



UNIVERSIDAD DEL MAR

CAMPUS PUERTO ESCONDIDO

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

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

EDER FLORES TAMAYO

DIRECTOR:

DR. DIMITRIS GEORGELLIS

PUERTO ESCONDIDO, OAXACA, ABRIL 2014



UNIVERSIDAD DEL MAR

Puerto Escondido - Puerto Ángel - Huatulco

O A X A C A

Puerto Escondido, Oaxaca, 17 de febrero de 2014

ASUNTO: Votos aprobatorios

Dra. Rosalía Guerrero Arenas
Jefa de Carrera de Licenciatura en Biología
Universidad del Mar, campus Puerto Escondido

Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito "**Mecanismo molecular de regulación de la cinasa sensora ArcB de *Haemophilus influenzae***", realizado por el pasante de la Licenciatura en Biología **Eder Flores Tamayo**, con número de matrícula 08080003, quién cubrió los créditos de la Licenciatura en Biología. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Dr. Dimitris Georgellis

Dra. Mónica Marcela Galicia Jiménez

M. en C. Mónica Alicia Calderón Oropeza

M. en C. Julieta Karina Cruz Vázquez

Dr. Adrián Fernando Alvarez

c.c.p M. en C. Gerardo E. Leyte Morales. Vice-Rector Académico, Universidad del Mar
c.c.p. Ing. Ruth Cruz Ríos. Jefa del Departamento de Servicios Escolares, Universidad del Mar

DEDICATORIA

A mis padres,

que sin su enorme apoyo incondicional siempre, su cariño y motivación, no hubiera sido capaz de alcanzar ésta ni ningún otra meta.

A mi hermano,

que siempre ha estado conmigo.

A la familia González Tamayo,

por su cariño, apoyo, motivación y gran ejemplo.

A mis abuelitos José y Josefina,

que siempre han estado conmigo y me han brindado el mejor de los
cariños.

A mi tío Pepe Tamayo

A Cindy,

por su inmenso cariño durante tantos años y por pulirme para ser el estudiante que he sido desde que la conocí.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Universidad del Mar, por haberme hospedado durante cinco años y un prope dentro de sus aulas para darme la oportunidad de formarme como biólogo.

Al Dr. Genaro R. Hernández Castillo, a la M. C. Helisama Colín Martínez y a la Dra. Rosalía Guerrero Arenas por sus grandes enseñanzas dentro y fuera del aula, por brindarme siempre un extra de su tiempo y por motivarme a seguir adelante.

A todos mis profesores por haberme transmitido sus conocimientos y experiencias.

A la familia Ramírez Torres, por su cariño, sus atenciones y por hacerme parte de su familia durante mis estancias en el D. F., los quiero mucho.

A Karensin, Jenny y Selene por su amistad, por esas tardes de paseo y por invitarme a salir siempre de mi cueva.

A Marbe, Nelly y Lalo por su amistad, por esas largas pláticas en la cafe y/o biblioteca y sobre todo por tantas risas.

A los integrantes del laboratorio 226 norte del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM que conocí en las distintas etapas en que realicé este trabajo de tesis, especialmente a Claus, Adrián y Peter que han hecho mi estancia en el labo muy amena, siempre me han ayudado y enseñado muchas cosas.

A todos mis compañeros de generación con los que compartí estos cinco años y dos meses o parte de estos. Y a todos aquellos amigos de diferentes semestres y diferentes carreras con los que compartí algún momento en la biblio, la cancha, las playas, el campo o algún lugar de este enorme planeta.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Dr. Dimitris Georgellis por haberme recibido en su laboratorio por primera vez un verano hace ya más de dos años, por su apoyo en todos los aspectos y por aceptar ser mi director para dirigir esta tesis, la cual se realizó en el laboratorio 226 norte del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Al Dr. Adrián Fernando Alvarez por la co-dirección en el desarrollo de esta investigación, su asesoría en toda la parte experimental y sus comentarios a este escrito.

A la M. en C. Mónica A. Calderón Oropeza, a la M. en C. Julieta K. Cruz Vázquez y a la Dra. Mónica M. Galicia Jiménez por sus comentarios que enriquecieron y mejoraron mucho éste trabajo.

A la M. en C. Claudia Rodríguez Rangel por el apoyo técnico durante la realización experimental de este trabajo.

Al Sr. Pedro Guadalupe Hernández Trujillo por proveer siempre de material para la realización de cada experimento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) que apoyó este trabajo con el proyecto 178033. Y que me otorgó una beca por éste mismo proyecto, con el número de becario 20051.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM quién también apoyó el proyecto a través del donativo IN206412 con el que se me otorgó una beca de Licenciatura /Elaboración de Tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ABREVIATURAS	1
1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1 Sistema de Dos Componentes	4
2.2 Sistema de Dos Componentes de Transducción de Señales Arc	5
2.3 Regulador de Respuesta ArcA	6
2.4 Cinasa Sensora ArcB.....	7
2.5 Mecanismo de señalización y regulación de ArcB.....	8
2.6 <i>Haemophilus influenzae</i> y su ArcB	10
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. OBJETIVOS	13
4.1 Objetivo general	13
4.2 Objetivos particulares	13
5. HIPÓTESIS	14
6. MATERIAL Y MÉTODOS	15
6.1 Mutagénesis de ArcB _{Hi}	15
6.2 Cepas y plásmidos.....	15
6.3 Extracción y purificación de plásmidos	17
6.4 Preparación de células competentes.....	17
6.5 Transformación de células.....	18
6.6 Purificación de ArcB _{Hi} ^{Cit}	19
6.7 Fosforilación <i>in vitro</i> de ArcB _{Hi} ^{Cit} con análogos de quinonas	19
6.8 Ensayos de β-galactosidasa	20
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
7.1 Inhibición de ArcB _{Hi} por análogos de quinona con alto potencial redox	22
7.2 Complementación <i>in vivo</i> de <i>Escherichia coli</i> mutante en <i>arcB</i> por ArcB _{Hi}	24
7.3 Efecto del reemplazo de residuos Cys en ArcB _{Hi}	25
7.4 El residuo Cys37 es necesario para silenciar a ArcB _{Hi} <i>in vivo</i>	27
7.5 Modelo de regulación de ArcB _{Hi}	33
8. CONCLUSIONES	35
9. PERSPECTIVAS	36

10. BIBLIOGRAFÍA.....	37
11. ANEXO 1. SOLUCIONES PARA LISIS ALCALINA	43
12. ANEXO 2. SOLUCIONES PARA PREPARAR CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES	44
13. ANEXO 3. PREPARACIÓN DE BUFFER Z	45
14. ANEXO 4. BUFFERS PARA LA PURIFICACIÓN DE ARCB _{Hi} ^{Cit}	46
15 ANEXO 5. BUFFER DE FOSFORILACIÓN	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de un sistema de dos componentes.	5
Figura 2. Sistema de dos componentes Arc.	6
Figura 3. Estructura de ArcB de <i>E. coli</i> .	8
Figura 4. Modelo de regulación de ArcB de <i>E. coli</i> .	9
Figura 5. Diferencias estructurales de las cinasas sensoras ArcB de <i>E. coli</i> y <i>H. influenzae</i> .	11
Figura 6. Inhibición de la actividad cinasa por análogos de quinonas.	23
Figura 7. Complementación en $\Delta arcB$ de <i>E. coli</i> con ArcB _{Hi} usando $\Phi(cydA-lacZ)$ como reportero.	24
Figura 8. Complementación en $\Delta arcB$ de <i>E. coli</i> con ArcB _{Hi} usando $\Phi(lldP-lacZ)$ como reportero.	25
Figura 9. Expresión del gen reportero $\Phi(cydA-lacZ)$ en mutantes de ArcB _{Hi} .	26
Figura 10. Expresión del gen reportero $\Phi(lldP-lacZ)$ en mutantes de ArcB _{Hi} .	27
Figura 11. Activación de ArcB.	29
Figura 12. Inactivación de ArcB.	31

ABREVIATURAS

aa: aminoácidos

ArcA-P: ArcA fosforilado (activo)

ArcB_{Hi}: ArcB de *Haemophilus influenzae*

ArcB_{Hi}^{Cit}: región citosólica de ArcB de *H. influenzae*

ArcB_{Ms}: ArcB de *Mannheimia succiniciproducens*

Asp576: residuo conservado de aspartato en la posición 576

CS: cinasa sensora

Cys180: residuo de cisteína en la posición 180

Cys241: residuo de cisteína en la posición 241

Cys268: residuo de cisteína en la posición 268

Cys37: residuo de cisteína en la posición 37

D1: dominio receptor de ArcB

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

g: aceleración de la gravedad

H1: dominio transmisor primario de ArcB

His292: residuo conservado de histidina en la posición 292

His717: residuo conservado de histidina en la posición 717

HPt/H2: dominio de fosfotransferencia o dominio transmisor secundario

kDa: kilo Dalton (unidad de masa atómica unificada)

kV: kilovoltios

l: litros

M: concentración molar

m/v: concentración masa/volumen

min: minutos

ml: mililitros

mM: milimolar

mV: milivoltios

ng: nanogramos

nm: nanómetros

°C: grados Celsius

OD₄₂₀: Densidad óptica a 420 nm

OD₅₅₀: Densidad óptica a 550 nm

OD₆₀₀: Densidad óptica a 600 nm

pH: potencial de hidrógeno

psi: libra fuerza por pulgada (pounds per square inch)

Red/Ox: relación reducido/oxidado

rpm: revoluciones por minuto

RR: regulador de respuesta

SDC: sistema de dos componentes

TM: dominio transmembranal

UBM-IFC: Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular

μl: microlitros

1. RESUMEN

Los sistemas de dos componentes (SDC) de transducción de señales son el principal mecanismo por el cual las bacterias perciben las condiciones ambientales y adaptan su metabolismo a éstas. El sistema Arc, que detecta las condiciones redox del ambiente, se conforma por la cinasa sensora ArcB anclada a la membrana y ArcA, su regulador de respuesta. En condiciones reductoras, ArcB de *Escherichia coli* se autofosforila y transfosforila a ArcA vía His292→Asp576→His717→Asp54, el cual regula la expresión de genes relacionados con el metabolismo aeróbico/anaeróbico. Por el contrario, bajo condiciones oxidantes las ubiquinonas oxidan los residuos citoplasmáticos cys180 y cys141 de ArcB de *E. coli*, inhibiendo su actividad cinasa y activándola como fosfatasa, lo que le permite desfosforilar a ArcA vía Asp54→His717→Asp576→P_i. *Haemophilus influenzae* presenta un ArcB (ArcB_{Hi}) homólogo al de *E. coli*, el cual es capaz de complementar mutantes en *arcB* a pesar de que carece de la porción citoplasmática en donde se encuentran los residuos de cys reguladores. En este trabajo se demostró *in vivo* que el residuo cys37 de ArcB_{Hi} participa en la inactivación del sistema Arc en condiciones oxidativas.