son capaces de silenciar la actividad cinasa de ArcB durante la aerobiosis (Georgellis et al., 2001). De este modo el estado redox en el ambiente de crecimiento de las células es reflejado de igual modo en el estado redox de las quinonas.

La interacción entre las quinonas y la cinasa sensora ArcB se basa en dos residuos de cisteína conservados (Cys-181 y Cys-241) alojados dentro del dominio PAS de la región de unión de la proteína (el segmento que une la región transmembranal con la región citosólica catalítica). El alineamiento de secuencias de varias cinasas sensoras, ha revelado que la presencia de este par de residuos de cisteína, es exclusiva para el dominio PAS de la cinasa ArcB (Taylor y Zhulin, 1999). Durante el crecimiento anaeróbico, las cisteínas de la región de unión están reducidas, el sistema está activo y la actividad de ArcB es de cinasa; pero en el momento del cambio, al pasar a un ambiente aeróbico, las quinonas proveen el poder oxidante necesario para formar un puente disulfuro entre dichos residuos, se ensambla un homodímero de dos proteínas y cesa la actividad cinasa de ArcB para entrar en una actividad fosfatasa sobre ArcA-P y comenzar con el decaimiento de la señal (Malpica et al., 2004).

### **2.3. Diferencias Entre ArcB de *E. coli* y *H. influenzae*.**

La importancia del sistema Arc para el control y regulación del metabolismo energético basada en las condiciones de oxido reducción del medio parece ser grande, ya que su presencia en diversos grupos de bacterias Gram-negativas así lo demuestra. La búsqueda en acervos genómicos de dichas especies ha revelado la presencia de proteínas homólogas con altos grados de identidad a ArcB de *E. coli* en *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica*, *Yersinia pestis* y *Haemophilus influenzae*. Sin embargo, el marco de lectura del gen *arcB* de *H. influenzae* (*arcB<sub>Hi</sub>*) muestra la ausencia de la región de unión (**Fig.6**), la secuencia de la proteína ArcB<sub>Hi</sub> muestra que contiene 598 residuos de aminoácido con dos cruces transmembranales en el extremo N-terminal, una porción periplásmica muy pequeña (8 residuos), un dominio transmisor, un dominio receptor y un dominio transmisor secundario en la región citoplásmica C-terminal de la molécula. Así mismo la ausencia de 163 residuos entre la parte transmembranal y el primer dominio transmisor, denota la carencia de la región de unión. ArcB<sub>Hi</sub> no presenta las regiones correspondientes a los aminoácidos 93 a 134 y del 153 al 271 de ArcB de *E. coli*. La sección comprendida

del aminoácido 153 al 271 de ArcB de *E. coli* contiene al dominio PAS y a las cisteínas conservadas Cys-181 y Cys-241 (Manukhov et al., 2000; Georgellis et al., 2001).



**Fig. 6.** Comparación esquemática de la cinasa sensora arcB. (A) proteína de *E. coli*; (B) proteína de *H. influenzae*. La región de Unión de la proteína de *E. coli* (residuos 78 a 267) contiene un dominio PAS (residuos 177 a 267). Las cajas negras representan las secuencias ausentes en ArcB de *H. influenzae*. El resto de los módulos catalíticos están conservados. (modificado de Georgellis 2001)

Los dominios PAS son módulos involucrados en señalización que generalmente se encuentran en las porciones citosólicas de las proteínas señalizadoras a las que pertenecen. Su función es la de monitorear cambios en la luz, potencial redox, oxígeno y pequeños ligandos.

Estos dominios han sido identificados en proteínas de organismos tanto eucariontes como procariontes. Están presentes en quimiorreceptores, fotoreceptores, proteínas de control del ciclo circadiano, cinasas sensoras de histidina o de serina/treonina, e incluso están involucrados en el desarrollo embriológico del sistema nervioso.

La versatilidad de los dominios PAS se debe a que se encuentran en combinación con las regiones reguladoras de múltiples proteínas señalizadoras; de este modo es posible disponer de una amplia gama de respuestas a diversas condiciones ambientales e intracelulares mediadas por sistemas donde estos dominios están presentes.

El término PAS se refiere a las iniciales de aquellas proteínas donde la secuencia de dicho dominio fue encontrada por primera vez: la proteína de reloj de *Drosophila* (PER), el translocador nuclear receptor de aril hidrocarburos en vertebrados (ARNT) y la proteína SIM de *Drosophila* (Taylor y Zhulin, 1999).

Para la cinasa sensora ArcB de *E. coli* el dominio PAS contiene los residuos de cisteína claves para el monitoreo de la condición redox de crecimiento; la presencia o ausencia de oxígeno en el medio, es estimada indirectamente mediante el estado redox de las quinonas. En condiciones aeróbicas las quinonas oxidadas promueven la formación de puentes disulfuro entre dos monómeros de la proteína ArcB inhibiendo así su actividad cinasa, mientras que en condiciones anaeróbicas, las quinonas están reducidas y los puentes disulfuro se rompen para reanudar nuevamente la actividad cinasa de ArcB.

Sin embargo como ya se mencionó con anterioridad, la mayoría de los homólogos de la cinasa sensora ArcB en diversas especies de bacterias Gram-negativas presenta un dominio PAS con el par de residuos de cisteína conservados claves en la región de unión; la mayoría, excepto *Haemophilus influenzae*. En el caso particular de ArcB<sub>Hi</sub> se presentan 5 residuos de cisteína a lo largo de toda la proteína, localizados en las posiciones 47, 268, 472 574 y 596 (Malpica et al., 2004).

### **3. Hipótesis y Objetivos.**

Se ha observado que el par de residuos de cisteína conservado dentro del dominio PAS de ArcB<sub>Ec</sub>, es importante para el funcionamiento del sistema; estos residuos están también presentes en los diferentes homólogos de dicha proteína, sin embargo ArcB<sub>Hi</sub> presenta un arreglo y número diferente de estos residuos, por lo tanto es posible pensar que el comportamiento en la transducción de la señal de esta proteína sea diferente en cuanto a: el monitoreo de la condición redox de crecimiento, el papel de los residuos de cisteína en el procesamiento de la señal, y su relación con los metabolitos presentes durante el crecimiento anaeróbico.

El objetivo del presente trabajo es encontrar diferencias en el funcionamiento de ambas cinasas sensoras (ArcB<sub>Ec</sub> y ArcB<sub>Hi</sub>) mediante cambios en la expresión del gen reportero *cyd* regulado por el sistema Arc, bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas de crecimiento, en presencia o ausencia de un agente reductor y en presencia o ausencia de un factor potenciador de la transducción de la señal.

#### 4. Materiales y Métodos.

**Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento.** Se utilizaron la cepa ECL 5004 de *E. coli* con genotipo  $\Delta fnr::Tn9$  ( $Cm^r$ ),  $\Delta arcB::Tet^r$  y  $\Phi(cyd-lacZ)$  como reportero y la cepa 83  $\Delta fnr::Tet^r$ ,  $ArcB$  wt con  $\Phi(cyd-lacZ)$  como control silvestre, para los ensayos *in vivo* de  $\beta$ -Galactosidasa; y la cepa JM101 de *E. coli* para la construcción del vector de expresión pMX501. El crecimiento rutinario de las células fue hecho en medio de cultivo preparado Luria-Bertani (LB) a una concentración final de 20 g/l y en placas de LB con 15 g/l de agar a una temperatura constante de 37 °C. Los antibióticos ampicilina, tetraciclina, kanamicina y cloranfenicol fueron adicionados a una concentración final de 100, 20, 50 y 25  $\mu$ g/ml respectivamente. La cepa ECL 5004 fue transformada con los vectores pBB31  $arcB_{Ec}$ , pBR322  $arcB_{Hi}$  y pMX501  $arcB_{Hi}$  para generar la cepa IFC 500 con genotipo  $\Delta fnr::Tn9$  ( $Cm^r$ ),  $\Delta arcB::Tet^r$ ,  $\Phi(cyd-lacZ)$  / pBB31  $arcB_{Ec}$   $Amp^r$  como control de plásmido, la cepa IFC 501 con genotipo  $\Delta fnr::Tn9$  ( $Cm^r$ ),  $\Delta arcB::Tet^r$ ,  $\Phi(cyd-lacZ)$  / pBR322  $arcB_{Hi}$   $Amp^r$  como experimental #1 y la cepa IFC 502 con genotipo  $\Delta fnr::Tn9$  ( $Cm^r$ ),  $\Delta arcB::Tet^r$ ,  $\Phi(cyd-lacZ)$  / pMX501  $arcB_{Hi}$   $Kn^r$  como experimental #2. La transformación fue realizada mediante choque térmico a 42 °C durante 30 seg en células competentes previamente tratadas con la solución TSS (LB 85%, Polietilenglicol 10 %, Dimetilsulfóxido 5% y  $MgCl_2$  50mM) (Chung et al., 1989).

Para los ensayos de  $\beta$ -Galactosidasa, las cepas con la fusión  $\Phi(cyd-lacZ)$  fueron cultivadas en LB amortiguado con 0.1 M final de ácido morfolinpropanosulfónico (MOPS) a pH 7.4 y adicionado con 20 mM final de D-xilosa.

**Construcción del vector de expresión pMX501  $arcB_{Hi}$ .** El vector pMX501  $arcB_{Hi}$  fue construido a partir del vector vacío pEXT 22 monocopia (6 Kb,  $Kn^r$ ) (Dykxhoorn et al., 1996) al cual le fue integrado un fragmento de 2.2 Kb correspondiente con el gen  $arcB_{Hi}$ . Este fragmento fue extraído del vector pBR322  $arcB_{Hi}$  mediante digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* y ligado al vector vacío pEXT 22 después de una digestión con la misma combinación de enzimas de restricción.

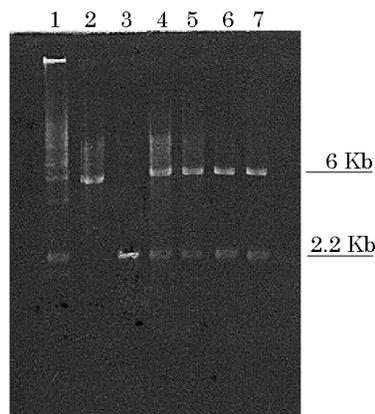
La ligación fue transformada en la cepa de *E. coli* JM101 usando el método de transformación TB, un choque térmico a 42 °C durante 30 seg después de un tratamiento con el buffer TB, preparado con 10 mM PIPES, 55 mM  $MnCl_2$ , 15 mM  $CaCl_2$  y 250 mM KCl, todos los componentes excepto por el  $MnCl_2$  fueron mezclados y el pH ajustado a 6.7 con KOH. Entonces, el  $MnCl_2$  fue disuelto, la solución se esteriliza por filtración y se almacena a 4 °C. Todas las sales se agregan como sólidos (Inoue et al., 1990). Las nuevas transformantes fueron seleccionadas mediante resistencia a kanamicina; una vez obtenidas fueron sembradas en una placa de LB agar nueva en presencia del mismo antibiótico. De una colonia transformante recuperada se realizó la extracción (miniprep por lisis alcalina) de la construcción para confirmarse mediante digestión analítica.

**Ensayos de  $\beta$ -Galactosidasa.** Para observar la regulación del gen *cyd* por parte del sistema Arc, se empleó una fusión transcripcional  $\Phi(\textit{cyd-lacZ})$  compuesta por el promotor del gen *cyd* que codifica para la citocromo oxidasa *d* y la secuencia codificante del gen *lacZ* que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa, en este trabajo se hará referencia a esta fusión transcripcional como gen reportero *cyd*. Los ensayos para determinar la actividad del gen reportero *cyd*, fueron realizados tomando un solo punto del crecimiento y en forma de cinéticas o curvas de actividad. En los experimentos aeróbicos o anaeróbicos, ambos modos de cultivo fueron iniciados simultáneamente, el cultivo aeróbico se hizo en matraces Erlenmeyer de 250 ml modificados con aspas en el fondo con un volumen de 15 ml por cada matraz y el cultivo anaeróbico fue colocado en viales cerrados con tapa de rosca de 5ml cada uno, el volumen para los cultivos anaeróbicos fue tomado directamente de cada matraz aeróbico correspondiente. Los matraces aeróbicos fueron puestos en agitación a 250 rpm y los viales anaeróbicos en una parrilla magnética de agitación. Todos los cultivos se mantuvieron a una temperatura constante de 37 °C. Una vez que se alcanza una densidad óptica de entre 0.4 a 0.5 a una longitud de onda de 600 nm, las células fueron cosechadas para ejecutar el ensayo.

Para realizar los experimentos de cinética de actividad bajo agente reductor, los cultivos fueron crecidos aeróbicamente en matraces Erlenmeyer de 250 ml modificados a una temperatura constante de 37 °C, con una agitación de 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica aproximada de 0.2 a una longitud de onda de 600 nm, en este punto se permitió crecer a las células durante un lapso de 20 min, el final de este tiempo se tomó como el minuto 0 de la curva en el cual el cultivo aeróbico fue dividido en dos condiciones, un control aeróbico y un cultivo experimental tratado con ditionitroto (DTT) a una concentración final de 10 mM. El seguimiento de la curva se realizó a intervalos de 20 minutos durante 1 hora con 20 min, al final se ejecuto el ensayo en todas las muestras tomadas a lo largo de la curva.

Los experimentos del factor potenciador con D-Lactato como tratamiento, fueron realizados en cultivos crecidos aeróbicamente como se describió para el experimento con agente reductor. Una vez alcanzada la densidad óptica de 0.2 a una longitud de onda de 600 nm, cada cultivo fue dividido en 4 condiciones: un control sin tratamiento, 5 mM final de DTT para inducir la actividad del sistema en crecimiento aeróbico, 10 mM final de D-Lactato para corroborar que por sí mismo este metabolito no es capaz de inducir una respuesta del sistema, y finalmente la mezcla de ambos tratamientos. Después de 30 minutos de crecimiento, las células fueron cosechadas para ejecutar el ensayo. Cave mencionar que en este experimento, se redujo la concentración final de DTT a 5 mM para poder observar claramente la diferencia entre este tratamiento y el tratamiento de DTT + D-Lactato.

La actividad de  $\beta$ -Galactosidasa para todos los experimentos se ensayó como fue previamente descrito (Miller, 1972). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.



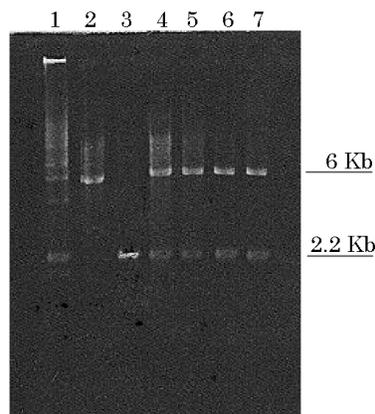
**Fig.7.** Digestión analítica del vector pMX501 *arcB<sub>Hi</sub>*. Carril #1, marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII*; carril #2, vector vacío pEXT 22 de 6 Kb; carril #3, inserto de 2.2 Kb del gen *arcB<sub>Hi</sub>*; carriles 4 al 7, digestión analítica *EcoRI* y *BamHI* de 4 colonias transformantes de la cepa JM101.

## 5. Resultados.

**Construcción del vector de expresión pMX501.** El vector de expresión monocopia pEXT 22 recibió un inserto de 2.2 Kb correspondiente con el gen *arcB* de *Haemophilus influenzae* (*arcB<sub>Hi</sub>*) extraído del vector pBR322 *arcB<sub>Hi</sub>*. La clonación se realizó en los sitios de restricción *EcoRI* y *BamHI*. Debido a su bajo número de copias, el vector pEXT 22 fue usado en esta construcción para tratar de observar una respuesta lo mas clara posible en la transducción de la señal de la cinasa ArcB<sub>Hi</sub>. Después de la transformación en la cepa JM101, diversas colonias fueron sembradas en medio líquido para realizar una extracción del plásmido junto con una digestión analítica y comprobar la correcta inserción del fragmento en el vector vacío. La digestión analítica reveló una banda con el peso correspondiente al vector vacío pEXT 22 de 6 Kb y una banda mas pequeña en el mismo carril correspondiente al fragmento de 2.2 Kb del gen *arcB<sub>Hi</sub>* (**Fig. 7**).

**Actividad aeróbica o anaeróbica.** En esta prueba se observó la capacidad de ambas cinasas sensoras para monitorear y responder a la condición redox de crecimiento. Como se mencionó en los materiales y métodos, ambos cultivos, tanto el aeróbico como el anaeróbico fueron iniciados al mismo tiempo. En todos los casos se observa la inducción anaeróbica del gen reportero *cyd* contrastando con los niveles de expresión basal aeróbicos (**Fig. 8**), 5 veces mas alto en la cepa silvestre 83, 4 veces en la cepa 5004 transformada con pBB31 *arcB<sub>Ec</sub>*, 3 veces en la cepa 5004 transformada con pBR322 *arcB<sub>Hi</sub>* y 4 veces en la cepa 5004 transformada con pMX501 *arcB<sub>Hi</sub>*.

**Actividad en presencia de un agente reductor.** Este experimento de actividad se realizó al dividir los cultivos para añadir un tratamiento con un agente reductor permeable a las membranas celulares, el ditioneitol (DTT). El DTT fue agregado a cada uno de los cultivos en el minuto 0 de la curva a una concentración final de 10 mM. La evidencia experimental previa (Rodríguez et al., 2004), mostró



**Fig.7.** Digestión analítica del vector pMX501 *arcB<sub>Hi</sub>*. Carril #1, marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII*; carril #2, vector vacío pEXT 22 de 6 Kb; carril #3, inserto de 2.2 Kb del gen *arcB<sub>Hi</sub>*; carriles 4 al 7, digestión analítica *EcoRI* y *BamHI* de 4 colonias transformantes de la cepa JM101.

## 5. Resultados.

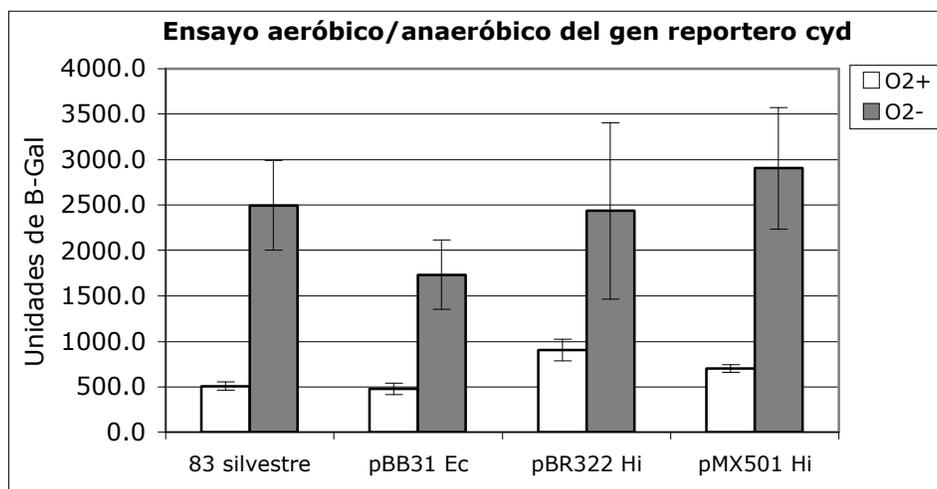
**Construcción del vector de expresión pMX501.** El vector de expresión monocopia pEXT 22 recibió un inserto de 2.2 Kb correspondiente con el gen *arcB* de *Haemophilus influenzae* (*arcB<sub>Hi</sub>*) extraído del vector pBR322 *arcB<sub>Hi</sub>*. La clonación se realizó en los sitios de restricción *EcoRI* y *BamHI*. Debido a su bajo número de copias, el vector pEXT 22 fue usado en esta construcción para tratar de observar una respuesta lo mas clara posible en la transducción de la señal de la cinasa ArcB<sub>Hi</sub>. Después de la transformación en la cepa JM101, diversas colonias fueron sembradas en medio líquido para realizar una extracción del plásmido junto con una digestión analítica y comprobar la correcta inserción del fragmento en el vector vacío. La digestión analítica reveló una banda con el peso correspondiente al vector vacío pEXT 22 de 6 Kb y una banda mas pequeña en el mismo carril correspondiente al fragmento de 2.2 Kb del gen *arcB<sub>Hi</sub>* (**Fig. 7**).

**Actividad aeróbica o anaeróbica.** En esta prueba se observó la capacidad de ambas cinasas sensoras para monitorear y responder a la condición redox de crecimiento. Como se mencionó en los materiales y métodos, ambos cultivos, tanto el aeróbico como el anaeróbico fueron iniciados al mismo tiempo. En todos los casos se observa la inducción anaeróbica del gen reportero *cyd* contrastando con los niveles de expresión basal aeróbicos (**Fig. 8**), 5 veces mas alto en la cepa silvestre 83, 4 veces en la cepa 5004 transformada con pBB31 *arcB<sub>Ec</sub>*, 3 veces en la cepa 5004 transformada con pBR322 *arcB<sub>Hi</sub>* y 4 veces en la cepa 5004 transformada con pMX501 *arcB<sub>Hi</sub>*.

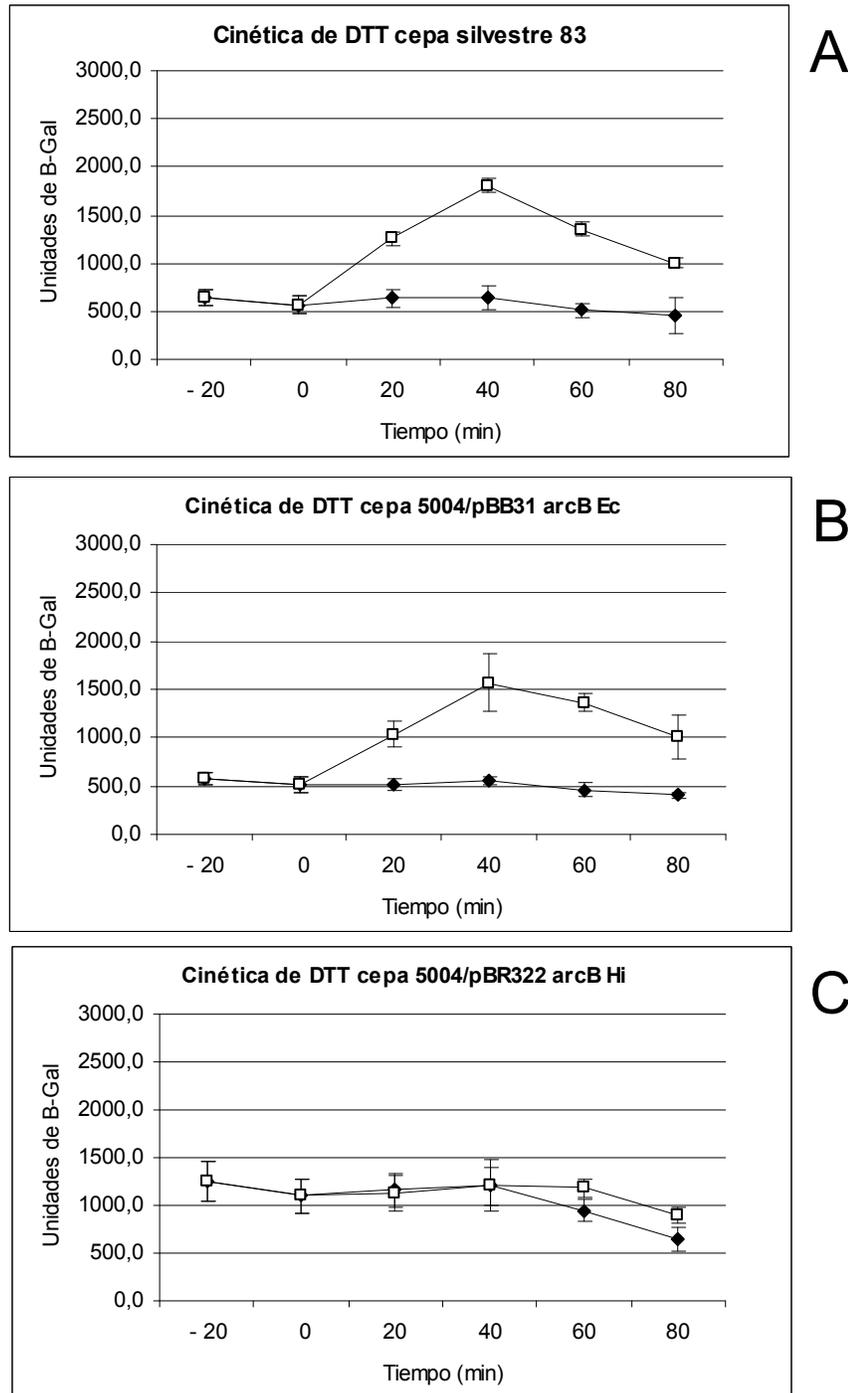
**Actividad en presencia de un agente reductor.** Este experimento de actividad se realizó al dividir los cultivos para añadir un tratamiento con un agente reductor permeable a las membranas celulares, el ditioneitol (DTT). El DTT fue agregado a cada uno de los cultivos en el minuto 0 de la curva a una concentración final de 10 mM. La evidencia experimental previa (Rodríguez et al., 2004), mostró

que el DTT es capaz de activar al sistema Arc de *E. coli* aun en condiciones aeróbicas de crecimiento, este mismo efecto se observó en los cultivos de la cepa silvestre 83 (**Fig. 9.A**) y de la cepa 5004 transformada con el vector pBB31 *arcB<sub>Ec</sub>* (**Fig. 9.B**), pero el cultivo de la cepa 5004 transformada con el vector pBR322 *arcB<sub>Hi</sub>* tratado con DTT, no mostró ningún cambio significativo frente al mismo cultivo que no estaba tratado (**Fig. 9.C**).

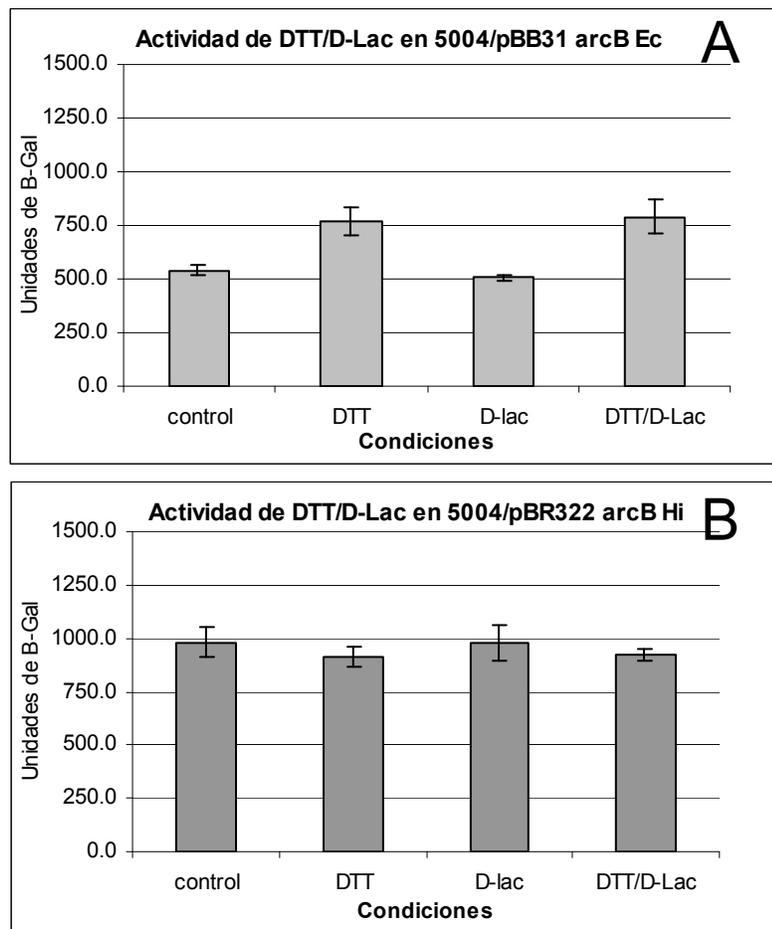
**Actividad en presencia de agente reductor y factor potenciador.** En esta serie de experimentos se observó la capacidad del metabolito D-Lactato como factor potenciador de la señal. Igualmente las actividades de todas las cepas fueron tomadas a un solo punto del crecimiento de diferentes cultivos divididos en los cuales fueron probados 4 diferentes tratamientos: un control sin tratamiento, 5 mM DTT, 10 mM D-Lactato y DTT con D-Lactato. Como ha sido mencionado con anterioridad, la activación del sistema es dependiente de la concentración del DTT (Rodríguez et al., 2004). En el caso de la cepa 5004 transformada con el vector pBB31 *arcB<sub>Ec</sub>* se observó actividad en DTT, sin actividad en D-Lactato y actividad en presencia de ambos (**Fig. 10.A**). Por otro lado la cepa 5004 transformada con pBR322 *arcB<sub>Hi</sub>* mostró actividades altas en todos los tratamientos, pero sin diferencia significativa entre ellos (**Fig. 10.B**).



**Fig. 8.** Actividad aeróbico / anaeróbico del gen reportero *cyd* en la cepa silvestre 83 y en la cepa 5004 transformada con los vectores pBB31 *arcB<sub>Ec</sub>*, pBR322 *arcB<sub>Hi</sub>* y pMX501 *arcB<sub>Hi</sub>*. Ensayo a un solo punto de actividad aeróbica en barras blancas y actividad anaeróbica en barras grises.



**Fig. 9.** Cinéticas de actividad en presencia de DTT como agente reductor. Tanto la cepa silvestre 83 (panel A) como la cepa 5004/pBB31 *arcB*<sub>Ec</sub> (panel B) presentan activación aeróbica del sistema, pero la cepa 5004/pBR322 *arcB*<sub>Hi</sub> (panel C) no muestra un cambio significativo en su actividad. Estas cinéticas fueron hechas en cultivos divididos, sin tratamiento (◆) y tratados con 10 mM de DTT (□) durante 80 min.



**Fig. 10.** Actividad a un solo punto en presencia de DTT y D-Lactato. Cada cultivo fue dividido en cuatro condiciones: control sin tratamiento, DTT 5mM, D-Lactato 10 mM y una mezcla de ambos. Los cultivos fueron incubados durante 30 min. Panel A, cepa 5004 transformada con vector pBB31 *arcB<sub>Ec</sub>* y panel B, cepa 5004 transformada con vector pBR322 *arcB<sub>Hi</sub>*.

## 6. Discusión.

La comparación de algunos genomas bacterianos reveló la presencia de secuencias con altos niveles de identidad a ArcB de *E. coli* en *Salmonella enterica* (92%), *Yersinia pestis* (83%), *Vibrio cholerae* (74%), y *Haemophilus influenzae* (69%). Sin embargo la secuencia predicha para *H. influenzae* carece de la región previamente descrita para *E. coli* como dominio de unión o región “Linker”. Actualmente se sabe que el dominio PAS dentro de la región de unión contiene un par de residuos de cisteína altamente conservados en diversos homólogos de ArcB, directamente involucrados en el monitoreo de la señal. La diferencia estructural en cuanto al número y arreglo de los residuos de cisteína en el homólogo ArcB de *H. influenzae* nos hizo pensar en la posibilidad de que existieran diferencias también en su comportamiento de transducción de señal.

Experimentos previamente realizados (Manukhov et al., 2000; Georgellis et al., 2001), mostraron que ArcB<sub>Hi</sub> puede participar en eventos de transfosforilación *in vitro* con ArcA de *E. coli*, y que además es capaz de complementar una mutación en el gen *arcB<sub>Ec</sub>* recuperando el fenotipo silvestre durante pruebas de actividad *in vivo* (ensayos de β-Gal.) con el gen reportero *lldP* correspondiente a la L-lactato permeasa y con el gen reportero *sdh* correspondiente a la succinato deshidrogenasa (ambos regulados negativamente cuando el sistema está activo). Esta evidencia dio pauta para proponer una serie de experimentos con otro gen reportero: el gen *cyd* correspondiente con la citocromo oxidasa *d*, el cual es regulado positivamente cuando el sistema Arc está activo.

El primer paso fue observar el comportamiento de ambas cinasas durante el crecimiento en los dos ambientes redox. Se determinó que tanto la cepa silvestre 83 como la cepa 5004/pBB31 *arcB<sub>Ec</sub>* mostraron una expresión basal de *cyd* durante el crecimiento aeróbico. El sistema está inactivo y no hay función cinasa. Por otro lado, en la condición anaeróbica los niveles de expresión de *cyd* fueron mucho más altos en la cepa silvestre que en aquellas cepas complementadas con los plásmidos pBB31 *arcB<sub>Ec</sub>*, pBR322 *arcB<sub>Hi</sub>* y pMX501 *arcB<sub>Hi</sub>* (**Fig. 8**).

Por otro lado, la cepa 5004 transformada con el vector pBR322 *arcB<sub>Hi</sub>* muestra un nivel de expresión de *cyd* aeróbico casi dos veces mayor que en el control silvestre y que en la cepa 5004/pBB31 *arcB<sub>Ec</sub>*. También se observó un efecto similar en la cepa 5004/pMX501 *arcB<sub>Hi</sub>* aunque en menor medida, posiblemente debido a que este vector es sólo de una copia. Ambos efectos son reproducibles. Este efecto parece mostrar una parcial actividad cinasa aeróbica en ArcB<sub>Hi</sub> (**Fig.8**).

De igual modo como era de esperarse (Manukhov et al., 2000), ambas cinasas tanto ArcB de *E. coli* como de *H. influenzae* muestran regulación anaeróbica positiva del gen reportero *cyd* en mayor o menor grado. Ambos sistemas están activos y presentan la función cinasa.

Habiendo observado que la cinasa sensora ArcB de *H. influenzae* responde al crecimiento en un ambiente anaeróbico, se procedió a realizar experimentos para determinar si la cinasa ArcB<sub>Hi</sub> monitorea el

ambiente redox de crecimiento de la misma manera que la cinasa ArcB<sub>Ec</sub>. Evidencia experimental (Malpica et al., 2004) ha mostrado que el par de cisteínas conservadas dentro del dominio PAS en la región de unión de ArcB de *E. coli* es esencial para el correcto funcionamiento del sistema. Durante el crecimiento anaeróbico, estos residuos son reducidos y el sistema se activa, por lo tanto si fuese posible reducir dichos residuos durante el crecimiento aeróbico, entonces sería posible inducir la función cinasa. Esta inducción se logra mediante un agente reductor permeable a membranas: el ditioneitol (DTT). La intensidad de la inducción es dependiente de la concentración de DTT, pero mas alla de 20 mM se vuelve letal para las células.

De este modo se plantearon las cinéticas de actividad en presencia y ausencia de DTT, las cuales determinaron que tanto la cepa silvestre 83 como la cepa 5004/pBB31 *arcB<sub>Ec</sub>* mostraban una inducción aeróbica del gen reportero 20 min después de la adición del tratamiento con DTT (**Figs. 9.A y 9.B**), lo cual significa que los residuos de cisteína dentro del dominio PAS de ArcB<sub>Ec</sub> fueron reducidos activando así al sistema. Por otro lado la cepa 5004/pBR322 *arcB<sub>Hi</sub>* no muestra ninguna respuesta ante el tratamiento con DTT (**Fig. 9.C**), no hubo inducción aeróbica del gen reportero. Este resultado sugiere que los residuos de cisteína dentro de la cinasa ArcB<sub>Hi</sub> no están precisamente involucrados en la activación del sistema como ocurre en el caso de *E. coli*. Esta característica sugiere que la cinasa ArcB<sub>Hi</sub> monitorea la condición redox de crecimiento de un modo desconocido hasta ahora.

Si la reducción de los residuos de cisteína no está involucrada en el funcionamiento de la cinasa sensora ArcB<sub>Hi</sub>, entonces posiblemente un metabolito anaeróbico sea la clave para la activación del sistema. Como fue previamente observado (Rodríguez et al., 2004), el D-Lactato tiene un efecto potenciador de la señal sobre ArcB<sub>Ec</sub>. En condiciones anaeróbicas, el aceptor alternativo de electrones al final de la cadena respiratoria es el piruvato, el cual es reducido a lactato. Este componente reafirma la condición anaeróbica de crecimiento. Con esta evidencia se diseñó un experimento que involucrara al factor potenciador D-Lactato como posible inductor.

La inducción aeróbica del gen reportero *cyd* mediante reducción de ArcB<sub>Ec</sub> por DTT en la cepa 5004/pBB31 ArcB<sub>Ec</sub>, se observa claramente (**Fig. 10.A**). Del mismo modo, tampoco el D-Lactato por si mismo muestra inducción del gen reportero. Sin embargo la combinación de ambos tratamientos no muestra el efecto potenciador previamente reportado, lo que significa que el DTT está actuando reduciendo a ArcB<sub>Ec</sub>, pero el D-Lactato no esta ejerciendo su efecto. Ninguna de las repeticiones de este experimento fue capaz de reproducir el efecto potenciador del D-Lactato como ya había sido previamente reportado (Rodríguez et al., 2004).

Por otro lado, ArcB<sub>Hi</sub> no muestra ninguna diferencia significativa entre el control y los tratamientos (**Fig. 10.B**). Esto concuerda con la evidencia obtenida del experimento anterior de inducción con DTT, el agente reductor no inicia la actividad cinasa.

Entre otros detalles, una característica que permaneció constante en todos los experimentos de este estudio, es la alta actividad aeróbica de la cinasa ArcB<sub>Hi</sub> *per se*, (**Figs. 8, 9.C y 10.B**) la cual es casi el doble de la actividad basal de ArcB<sub>Ec</sub>. Esta evidencia sugiere una actividad cinasa parcial.

## 7. Conclusión.

Con esta serie de tres experimentos, se han encontrado diferencias en el comportamiento de transducción de la señal de ambas cinasas sensoras, ArcB<sub>Ec</sub> y ArcB<sub>Hi</sub>.

En el primer acercamiento, durante el crecimiento aeróbico o anaeróbico se observa una evidente inducción anaeróbica del gen reportero *cyd* por parte de ambas cinasas sensoras, lo cual indica que ArcB<sub>Hi</sub> es capaz de complementar una mutación en el gen *arcB* cromosomal de *E. coli* recuperando así el fenotipo silvestre de una manera funcional. También se observa que el número de copias del vector con el gen *arcB<sub>Hi</sub>* usado para complementar la mutación, no influye de manera significativa en el mecanismo de la transducción de la señal por la cinasa sensora ArcB<sub>Hi</sub> durante la anaerobiosis. Por otro lado, también en este primer acercamiento pudimos observar un ligero aumento en la expresión aeróbica del gen reportero *cyd* por parte de las construcciones con *arcB<sub>Hi</sub>*, este efecto parece sugerir la presencia de actividad cinasa durante el crecimiento aeróbico, sin embargo bajo el supuesto de que esta actividad cinasa aeróbica fuera real y no alguna clase de artefacto, sería necesaria la realización de otros experimentos encaminados a la búsqueda de evidencia que apoyara tal efecto.

En el segundo experimento, la cinética con agente reductor, se observa que ArcB<sub>Hi</sub> es resistente al tratamiento con DTT, lo cual sugiere que esta cinasa sensora esta monitoreando el ambiente redox de crecimiento de un modo aun no descrito, diferente al de ArcB<sub>Ec</sub>.

Finalmente en el ultimo experimento, con agente potenciador, se observa el efecto del tratamiento con DTT sobre ArcB<sub>Ec</sub>, pero fue imposible reproducir el efecto potenciador del D-Lactato. En el caso de ArcB<sub>Hi</sub>, observamos que ninguno de los dos tratamientos tuvo efecto alguno sobre la actividad del gen reportero.

La evidencia que ofrece este último experimento no es del todo determinante, se confirma el hecho de que el DTT no tiene ningún efecto sobre la proteína ArcB<sub>Hi</sub>, pero en vista de que el D-Lactato tampoco tuvo efecto ni siquiera sobre el control ArcB<sub>Ec</sub>, es imposible sostener una conclusión al respecto. La alternativa es buscar otro diseño experimental que logre reproducir el efecto potenciador para ArcB<sub>Ec</sub> y aplicarlo del mismo modo con ArcB<sub>Hi</sub>.

Otro punto importante es averiguar cual es el modo en que ArcB<sub>Hi</sub> monitorea el ambiente redox de crecimiento de la célula. Para ello será necesario aislar a la cinasa y realizar experimentos *in vitro* con distintos tratamientos de agentes oxidantes y reductores, mutaciones dirigidas a los diferentes residuos de cisteína, e inclusive un tratamiento de alquilación para verificar el papel de dichos residuos en el plegamiento de la proteína o en su mecanismo de señalización.

## ***Bibliografía.***

- Black, J. G. (2002). Microbiology. Principles and Explorations, John Wiley & Sons, Inc.
- Chung, T. C., S. L. Niemela and R. H. Miller (1989). "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution." PNAS **86**: 2172 - 2175.
- Dykxhoorn, D. M., R. St. Pierre and T. Linn (1996). "A set of compatible *tac* promoter expression vectors." GENE **177**: 133 - 136.
- Georgellis, D., O. Kwon, P. De Wulf and E. C. Lin (1998). "Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system." J Biol Chem **273**(49): 32864-9.
- Georgellis, D., O. Kwon and E. C. Lin (2001). "Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria." Science **292**(5525): 2314-6.
- Georgellis, D., O. Kwon, E. C. Lin, S. M. Wong and B. J. Akerley (2001). "Redox signal transduction by the ArcB sensor kinase of *Haemophilus influenzae* lacking the PAS domain." J Bacteriol **183**(24): 7206-12.
- Georgellis, D., A. S. Lynch and E. C. Lin (1997). "*In vitro* phosphorylation study of the arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*." J Bacteriol **179**(17): 5429-35.
- Goudreau, P. N. and A. M. Stock (1998). "Signal transduction in bacteria: molecular mechanisms of stimulus-response coupling." Current Opinion in Microbiology **1**(2): 160-169.
- Hoch, J. A. and T. J. Silhavy (1995). Two-component signal transduction. Washington D. C., ASM Press.
- Inoue, H., H. Nojima and H. Okajama (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." GENE **96**: 23 - 28.
- Ishige, K., S. Nagasawa, S. Tokishita and T. Mizuno (1994). "A novel device of bacterial signal transducers." Embo J **13**(21): 5195-202.
- Iuchi, S., D. C. Cameron and E. C. C. Lin (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., V. Chepuri, H. A. Fu, R. B. Gennis and E. C. Lin (1990). "Requirement for terminal cytochromes in generation of the aerobic signal for the arc regulatory system in *Escherichia coli*: study utilizing deletions and lac fusions of *cyo* and *cyd*." J Bacteriol **172**(10): 6020-5.
- Iuchi, S. and E. C. Lin (1988). "*arcA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways." PNAS **85**: 1888 - 1892.
- Iuchi, S. and E. C. Lin (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**(12): 3972-80.
- Iuchi, S. and E. C. C. Lin (1992). "Purification and Phosphorylation of the Arc Regulatory Components of *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology **174**(17): 5617 - 5623.
- Iuchi, S., Z. Matsuda, T. Fujiwara and E. C. Lin (1990). "The *arcB* gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the arc modulon." Mol Microbiol **4**(5): 715-27.
- Jacob, F. and J. Monod (1961). "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins." J Mol Biol **3**: 318-56.
- Kwon, O., D. Georgellis and E. C. Lin (2000). "Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the Arc two-component system of *Escherichia coli*." J Bacteriol **182**(13): 3858-62.

- Kwon, O., D. Georgellis, A. S. Lynch, D. Boyd and E. C. Lin (2000). "The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region." J Bacteriol **182**(10): 2960-6.
- Liu, X. and P. De Wulf (2004). "Probing the ArcA-P modulon of *Escherichia coli* by whole genome transcriptional analysis and sequence recognition profiling." J Biol Chem **279**(13): 12588-97.
- Magasanik, B. (1995). Historical Perspective. Two-Component Signal Transduction. J. A. H. a. T. J. Silhavy.
- Malpica, R., B. Franco, C. Rodriguez, O. Kwon and D. Georgellis (2004). "Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13318-23.
- Manukhov, I. V., Y. V. Bertsova, D. Y. Trofimov, A. V. Bogachev and V. P. Skulachev (2000). "Analysis of HI0220 protein from *Haemophilus influenzae*, a novel structural and functional analog of ArcB protein from *Escherichia coli*." Biochemistry (Moscow) **65**(11): 1321-6.
- Melville, S. B. and R. P. Gunsalus (1996). "Isolation of an Oxygen-sensitive FNR protein of *Escherichia coli*: Interaction at activator and repressor sites of FNR-controlled genes." PNAS **93**(3): 1226-1231.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Mizuno, T. (1998). "His-Asp Phosphotransfer Signal Transduction." Journal of Biochemistry **123**(4): 555-563.
- Ninfa, A. J. and B. Magasanik (1986). "Covalent modification of the *glnG* product, NR<sub>I</sub>, by the *glnL* product, NR<sub>II</sub>, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*." PNAS **83**: 5909-5913.
- Nixon, B. T., C. W. Ronson and F. M. Ausubel (1986). "Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(20): 7850-4.
- Parkinson, J. S. and E. C. Kofoid (1992). "Communication Modules in Bacterial Signaling Proteins." Annual Review of Genetics **26**: 71-112.
- Perraud, A. L., V. Weiss and R. Gross (1999). "Signalling pathways in two-component phosphorelay systems." Trends Microbiol **7**(3): 115-20.
- Perry, J. J., J. T. Staley and S. Lory (2002). Microbial Life, Sinauer Associates, Inc.
- Peña-Sandoval, G. R., O. Kwon and D. Georgellis (2005). "Requirement of the receiver and phosphotransfer domains of ArcB for efficient dephosphorylation of phosphorylated ArcA *in vivo*." J Bacteriol **187**(9): 3267-72.
- Popescu, C. V. (1998). "Mössbauer spectroscopy as a tool for the study of activation \ inactivation of the transcription regulator FNR in whole cells of *Escherichia coli*." PNAS **95**: 13431-13435.
- Rodríguez, C., O. Kwon and D. Georgellis (2004). "Effect of D-lactate on the physiological activity of the ArcB sensor kinase in *Escherichia coli*." J Bacteriol **186**(7): 2085-90.
- Sawers, G. and B. Suppmann (1992). "Anaerobic induction of pyruvate formate-lyase gene expression is mediated by the ArcA and FNR proteins." J Bacteriol **174**(11): 3474-8.
- Stock, A. M., V. L. Robinson and P. N. Goudreau (2000). "Two-Component Signal Transduction." Annual Review of Biochemistry **69**: 183 - 215.
- Taylor, B. L. and I. B. Zhulin (1999). "PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light." Microbiol Mol Biol Rev **63**(2): 479-506.
- West, A. H. and A. M. Stock (2001). "Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signal systems." Trends in Biochemical Sciences **26**(6): 369 - 376.