



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Regulación del sistema de dos componentes ArcB/ArcA”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Antonio de Jesús Santilán Jiménez

DIMITRIS GEORGELLIS  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

GLORIA SAAB RINCÓN  
[Instituto de Biotecnología](#)

Ciudad de México. Abril, 2024



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.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y  
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL  
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

que presenté para obtener el grado de ----Maestría es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

**Atentamente**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio de Jesús Santillán Jiménez', written over a horizontal line.

**Antonio de Jesús Santillán Jiménez**  
315061769

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en el laboratorio 226 norte bajo la tutoría del Dr. Dimitris Georgellis.

Agradezco la asesoría del Dr. Adrián F. Álvarez.

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), # IN209924.

“Estudio de microdominios membranales similares a balsas lipídicas en *Pseudomonas aeruginosa*” de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), # IN213724.

“Control del Sistema de Dos Componentes BarA/UvrY” del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), CF 19-514856.

Agradezco también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de Beca de Maestría con número de becario 1225871

Agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico dado para poder asistir al VII Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

*Este trabajo representa una de mis más grandes pasiones en la vida y un gran esfuerzo a lo largo de los 2 años en los que se realizó este proyecto y su realización no sería posible sin el apoyo incondicional de las personas cercanas a mi*

*Le agradezco a mis padres Dominga Jiménez Guzmán y Marco Antonio Santillán Verde, sin sus constantes sacrificios y apoyo para darme las mejores oportunidades en la vida yo no estaría aquí.*

*A mi hermano Marco porque a pesar de todas nuestras diferencias siempre ha sido un persona que he admirado y me ha mostrado otra forma diferente de ver la vida.*

*A mi mejor amigo Edson por siempre darme su apoyo incondicional y mostrarme que sin importar el qué tan seguido nos veamos siempre se que puedo contar con él. Además le agradezco por cambiar mi vida mostrándome la música que más amo en mi vida y que me ha salvado en incontables ocasiones,*

*A Karlita por la increíble amistad que hemos tenido a lo largo de los años y el hecho de que siempre he sentido que puedo contarle lo que sea sin importar que tan raro pueda ser, además de que siempre me ha hecho sentir escuchado.*

*A mi compa Montse por ser una de las personas que más me inspira a ser cada día mejor tanto en los aspectos profesionales como personales, también por ser una persona que admiro y respeto como a ninguna otra y también por ser un persona con la que siempre puedo contar sin importar la situación.*

*A Frank y Mafer por ser personas tan magníficas y hacer que la licenciatura fuera un increíble período en mi vida y por todas nuestras reuniones para chismear y actualizarnos sobre nuestras vidas.*

*A Roberto por ser un amigo con el que he podido recorrer el camino de la academia y vivir grandes experiencias y tener conversaciones por horas sobre música, deporte, viajes,etc.*

*A Dimitris por darme la oportunidad de estar en el laboratorio y cumplir uno de los sueños más grandes en mi vida, también le agradezco por ser no solo un gran tutor que me sigue presionando para ser cada vez mejor sino también por ser una persona increíble.*

*A Claus por siempre estar dispuesta a apoyarme en lo que sea, y ser alguien que me ha hecho ver el laboratorio como mi segunda casa.*

*A todos mis amigos en el lab 226 N que hacen que ir al laboratorio sea todo un placer y me hacen disfrutar inmensamente de la vida académica.*

*A Magali porque sin importar todo lo sucedió entre nosotros no puedo discutir el hecho de que conocerla alteró el curso de mi vida y me hizo cambiar mi perspectiva de la vida y sin ella no estaría en donde estoy en estos momentos.*

*A Dany por ser la mejor persona que he conocido en mi vida, una fuente inmensa de bondad y amor que solo creí existía en mis sueños, su presencia hace que mis días estén llenos de felicidad y cariño. Le agradezco por todo lo que hace por mi aunque no haya palabras suficientes para hacerlo.*

## ÍNDICE

1	Introducción.....	6
1.1	Sistemas de dos componentes (SDC) .....	6
1.2	Sistema de dos componentes ArcB/ArcA de Escherichia Coli.....	6
1.3	Señalización y Regulación del Sistema ArcB/ArcA de Escherichia coli.....	7
1.4	La señal de ArcB de Escherichia coli.....	9
1.5	Estado oligomérico de ArcB.....	9
2	Hipótesis.....	10
3	Objetivo.....	11
3.1	Objetivo general.....	11
3.2	Objetivos particulares.....	12
4	Materiales y Métodos.....	12
4.1	Cepas.....	12
4.2	Plásmidos.....	13
4.3	Modelado de ArcB.....	14
4.4	Diseño de primers.....	14
4.5	Mutagénesis de los aminoácidos seleccionados por megaprimer.....	14
4.6	Ensayos de Beta Galactosidasa.....	15
4.61	Ensayos para medir la actividad de Fosfatasa.....	15
4.62	Ensayos con agentes reductores.....	15
4.63	Ensayos de cambio de anaerobiosis a aerobiosis.....	15
4.7	Western blot.....	16
5	Resultados .....	16
5.1	Modelado de ArcB como tetrámero.....	16
5.2	Efecto de las mutaciones puntuales en la regulación de ArcB.....	18
5.3	Evaluación de las mutantes con fenotipo F.C. (Fosfatasa Constitutiva).....	20
5.4	Evaluación de las mutantes con fenotipo Ci.C (Cinasa Constitutiva).....	26
5.5	Efectos de las mutaciones puntuales fuera del túnel.....	29
6	Discusión .....	30
7	Conclusiones.....	32
8	Perspectivas.....	33
9	Referencias .....	33
10	Appendices.....	36
10.1	Lista de Primers.....	36
10.2	Lista de los efectos de las mutaciones puntuales.....	39
10.3	Abreviaturas.....	40

## 1.INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos tienen la capacidad de responder a estímulos en su medio ambiente y ajustar parámetros fisiológicos acorde a la condición en que se encuentran, esto se logra en todos los organismos gracias a los sistemas de transducción de señales, los cuales están encargados de convertir una señal ambiental en una respuesta celular [1]. En bacterias existen muchos sistemas que permiten sentir cambios ambientales y realizar ajustes en la expresión génica, algunos ejemplos de estos sistemas son los Sistemas de dos componentes (SDC), Sistema de Quorum Sensing (QS), Proteínas Quimiotácticas receptoras de Metilo (PQM), Sistemas de Fosfotransferencia (SFT), Adenilato Ciclasas (AC), etc. [2]

### 1.1 SISTEMAS DE DOS COMPONENTES

En procariontes así como en algunos hongos y plantas los SDC llevan a cabo la transducción de señales para una gran variedad de estímulos, estos sistemas varían en número y arquitectura dependiendo la especie y pueden regular una gran cantidad de procesos celulares como el quorum sensing, motilidad, respuesta de estrés, virulencia, metabolismo, etc [1,3,4,5]. Los SDC están conformados por dos proteínas, una cinasa sensora (CS) y un regulador de respuesta (RR). De manera prototípica la señalización por un SDC canónico empieza cuando la CS recibe una señal que promueve la autofosforilación a expensas de ATP de un residuo de Histidina (His) conservado en el dominio de transferencia, posteriormente el grupo fosfato en el residuo His es transferido a un residuo conservado de Aspartato (Asp) en el dominio receptor de su respectivo RR. La fosforilación del RR provoca en la mayoría de los casos que este actúe como un regulador transcripcional de varios genes relacionados a una respuesta celular específica. (Fig 1)

### 1.2 Sistema de dos componentes ArcB/ArcA de *Escherichia coli*

En *Escherichia coli* existe un SDC denominado ArcB/A el cual se encarga de regular alrededor de 300 operones, controlando principalmente genes involucrados en el metabolismo anaerobio, esto lo hace dependiendo de las condiciones redox de la célula. Este sistema está formado por la CS ArcB y por el RR ArcA. ArcA un RR convencional de

228 a.a, tiene un dominio receptor en su extremo amino terminal y un dominio de unión a DNA de hélice vuelta hélice (HVH) en su extremo carboxilo terminal. Por su parte la proteína ArcB no es una CS convencional, está conformada por 778 a.a. y es un CS tripartita o híbrida, (Fig 2) tiene dos dominios transmembranales, un dominio periplásmico corto de tan solo 16 a.a., tiene un dominio de zipper de leucinas entre 73 y 108, un dominio PAS, y a diferencia de de CS convencionales que solo presentan un dominio catalítico , ArcB presenta tres, un dominio transmisor primario (H1), un dominio receptor (D1) y un dominio transmisor secundario o dominio de fosfotransferencia (H2 o HPt).(Fig.2)

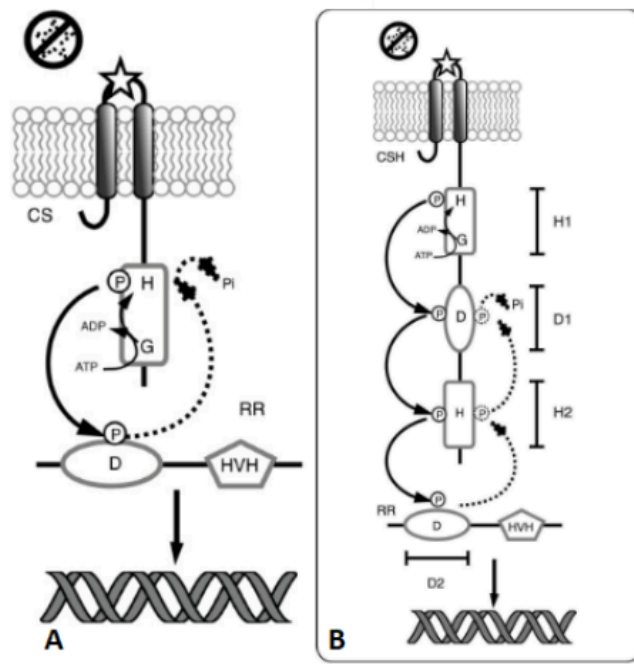


Fig.1 Esquema de la señalización en un SDC convencional y en una cinasa híbrida. A) La CS normalmente se encuentra anclada a la membrana plasmática, y en muchas ocasiones el segmento sensor de la CS se encuentra en la región periplásmica. La señal es pasada de la CS al RR y posteriormente este regulará transcripcionalmente diversas regiones. Y la señalización también puede ir en el sentido contrario y promover la desfosforilación del RR y la CS liberando fosfato inorgánico. B) En las cinasas híbridas existen más dominios catalíticos por lo que la transferencia del grupo fosfato se da entre más dominios de la CS. Imagen tomada de Barba-Ostria, C. (2014)

### 1.3 Señalización y Regulación del Sistema ArcB/ArcA de *Escherichia coli*

La CS ArcB se encuentra en estado de fosfatasa en condiciones aeróbicas y se encuentran en estado de cinasa en condiciones anaeróbicas o microanaeróbicas [8], una vez ArcB recibe su señal adquiere actividad de cinasa y se autofosforila en su residuo de His 292 a expensas de ATP, posteriormente a través de un mecanismo conocido como fosfo relevo, el grupo fosforilo es transferido de His 292 a Asp 576, después de Asp 576 a His 717 y



finalmente de His 717 a Asp 54 de ArcA (His-292→Asp-576→His-717→Asp-54), por el contrario si la célula se encuentra en condiciones aeróbicas ArcB deja de funcionar como cinasa y actúa como fosfatasa y cataliza la desfosforilación de ArcA por el mecanismo de fosfo relevo reverso, el grupo fosforilo de Asp 54 de ArcA es pasado al residuo His 717 de ArcB después se da la transferencia de His 717 a Asp 576 y posteriormente se da la liberación del grupo fosforilo como fosfato inorgánico (Asp-54→His-717→Asp-576→Pi).[3,5,6,7]

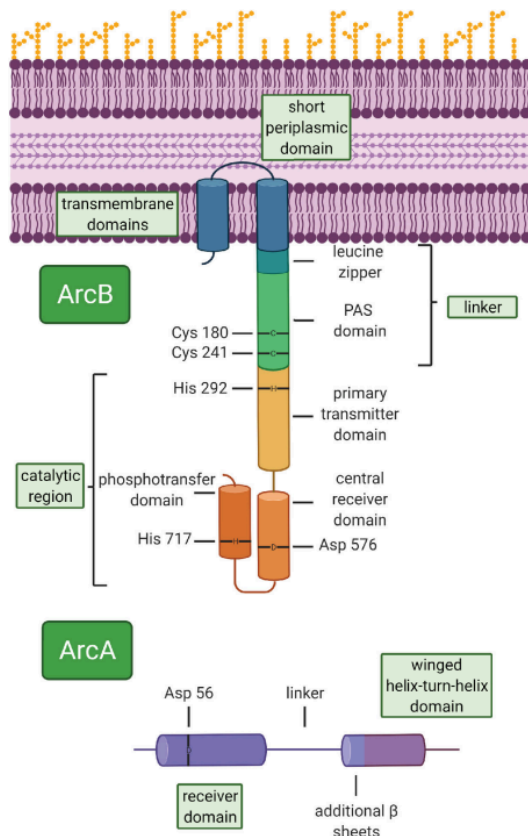


Fig.2 Representación de todos los dominios presentes en ArcB y ArcA. En ArcB se tienen dos dominios transmembranales, después en la región linker se encuentra un dominio de zipper de leucinas funcional que es necesario para la señalización, un dominio PAS en el que se encuentran las cisteínas 180 y 241, Después se encuentran los tres dominios catalíticos H1, D1 y H2. En el dominio H1 también se encuentra la caja G que funciona como el sitio de unión del ATP. ArcA contiene un dominio receptor en su extremo amino terminal y un dominio de HVH en su dominio carboxilo terminal. Imagen tomada de Brown, A. N., et.al. (2022)

La señal de ArcB no es la cantidad de oxígeno molecular [7], en experimentos in vitro se demostró que la cloramina-T inhibe la actividad de cinasa de ArcB, debido a que la cloramina-T oxida residuos de cisteína y metionina esto sugirió un mecanismo de silenciamiento de la actividad de cinasa a través de alguno de estos residuos. Al hacer mutantes para las únicas cisteínas de ArcB 180 y 241 se comprobó que estas son necesarias para la regulación del estado de cinasa/fosfatasa de ArcB y al momento de sustituirlas por residuos de alanina, la proteína tiene actividad de cinasa constitutiva, la cisteína 180 tenía el mayor efecto al sustituirla ya que esta

mutación generaba que la proteína tuviera 85 % de su actividad cinasa mientras que la mutación en la cisteína 241 solo generaba 15% de actividad cinasa. Congruente con esto al añadir agentes reductores como DTT o  $\beta$ -mercaptoetanol ArcB podía actuar como cinasa incluso en condiciones de aerobiosis debido que sus cisteínas sufren una reducción, de esta manera se concluyó que las cisteínas regulan el estado de cinasa/fosfatasa de ArcB a través de la formación de puentes disulfuro intermoleculares, bajo condiciones aeróbicas se forma puentes disulfuro y esto promueve el estado de fosfatasa, en condiciones de anaerobiosis se rompen los puentes disulfuro y se promueve el estado de cinasa.[8] Fig.3

#### 1.4 La señal de ArcB de *Escherichia coli*

La señal de ArcB es la poza de quinonas, las quinonas son moléculas pequeñas encontradas en la membrana interna que ayudan a la transferencia de electrones entre elementos de la cadena de transporte de electrones. Existen tres tipos de quinonas en *E.coli*, las ubiquinonas (UQ), menaquinonas (MQ) y las demetilmenaquinonas(DMQ). Bajo condiciones aeróbicas las UQs representan el 60% de las quinonas de la célula mientras que las MQs representan solo el 3%, por el contrario bajo condiciones anaeróbicas las UQs representan el 10% y las MQs el 74%.[3,7,8]

Existen diversos experimentos que nos dan evidencia que las quinonas efectivamente son la señal y las que regulan la formación de puentes disulfuro, primero en experimentos [23] *in vitro* se había visto que la Ubiquinona 0 inhibe la actividad de cinasa de ArcB purificado, también al generar mutantes en el operón *ubiCA*, que codifica para las enzimas necesarias para la síntesis de UQ se encontró que en estas mutantes al hacer un cambio de condiciones de anaerobiosis a aerobiosis ArcB continua como cinasa. De la misma manera se vio que al generar mutantes en el operón *menFDHB* que codifica para las enzimas para la síntesis de MQ y DMQ las mutantes ya no son capaces de tener actividad de cinasa en condiciones de anaerobiosis [9], por último se determinó el potencial redox de las cisteínas de ArcB y se encontró que es de -41mV,[9] esto concuerda con lo observado ya que las UQ presentan un potencial redox de +110 mV y las DMQ de +40 mV por lo que pueden oxidar las cisteínas de ArcB y fomentar un estado de fosfatasa, mientras que las MQ tienen un potencial redox de -74 mV por lo que pueden reducir las cisteínas y fomentar la actividad cinasa de ArcB Fig.5. Con lo que se sabe de la regulación de ArcB se llegó al modelo (Fig 3.) en el cual durante condiciones de aerobiosis la principal clase quinonas en la poza son las UQs las cuales van a oxidar los residuos de cisteína (debido a su potencial redox mayor) en la región linker inhibiendo la actividad de cinasa de ArcB promoviendo su actividad como fosfatasa, cuando ahora hay un cambio a condiciones de anaerobiosis la principal clase de quinonas presentes son las MQs las cuales van a reducir las cisteínas(debido a que tienen un potencial redox menor) y promover la actividad de cinasa de ArcB.

#### 1.5 Antecedentes (Estado oligomérico de ArcB)

El modelo actual explica la regulación del sistema sin embargo algo que queda en duda es **¿Cómo es que las quinonas embebidas en membrana llegan hasta la región citoplásmica de ArcB en donde se encuentran las cisteínas?** Esta pregunta es importante ya que las quinonas son moléculas muy hidrofóbicas que se encuentran en membrana[10], por lo que no queda claro cómo es que pueden regular regiones citoplasmáticas de ArcB. Hay algunas evidencias experimentales, que nos ayudan a generar una hipótesis, por ejemplo, normalmente en los SDC las CS forman dímeros, sin embargo al hacer geles de proteína nativa de ArcB se encuentran monómeros y tetrámeros.(Fig.4).Además de saber que era un tetrámero una primera aproximación de la estructura secundaria de ArcB muestra la formación de una larga alfa hélice

desde el segundo cruce transmembranal hasta el dominio PAS donde se encuentran las cisteínas que regulan ArcB.

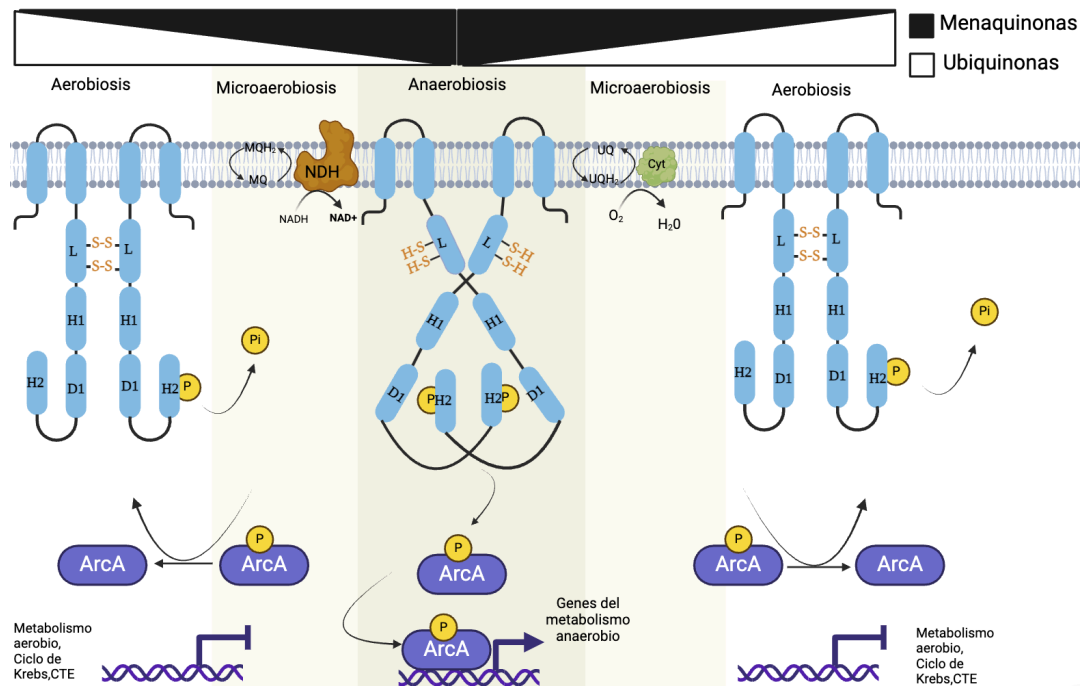


Fig.3 Modelo de la regulación de ArcB bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. En condiciones de aerobiosis las ubiquinonas se oxidan lo que permite la transferencia de electrones desde las cisteínas a las ubiquinonas, esto permite que se formen puentes disulfuro entre las cisteínas lo que hace que ArcB actúe como fosfatasa de ArcA. Por el contrario, cuando hay condiciones de anaerobiosis las menaquinonas se encuentran reducidas por lo que pueden donar electrones a las cisteínas lo que hace que ya no se formen los puentes disulfuro y ArcB actúe como cinasa de ArcA, ArcA en su estado fosforilado actuará como un factor de transcripción de genes del metabolismo anaerobio.

## 2. Hipótesis

El hecho de que ArcB sea un tetrámero y forme una larga alfa hélice en la región linker dio como resultado la siguiente hipótesis :

“La región linker de ArcB en forma tetramérica forma un túnel que da las condiciones hidrofóbicas necesarias para que las quinonas pudieran bajar de la membrana hasta las cisteínas y oxidar/reducirlas dependiendo del estado redox de la célula”

Para que este modelo se cumpla se necesitaría que en la región linker hubiera los aminoácidos correctos para que las quinonas pudieran bajar y subir, y que hubiera sitios de unión a quinonas en las regiones cercanas a ambas cisteínas (180 y 241). Contrario a lo que se pueda pensar inicialmente, no se necesitan únicamente de aminoácidos hidrofóbicos, también se necesitan aminoácidos con cargas que permitan la formación de puentes de hidrógeno con los oxígenos de los grupos hidroxilos de las quinonas[10]

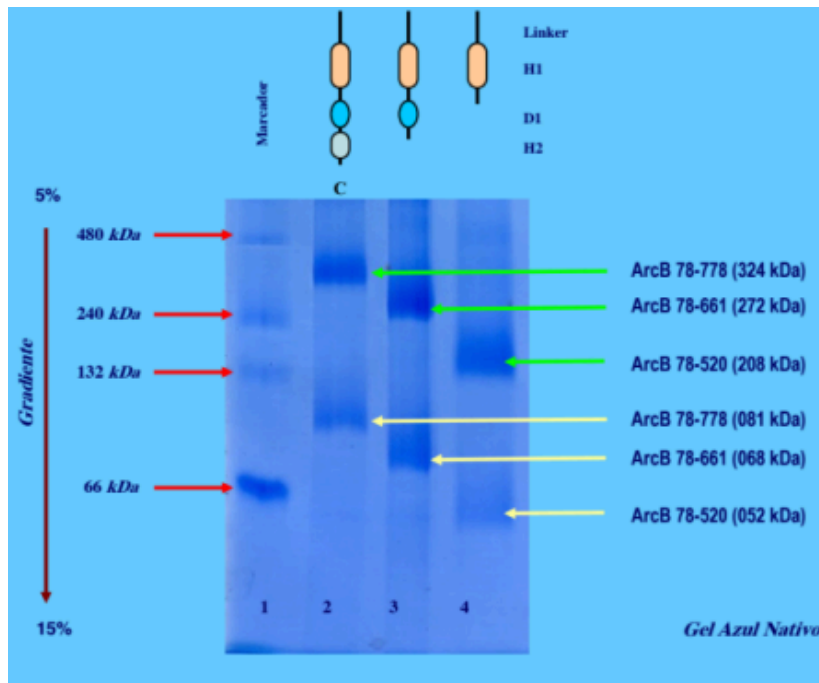


Fig.4 Gel de proteína nativa con ArcB, se corrieron distintas versiones de ArcB, primer carril se encuentra el marcador molecular, segundo carril ArcB 78-778, tercer carril ArcB sin dominio H2 78-661 y en el cuarto carril ArcB sin dominio H2 y D1 78-520.

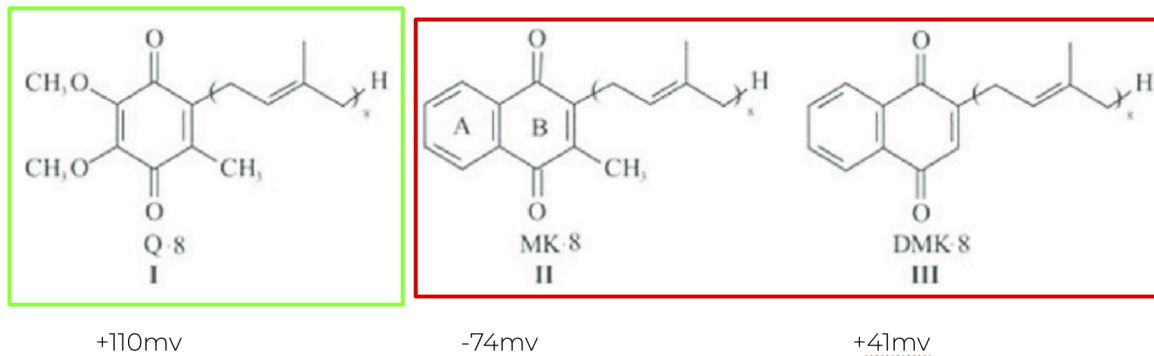


Fig.5 Estructura de las quinonas presentes en E.coli. De izquierda hacia la derecha se muestra ubiquinona(UQ), menaquinona (MQ) y demetil menaquinona (DMQ). En la parte de abajo de cada estructura se muestra el potencial redox de cada quinona.

### 3. Objetivo

#### 3.1 Objetivo general

- Elucidar el mecanismo a través del cual las quinonas embebidas en la membrana pueden oxidar/reducir las cisteínas citoplasmáticas de ArcB de *Escherichia Coli*

#### 3.2 Objetivos particulares

- Generar un modelo de ArcB en estado tetramérico

- Generar mutantes puntuales de residuos necesarios para la unión a quinonas
- Comprobar que los efectos observados no se deben a cambios estructurales sino al impedimento del paso de las quinonas
- Generar mutantes que en residuos que no sean necesarios para la unión a quinonas como control

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cepas

Nombre	Características	Construcción
<b>MC4100</b>	F- araD139 (argF-lac) U169 rpsL150 relA1 flbB5301 deoC ptsF25 rbsR	<b>Referencia (7)</b>
<b>Ecl 5004</b>	<b>MC4100</b> $\Delta arcB::Tet^r$ $\Delta fnr::Tn9(cm')$ $\lambda\phi(cydA-lacZ)$	<b>Referencia (6)</b>
<b>Ecl 5012</b>	<b>MC4100</b> $\Delta arcB::Tet^r$ $\lambda\phi(lldP-lacZ)$	<b>Referencia (6)</b>
<b>M(1-26)</b>	<b>Ecl 5004</b> + PBR322 con <i>arcB</i> ( 24 mutaciones puntuales y 2 dobles) bajo su propio promotor Amp <sup>r</sup>	<b>Electroporación de plásmido en la cepa ECI 5004</b>
<b>LM(1-14)</b>	<b>Ecl 5012</b> +PBR322 con <i>arcB</i> ( 24 mutaciones puntuales y 2 dobles) bajo su propio promotor Amp <sup>r</sup>	<b>Electroporación de plásmido en la cepa Ecl 5012</b>
<b>CF7789</b>	MG1655 $\Delta lacZ$ (MluI)	<b>Referencia (11)</b>
<b>IFC 5006</b>	<b>MC4100</b> $\Delta fnr::Tn9(cm')$ $\lambda\phi(cydA'-lacZ)$ $\Delta menFDHB::Kanr$	<b>Referencia (9)</b>
<b><math>\Delta menFDHB</math> <math>\Delta arcB</math></b>	<b>Ecl 5004</b> $\Delta menFDHB::Kanr$	<b>Transducción por Fago P1vir de IFC5006 a Ecl 5004</b>
<b>M(1-14)men</b>	<b><math>\Delta menFDHB</math> <math>\Delta arcB</math></b> + PBR322 con <i>arcB</i> ( 24 mutaciones puntuales y 2 dobles) bajo su propio promotor Amp <sup>r</sup>	<b>Electroporación de plásmido en la cepa <math>\Delta menFHDB</math> <math>\Delta arcB</math></b>
<b>ECL 5040</b>	<b>MC4100</b> $\Delta arcB::Tet^r$ $\Delta ubiCA::Kanr$ $\lambda\phi(cydA'-lacZ)$	<b>Referencia (9)</b>
<b>Ecl 5012 <math>\Delta ubiCA</math> <math>\Delta arcB</math></b>	<b>Ecl 5012</b> + $\Delta ubiCA$	<b>Transducción por Fago P1 vir de Ecl 5040 a cepa Ecl 5012</b>

LM(1-14)ubi	Ecl 5012 $\Delta ubiCA \Delta arcB$ + PBR322 con arcB( 24 mutaciones puntuales y 2 dobles) bajo su propio promotor Amp <sup>r</sup>	Electroporación de plásmido en la cepa Ecl 5012 $\Delta ubiCA \Delta arcB$
$\Delta ubiE \Delta arcB$	Ecl 5004 $\Delta ubiE::Kanr$	Transducción por Fago P1vir de $\Delta ubiE$ colección Keio a Ecl 5004
M(1-14)dmk	$\Delta ubiE \Delta arcB$ + PBR322 con arcB( 24 mutaciones puntuales y 2 dobles) bajo su propio promotor Amp <sup>r</sup>	Electroporación de plásmido en la cepa $\Delta ubiE \Delta arcB$
ArcB WT citoplasmático	Ecl 5004 + pBR322 <i>arcB</i> 1-22-78-778	Electroporación de plásmido en la cepa ECL 5004
M(1-14) cito	Ecl 5004 + pBR322 <i>arcB</i> 1-22-78-778 ( mutaciones puntuales generadas por Megaprimer)	Electroporación de plásmido en la cepa ECL 5004
ArcB CC	Ecl 5004 + pBR322 <i>arcB</i> CC (C180A y C241A)	Electroporación de plásmido en la cepa ECL 5004
ArcB M(1-14) CC	Ecl 5004 + pBR322 <i>arcB</i> CC (C180A y C241A) + mutaciones puntuales generadas por Megaprimer.	Electroporación de plásmido en la cepa ECL 5004

#### 4. 2 Plásmidos

Nombre	Características	Construcción
pBR322	Vector de bajo número de copias Amp <sup>r</sup> y Tc <sup>r</sup>	Referencia (20)
pBR322 <i>arcB</i>	Vector de bajo número de copias con <i>arcB</i> bajo su propio promotor Amp <sup>r</sup>	Digestión de pBR322 y pMX712-PKS- <i>arcB</i> con BamHI y HindIII
pBR322 sin <i>ndeI</i>	Vector de bajo número de copias Amp <sup>r</sup> y Tc <sup>r</sup> sin sitio <i>ndeI</i>	Se digirió pBR322 con <i>ndeI</i> y se utilizó Klenow para generar extremos romos y se ligó con ligasa Tn4
pBR322 <i>arcB</i> sin <i>ndeI</i>	Vector de bajo número de copias con <i>arcB</i> bajo su propio promotor Amp <sup>r</sup> sin sitio <i>ndeI</i>	Se digirió pBR322 sin <i>ndeI</i> y pMX712 con BamHI y HindIII
pBR322 <i>arcBM</i> (1-26)	Vector de bajo número de copias con <i>arcB</i> (versiones mutadas 1-26) bajo su propio promotor Amp <sup>r</sup>	Digestión de pBR322 <i>arcB</i> y producto de permutados con <i>ncol</i> y <i>mluI</i>
pMX712	pBluescript KS II (+) con <i>arcB</i> bajo su propio promotor Amp <sup>r</sup>	Referencia (21)

<b>pBR322 arcB 1-22-78-778</b>	Vector de bajo número de copias con <i>arcB</i> citoplasmático ([1-22]-[78-778]) bajo su propio promotor, Amp <sup>r</sup>	Amplificación de <i>arcB</i> citoplasmático de cromosoma <b>Referencia (18)</b> y digestión de pBR322 <i>arcB</i> sin <i>ndeI</i> y producto de PCR con <i>ndeI</i> y <i>mluI</i>
<b>pBR322 arcB CC (C180A y C241A)</b>	Vector de bajo número de copias con <i>arcB</i> con las cisteínas cambiadas por alaninas (C180A y C241)	Amplificación de <i>arcB</i> CC de cromosoma <b>Referencia (8)</b> y digestión de pBR322 <i>arcB</i> y producto de PCR con <i>neoI</i> y <i>mluI</i>

### 4.3 Modelado de ArcB

La secuencia de ArcB fue obtenida de Uniprot (<https://www.uniprot.org/uniprot/P0AEC3.fasta>), el modelado del monomero se realizó utilizando el servidor de trRossetta (<https://yanglab.nankai.edu.cn/trRosetta/>) y el servidor de alphafold colab <https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb#scrollTo=mbaIO9pWjaN0>. El modelado de ArcB como tetrámero se obtuvo utilizando los servidores para docking proteína-proteína de Symmdock (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/SymmDock/php.php>), en el caso del modelo de alphafold se utilizó la función de multímeros de alphafold. No se realizó modelado con un templado debido a que no existen estructuras resueltas que compartan suficiente homología en la región linker.

### 4.4 Diseño de Primers

Para el diseño de los primers se tomaron la secuencia del gen de *arcB*, los sitios de inicio y final de la transcripción del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/X53315.1>). Para el diseño de los primers se utilizó la página de Agilent para Quick Change (<https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp>) y para calcular la T<sub>m</sub> de los primers modificados se utilizó la calculadora de T<sub>m</sub> de la Universidad de Washington (<https://depts.washington.edu/bakerpg/primertemp/>). (La lista de oligos utilizados con su secuencia se encuentra en apéndice 10.1)

### 4.5 Mutagénesis de los aminoácidos seleccionados por Megaprimer.

Para realizar la mutagénesis sitio dirigida de los aminoácidos seleccionados, se utilizó el método de Megaprimer descrito en [22], brevemente se amplificó una región de *arcB* utilizando un oligo directo que se une a la secuencia que codifica que el primer aminoácido de ArcB, después como oligo reverso se utilizó un oligo que contenía la mutación deseada que cambia los aminoácidos seleccionados por alanina, como molde se utilizó el plásmido pMX712. El producto de PCR de la amplificación fue utilizado como oligo directo para una segunda reacción de PCR, como oligo reverso se utilizó un oligo que se une después de un sitio de restricción MluI para realizar la clonación. Finalmente el producto de la segunda reacción de PCR fue clonado en un plásmido pBR322 con *arcB*, utilizando las enzimas de restricción MluI y NcoI. Todos los plásmidos con su respectiva mutación fueron transformados por quimiocompetencia en células Top 10.

Se purificó plásmido por Miniprep de las Top 10 y los plásmidos obtenidos fueron electroporados en una cepa de *E. coli* con un reportero *cydA-lacZ* o *lldp-lacZ* de esta forma se obtuvieron catorce cepas mutantes MC4100  $\Delta arcB \Delta fnr$  + PBR322 *arcB* (con las mutaciones sustituyendo el aminoácido original por alanina). Todas las mutaciones fueron verificadas por secuenciación.

#### 4.6 Ensayos de Beta galactosidasa

Para los ensayos de Beta galactosidasa se crecieron los cultivos en medio Luria Bertani con MOPS 0.1M pH 7.4 y 20 mM de D-Xilosa. Para los ensayos aeróbicos se crecieron 10 ml de medio en matraces de 125 ml a 37 °C con agitación a 250 rpm, se tomaron muestras a una O.D.<sub>600</sub> de 0.6 aproximadamente. Para los ensayos anaerobios las células fueron crecidas en tubos de 5 mL llenados hasta el tope con un agitador magnético, y cerrados con un tapa de rosca, se crecieron en agitación y a 37 °C y se dejaron crecer al menos 8 hrs y posteriormente se tomó una muestra para medir O.D.<sub>600</sub> y hacer el ensayo de B-galactosidasa.

Para el ensayo de Beta Galactosidasa se tomaron 100 uL de cultivo y se añadieron a tubos con 900 µL de Buffer Z ( 0.1 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4, KCl 0.0033 M y MgSO<sub>4</sub> 0.0033M ) y 17.5 µL de Cloroformo, posterior a añadir el cultivo los tubos se agitaron en un vortex por 10 segundos aproximadamente.

Para cuantificar la actividad de B-galactosidasa en las muestras se añadió como sustrato 200 µL/tubo de ONPG (2-Nitrofenil B-D-galactopiranosido) a una concentración de 4mg/mL, las muestras se dejaron reaccionar por 10 min para el caso del reportero *cydA-lacZ* y 5 min para el reportero *lldP-lacZ*, una vez finalizado el tiempo de reacción la actividad enzimática se detuvo agregando 500 µL/tubo de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. Finalmente se midió la O.D.<sub>420</sub> y O.D.<sub>550</sub> y con estos datos se obtuvieron las unidades de actividad de B-Galactosidasa o Unidades Miller utilizando la siguiente fórmula:

$$U. Miller = [O. D. 420 - (1.75 \times O. D. 550)] \div [Tiempo de reacción \times mL de muestra \times O. D. 600]$$

O.D.= Densidad Óptica 420/550/600 nm

#### 4.61 Ensayos para medir actividad fosfatasa

Para verificar la actividad de fosfatasa de algunas de las cepas mutantes se crecieron las células en medio mínimo M9 ( 48 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.54 mM NaCl, 18.7 mM NH<sub>4</sub>Cl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>), 0.1 M MOPS pH 7.4 con piruvato (40 mM) como única fuente de carbono. Posteriormente se dejaron crecer las células hasta una O.D.<sub>600</sub> de 0.3 y se tomaron muestras para realizar un ensayo de beta galactosidasa.

#### 4.62 Ensayos con Agentes reductores

Los cultivos fueron crecidos en medio Luria Bertani con MOPS 0.1M y pH 7.4 a 37 °C con agitación a 250 rpm cuando el cultivo alcanzara una O.D.<sub>600</sub> de 0.3 se añadió 30 mM de DTT o 20mM de □-Mercaptoetanol y se dejaron por 1 hora antes de medir la actividad de beta galactosidasa.

#### 4.63 Ensayos de cambio de anaerobiosis a aerobiosis

Se realizaron cultivos en medio LB MOPS 0.1M pH 7.4 con xilosa 20 mM, se iniciaron los cultivos a una O.D.<sub>600</sub> de 0.01 y se separó el cultivo en ocho tubos de 5 mL llenados hasta tope y



cerrados con una tapa de rosca, los cultivos se dejaron crecer por 8 hrs hasta una O.D.<sub>600</sub> de 0.3 aproximadamente, posteriormente dos tubos en anaerobiosis se abrieron y se pasaron a un matraz de 125 mL precalentado a 37°C, para dejarse a 37°C y agitación 250 rpm en condiciones de aerobiosis, se tomó punto al momento de realizar el cambio a aerobiosis y se tomó como el punto cero, posteriormente se tomó muestra cada 20 min de uno de los cultivos anaerobios y del cultivo aerobio hasta llegar a 120 min.

#### **4.7 Western Blot**

Para la comprobación de la expresión de las proteínas mutantes se realizó un western blot, se tomaron 500 µL de cultivo overnight de todas las cepas, se bajaron por centrifugación a 10000 rpm X 4 min y se resuspendió en 50 µL de Buffer de carga. Se corrieron 15 µL de cada muestra en un gel de poliacrilamida al 10% por dos horas y cuarenta minutos. Posteriormente se hizo la transferencia húmeda a una membrana activada con metanol por una hora a 100V. Posterior a la transferencia se bloqueó la membrana con leche descremada al 2% (Svelty con colágeno) en PBS tween al 0.1% toda la noche a 4°C en agitación.

Se hicieron lavados con PBS tween y se incubó la membrana con anticuerpo policlonal de suero de conejo contra ArcB a una concentración 1:10000 por 1 hr a temperatura ambiente, después se lavó la membrana con PBS tween y se incubó con un anticuerpo secundario anti conejo que contiene la peroxidasa de rábano.

Para revelar las membranas se incubó la membrana con una mezcla de luminol y sustrato de la peroxidasa de rábano por 5 minutos, posteriormente en oscuridad se revelaron en películas que permiten detectar la luminiscencia.

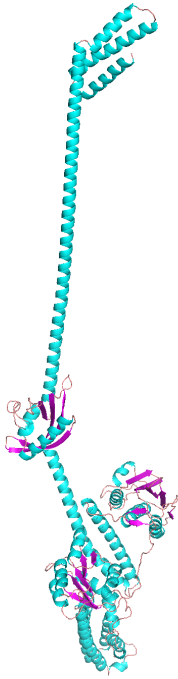
## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Modelado de ArcB como tetrámero**

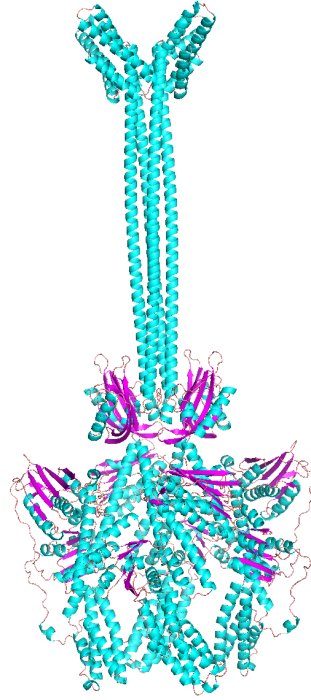
Basándose en los resultados previos que se tenían de los geles nativos de ArcB se realizó un modelado de ArcB como monómero y como tetrámero. La primer aproximación que se tuvo fue realizar el modelo *de novo* con trRosetta y el docking proteína-proteína con Symdock Fig.6 A/B, el motivo de realizar un modelo *de novo* es que no existen estructuras resueltas que compartan suficiente nivel de homología para poder realizar un modelado por homología. Del primer modelo se seleccionaron los primeros aminoácidos que se mutaron (mutaciones M1-M15).

Posteriormente se realizó el modelado de ArcB como un tetrámero y como monómero utilizando Alphafold Colab Fig.6 C/D, en ambos modelos del tetrámero se ve la formación de un túnel que conecta la membrana con la región del dominio PAS donde se encuentran las cisteínas. Se seleccionaron varios aminoácidos que se creía que podían tener importancia para la interacción con las quinonas y se mutaron por alaninas. El criterio de selección de los aminoácidos fue seleccionar aminoácidos cargados que pudieran interactuar con los oxígenos de la parte del anillo de la quinona (Fig.5) y que estuvieran viendo al interior del túnel que se forma.

A)



B)



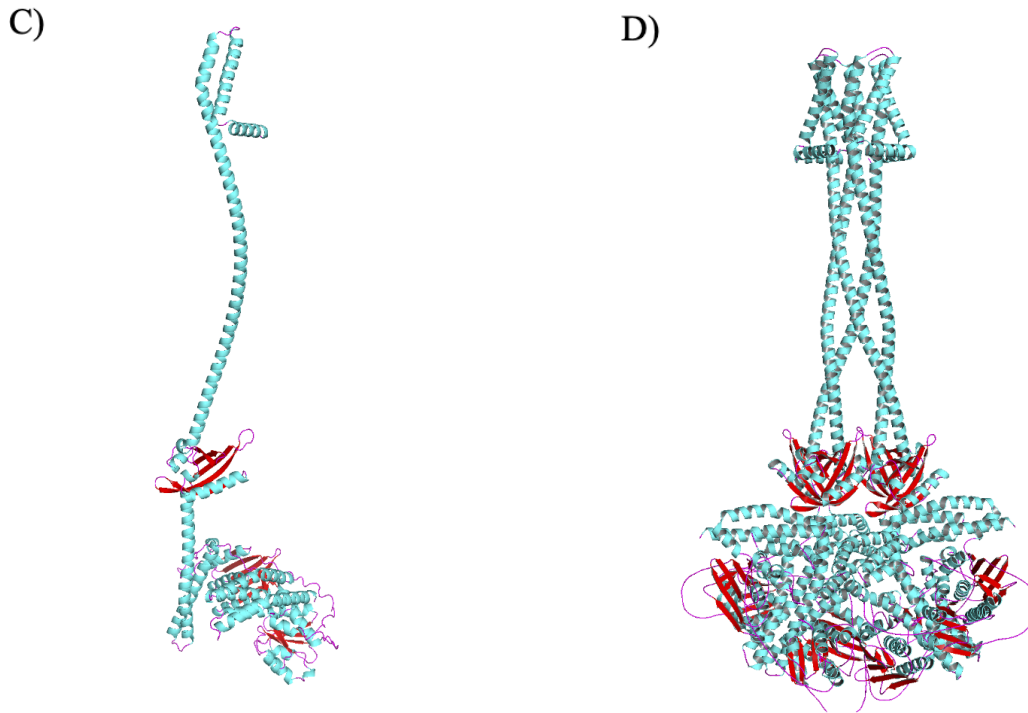


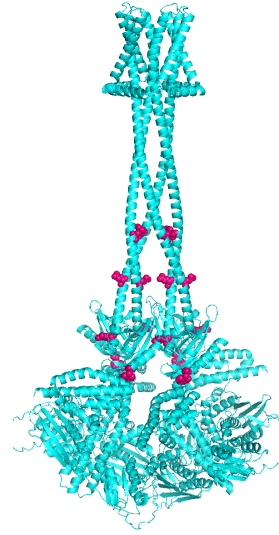
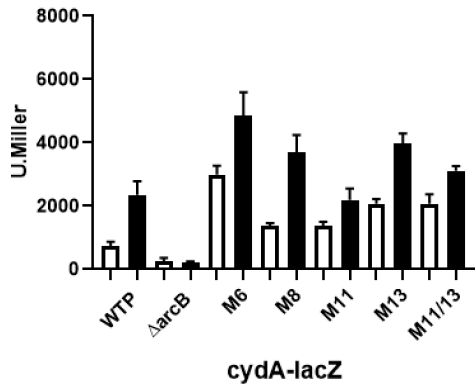
Fig.6 Modelos de ArcB . A) Primer modelo de ArcB monómero hecho con trRossetta B) Modelo del tetrámero hecho con trRossetta y con symmdock C) Modelo del monómero de ArcB con AlphaFold colab D) Modelo del tetrámero de ArcB hecho con AlphaFold Colab. Los colores indican la estructura secundaria, en cyan se muestra alfa hélices en rojo y púrpura se muestran láminas beta.

## 5.2 Efectos de las mutaciones puntuales en la regulación de ArcB

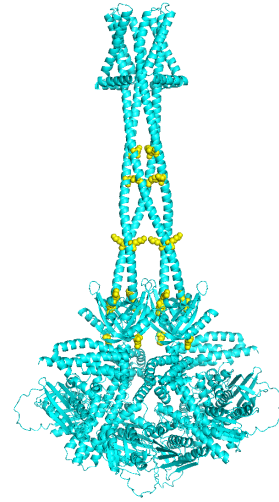
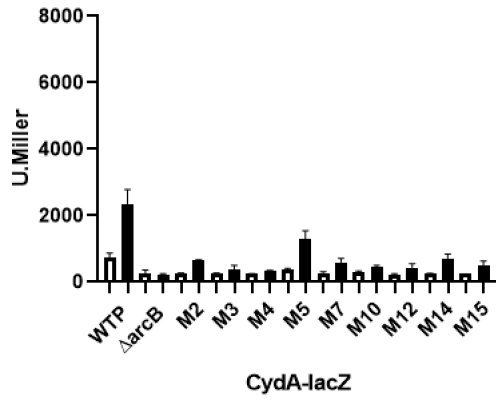
El efecto de las mutaciones puntuales se probaron clonando las mutaciones puntuales en un plásmido de bajo número de copias con ArcB bajo su propio promotor. Los efectos de las mutaciones puntuales se observaron *in vivo* midiendo la expresión de la fusión transcripcional *cydA-lacZ* la cual está regulada positivamente por ArcA-P y también se midió la fusión transcripcional *lldp-lacZ* la cual está regulado negativamente por ArcA-P.

Como se esperaba las mutaciones dentro del predicho túnel tuvieron efectos importantes sobre la actividad de ArcB, se vieron dos efectos principales en las mutantes, el primero fue de fosfatasa constitutiva (FC) es decir no se observaba actividad del reportero *cydA-lacZ* aun en condiciones de anaerobiosis donde normalmente hay mayor actividad, el segundo fenotipo encontrado fue de cinasa constitutiva (CiC) aquí se observaba una mayor actividad del reportero *cydA-lacZ* en condiciones de aerobiosis donde normalmente se encuentra con poca actividad, también hubo 2 mutaciones que tuvieron un fenotipo silvestre(no mostradas). Fig.6

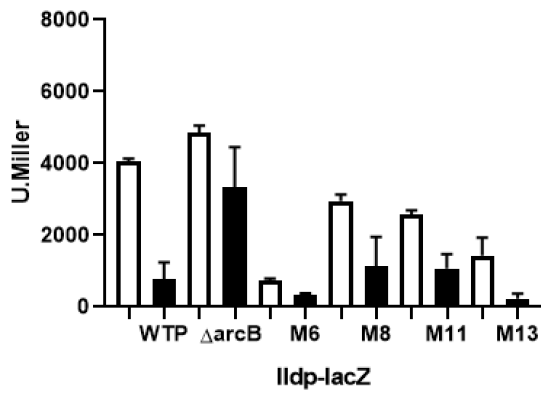
A)



B)



C)



D)

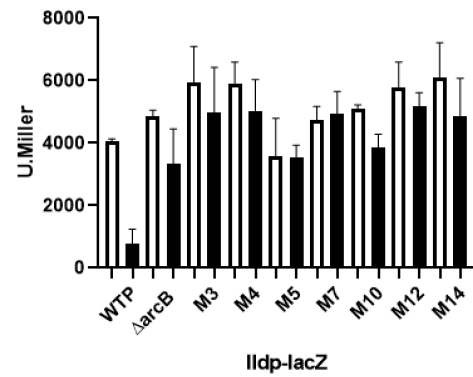


Fig.7 Efectos de las mutaciones en la actividad del reportero *cydA-lacZ* y *lldP-lacZ*. a) Mutantes con fenotipo CCI (cinasa constitutiva) reportero *cydA-lacZ* a la derecha se muestra un modelo donde se marcan en rosa la posición de las mutaciones b) Mutantes de fenotipo FC (fosfatasa constitutiva) con *cydA-lacZ* a la derecha se muestra un modelo donde se marcan en amarillo la posición de las mutaciones C) Mutantes CCI reportero *lldP-lacZ* D) Mutantes FC reportero *lldP-lacZ*. En todas las gráficas las barras blancas muestran condiciones de aerobiosis y las barras negras condiciones de anaerobiosis.

Los efectos observados en las mutaciones FC podrían deberse a que la proteína no se estuviera expresando o no se estuviera expresando en la misma cantidad, si este fuera el caso explicaría porque nuestras mutantes no presentan mayor actividad de B-galactosidasa en anaerobiosis es por esto que es necesario realizar un western blot para comprobar la expresión.

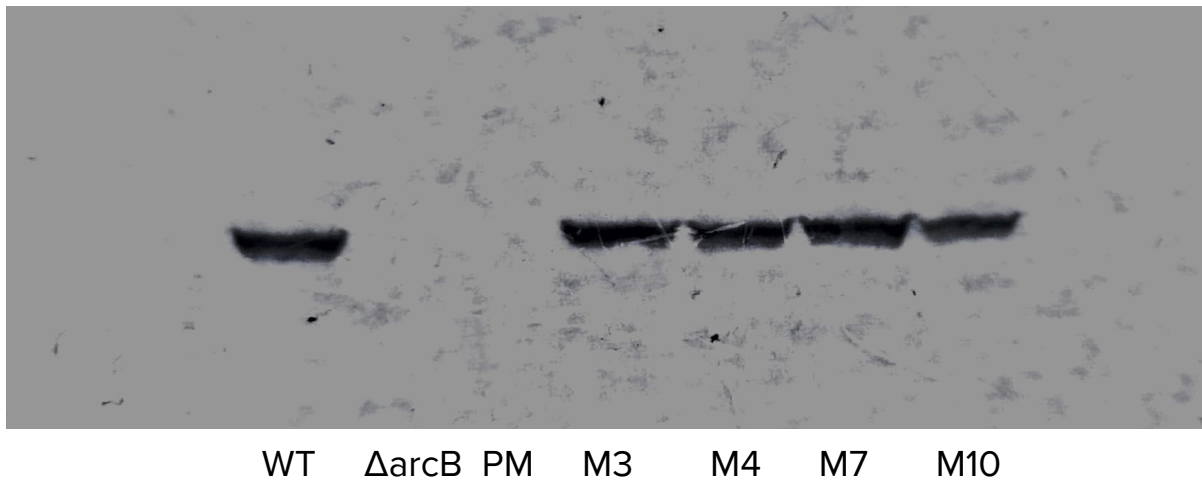


Fig.8 Western blot mutantes con fenotipo de Fosfatasa Constitutiva. En orden de izquierda a derecha se muestra cepa Wild Type (WT),  $\Delta arcB$ , Marcador de peso molecular (PM), Mutantes 3,4,7 y 10.

Como se observa en la Fig.8 ninguna de las mutantes con fenotipo de FC se estaba expresando en menor cantidad y todas mostraban una expresión similar (todas las muestras para western se calculó la cantidad de células por Densidad óptica y se pusieron por igual cantidad), sabiendo que el efecto no se debe a una ausencia de la expresión de la proteína.

### 5.3 Evaluación de las mutantes con fenotipo de F.C. (Fosfatasa Constitutiva)

Lo siguiente que se quiso hacer es ver la actividad de fosfatasa de las mutantes FC, para esto se crecieron todas las mutantes FC en medio mínimo con Piruvato como única fuente de carbono, bajo estas condiciones se sabe que se da lugar la acumulación de Acetil fosfato el cual actúa como un fosfo donador de bajo peso molecular que puede fosforilar directamente a los

reguladores de respuesta, si bajo estas condiciones las mutantes retienen actividad de fosfatasa se va a observar poca actividad del reportero y si por el contrario no tienen actividad de fosfatasa se va a observar un alta expresión del reportero, de esta manera el resultado nos indicará si la mutación generó algún cambio estructural que dejó a ArcB sin actividad alguna o si la mutación generó una versión de ArcB con un estado de fosfatasa constitutiva. Como se muestra en la Fig.9 todas las mutantes FC retienen actividad de fosfatasa e incluso muestran una mayor actividad de fosfatasa que la cepa silvestre, por su parte las mutantes CC muestran menor activación que la cepa  $\Delta arcB$  probablemente debido a que una mayor activación del sistema Arc lleva a que el metabolismo se redirige hacia la formación de acetato a partir de Acetil fosfato[24].

Una vez que se sabía que las mutantes FC tenían actividad de fosfatasa se realizaron ensayos con  $\beta$ -mercaptoetanol un agente reductor que reduce cisteínas y por lo tanto es capaz de activar ArcB en condiciones aerobias[8]. Inesperadamente la mutantes FC no se activaron en presencia de 20mM de  $\beta$ -mercaptoetanol Fig.10 Estos resultados podrían indicar dos cosas la primera es que el  $\beta$ -mercaptoetanol ya no fuera capaz de reducir las cisteínas de estas proteínas mutantes y la segunda es que estas versiones mutadas hayan perdido su regulación por cisteínas, tal vez debido a grandes cambios estructurales.

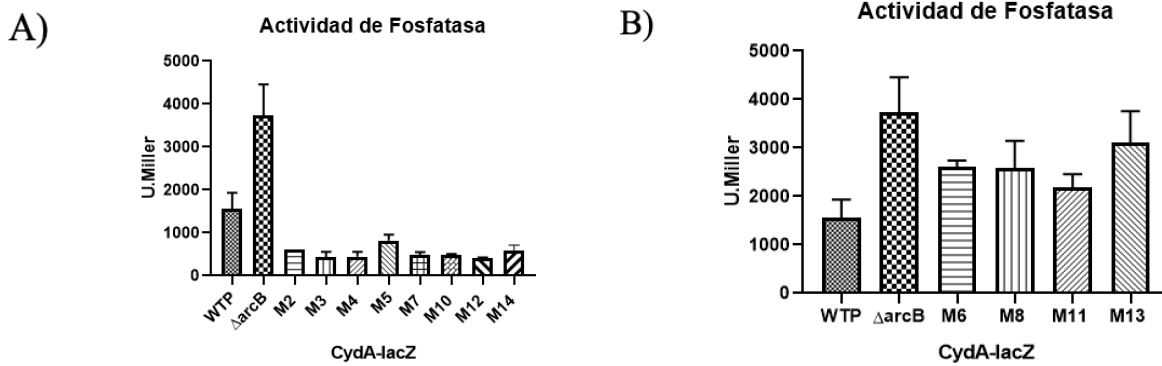


Fig.9 Actividad de fosfatasa de las mutantes, cepas crecidas en M9 con piruvato en donde se acumula acetil fosfato. A) Mutantes FC B) Mutantes CC

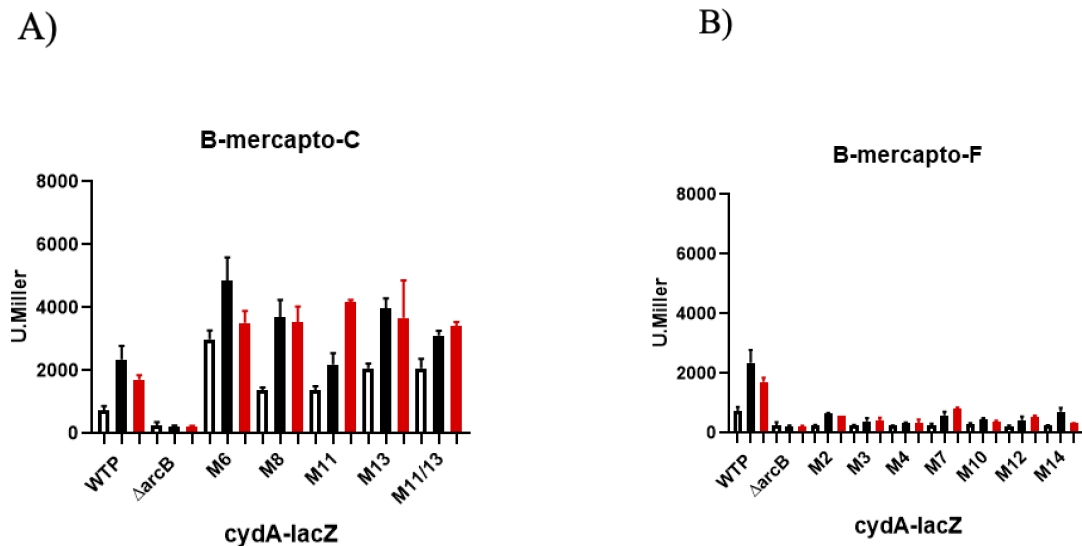


Fig. 10 Efectos del  $\beta$ -mercaptoetanol sobre el reportero *cydA-lacZ*. Las barras blancas muestran condiciones de aerobiosis, las barras negras muestran condiciones de anaerobiosis y las barras rojas muestran crecimiento aerobio con 20mM de  $\beta$ -mercaptoetanol. A) Mutantes CC B) Mutantes FC.

Para ver si las mutaciones tuvieron grandes efectos en la estructura se realizó el modelado del monómero con una de las mutaciones de FC, como se esperaba Fig.11 no se ven grandes diferencias entre el modelo de ArcB silvestre y el ArcB con la mutación N111A (M4), por lo que se trató de investigar más a detalle el efecto de las mutaciones

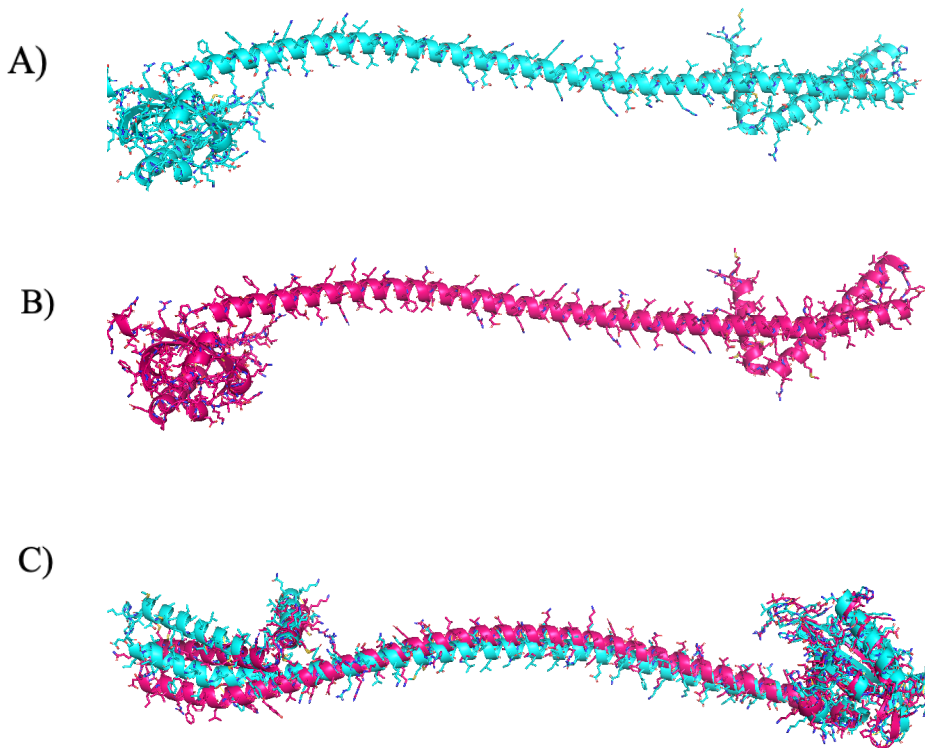


Fig.11 Modelos del monómero de ArcB. A) Monómero de ArcB WT B) Monómero de ArcB M4 (N111A) C) Alineamiento de los dos modelos silvestre y mutado.

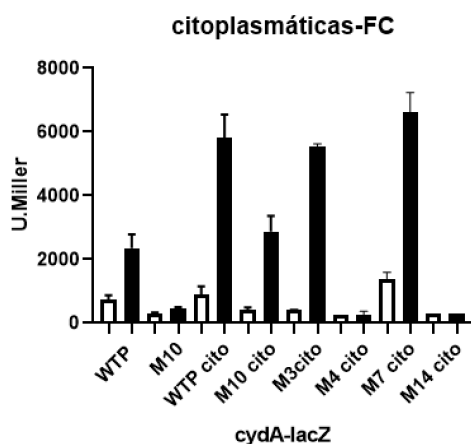
Lo siguiente que se hizo fue generar versiones citoplasmáticas de las mutantes FC, esto debido a que se sabe que una versión citoplasmática de ArcB es una cinasa semi constitutiva[18] además de que si se propone que las mutantes FC no permiten el paso de las menaquinonas pero sí de las ubiquinonas se espera que al separar de la membrana estas versiones mutadas de la proteína ahora si pudieran activar. Lo que observamos en la Fig.12A es que algunas de las mutantes FC

recuperan su actividad en anaerobiosis lo que indica que las mutaciones estaban generando efectos sobre la regulación por algún elemento de la membrana y no por cambios en la estructura.

Debido a que las mutantes citoplasmáticas FC recuperaban regulación se decidió comprobar que estas mutantes ahora si pudieran activarse en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol, se esperaba que ahora que ya había recuperado su regulación aerobio/anaerobio no tuvieran problemas para activarse con 20mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, sin embargo lo que se encontró fue que aunque algunas de las mutantes si mostraban mayor actividad en aerobiosis en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol ninguna de las mutantes supera el 55% de la actividad de B-galactosidasa observada en anaerobiosis, mientras que la cepa silvestre citoplasmática alcanza hasta el 75% de su actividad máxima en aerobiosis con  $\beta$ -mercaptoetanol.

Para verificar que las mutantes citoplasmáticas siguieran teniendo regulación aerobio/anaerobio se realizó un cambio de condiciones de anaerobiosis a aerobiosis, se esperaba que al ya no estar en la membrana estas versiones no pudieran disminuir la expresión del reportero, sorprendentemente se encontró que las mutantes citoplasmáticas seguían siendo capaz de inhibir la actividad de ArcB al entrar en condiciones de aerobiosis Fig.13 Estos resultados parecían dar a entender que las mutantes ya no tenían una regulación por cisteínas, para comprobarlo definitivamente se hicieron mutantes triples que tuvieran las dos cisteínas conservadas cambiadas por alaninas (C180A y C241A) y una de las mutaciones que genera fenotipo de fosfatasa. Lo que se espera en las mutantes de cisteínas más la mutación de FC es que si el efecto de la mutación se debe a un cambio estructural el fenotipo de la mutante sea el de una mutante FC, sin embargo si el fenotipo se vuelve el de una Cinasa constitutiva las mutaciones estarían afectando la regulación de algún elemento en la membrana (posiblemente quinonas) necesario para la reducción de los puentes disulfuro. Lo que se muestra en la Fig.14 es que si hay mutantes FC que se vuelven Cinasas Constitutivas cuando hay un cambio en las cisteínas por alaninas, lo que nos indica que estas mutantes estaban afectando la regulación por cisteínas.

A)



B)

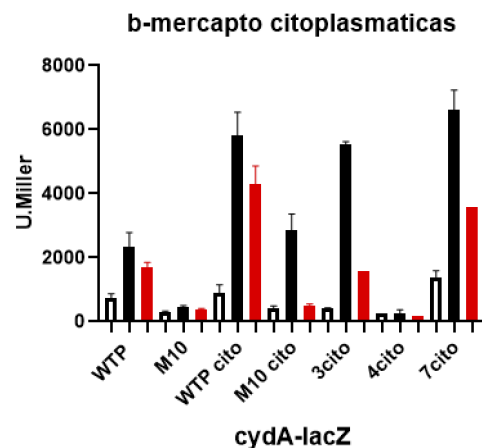




Fig 12.Regulación de ArcB citoplasmático. A) Ensayo de beta galactosidasa de las mutantes FC citoplasmáticas. B) Actividad de beta galactosidasa de las mutantes FC citoplasmáticas en presencia de 20mM de 2-mercaptoetanol. Se muestran en barras blancas condiciones de aerobiosis, barras negras condiciones de anaerobiosis y barras rojas condiciones aeróbicas con 20 mM de 2-mercaptoetanol

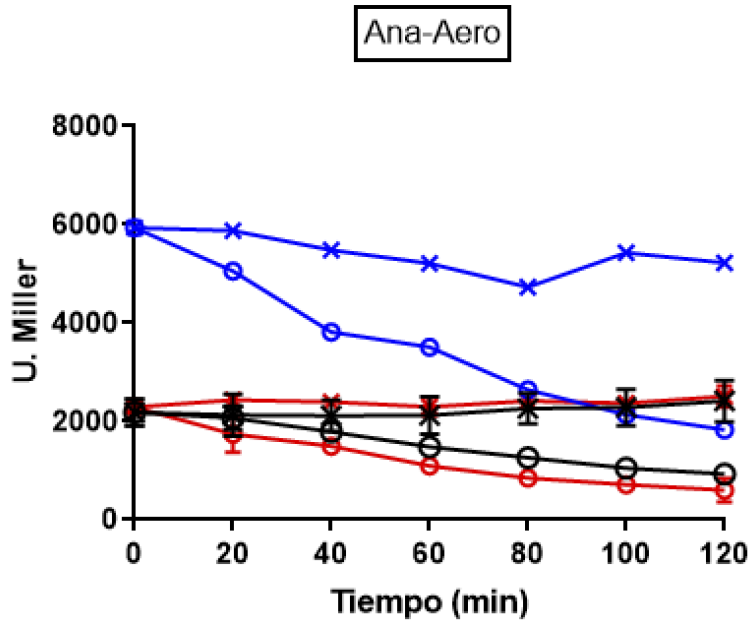


Fig 13. Ensayo de cambio de condiciones anaeróbicas a aeróbicas en las mutantes FC citoplasmáticas. En color azul se muestra la cepa silvestre citoplasmáticas, en negro se muestra una cepa silvestre en membrana, en rojo se muestra la mutante M10 citoplasmática. Los puntos que se marcan con (X) muestran condiciones de anaerobiosis mientras que los puntos (O) muestran condiciones de aerobiosis. En el tiempo 0 se realizó el cambio de condiciones de anaerobiosis a condiciones de aerobiosis

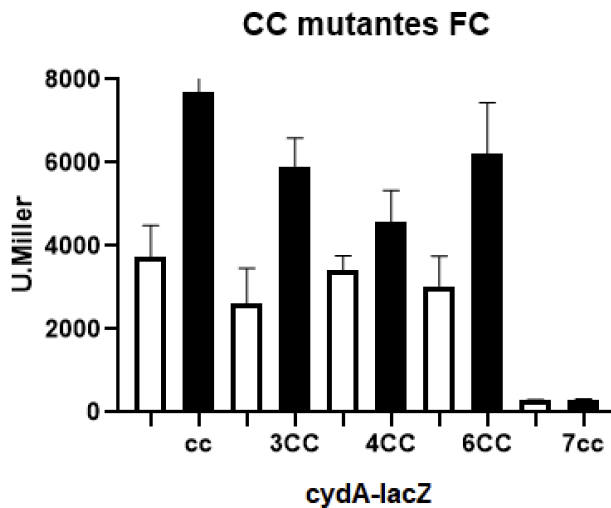


Fig.14 Actividad de beta galactosidasa de las mutantes FC con las cisteínas mutadas por alaninas. CC es la cepa con las cisteínas mutadas, 3CC es una cepa con las cisteínas mutadas y la mutación M3, 4CC contiene la mutación M4,

6CC contiene la mutación M6 y 7CC contiene la mutación M7. Barras blancas son condiciones de aerobiosis y barras negras indica condición de anaerobiosis.

Debido a que este resultado fue un poco inesperado se decidió realizar una mutante que tuvieran los cambios en las cisteínas y que además fuera citoplasmática esto con el fin de ver si las versiones citoplasmáticas se encuentran reguladas por algún otro elemento que no sean cisteínas, para este fin también se evaluaron tanto a la mutante de cisteínas en membrana como a la mutante de cisteínas en citoplasma bajo un cambio de condiciones de anaerobiosis a aerobiosis Fig. 15

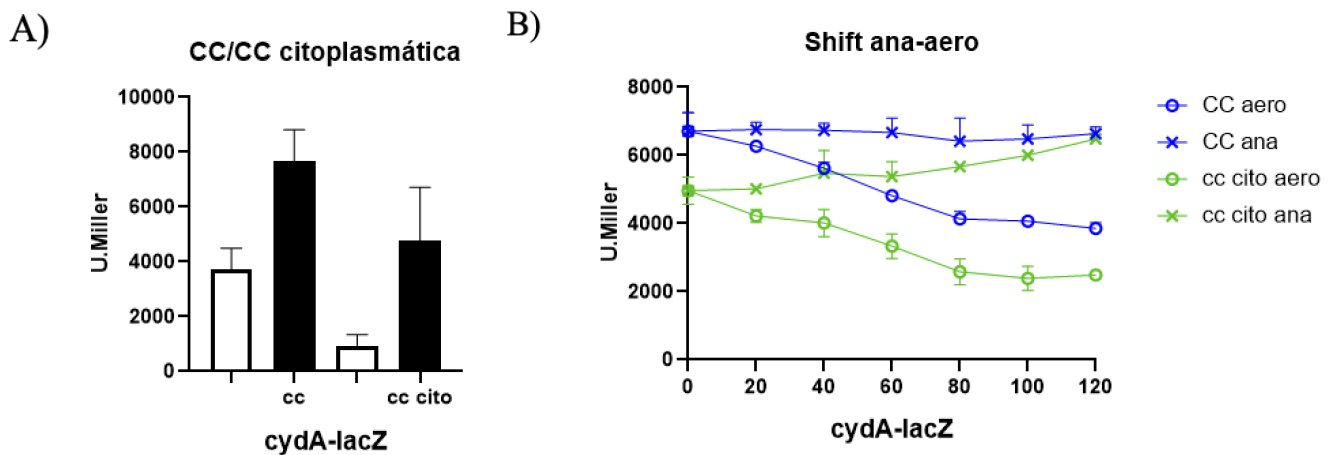


Fig.15 Regulación de la mutante CC citoplasmática comparada con la mutante CC de membrana. A) Actividad de beta galactosidasa de las mutantes CC (membrana) y CC cito ( citoplasmática). B) Cambio de condiciones anaeróbicas a aerobias, en azul se muestra la mutante CC de membrana y en verde se muestra la mutante CC citoplasmática. Los puntos que se marcan con (X) muestran condiciones de anaerobiosis mientras que los puntos (O) muestran condiciones de aerobiosis. En el tiempo 0 se realizó el cambio de condiciones de anaerobiosis a aerobiosis.

Podemos ver en la fig.15 que la mutante en cisteínas citoplasmática ahora ya adquiere una nueva regulación y se encuentra apagada en aerobiosis, esto nos confirma que las mutantes citoplasmáticas adquieren un nuevo tipo de regulación independiente de cisteínas, se ve incluso en el cambio de anaerobiosis a aerobiosis como la mutante citoplasmática va aumentando su actividad anaerobia y en condiciones aeróbicas baja mucho su actividad. En conjunto estos resultados parecen indicar que las mutaciones FC están afectando la regulación por cisteínas a través de algún elemento encontrado en la membrana.

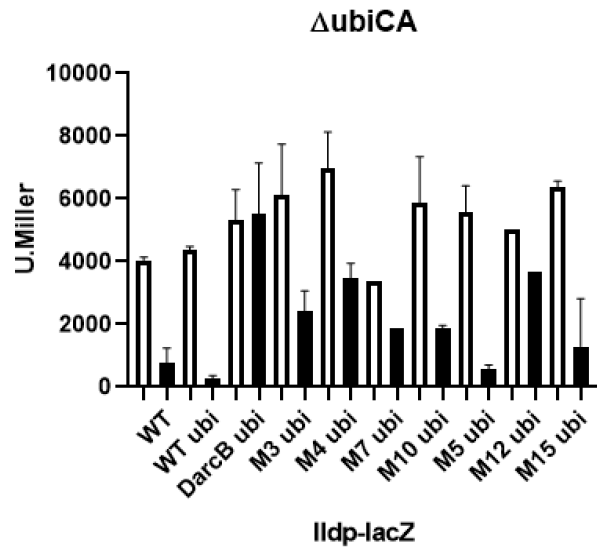


Fig.16 Mutantes de ubiquinonas FC. Se muestra la actividad del reportero *lldp-lacZ* en varias de las mutantes FC con una delección en los genes de biosíntesis de ubiquinonas ( $\Delta ubiCA$ ). En barras blancas se muestran condiciones de aerobiosis y en barras negras condiciones de anaerobiosis, todos los ensayos se realizaron con 100 mM de MOPS 7.4, 20 mM de Xilosa y 20 mM de L-lactato.

Para obtener más datos que respalden la idea de que las mutaciones en el túnel afectan la regulación por quinonas, se realizaron delecciones en los genes de biosíntesis de ubiquinona *ubiCA* de las mutantes FC, y como se ve en la Fig.16 todas las mutantes tuvieron una recuperación de su actividad de cinasa en condiciones de anaerobiosis, por lo que estos resultados soportan la idea de que estas mutaciones están afectando la regulación por la poza de quinonas.

#### 5.4 Evaluación de las Mutantes CiC (cinasa constitutiva)

En el caso de las mutantes CiC (cinasa constitutiva) lo primero que se quería investigar sobre ellas es que su fenotipo no se debiera a la sobreexpresión de la proteína por lo que hizo un western blot para ver que se estuvieran expresando en niveles similares, y lo que se vio Fig.16 fue que las mutantes M25 y M20 se estaban expresando en menor cantidad pero que todas las demás se expresan a niveles iguales a los de la cepa silvestre. M25 y M20 a pesar de tener niveles de expresión distintos estos niveles no tenían correlación con el nivel de actividad del reportero observado.



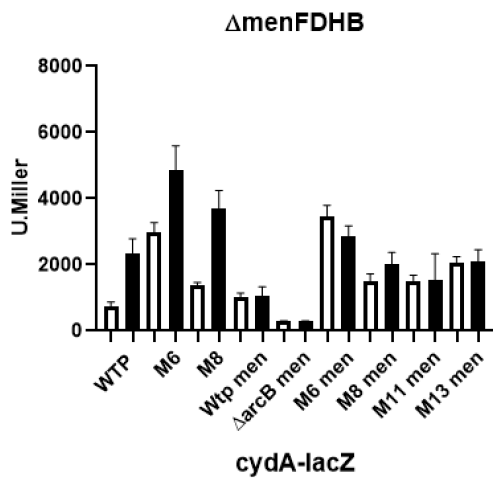
WT  $\Delta arcB$  PM M6 M8 M11 M13 M25 M17 M20

Fig.17 Western blot de las mutantes CC. Se muestran de izquierda a derecha las cepas WT, $\Delta arcB$ , Marcador de peso molecular (PM), Mutante M6, mutante M8, mutante M11, mutante M13, mutante M25, mutante M17 y mutante M20. M25 y M20 se expresan en menor cantidad que el resto de las mutantes.

Una vez que se observó que el fenotipo de las mutantes no se debía a sobreexpresión se decidió ver el efecto que tenía la delección de los genes de biosíntesis de menaquinona y demetil menaquinona, se espera que como las menaquinonas son necesarias para la activación anaerobia su delección tenga efectos sobre las mutantes CiC. La delección de los genes de menaquinona en las mutantes CiC no tuvo efectos en la expresión del reportero *cydA-lacZ* en condiciones aerobias, en anaerobiosis es donde se vio el mayor efecto ya que la expresión del reportero no aumentó como lo hacía en las versiones silvestre Fig.17A, estos resultados nos indican que estas mutantes no necesitan de las menaquinonas para estar activas por lo que puede ser que algo más las está activando en ausencia de menaquinonas o simplemente el ArcB está activo desde el inicio y se inhibe posteriormente y en estas mutantes la inhibición no se puede dar o no se da completamente.

El hecho de que al quitar las menaquinonas y demetil menaquinonas hizo que se aumentara la expresión del reportero en aerobiosis indicó que probablemente las demetil menaquinonas siguen inhibiendo parcialmente a las mutantes CiC para comprobarlo se realizaron mutantes CiC con una delección en el gen *ubiE*, esta mutación genera cepas que solo contienen demetil menaquinonas, y como se ve en la Fig 17B. aeróbicamente todas las mutantes tuvieron una disminución de entre 40% y hasta 66% respecto a sus versiones silvestres, esto nos muestra que las mutantes CiC siguen siendo sensibles a una inhibición parcial por demetil menaquinonas pero no por ubiquinonas, esto podría deberse a una similitud entre las estructuras de menaquinonas y demetil menaquinonas, de manera que las mutaciones impiden el paso de ubiquinona pero no el de menaquinona.

A)



B)

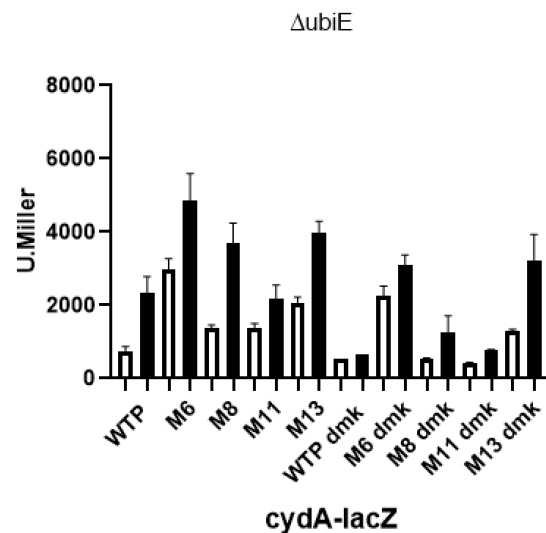


Fig.18 Actividad de beta galactosidasa de mutantes deficientes en menaquinonas y mutantes que sólo contienen demetil menaquinonas. A) mutantes CC con delección en los genes de biosíntesis de menaquinonas ( $\Delta menFDHB$ ) B) mutantes CC con delección en el gen *ubiE*, solo puede sintetizar demetil menaquinona.

Para comprobar que las ubiquinonas ya no tienen efecto inhibiendo a las mutantes CiC se hicieron cambios de anaerobiosis a aerobiosis y se observa Fig.18 que las mutantes M6 y M11 se mantienen activas después de pasar a condiciones de aerobiosis, es cierto que la mutante M11 si disminuye aeróbicamente su actividad pero se esperaba ya que es una cinasa semi constitutiva por lo que se espera que todavía tenga un poco de regulación por ubiquinonas pero no completa.

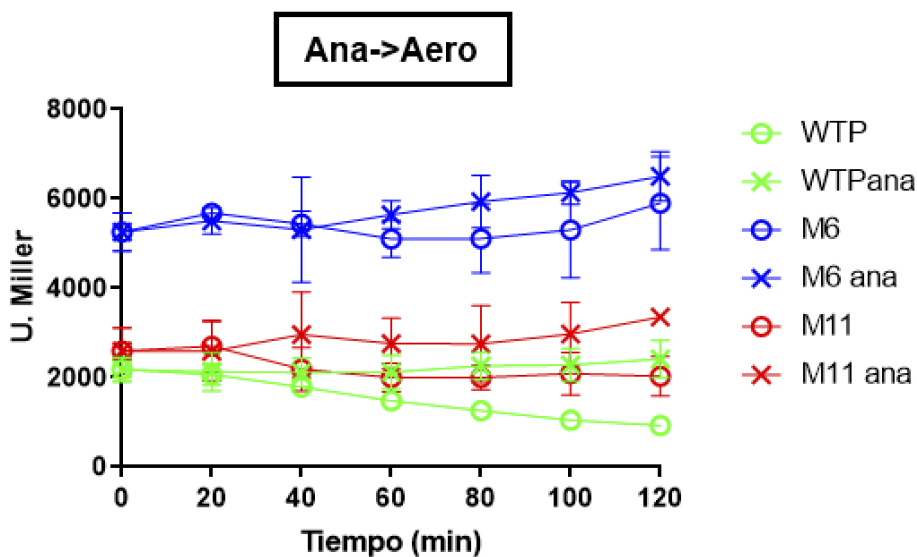


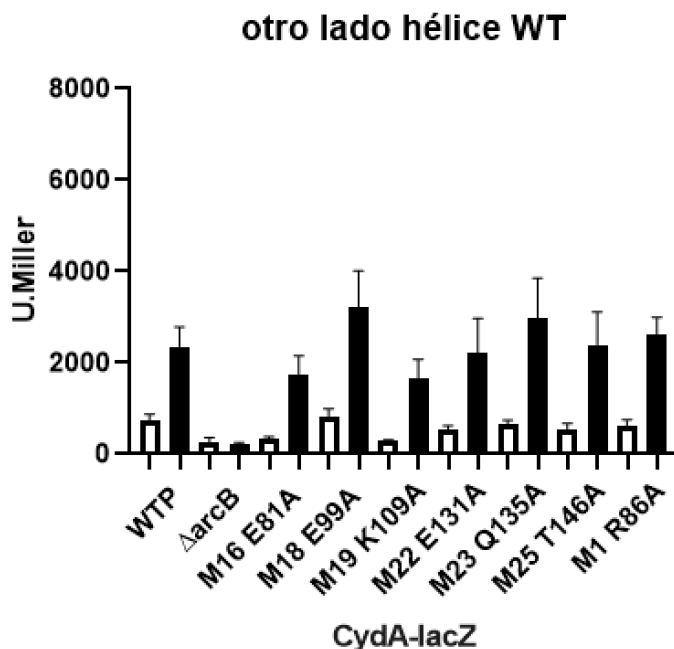
Fig.19 Ensayo de cambio de condiciones anaeróbicas y aeróbicas de las mutantes CC. En azul se muestra la mutante CC M6, en rojo se muestra la mutante M11 y en verde se muestra la cepa WT. Los puntos que se marcan con (X) muestran condiciones de anaerobiosis mientras que los puntos (O) muestran condiciones de aerobiosis.

Con los resultados obtenidos de las mutantes CiC se puede ver que las mutaciones si afectan la habilidad de ubiquinona de inhibir ArcB mientras que demetil menaquinona sigue siendo capaz de inhibir ArcB aunque lo hace en menor medida y no parece hacerlo después de un cambio de anaerobiosis a aerobiosis. También se vio que las menaquinonas no son necesarias para que las mutantes CiC estén como cinasas constitutivas.

### 5.5 Efecto de las mutaciones puntuales fuera del túnel

Si la hipótesis que tenemos sobre la formación de un túnel es correcta se espera que al mutar amino ácidos del otro lado de la alfa hélice que estén viendo hacia el citoplasma, estos no tenga efecto y nos sirvan como un control de las mutaciones iniciales que estarían dentro del túnel. Se hicieron once mutaciones del otro lado del túnel que se espera que no tengan efectos, de las once mutaciones que se realizaron siete no tuvieron efectos y fueron silvestres mientras que dos fueron FC y dos CiC Fig.20, estos resultados son un poco inesperados ya que se si el efecto se debe a que las quinonas no pueden bajar e interactuar con las quinonas estas mutaciones no debieron tener efectos. El modelo del tetrámero según los parámetros de alphafold no es muy preciso en algunas regiones de la alfa hélice por lo que podría ser que algunas de estas mutaciones que tienen efectos estén viendo hacia el interior del túnel pero solo están hacia el exterior en el modelo y no en la realidad, para poder ver qué está pasando será necesario tener la estructura de la proteína para ver cómo se acomodan los residuos en verdad.

A)



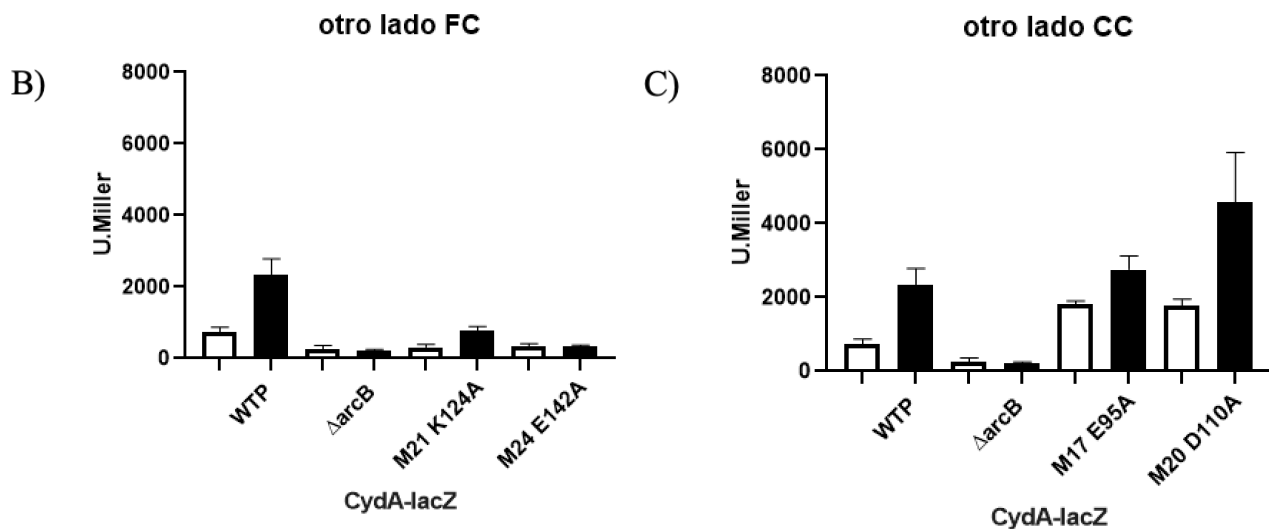


Fig.20 Actividad de beta galactosidasa de las mutantes fuera del túnel (otro lado de la hélice). A) Se muestran las seis mutaciones que no tuvieron efecto (fenotipo silvestre) B) Se muestran las mutaciones del otro lado de la hélice que resultaron en un fenotipo de fosfatasa constitutiva. C) Se muestran las mutaciones del otro lado de la hélice que resultaron en un fenotipo de cinasa constitutiva.

## 6. DISCUSIÓN

Se sabe que *E. coli* es capaz de adaptarse a condiciones de crecimiento variables entre ellas cambios en el estado redox de la célula, esto lo logra en gran medida gracias al SDC ArcB/ArcA[1,3,5,8]. La CS ArcB es capaz de sensar el estado redox a través de la poza de quinonas las cuales pueden reducir y oxidar las cisteínas conservadas en el dominio PAS de ArcB y de esta manera regulan el estado de cinasa/fosfatasa de la proteína[9], sin embargo aún no quedaba claro cómo es que las quinonas que son moléculas muy hidrofóbicas y que se encuentran en membrana, podían interactuar con las cisteínas citoplasmáticas de ArcB. Con la información disponible de las predicciones de la estructura cuaternaria de ArcB propusimos un modelo en el cual ArcB se encuentra en forma tetramérica y forma un túnel en la región linker que conecta la membrana con las cisteínas del dominio PAS de ArcB.

Para comprobar nuestra hipótesis seleccionamos aminoácidos que pudieran ser de importancia para el paso de quinonas a través del túnel utilizando como base nuestro modelo bioinformático. De las catorce mutaciones iniciales seleccionadas doce tuvieron efectos significativos sobre la regulación del SDC ArcB/ArcA esto visto por su efecto en la expresión del reportero *cydA-lacZ* o el reportero *lldp-lacZ*.

Dentro de las mutaciones que tuvieron efectos existen dos fenotipos marcados que se generan por las mutaciones puntuales, las mutantes FC (fosfatasa constitutiva) y las mutantes CiC (Cinasa

Constitutiva). Para evaluar más a detalle los efectos de las mutaciones FC primero se realizó un western blot en cual se confirmó que la mutantes FC no se expresan en cantidades diferentes a la proteína silvestre, con esto nos aseguramos de que los efectos vistos no se deben simplemente a una expresión diferencial de la proteína mutada respecto a su versión silvestre.

Después para se realizaron ensayos para medir la actividad de fosfatasa de las versiones FC de ArcB, esto se realizó creciendo las células en medio mínimo con piruvato 40 mM como única fuente de carbono, se espera que si las versiones mutadas perdieron su actividad de fosfatasa debido a cambios estructurales grandes en este ensayo se debería ver una expresión elevada del reportero, como se esperaba este no fue el caso y todas las mutantes FC no solo retuvieron actividad de fosfatasa sino que tuvieron una mayor actividad de fosfatasa comparada con la cepa silvestre.

Como las mutantes FC presentaban actividad de fosfatasa el siguiente paso fue evaluar si eran capaces de responder a la presencia de un agente reductor como el  $\beta$ -mercaptoetanol el cual puede reducir cisteínas y generar que ArcB cambie a un estado de cinasa aún en aerobiosis [8], sorprendentemente ninguna de las mutantes FC respondieron a la presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol o de DTT (datos no mostrados), esto sugería que estas mutantes habían perdido su regulación normal por lo que se realizaron versiones citoplasmáticas de las mutantes FC ya que se sabe que las versiones citoplasmáticas de ArcB se encuentran como cinasa semi constitutiva [6,18], si las mutaciones tuvieron de alguna forma efectos estructurales las versiones citoplasmáticas deberían permanecer con el mismo fenotipo ya que los efectos en la estructura deberían persistir, sin embargo si este no fuera el caso las versiones citoplasmáticas deberían poder estar en un estado de cinasa ya que se están separando de la membrana y por lo tanto se están separando de la señal inhibitoria del estado de cinasa, las ubiquinonas, como se esperaba la mayoría de las mutaciones FC recuperaron parte de su regulación aerobio/anaerobio y ahora si presentaban condiciones donde se encontraban como cinasas, a pesar de esto estas versiones seguían sin responder completamente ante la presencia de  $\beta$ -Mercaptoetanol por lo que se realizó una versión citoplasmática de la mutante doble en ambas cisteínas para ver si esta tenía regulación, y por lo visto en los ensayos de beta galactosidasa las versiones citoplasmáticas de ArcB pierden su regulación por cisteínas y adquieren un nuevo tipo de regulación, estos experimentos en conjunto nos indicaron que las mutaciones FC probablemente no están generando efectos estructurales y que están afectando como elementos de la membrana regulan la actividad cinasa/fosfatasa de ArcB.

Para confirmar sin duda alguna si las mutantes FC siguen estando reguladas por cisteínas se realizaron triples mutantes que contienen las mutaciones en cisteínas (C180A y C241A) además de alguna de las mutaciones puntuales que generan el efecto de FC, se encontró que las mutaciones FC al tener mutadas las cisteínas por alaninas se comportan como Cinasas constitutivas por lo que indicaban que las mutaciones FC de ArcB siguen siendo reguladas por cisteínas.

Finalmente se realizó una delección en los genes de biosíntesis de ubiquinonas en las mutantes FC ya que una explicación para el fenotipo observado en estas mutantes es que estas mutaciones puntuales no permiten el paso de menaquinonas pero si el paso de ubiquinonas por lo que se



esperaba que la delección en los genes de biosíntesis de ubiquinonas tuviera el efecto de hacer que se recuperara la actividad cinasa en estas mutantes, esto fue lo observado en los ensayos de B-galactosidasa aunque no se recuperó la actividad de cinasa a los niveles de una silvestre esto probablemente se debe a que en estas cepas todavía existen demetilmenaquinonas las cuales pueden inhibir todavía a ArcB.[16]

En el caso de las mutantes CiC al realizar western blot se encontró que la mayoría de las proteínas se expresan en cantidades iguales a la versión silvestre sin embargo las mutantes M20 y M25 se expresan en menor cantidad, a pesar de esto, no parece que este cambio de expresión este afectando la regulación ya que no hay correlación entre un menor nivel de expresión de la proteína y mayor actividad de cinasa de ArcB o viceversa.

En las mutantes CiC se realizaron delecciones en los genes de menaquinonas ( $\Delta menFDHB$ ) y en los genes de menaquinonas y ubiquinonas ( $\Delta ubiE$ ), lo que se encontró fue que las mutantes CiC no necesitan de las menaquinonas para estar activas y que al aumentar la cantidad de demetilmenaquinonas estas si son capaces de inhibir parcialmente la actividad de ArcB, con esto nos parece indicar que en las mutantes de CiC ya no son sensibles a la inhibición por ubiquinonas, para ver asegurarse de que este fuera el caso se realizó un cambio de condiciones de anaerobiosis a aerobiosis en las mutantes CiC y se encontró que estas mutantes ya no se reprime la expresión del reportero *cydA-lacZ* por lo que se muestra una incapacidad de las ubiquinonas de inhibir la actividad de cinasa de ArcB.

Por último si el efecto de las mutantes es efectivamente afectando el paso de las quinonas se esperaría que mutantes del otro lado del modelo fuera del túnel no tengan efecto, se seleccionaron once mutantes del otro lado del túnel y siete de once mutantes no tuvieron efectos mientras que dos tuvieron efecto de FC y dos de CiC. Estos resultados dan soporte a la hipótesis del túnel aunque algunas de las mutantes tuvieron efectos ya que estos se pueden deber a que el modelo no está prediciendo con precisión la posición de estas mutaciones, por esto es necesario obtener la estructura de la proteína para poder identificar la posición correcta de todos los aminoácidos seleccionados para mutación puntual.

## 7 Conclusiones

- El modelo del tetrámero de ArcB predice la formación de un túnel que conecta la membrana con las cisteínas del dominio PAS
- Los aminoácidos que se predicen dentro del túnel tienen efectos sobre la regulación del estado de cinasa/fosfatasa ArcB
- Las mutantes FC se expresan en cantidades iguales a un ArcB silvestre y siguen reteniendo actividad de fosfatasa
- Las mutantes FC siguen estando reguladas por cisteínas
- Las mutantes FC se ven afectadas por cambios en la poza de quinonas
- Las mutantes CiC no necesitan de las menaquinonas para estar como cinasas constitutivas

- Las mutantes CiC siguen siendo inhibidas parcialmente por demetilmenaquinonas
- Las mutantes CiC ya no son sensibles a la inhibición por ubiquinonas.
- Las mutaciones en el otro lado de la hélice no tuvieron efectos sobre la regulación del estado de cinasa/fosfatasa ArcB

## 8 Perspectivas

- Obtener la estructura de ArcB por cristalografía
- Completar la generación de las triples mutantes FC/CC
- Generar mutantes que generen impedimento estérico y bloqueen el túnel.

## 9 REFERENCIAS

1. BARBA-OSTRIA, Carlos A.. Los sistemas de dos componentes: circuitos moleculares versátiles. *TIP* [online]. 2014, vol.17, n.1 [citado 2021-06-24], pp.62-76. Disponible en: <[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-888X2014000100005&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2014000100005&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 1405-888X.
2. Galperin MY. What bacteria want. *Environ Microbiol.* 2018 Dec;20(12):4221-4229. doi: 10.1111/1462-2920.14398. Epub 2018 Oct 25. PMID: 30187651; PMCID: PMC7020242.
3. NUNEZ-OREZA, Luis Alberto; GEORGELLIS, Dimitris y ALVAREZ, Adrián F.. ArcB: El sensor del estado redox en bacterias. *TIP* [online]. 2014, vol.17, n.2 [citado 2021-06-24], pp.135-146. Disponible en: <[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-888X2014000200004&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2014000200004&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 1405-888X.
4. Groisman, E. A. (2016). *Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. Annual Review of Microbiology, 70(1), 103–124.* doi:10.1146/annurev-micro-102215-095331
5. Brown, A. N., Anderson, M. T., Bachman, M. A., & Mobley, H. L. T. (2022). The ArcAB Two-Component System: Function in Metabolism, Redox Control, and Infection. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 86(2), e0011021.* <https://doi.org/10.1128/mmbr.00110-21>
6. Kwon, O., Georgellis, D., Lynch, A.S., Boyd, D. & Lin, E.C. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region. *J. Bacteriol.* **182**, 2960-2966 (2000).
7. Iuchi, S., Chepuri, V., Fu, H. A., Gennis, R. B., & Lin, E. C. (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.. *Journal of Bacteriology, 172(10), 6020-6025.* <https://doi.org/10.1128/jb.172.10.6020-6025.1990>
8. Malpica, R., Franco, B., Rodríguez, C., Kwon, O. & Georgellis, D. Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**, 13318-13323 (2004).
9. Álvarez, A. F., Rodríguez, C. & Georgellis, D. Ubiquinone and menaquinone electron carriers represent the yin and yang in the redox regulation of the ArcB sensor kinase. *J. Bacteriol.* **195**, 3054-3061 (2013).

10. Iwata, M., Abramson, J., Byrne, B., & Iwata, S. . (2003). *Structure and function of quinone binding membrane proteins. Advances in Protein Chemistry*, 151–176. doi:10.1016/s0065-3233(03)63007-x
11. Vázquez-Ciros, O. J., Alvarez, A. F., & Georgellis, D. (2020). Identification of Z nucleotides as an ancient signal for two-component system activation in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(52), 33530–33539. <https://doi.org/10.1073/pnas.2006209117>
12. McCleary, W. R., & Stock, J. B. (1994). Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *The Journal of biological chemistry*, 269(50), 31567–31572.
13. Jung W.S., Jung Y.R., Oh D.B., Kang H.A., Lee S.Y., Chavez-Canales M., Georgellis D., Kwon O. Characterization of the Arc two-component signal transduction system of the capnophilic rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens* FEMS Microbiol. Lett, 284 (2008), pp. 109-119 [10.1111/j.1574-6968.2008.01187.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01187.x) 18462392
14. Georgellis D., Kwon O., Lin E.C., Wong S.M., Akerley B.J. Redox signal transduction by the ArcB sensor kinase of *Haemophilus influenzae* lacking the PAS domain *J. Bacteriol*, 183 (2001), pp. 7206-7212 [10.1128/JB.183.24.7206-7212.2001](https://doi.org/10.1128/JB.183.24.7206-7212.2001) 11717280
15. Nitzschke A, Bettenbrock K (2018) All three quinone species play distinct roles in ensuring optimal growth under aerobic and fermentative conditions in *E. coli* K12. *PLoS ONE* 13(4): e0194699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194699>
16. Sharma, P., Stagge, S., Bekker, M., Bettenbrock, K., & Hellingwerf, K. J. (2013). Kinase activity of ArcB from *Escherichia coli* is subject to regulation by both ubiquinone and demethylmenaquinone. *PloS one*, 8(10), e75412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075412>
17. Lee, P. T., Hsu, A. Y., Ha, H. T., & Clarke, C. F. (1997). A C-methyltransferase involved in both ubiquinone and menaquinone biosynthesis: isolation and identification of the *Escherichia coli* ubiE gene. *Journal of bacteriology*, 179(5), 1748–1754. <https://doi.org/10.1128/jb.179.5.1748-1754.1997>
18. Rodriguez, C., Kwon, O., & Georgellis, D. (2004). Effect of D-lactate on the physiological activity of the ArcB sensor kinase in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 186(7), 2085–2090. <https://doi.org/10.1128/JB.186.7.2085-2090.2004>
19. Uden G. Differential roles for menaquinone and demethylmenaquinone in anaerobic electron transport of *E. coli* and their *fnr*-independent expression. *Arch Microbiol*. 1988;150(5):499-503. doi: 10.1007/BF00422294. PMID: 2849923.
20. Bolivar F, Rodriguez RL, Betlach MC, Boyer HW (1977). "Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9". *Gene*. 2 (2): 75–93. doi:10.1016/0378-1119(77)90074-9. PMID 344136.
21. Peña-Sandoval GR, Georgellis D. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli* autophosphorylates by an intramolecular reaction. *J Bacteriol*. 2010 Mar;192(6):1735-9. doi: 10.1128/JB.01401-09. Epub 2010 Jan 22. PMID: 20097862; PMCID: PMC2832521.
22. Forloni M, Liu AY, Wajapeyee N. Megaprimer Polymerase Chain Reaction (PCR)-Based Mutagenesis. *Cold Spring Harb Protoc*. 2019 Jun 3;2019(6). doi: 10.1101/pdb.prot097824. PMID: 31160386.
23. Georgellis D, Kwon O, De Wulf P, Lin EC. Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system. *J Biol Chem*. 1998 Dec 4;273(49):32864-9. doi: 10.1074/jbc.273.49.32864. PMID: 9830034.

24. Kumari S, Beatty CM, Browning DF, Busby SJ, Simel EJ, Hovel-Miner G, Wolfe AJ. Regulation of acetyl coenzyme A synthetase in Escherichia coli. J Bacteriol. 2000 Aug;182(15):4173-9. doi: 10.1128/JB.182.15.4173-4179.2000. PMID: 10894724; PMCID: PMC101899.

## 10. Appendices

### 10.1 Lista de Primers utilizados

Nombre de oligos	Secuencia (5' ->3')	Función
ArcB5'(1-x)	CCC GGA TCC CAT ATG AAG CAA ATT CGT CTG CTG GCG C	Contiene sitios NdeI y BamHI, amplifica arcB eco desde el codón de inicio (Fw)
ArcB#6 ZZ-11	TGG CCT TGC TGG GTG AAT TT	Primer que amplifica arcB desde E418 (Rv)
D162A Rv	GTCGGGTGAAGCAGCAAGG AAGGAAC	Para mutar arcB y cambiar la D162 por Alanina (Megaprimer)
T146A Rv	GCTGAATTTGTGCCTCTTCGC GCTC	Para mutar arcB y cambiar la T146 por Alanina (Megaprimer)
E142A Rv	GTCTCTTCGCGCGCTTTGATT TCAATTTTC	Para mutar arcB y cambiar la E142 por Alanina (Megaprimer)
Q135A Rv	GATTTCAATTTTCAGTGCGCC GAAGGTTTCCTGC	Para mutar arcB y cambiar la Q135A por Alanina (Megaprimer)
E131A Rv	CAGTTGGCCGAAGGTTGCCT GCAGTTCTGCTTC	Para mutar arcB y cambiar la E131 por Alanina (Megaprimer)
K124A Rv	GTTCTGCTTCCGCTGCTTCAC GAACGGCAATTTCC	Para mutar arcB y cambiar la k124 por Alanina (Megaprimer)
D110A Rv	GCTGGGCAATATTAGCTTTTA ACTGAACG	Para mutar arcB y cambiar la D110 por Alanina (Megaprimer)
K109A Rv	GGGCAATATTATCTGCTAACT	Para mutar arcB y cambiar la

	GAACGTTGAGGC	K109 por Alanina (Megaprimer)
E99A Rv	GCTCAAATCGCGCGCGCA TCTCCTC	Para mutar arcB y cambiar la E99 por Alanina (Megaprimer)
E95A Rv	GCTCGCGCATCTCCGCCAGTT TTTGCACC	Para mutar arcB y cambiar la E95 por Alanina (Megaprimer)
E81A Rv	GTTGTCGTGACTCCGCCAGT TGCTCGACG	Para mutar arcB y cambiar la E81 por Alanina (Megaprimer)
R86A Rv	CCAGCCGTGACAGAGCTTGT CGTGACTCCTCC	Para mutar arcB y cambiar la R86 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
R86A Fw	GGAGGAGTCACGACAAGCTC TGTCACGGCTGG	Para mutar arcB y cambiar la R86 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
K93A Rv	CATCTCCTCCAGTGCTTGAC CAGCCGTGACAGAC	Para mutar arcB y cambiar la K93 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
K93A Fw	GTCTGTCACGGCTGGTGCAA GCACTGGAGGAGATG	Para mutar arcB y cambiar la K93 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
D101A Rv	CGTTGAGGCTCAAAGCGCGC TCGCGCATC	Para mutar arcB y cambiar la D101 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
D101A Fw	GATGCGCGAGCGCGCTTTGA GCCTCAACG	Para mutar arcB y cambiar la D101 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
N111A Rv	CTGATTTAGCTGGCAATAGC ATCTTTTAACTGAACGTTGAG GCTC	Para mutar arcB y cambiar la N111 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
N111A Fw	GAGCCTCAACGTTTCAGTTAA	Para mutar arcB y cambiar la

	AAGATGCTATTGCCAGCTAA ATCAG	N111 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
E118A Rv	TTTCACGAACGGCAATTGCC TGATTTAGCTGGGCA	Para mutar arcB y cambiar la E118 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
E118A Fw	TGCCAGCTAAATCAGGCAA TTGCCGTTTCGTGAAA	Para mutar arcB y cambiar la E118 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
E126A Rv	TTTCTGCAGTTCTGCTGCCG CTTTTTACGAACG	Para mutar arcB y cambiar la E126 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
E126A Fw	CGTTCGTGAAAAAGCGGCAG CAGAACTGCAGGAAA	Para mutar arcB y cambiar la E126 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
E144A Fw	ATTGAAATCAAAGAGCGCGC AGAGACACAAATTCAGCTC	Para mutar arcB y cambiar la E144 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
K137A Rv	GCGCTCTTTGATTTCAATTGC CAGTTGGCCGAAGGTTTCC	Para mutar arcB y cambiar la K137 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
K137A Fw	GGAAACCTTCGGCCAACTGG CAATTGAAATCAAAGAGCGC	Para mutar arcB y cambiar la K137 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
E144A Rv	GAGCTGAATTTGTGTCTCTGC GCGCTCTTTGATTTCAAT	Para mutar arcB y cambiar la E144 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
E151A Rv	AGAATGAGGATTGCTGCGCG AGCTGAATTTGTGTC	Para mutar arcB y cambiar la E151 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
E151A Fw	GACACAAATTCAGCTCGCGC AGCAATCCTCATTCT	Para mutar arcB y cambiar la E151 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)

R158A Rv	AAGCATCAAGGAAGGAAGCT AAGAATGAGGATTGCTGCTC	Para mutar arcB y cambiar la R158 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
R158A Fw	GAGCAGCAATCCTCATTCTTA GCTTCCTTCCTTGATGCTT	Para mutar arcB y cambiar la R158 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
R182A Rv	GCAGCTCCATCGCGGCGTTA CAGCCGGA AAA	Para mutar arcB y cambiar la R182 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
R182A Fw	TTTTCCGGCTGTAACGCCGC GATGGAGCTGC	Para mutar arcB y cambiar la R182 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
E229A Fw	TGTGTCACTGACCTATGCACA GTGGCTGGATTACC	Para mutar arcB y cambiar la E229 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
E229A Rv	GGTAATCCAGCCACTGTGCAT AGGTCAGTGACACA	Para mutar arcB y cambiar la E229 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
W231A Rv	CGTCCGGGTAATCCAGCGCC TGTTTCATAGGTCAGTG	Para mutar arcB y cambiar la W231 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
W231A Fw	CACTGACCTATGAACAGGCG CTGGATTACCCGGACG	Para mutar arcB y cambiar la W231 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
E229A & W231A Rv	GTCCGGGTAATCCAGCGCCT GTGCATAGGTCAGTGACAC	Para mutar arcB y cambiar E229 & W231 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)
E229A & W231A Fw	GTGTCACTGACCTATGCACA GGCGCTGGATTACCCGGAC	Para mutar arcB y cambiar E229 & W231 por Alanina (Megaprimer y Quickchange)

--	--	--

## 10.2 Efectos de las mutaciones

Nombre de la mutación	Mutación en la secuencia de aminoácidos de arcB 1-778
M1	R86A fenotipo WT (fuera del túnel)
M2	K93A fenotipo de Fosfatasa constitutiva
M3	D101A fenotipo de Fosfatasa constitutiva
M4	N111A fenotipo de Fosfatasa constitutiva
M5	E118A fenotipo WT
M6	E126A fenotipo de Cinasa constitutiva
M7	K137A fenotipo de Fosfatasa constitutiva
M8	E144A fenotipo de Cinasa constitutiva
M9	E151A fenotipo WT
M10	R158A fenotipo de fosfatasa constitutiva
M11	R182A fenotipo de cinasa constitutiva
M12	E229A fenotipo de Fosfatasa constitutiva
M13	W231A fenotipo de Cinasa constitutiva
M14	E229A & W231A fenotipo de Fosfatasa constitutiva
M15	D162A fenotipo de Fosfatasa constitutiva
M16	E81A fenotipo WT
M17	E95A fenotipo de Cinasa constitutiva
M18	E99A fenotipo WT
M19	K109A fenotipo WT
M20	D110A fenotipo de Cinasa constitutiva
M21	K124A fenotipo de Fosfatasa constitutiva
M22	E131A fenotipo WT
M23	Q135A fenotipo WT
M24	E142A fenotipo de Fosfatasa constitutiva



M25	T146A fenotipo WT
-----	-------------------

### 10.3 Abreviaturas

SDC: Sistema de dos Componentes

CS: Cinasa sensora

RR: Regulador de Respuesta

FC:Fosfatasa Constitutiva

CiC:Cinasa Constitutiva

CC:Mutante doble en cisteínas C180A y C241A

cito: Versión citoplasmática de ArcB

UQ:ubiquinonas

MQ:Menaquinona

DMQ: Demetilmenaquinona