

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Decaimiento *in vivo* de la fosforilación en el
sistema de dos componentes ArcA/B de
Escherichia coli.

T E S I S

Que para obtener el grado académico de

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Biól. Gabriela Rosario Peña Sandoval

DIRECTOR DE TESIS: DR. DIMITRIS GEORGELLIS

MÉXICO, D. F.

MAYO, 2005



m343951



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL

AUTÓNOMA DE
MÉXICO

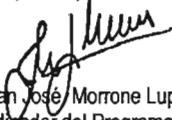
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de marzo del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) Peña Sandoval Gabriela Rosario con número de cuenta 503005827 con la tesis titulada: "Decaimiento in vivo de las fosforilación en el sistema de dos componentes ArcA/B de *Escherichia coli*", bajo la dirección del(a) Dr. Dimitris Georgellis.

Presidente:	Dr. George Dreyfus Cortés
Vocal:	Dr. Hipólito Angel Manjarres Hernández
Secretario:	Dr. Dimitris Georgellis
Suplente:	Dra. Irma Romero Álvarez
Suplente:	Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 22 de abril del 2005


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por CONACyT mediante el proyecto 37342-N
y DGAPA-PAPIIT UNAM por medio del proyecto IN218902

Al CONACyT por la beca de maestría y el apoyo para asistencia a
congresos nacionales otorgados mediante el proyecto 37342-N

Comité Tutorial

Dra. Irma Romero Álvarez
Dr. Dimitris Georgellis
Dr. Georges Dreyfus Cortés

A G R A D E C I M I E N T O S

A mis padres por su incondicional apoyo y por el cariño que me han demostrado durante toda mi vida, sin ustedes no hubiera sido posible llegar hasta aquí, los quiero mucho.

Στον Δημήτρη Γεωργέλλη για την αστείρευτη υπομονή του, αφοσίωση, και καθοδήγηση καθώς επίσης για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ώστε να μπορέσω να δουλέψω στο εργαστήριό του και που μοιράστηκε μαζί μου την έρευνά του

A mis hermanas Nadia, Alejandra y Vanesa las quiero mucho

Por todos los momentos que hemos pasado juntos, a mis compañeros del laboratorio y a mis amigos Anita, Arturo, Bernardo, Claudia, Fabiola, Ivonne, Luis, Roxana, Yael, Javier Esperanza, Dra. Rocío Gina, Hortensia, Miriam y Verónica

**A una maestra muy especial de la UAEM Clara Olguín
—Qué razón tenía—**

A Alberto por que has llegado a ser alguien significativo en mi vida

A mis tutores la orientación en mi trabajo

Agradezco a Claudia Rodríguez Rangel por el apoyo técnico otorgado durante la realización de este trabajo

A Gerardo Coello Coutiño, Ivette Rosas Arciniega, Juan M. Barbosa y Sergio J. Rojas Hernández por su asesoría en temas informáticos

**A todas las personas y sucesos de mi vida que me han encaminado hasta estos
momentos**

A los miembros del jurado:

Dr. Georges Dreyfus Cortès

Dr. Dimitris Georgellis

Dr. Hipólito Angel Manjarres Hernández

Dra. Irma Romero Álvarez

Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo

ÍNDICE

Resumen	6
Asbtract	7
Introducción	8
Sistemas de transducción de señales en bacterias	9
Sistemas de dos componentes	9
Estructura de los sistemas de dos componentes	10
Activación de los sistemas de dos componentes	13
Función del acetil fosfato en el sistema de dos componentes ArcA/B	14
Sistema de dos componentes ArcA/B	16
Transferencia del grupo fosforilo en el sistema Arc	18
Objetivos	23
Metodología	24
Construcción de los plásmidos	25
Células competentes	26
Transformación	27
Mantenimiento de las cepas	27
Medios y condiciones de crecimiento	28
Ensayos de β-galactosidasa	29
Resultados	30
Discusión	40
Perspectivas	43
Literatura citada	47

Resumen

Los organismos procariontes son muy adaptables a fluctuaciones ambientales gracias a que han desarrollado diferentes circuitos sensor-respuesta con los que reciben y amplifican señales ambientales. *Escherichia coli* tiene la capacidad de crecer en condiciones aeróbicas, anaeróbicas y fermentativas. Uno de los elementos mas importantes que brinda esta capacidad, es el sistema de transducción de señales Arc (por sus siglas en inglés Anoxia redox control). Este sistema se compone de dos proteínas: la cinasa sensora tripartita denominada ArcB la cual se encuentra unida a la membrana y el regulador de respuesta ArcA localizado en el citoplasma.

Bajo condiciones anaeróbicas el sistema se encuentra activo, ArcB es autofosforilado y subsecuentemente por un mecanismo de fosfo-relevo activa a ArcA. La proteína ArcA fosforilada reprime alrededor de 100 genes involucrados en la respiración aeróbica y activa un pequeño número de genes involucrados en la respiración anaeróbica.

Se sabe que cuando las condiciones de crecimiento son aeróbicas la actividad cinasa de ArcB se encuentra inhibida, mediante un mecanismo que involucra la oxidación de dos residuos de cisteínas (Cys¹⁸⁰ y Cis²⁴¹) los cuales participan en la formación de un enlace disulfuro intermolecuar, sin embargo la vía por la cual ArcA fosforilada es inactivada no ha sido totalmente caracterizada.

Estudios *in vitro* indican que la desfosforilación de ArcA se realiza por medio de fosfo-relevo reverso involucrando tanto al dominio de fosfotransferencia como al dominio receptor presentes en ArcB.

Los resultados del presente trabajo demuestran que tanto el dominio receptor como el de fosfotransferencia de la cinasa sensora ArcB son necesarios y suficientes para la desfosforilación de ArcA fosforilado *in vivo*.

Abstract

Microorganisms can respond to environmental fluctuations due to the presence of different sensor-response circuits which receive and amplify environmental signals and generate an adaptive response. *Escherichia coli* can grow in aerobic, anaerobic and fermentative conditions. One of the most important elements that confers this ability is the Arc (Anoxic redox control) two component system. This system includes the tripartite sensor kinase ArcB and the cytosolic response regulator ArcA.

Under anoxic growth conditions, ArcB autophosphorylates and transphosphorylates ArcA, which in turn represses or activates its target operons. Under aerobic growth conditions, phosphorylated ArcA dephosphorylates and its transcriptional regulation is released. The dephosphorylation of ArcA phosphorylated has been shown to occur, at least *in vitro*, via an ArcA(Asp54)-P --> ArcB(His717)-P --> ArcB(Asp576)-P --> P(i) reverse phosphorelay. In this study, the physiological significance of this pathway was assessed. The results demonstrate that the receiver and phosphotransfer domains of the tripartite sensor kinase ArcB are necessary and sufficient for efficient ArcA dephosphorylation *in vivo*.

Introducción

Las bacterias son organismos microscópicos caracterizados por ser cosmopolitas, unicelulares, carecen tanto de membrana nuclear como de organelos y por que se reproducen por fisión binaria. Presentan distintas morfologías: esférica las que se les conoce como cocos; en forma de espiral conocidas como espirilos y en forma de bastón denominadas bacilos. Actualmente se sabe que las bacterias tienen una gran importancia en diferentes aspectos de la vida, ya que si bien las hay patógenas y oportunistas, muchas otras participan en procesos esenciales para la vida, como en la fijación del nitrógeno o degradación de desechos, así como en la producción de alimentos o de metabolitos secundarios de importancia médica.

A la fecha la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* ha sido ampliamente estudiada, fue descrita por primera vez por Theodor Escherich, pediatra alemán quien la denominó *Bacterium coli commune* aislándola de heces fecales y frecuentemente en la orina de mujeres jóvenes con infección en el tracto urinario, lo que permitió considerarla como un importante patógeno oportunista.

Se sabe que *E. coli* coexiste con el humano como un organismo mutualista, sin embargo también se han descrito tres aislados patógenos que pueden causar síndromes clínicos: el primer tipo es la entérica causante de la diarrea dividiéndose en seis patotipos que son: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y perteneciendo a este grupo la *E. coli* adherente difusa (DAEC); el segundo aislado patógeno es el que provoca infecciones en el tracto urinario (UTIs), siendo el tipo más común la *E. coli* uropatogénica (UPEC) y el tercer aislado patógeno es el causante de infecciones extraintestinales, y meningitis asociada a *E. coli* (MNEC) (Revisado en Kaper *et al.*, 2004). A *E. Coli* se le ha utilizado como modelo en numerosos estudios, principalmente de genética y bioquímica.

Sistemas de transducción de señales en bacterias

Aunque en general los organismos procariontes parecen formas de vida relativamente simples, son organismos sofisticados y muy adaptables. Viven en ambientes en los cuales, rápida e inesperadamente pueden variar las condiciones ambientales como por ejemplo la humedad, la osmolaridad, los niveles de toxinas, la disponibilidad de nutrientes y la temperatura entre otros. Para sobrevivir a tales cambios, las bacterias constantemente monitorean las condiciones externas y ajustan adecuadamente su desarrollo, estructura y fisiología.

Existe una gran variedad de sistemas utilizados por las bacterias para responder a estímulos externos, como por ejemplo el sistema de reparación de DNA SOS, quimio-receptores, las proteínas participantes en estrés térmico y estrés ácido (pH) entre otros, sin embargo muchas otras respuestas a señales ambientales, son llevadas a cabo por medio de los sistemas de dos componentes, en los que la mayoría de los organismos procariontes ya sean de vida libre, comensales, simbioses o patógenos basan sus estrategias de sobrevivencia.

Sistemas de dos componentes

Los sistemas de dos componentes (Nixon *et al.*, 1986) son circuitos sensor-respuesta con los que las bacterias reciben y amplifican señales ambientales. Ninfa y Magazanik (1986) estudiando el sistema Ntr, el cual controla la respuesta a fuentes de nitrógeno, establecieron por primera vez sus bases bioquímicas. Con estos sistemas, las bacterias modulan la expresión génica para tomar la máxima ventaja en respuesta a una gran cantidad de fluctuaciones en su ambiente, algunos ejemplos son: adaptaciones metabólicas para la asimilación de nitrógeno (NtrB/C), respuesta a la cantidad de fosfato (PhoP/R), osmolaridad (EnvZ/OmpR), condiciones rédox (ArcA/B), así como vías de desarrollo complejo como la formación de colonias, esporulación (KinA/B-Spo0A) o biopelículas entre otros.

Estructura de los sistemas de dos componentes

Los sistemas de dos componentes están integrados por una proteína cinasa sensora y una proteína efectora o regulador de respuesta (Ronson *et al.*, 1987; Kofoid y Parkinson, 1988), en las figuras 1 y 2 se muestran los prototipos clásicos de cada uno de estos.

Existen dos clases de cinasas sensoras; las ortodoxas y las tripartitas (también nombradas híbridas). Las ortodoxas son encontradas en mayor número en procariontes. Son proteínas que se encuentran generalmente unidas a la membrana celular, contienen un dominio periplásmico NH₂-terminal definido por dos regiones hidrofóbicas transmembranales. Seguida de una de estas regiones, se encuentra la porción "linker", su longitud es comúnmente de alrededor de 100 aminoácidos y funge como conexión entre la región transmembranal y la porción NH₂-terminal del dominio fosfotransmisor. La porción "linker" también puede contener diferentes módulos: el dominio PAS (acrónimo formado por los nombres de las primeras proteínas en las cuales fueron identificadas las secuencias repetidas imperfectas: PER de *Drosophila* –period clock protein-; ARNT de un vertebrado –aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator y SIM de *Drosophila* –single-minded protein-) (Taylor y Zhulin, 1999). Este dominio tiene la capacidad de detectar, dependiendo del cofactor asociado cambios en el potencial redox, luz, oxígeno y pequeños ligandos. Otro módulo que puede estar presente en esta porción es el "zipper" de leucina, el cual se ha referido que en algunas proteínas posiblemente sea el responsable de mediar la dimerización (Lau *et al.*, 1997).

Posterior al "linker" se encuentra el dominio fosfotransmisor. Este dominio generalmente contiene secuencias comunes designadas como: cajas H, G₁, G₂, N y F. La caja H se localiza en la mitad del NH₂-terminal del dominio fosfotransmisor, tiene un residuo conservado de histidina (His) el cual sirve como sitio de unión al grupo fosforilo que es extraído del ATP.

Las otras cajas se localizan en la mitad del COOH-terminal del mismo dominio. Las cajas G₁ y G₂, son ricas en residuos de glicina y se sabe que sirven

para unir el ATP cuando la cinasa se encuentra activa. Se ha observado que mutaciones tanto en estas tres cajas como en la N inhiben la actividad cinasa en estas proteínas, presumiblemente esos motivos mantienen una estructura terciaria de la proteína que permita mantener accesible el sitio de unión a ATP. En el caso de la caja F, hasta la fecha no se ha descrito su función (Parkinson y Kofoid, 1992). Todas las cajas mencionadas anteriormente, usualmente se encuentran contiguas pero el espacio entre ellas varía dependiendo de la cinasa sensora.

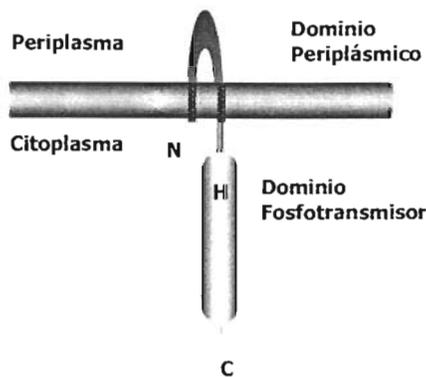


Fig 1. Representación estructural de una cinasa sensora típica. Generalmente se encuentra anclada a la membrana por dos o mas cruces transmembranales, consta de un dominio periplásmico prominente y una porción citosólica catalítica con una caja G cuya función es unir ATP y un residuo de His conservado en el sitio de autofosforilación.

Las cinasas sensoras tripartitas son menos usuales en procariontes. Su arquitectura es compleja, ya que además de contener las estructuras de una cinasa ortodoxa tienen un dominio receptor con un residuo de aspartato (Asp) y un dominio de fosfotransferencia con una histidina conservada (His). Ambos residuos pueden encontrarse en módulos aislados como es el caso de la cinasa Kin de *Bacillus subtilis* (Burbulys *et al.*, 1991) o estar fusionadas entre sí como BvgS de *Bordetella pertussis* (Uhl y Miller, 1996). Se cree que la complejidad estructural de las cinasas sensoras tripartitas permiten puntos de chequeo dentro del fosfo-relevo (Stock *et al.*, 2000).

El regulador de respuesta (Fig. 2) se encuentra en el citoplasma, se compone por dos estructuras; un dominio NH₂-terminal en donde se localiza un residuo de Asp conservado y uno o varios dominio(s) efector(es) en el extremo COOH-terminal. En la mayoría de los casos la función del dominio efector es la de unión a ADN, mediante lo cual activa o reprime genes específicos. Existen ejemplos de sistemas en los que el dominio COOH-terminal del regulador de respuesta funciona como enzima, un ejemplo es CheB de *E. coli* que es una metilesterasa (Simms *et al.*, 1985), otro ejemplo es RegA de *Dictyostelium discoideum* que es una fosfodiesterasa de AMPc (Shaulski *et al.*, 1996). En otros reguladores de respuesta como es el caso de CheY, el dominio efector es una caja con aminoácidos específicos que aparte de unir Mg²⁺, se pueden fosforilar, lo que permite su unión al componente del motor flagelar FlIM (Welch *et al.*, 1993).



Fig 2. Modelo típico de una proteína reguladora de respuesta. Se localizan en el citoplasma, contienen un residuo de Asp conservado en su dominio receptor y en la mayoría de los casos un dominio de hélice-vuelta-hélice para unión a ADN.

Los sistemas de dos componentes se encuentran principalmente en organismos procariontes, entre ellos bacterias patógenas como *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pestis*, *Hemophilus influenzae*. Se ha descrito que constituyen cerca del 1% de las proteínas codificadas (West y Stock, 2001), aunque también existen organismos pertenecientes a este grupo que no poseen sistemas de dos componentes en su genoma. *E. coli* posee 62 proteínas pertenecientes a sistemas de dos componentes: 29 cinasas sensoras (24 ortodoxas y 5 tripartitas híbridas) y 32 reguladores de respuesta (Mizuno, 1997). Estos sistemas también han sido reportados en eucariontes y arqueas aunque en mucho menor cantidad.

Activación de los sistemas de dos componentes por estímulos ambientales

Los cambios ambientales, que pueden ser físicos o de unión directa al ligando son estimulantes para las cinasas, ya sea en la porción del periplasma o en el citoplasma. Algunos esquemas mas complejos detectan la señal indirectamente a través de la interacción con otras proteínas como por ejemplo componentes del motor flagelar (Stock *et al.*, 2000).

Posterior a la recepción de la señal, la cinasas sensoras típicamente forman un homodímero y por medio de una reacción dependiente de ATP ocurre la autofosforilación en el residuo conservado de His, transfosforilando posteriormente al regulador de respuesta en su dominio fosfo-receptor (en residuo de Asp) (Fig. 3).

Existen variaciones dependiendo del sistema de dos componentes que se trate, por ejemplo la cinasa sensora del sistema de quimiotaxis (CheA) se encarga de fosforilar a dos reguladores de respuesta (CheB y CheY) (Li *et al.*, 1995) o el sistema encargado del control de nitrito/nitrato Nar en el que interactúan dos sistemas de regulación que consisten en los sensores homólogos NarX y NarQ así como sus respectivos reguladores de respuesta NarL y NarP (Stewart y Rabin, 1995).

En las cinasas sensoras tripartitas como TorS, ArcB, y BvgS, se ha comprobado que la transfosforilación del regulador de respuesta, es por medio de cuatro pasos de fosfo-relevo entre residuos de His y Asp (Jourlin *et al.*, 1997; Georgellis *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 2000; Uhl y Miller, 1996).

Una vez fosforilado el regulador de respuesta se activa al dominio efector que promueve la transcripción de los operones necesarios para la respuesta específica correcta (Burbulys, 1991; Uhl y Miller, 1996; Kwon *et al.*, 2000). En el caso de algunos sistemas, el rango de vida media de hidrólisis de los grupos fosfo-aspartato en los reguladores tiene tiempos que van desde algunos segundos hasta horas (Aiba *et al.*, 1989; Lois *et al.*, 1993; Hess *et al.*, 1988; Igo *et al.*, 1989).

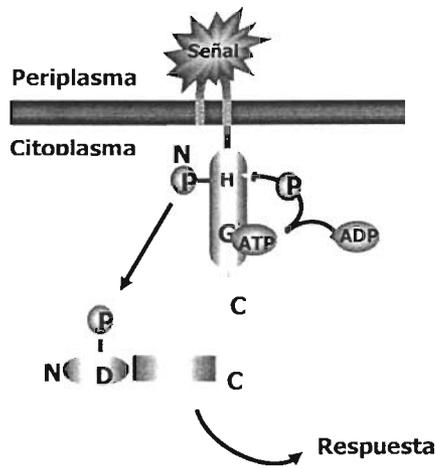


Fig 3. Fisiología de un sistema de dos componentes. Al presentarse un estímulo el cual en este caso es sentido por el dominio periplásmico, la cinasa sensora experimenta una autofosforilación a expensas de ATP y ocurre una subsecuente transfosforilación del regulador de respuesta .

Función del acetil-fosfato en el sistema de dos componentes ArcA/B

El acetil fosfato es un metabolito central que puede ser sintetizado a partir de acetato y ATP por la acción de la proteína acetato cinasa (codificada por el gen *ackA*) o por acetyl-CoA y ATP por la acción de la enzima fosfotransacetilasa (codificada por el gen *pta*). El acetyl-CoA puede ser formado a su vez por acetato y ATP por la acción de la acetyl-CoA sintetasa (codificada por el gen *acs*) o de piruvato y CoA por la descarboxilación catalizada por el complejo de la piruvato deshidrogenasa (Fig. 4).

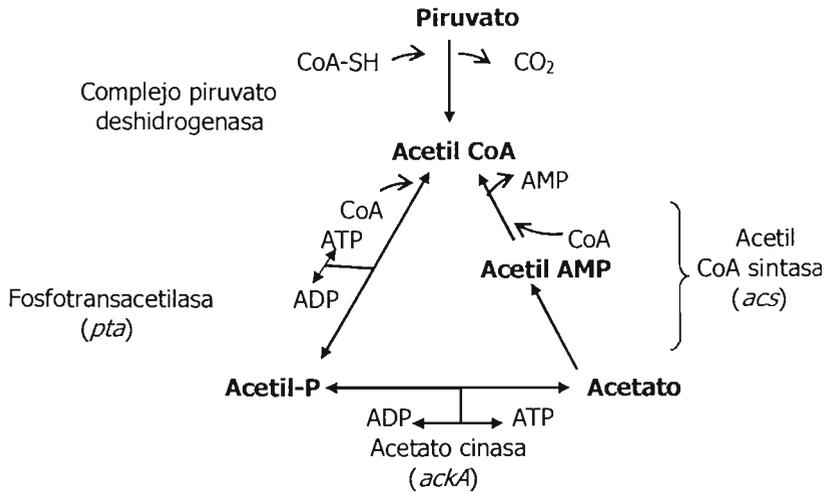


Fig 4. Esquema del metabolismo del acetil fosfato a partir de piruvato y acetato.

Los niveles de acetil fosfato varían dependiendo de las condiciones metabólicas de crecimiento. Bajo condiciones aeróbicas, cuando el flujo de carbono dentro de la célula excede la capacidad de las vías del metabolismo central (ejemplo el ciclo de Krebs) el acetil-CoA es metabolizado por la ruta Pta-AckA generando acetato y ATP. Como consecuencia de esto, las células acumulan el intermediario acetil fosfato. Si la densidad celular incrementa, la concentración del acetato sirve para aumentar a su vez la poza de acetil fosfato (McCleary y Stock, 1994). Existe evidencia de que la concentración de este intermediario metabólico puede jugar un papel importante en la regulación de ciertas vías dependientes de sistemas de dos componentes.

In vitro, algunos reguladores de respuesta son capaces de autofosforilarse por la reacción con moléculas de bajo peso molecular como el carbamil fosfato, el acetil fosfato o fosfoamidatos (Lukat *et al.*, 1992; McCleary y Stock, 1994). Ejemplos incluyen AlgR (Deteric *et al.*, 1992), CheY (Lukat *et al.*, 1992), FixJ (Reyrat *et al.*, 1993), NarL (Schröder *et al.*, 1994), NtrC (Feng 1992), OmpR

(McCleary y Stock, 1994; Head *et al.*, 1998), PhoB (Hiratsu *et al.*, 1995; McCleary, 1996), PhoP (Chamngopol y Groisman, 2000), RssB (Bouché *et al.*, 1998), VanR (Holman *et al.*, 1994) y ArcA (Lynch y Lin, 1996; Niström *et al.*, 1996). También ha sido determinado que *in vivo*, pueden ser fosforilados por estas moléculas solo en ausencia de la cinasa sensora correspondiente (Backman *et al.*, 1993; Feng, 1992).

Sistema de dos componentes Arc A/B

E. coli crece tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas o fermentativas, para lo cual debe ajustar su metabolismo de una forma eficiente, de acuerdo a las condiciones redox de crecimiento. En presencia de oxígeno la bacteria utiliza la cadena respiratoria siendo a la ubiquinona ($E_o=+0.1$ V) el intermediario que pasa electrones de la cadena respiratoria hacia el oxígeno ($E_o=+0.82$). Cuando la bacteria se encuentra en condiciones anaeróbicas, hay aceptores de electrones alternativos tales como nitrato ($E_o=+0.42$), fumarato ($E_o=+0.03$), nitrito, o trimetilamina-N-óxido ($E_o=+0.013$ V) utilizando a la menaquinona ($E_o=-0.074$ V) como intermediario para los tres últimos. Ambas vías respiratorias generan fuerza protón-motriz a través de la membrana plasmática. En caso de ausencia de estos aceptores de electrones, la célula entra en condiciones de crecimiento fermentativas para generar energía utilizable. En estos cambios de metabolismo, es donde el sistema ArcA/B (Anoxic redox control A/B) juega un papel muy importante.

La cinasa sensora de este sistema es la proteína transmembranal de 778 aminoácidos ArcB (Fig. 5a), codificada por el gen *arcB* localizado en el minuto 69.5 del genoma de *E. coli* (Iuchi *et al.*, 1989). ArcB es una cinasa sensora atípica, ya que su dominio periplásmico es de tan solo 16 aminoácidos (mientras que en la mayoría este dominio consta de alrededor de 100 aminoácidos). Este dominio esta flanqueado por dos cruces transmembranales (Iuchi *et al.*, 1990; Kwon *et al.*, 2000a). En la porción citosólica de la proteína se encuentra un "zipper" de leucina putativo (Georgellis *et al.*, 1999) y un dominio PAS (Taylor y Zhulin, 1999). Otra

característica de ArcB es que posee tres dominios catalíticos citosólicos: un transmisor primario (H₁) con un residuo conservado de His en la posición 292, una caja N y dos G (en donde se une el ATP); un dominio receptor (D₁) con un residuo de Asp conservado en la posición 576 (Iuchi y Lin, 1992a; Iuchi y Lin 1992b; Iuchi y Lin, 1993; Iuchi y Lin, 1995) y un dominio fosfotransmisor (H₂) con un residuo de His en la posición 717 (Ishige *et al.*, 1994).

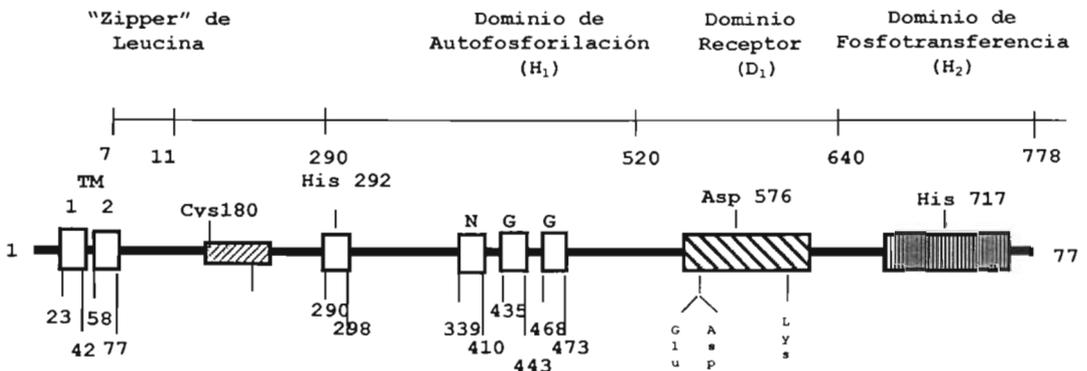


Fig 5a. Representación gráfica de la proteína ArcB (Kwon *et al.*, 2000).

El regulador de respuesta es una proteína citosólica de 238 aminoácidos nombrada ArcA (Iuchi y Lyn, 1988), es codificada por el gen *arcA* localizado en el minuto 0 del genoma de *E. coli*. Contiene un residuo de Asp conservado en la posición 54 de la región NH₂-terminal (también denominado D₂) el cual funciona como aceptor del grupo fosfato que viene de la cinasa, la región COOH-terminal es un dominio de hélice-vuelta-hélice para unión a ADN (Fig. 5b). También se le ha dado otros nombres dependiendo del enfoque de cada estudio como **dye** por que su deficiencia causa sensibilidad a ciertos marcadores colorantes que generan especies reactivas de oxígeno como al azul de toluidina (Roeder y Somerville, 1979), **seg** por que al estar mutado se observaron problemas en la replicación (Lee *et al.*, 2001) o segregación del plásmido F (Hathaway y Berquist, 1973; Jamieson y Berquist 1976), **sfrA** por estar implicado en la regulación del factor sex (o pili) (Beutin y Achtman, 1979; Beutin *et al.*, 1981; Gaffney *et al.*, 1983) y **cpxC**

por el plásmido de expresión para la conjugación (McEwen y Silverman, 1980). Sin embargo Iuchi y Lyn (1988) le llamaron *arcA* por su papel central en el sistema de respiración aeróbica.

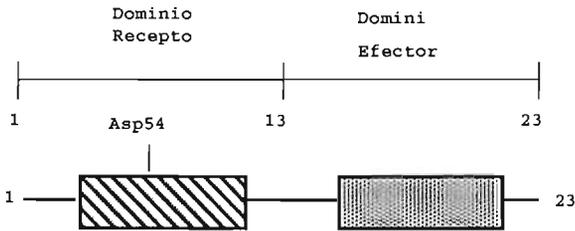


Fig 5b. Modelo del regulador de respuesta ArcA.

Transferencia del grupo fosforilo en el sistema Arc

En la figura 6, se esquematiza el funcionamiento del sistema de Arc. Bajo condiciones de microaerobiosis (Aleexeva *et al.*, 2003), ArcB funciona como cinasa y se autofosforila a expensas de ATP. Dicho proceso de fosforilación es modulado o incrementado, por ciertos metabolitos anaeróbicos tales como piruvato, D-lactato y acetato (Georgellis *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2004). Subsecuentemente ArcB transfosforila a ArcA en cuatro pasos de fosfo-relevo que involucra a los residuos His292→Asp576→His717→Asp548 (Georgellis *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 2000). También se ha sugerido que, tanto *in vitro* como *in vivo*, en condiciones de ayuno ArcA es capaz de autofosforilarse a expensas de acetil fosfato o carbamoil fosfato (Drapal y Sawers, 1995; Nyström *et al.*, 1996). ArcA fosforilada actúa como represor de alrededor de 100 operones involucrados en la respiración aeróbica entre ellos, genes que codifican deshidrogenasas de la clase de las flavoproteínas como la L-lactato deshidrogenasa (*lldp*), varias enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y genes que codifican proteínas del complejo citocromo *o* oxidasa (*cyo*) y por el contrario activa un pequeño número de genes que codifican proteínas asociadas al metabolismo anaeróbico o fermentativo como por ejemplo

genes que codifican a la citocromo oxidasa *d* (*cyd*) y piruvato formato liasa (*pfl*) (Iuchi y Lin, 1988; Iuchi y Lin, 1993; Lynch y Lin, 1995).

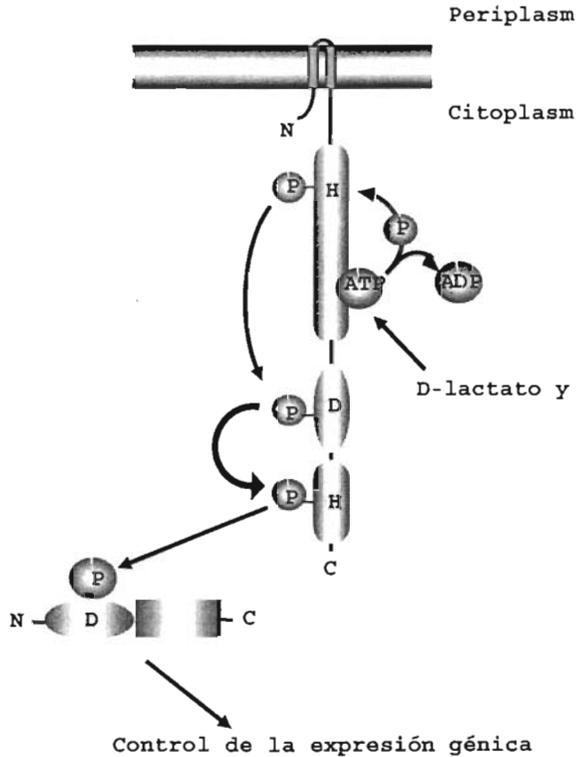


Fig 6. Modelo del funcionamiento del sistema Arc bajo condiciones anaeróbicas. ArcB se autofosforila a expensas de ATP y por fosforelevo secuencial transfosforila a ArcA.

Se sabe que en condiciones aeróbicas, las quinonas oxidadas actúan como la señal directa que apaga la actividad cinasa de ArcB (Georgellis *et al.*, 2001), mediante la activación de un mecanismo que inhibe la actividad cinasa, en el que ocurre la oxidación de dos residuos de cisteínas (Cys¹⁸⁰ y Cys²⁴¹) los cuales participan en la formación de un enlace disulfuro intermolecular (Malpica *et al.*, 2004), sin embargo, aún no se conoce la forma en que ArcA fosforilado es inactivado para que la bacteria module su expresión génica en respuesta a la

oxígeno, o en otras palabras, ¿Cómo ocurre la inactivación de ArcA fosforilado?. Ensayos *in vitro*, han propuesto que puede ser mediante la proteína previamente nombrada SixA (Signal inhibitory factor X) que actúa como fosfatasa con el dominio fosfotransmisor de ArcB, afectando a su vez la fosfotransferencia hacia el dominio receptor de ArcA *in vitro* (Ogino *et al.*, 1998) (Fig. 7). Sin embargo cuando se aumentó la expresión de la proteína *in vivo*, no se observó ningún efecto sobre la activación de un gene reportero, por lo tanto no parece ser un factor que apague el sistema (Matsubara y Mizuno, 2000).

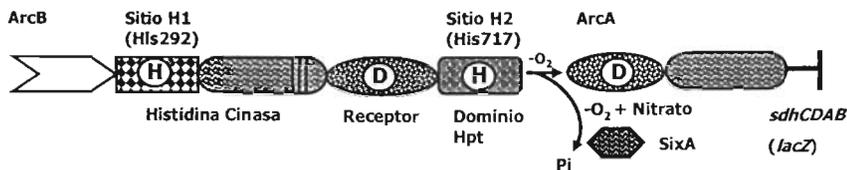


Fig 7. Modelo propuesto por el grupo de Mizuno. Se involucra una tercera proteína (SixA), la cual secuestra al grupo fosforilado del dominio de fosfotransferencia (H₂) de ArcB, lo que evita la transfosforilación hacia ArcA (Matsubara y Mizuno, 2000).

En otro trabajo, mediante purificación de las proteínas ArcA y ArcB previamente incubadas con (γ^{32} -P) ATP, probaron que la estabilidad de ArcA fosforilada es de más de 1 h. Posteriormente incubaron una fracción de ArcA previamente fosforilada con ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ (H₁-D₁-H₂), observaron que disminuyó la marca radioactiva de ArcA desde los primeros minutos de incubación. En otro ensayo en el mismo trabajo, le adicionaron a ArcA-P el dominio transmisor primario (H₁), el dominio receptor (D₁) y el dominio de fosfotransferencia (H₂) por separado y observaron que solo la presencia del fragmento H₂ afectaba la estabilidad de ArcA fosforilada, en cambio cuando la incubaron con el fragmento D₁-H₂ notaron que la radiactividad en ArcA rápidamente decrecía mientras aumentaba en D₁-H₂ (Georgellis *et al.*, 1998).

Para verificar si los dominios de ArcB D₁-H₂ eran necesarios para la desfosforilación de ArcA, procedieron a la incubación con los fragmentos D₁^{Asp576Ala}.

H₂ y D₁-H₂^{His717Gln}. Observaron que el grupo fosforilo fue transferido del fragmento ArcA hacia la proteína mutante D₁^{Asp576Ala}-H₂ pero en el caso de la proteína D₁-H₂^{His717Gln} no se observó transferencia de radiactividad de ArcA y en ninguno de los casos fue detectada la liberación de Pi.

Estos resultados realizados *in vitro*, permitieron proponer un modelo de desfosforilación de ArcA-P por la actividad fosfatasa de ArcB en un fosforelevo reverso (de ArcA-P hacia H₂ posteriormente D₁ y por último liberándose Pi), así también sugirieron que el dominio H₁ no es necesario para la desfosforilación, mientras que los dominios D₁ y H₂ son indispensables en la vía reversa del grupo fosforilo (Georgellis *et al.*, 1998) (Fig. 8)

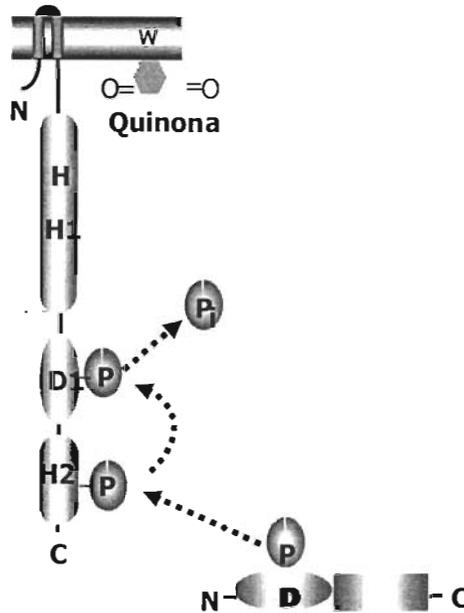


Fig 8. Modelo de desfosforilación de ArcA. De acuerdo a los antecedentes previamente explorados el modelo de desfosforilación de ArcA-P es por fosfo-relevo reverso e involucra a D₁-H₂ de ArcB.

A pesar de que en *E. coli* el sistema Arc, es uno de los modelos de los cuales se tiene abundante información, su complejidad no ha permitido el total entendimiento de su funcionamiento, por lo cual es necesario caracterizar a fondo sus mecanismos de control, lo que ayudará a ampliar el conocimiento de la integración de este circuito para la adaptación bacteriana a cambios redox en el medio.

Objetivos

1. Elucidar la vía de desfosforilación de ArcA-P *in vivo*.

Para llevar a cabo el objetivo anterior, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1.1 Obtención de cuatro plásmidos que codifiquen para el dominio transmisor y de fosfotransferencia de ArcB: silvestre (D₁-H₂), mutante en el dominio receptor (D₁*-H₂), mutante en el dominio transmisor (D₁-H₂*) y doble mutante (D₁*-H₂*). *Dominio mutado.
- 1.2 Determinar si los fragmentos silvestres de ArcB tienen un efecto sobre la actividad de ArcA fosforilado en cepas con genotipo silvestre, ArcB constitutiva, ArcB nula y que además contengan los genes reporteros $\lambda\phi$ (*lldp-lacZ*) y $\lambda\phi$ (*cyd-lacZ*), los cuales se reprimen y activan por ArcA fosforilado respectivamente.

2. Identificar si el acetil fosfato tiene alguna relevancia como metabolito activador de la proteína ArcA *in vivo*.

Metodología

Para confirmar que el dominio receptor (D_1) y el dominio de fosfotransferencia (H_2) de ArcB, son los responsables de la desfosforilación de ArcA-P *in vivo* cuando las condiciones redox de crecimiento cambian, se realizó la comparación de las expresiones de los genes reporteros $\lambda\Phi(ildp-P-lacZ)$ y $\lambda\Phi(cyd-lacZ)$, los cuales en condiciones anaeróbicas de crecimiento se reprime y activa por ArcA fosforilado respectivamente. Esta actividad fue cuantificada con ensayos de β -galactosidasa realizados en células de *E. coli* con genotipo silvestre y células transformadas con diferentes construcciones (ver Tabla 1) que codifican para los dominios receptor y de fosfotransferencia de ArcB en diferentes versiones: a) tipo silvestre (ArcB⁵²⁰⁻⁷⁷⁸ o D_1 - H_2), con el cual se espera que se observe anulación del control transcripcional dependiente de ArcA-P, esto debido a la desfosforilación de ArcA-P; b) mutante en el dominio receptor (ArcB^{521-778, D-576-Ala} o D_1^* - H_2) y c) mutante en el dominio fosfortransmisor (ArcB^{521-778, His-717-Q}/ D_1 - H_2^*), con los que se espera que la actividad de los reporteros sea menor debido a la disminución de la concentración de ArcA-P y la doble mutante (ArcB^{521-778, D-576-Ala; His717Q}/ D_1^* - H_2^*), con la que se espera que se mantenga normal el control transcripcional por ArcA-P.

Para verificar la relevancia fisiológica del acetil fosfato sobre el sistema de Arc, se realizó la comparación de la expresión del gen reportero $\lambda\Phi(cyd-lacZ)$ en dos cepas en fase estacionaria: una tipo silvestre en la que se espera ver aumento de la actividad el reportero al adicionar acetato y otra con mutaciones en los genes *ackA* y *pta* que codifican las proteínas acetato cinasa y fosfotransacetilasa, ambas involucradas en la síntesis de acetil fosfato que se tomó como control negativo del ensayo (Tabla 3).

Tabla 3. Cepas y plásmidos utilizados

Nombre de la cepa	Fenotipo	Referencia
<i>E. coli</i> JM101	<i>supE thi Δ(lac-proAB) F' {traD36 proAB⁺ lac⁺ lacZΔM15}</i>	Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>E. coli</i> ECL5002	MC 4100 con $\Phi\lambda$ (<i>lldp-lacZ</i>)	Kwon <i>et al.</i> , 2000a
<i>E. coli</i> ECL5003	MC4100 con Δ <i>fhr::Tn9(Cm^r) $\Phi\lambda$(<i>cydA-lacZ</i>)</i>	Kwon <i>et al.</i> , 2000a
<i>E. coli</i> ECL5047	(ϕ tar ⁻¹⁻¹²⁵ <i>arcB</i> ^{B1-778} ::Kan ^r Δ tar Δ <i>arcB</i>) $\Phi\lambda$ (<i>lldp-lacZ</i>)	Kwon <i>et al.</i> , 2003
<i>E. coli</i> ECL5004	Δ <i>arcB::tet^r $\lambda\phi$(<i>cydA⁻-lacZ</i>)</i>	Kwon <i>et al.</i> , 2000a
<i>E. coli</i> ECL5012	Δ <i>arcB::tet^r $\lambda\phi$(<i>lldp-lacZ</i>)</i>	Kwon <i>et al.</i> , 2000a
<i>E. coli</i> ECL5336	<i>pta::tet::ackA</i> $\lambda\phi$ (<i>cyd-lacZ</i>)	
Nombre del plásmido	Fragmento utilizado con sitios de restricción <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i>	Referencia
pQE30 ArcB ⁵²¹⁻⁷⁷⁸	ArcB ⁵²¹⁻⁷⁷⁸	Georgellis <i>et al.</i> , 1997
pQE30 ArcB ^{521-778;Asp576Ala}	ArcB ^{521-778 Asp576Ala}	Georgellis <i>et al.</i> , 1998
pQE30 ArcB ^{521-778;His717Gln}	ArcB ^{521-778 His717Gln}	Georgellis <i>et al.</i> , 1998
pQE30 ArcB ^{78-778;Asp576Ala;His717Gln}	ArcB ^{521-778 Asp576Ala, His717Gln}	
pBAD30		Guzmán <i>et al.</i> , 1995
Plásmido	Contenido	Referencia
pMX020	ArcB ⁵²¹⁻⁷⁷⁸ en pBAD30	Este trabajo
pMX021	ArcB ^{521-778 Asp576Ala} en pBAD30	Este trabajo
pMX022	ArcB ^{521-778 His717Gln} en pBAD30	Este trabajo
pMX023	ArcB ^{521-778 Asp576Ala, His717Gln} en pBAD30	Este trabajo

Construcción de los plásmidos

Para generar los vectores utilizados en este trabajo, el plásmido pBAD30 (Guzmán *et al.*, 1995) fue extraído de la cepa DH5alfa, se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, durante 3 h a 37°C. Para obtener los fragmentos necesarios de ArcB, se digirieron los plásmidos pQE30ArcB⁵²⁰⁻⁷⁷⁸ (D₁-H₂) (Georgellis *et al.*, 1997), pQE30ArcB^{520-778, Asp576Ala} (D₁*-H₂) y pQE30ArcB^{520-778, Asp576Ala} (D₁-H₂*) (Georgellis *et al.*, 1998), con los mismos sitios de restricción. Para obtener el fragmento que contiene la doble mutación (D₁*-H₂*), se realizó el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como templado al plásmido

pQE30 ArcB^{78-778, Asp576Ala; His717Q}, con los iniciadores pQE30 (5' CCCGGATCCCATatgctttaccg'gcgctgaatgtgc'3) y pQE30rev (5' CCCGGATCCATGCAtcgcgcaccccggtctacgg'3) (Georgellis *et al.*, 1997), los cuales contienen los sitios de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Posterior a la digestión, tanto al plásmido como los fragmentos fueron separados durante 30 min en gel de electroforesis de agarosa al 0.8%, para aislar las bandas correspondientes siguiendo el protocolo de extracción de DNA a partir de agarosa (Roche). Los fragmentos fueron ligados al vector pBAD30 (Guzmán *et al.*, 1995) en 20 μ l de reacción en presencia de T4 DNA ligasa (Invitrogen), incubando la reacción durante 12 h a 16 °C. Se generaron cuatro plásmidos nombrados pMX020, pMX021, pMX022, pMX023.

Células Competentes

Se prepararon células competentes para la transformación de las cepas JM101, MC4100 $\lambda\phi$ (*lldp-lacZ*), MC4100 $\lambda\phi$ (*cyd-lacZ*), ECL5047 $\lambda\phi$ (*lldp-lacZ*), ECL5004 $\lambda\phi$ (*cyd-lacZ*) y ECL5012 $\lambda\phi$ (*lldp-lacZ*). Se utilizó el método descrito por Inoue *et al.* (1990).

1. Se toman 200 μ l de un cultivo madre para inocularlos en 20 ml de medio líquido Luria-Bertani Broth (Fluka, BioChemica) al 2%, adicionado con Mg₂SO₄ 1M CaCl₂ 1M, incubándose el cultivo a 18 °C con agitación hasta a una DO₆₀₀ de 0.4.
2. Se incuba el cultivo en hielo durante 10 min y posteriormente se centrifuga a 3000 rpm durante 15 min a 4°C.
3. Se resuspende con cuidado la pastilla en 4 ml de buffer TBE (Sambrook, 1999) frío, incubándolo posteriormente en hielo durante 30 min y se centrifuga a 3000 rpm durante 15 min.
4. Se repite el paso anterior.
5. Finalmente la pastilla es resuspendió en 1.6 ml de TB con 7% de DMSO, separando 200 μ l de células en tubos eppendorff previamente marcados con el nombre del aislado correspondiente.

6. Inmediatamente se procede a la congelación con N₂ líquido y se almacenan en REVCO a -75°C hasta su posterior transformación.

Transformación

Se incubaron las células en hielo durante 10 min para descongelarlas, y se adicionó 1 µl de cada uno de los plásmidos pBAD30, pMX020, pMX021, pMX022 y pMX023. La mezcla fue incubada en hielo durante 30 min y posteriormente se les dio un choque térmico a 43 °C durante 30 s. Inmediatamente se le adicionó a cada tubo 1 ml de medio de recuperación (LB 3%) y se incubaron nuevamente durante 1 h a 37 °C con agitación. Las células recuperadas fueron centrifugadas a 2500 rpm y posteriormente se sembraron en placas LB-agar (suplementadas con ampicilina 100 µg/ml). Las placas de cultivo sembradas fueron incubadas durante toda la noche a 37 °C. Posteriormente se seleccionó una colonia aislada y se inoculó en 5 ml de LB líquido con ampicilina 100 µg/ml hasta una DO₆₀₀ de 1.5-2.

Para verificar la correcta construcción de los plásmidos después de la transformación de la cepa JM101, se procedió a extraer cada vector siguiendo el protocolo del Kit de extracción de ADN (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche Mannheim, Germany). Se digirió el ADN durante 1 h con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Los fragmentos fueron separados durante 30 min en gel de electroforesis de agarosa al 0.8%. Se utilizó la tinción con bromuro de etidio a una concentración de 0.01% para verificar los pesos moleculares de los fragmentos (pBAD30 y 900 pb del fragmento que contiene el sitio de unión a ribosoma y los dominios ArcB), tomando como referencia el marcador de peso molecular de escalera λ*HindIII* (Invitrogen).

Mantenimiento de las cepas

Para mantener las cepas bacterianas durante largo tiempo, se realizaron cultivos de cada cepa transformada durante 12-14 h con agitación constante inoculando una colonia en 5 ml de medio LB-líquido adicionado con ampicilina 100

µg/ml. Posteriormente se agregaron 1400 µl del cultivo en 480 µl de glicerol al 80% y se congelaron a -70 °C.

Medios y condiciones de crecimiento

Las condiciones de crecimiento fueron distintas dependiendo del ensayo realizado. Se utilizaron placas de medio LB-agar adicionado con glucosa 0.02% y ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml para seleccionar las células transformantes y para crecimiento de éstas en tubo, se utilizó LB-líquido con ampicilina (100 µg/ml).

En el caso de la cinética de activación del reportero $\lambda\phi(\text{lldp-lacZ})$, se inocularon 50 µl de bacterias en medio LB-líquido adicionado con MOPS (3-(N-Morfolina) ácido propanosulfónico) 0.1 M, D-xilosa 20 mM (LB buffereado), L-lactato 20 mM como inductor del reportero, ampicilina 100 µg/ml y arabinosa al 0.02% en el caso de los cultivos de células que fueron transformadas con los plásmidos (pBAD30, pMX020, pMX021, pMX022 y pMX023). Las condiciones de crecimiento fueron a una temperatura de 37 °C y con agitación hasta el término de las curvas.

Para el crecimiento anaeróbico de las cepas silvestres (ECL5002 y ECL5003) transformadas con los plásmidos (pBAD30, pMX020, pMX021, pMX022 y pMX023), se adicionaron 10 µl de cada cultivo madre en viales de 5 ml que contenían medio LB-líquido buffereado y suplementado con arabinosa 0.02% y L-lactato 20 mM como inductores de los vectores y del reportero $\lambda\phi(\text{lldp-lacZ})$ respectivamente. Los viales fueron incubados a 37°C hasta que llegaron a una DO_{600} de 0.4, posteriormente se detuvo el crecimiento bacteriano en hielo y se realizaron ensayos de β -galactosidasa.

En los experimentos de los aislados que contienen la mutación ΔarcB , se inocularon 30 µl de cada cultivo madre a matraces de 200 ml que contenían 5 ml de medio mínimo (Foraje y Lin, 1982) suplementado con piruvato 0.4% como única fuente de carbono. Se incubaron los cultivos a 37 °C con agitación hasta una

DO₆₀₀ de 0.2. Posteriormente cada matraz fue incubado en hielo para detener el crecimiento y proceder a los ensayos de β-galactosidasa.

Por último en el ensayo de fosforilación de ArcA por acetil fosfato, se inocularon 100 µl de cultivo madre de cada cepa utilizada en 30 ml medio mínimo (Sambrook y Rusell, 1999) adicionado con glucosa 0.02% dejando crecer el cultivo en un matraz de 1000 ml en agitación durante 1 h. Se comenzaron a tomar mediciones de DO₆₀₀ así como alicuotas para realizar ensayos de β-galactosidasa cada 30 min hasta llegar a la fase estacionaria, en la cual se siguieron tomando mediciones durante 5 h. Posteriormente se adicionó acetato de sodio 20 mM para aumentar la concentración de acetil fosfato, siguiendo la toma de muestras cada 15 minutos durante 2 h.

Ensayos de β-galactosidasa

La cuantificación de la actividad enzimática de los genes reporteros utilizados en las distintas cepas, se realizó por medio del ensayo β-galactosidasa (Miller, 1972). Se tomaron primero 1 ml de medio con células, para medir la DO₆₀₀ y posteriormente 100 µl para adicionarlos en tubos que contenían 900 µl de fosfatos suplementado con 10 µl de SDS 0.1% y 20 µl de cloroformo (amortiguador Z), se agitó con vortex cada tubo, posteriormente se adicionaron 200 µl de 0-nitrofenil-β-D-galactopiranosido 0.04 mg/ml incubándose a temperatura ambiente durante 15 min y deteniendo la reacción con 500 µl de NaCO₃ 1 M. Se tomaron lecturas a DO₄₂₀ y DO₅₅₀, los valores fueron utilizados en la fórmula de Unidades Miller:

$$\text{Unidades Miller (UM)} = \frac{1000 \times \text{DO}_{420} - (1.75 \times \text{DO}_{550})}{(t)(v)(\text{DO}_{600})}$$

y posteriormente graficados con el programa de computadora Excel.

Resultados

Efecto del cambio de condiciones redox en cultivo anaeróbico en la cepa MC4100 $\Phi(\text{Ildp-lacZ})$. Para determinar el tiempo que tarda en desreprimirse el reportero $\phi\lambda(\text{Ildp-lacZ})$ cuando hay transición de crecimiento anaeróbico a condiciones aeróbicas, se realizó una cinética de activación por medio de ensayos de β -galactosidasa en la cepa ECL5002.

La cepa ECL5002 que contiene el reportero $\phi\lambda(\text{Ildp-lacZ})$ el cual es reprimido por ArcA fosforilada fue cultivada en medio LB líquido a 37°C en condiciones anaeróbicas. Se inició una curva de cinética de activación del reportero cuando el cultivo de bacterias llegó a una DO_{600} de 0.2, se tomó la primera muestra. Pasados 10 min se procedió a tomar la segunda muestra (tiempo llamado 0). Inmediatamente fueron transferidos 50 ml de uno de los cultivos a un matríz incubándolo con agitación a 280 rpm. Se tomaron muestras de ambos cultivos cada 10 min hasta completar una hora.

Como se puede observar en la figura 10, en condiciones anaeróbicas se mantuvo reprimido el reportero, debido a la fosforilación de ArcA, mientras que en el cultivo que fue cambiado a condiciones aeróbicas, se observó la desrepresión del reportero desde los primeros minutos de aereación. Lo anterior sugiere que ocurrió una desfosforilación del regulador de respuesta desde que el oxígeno estuvo disponible en el cultivo. Lo anterior indica que ArcA es desfosforilado por otra proteína ajena e ella (que puede ser una fosfatasa o su cinasa reconocida ArcB) ya que previamente se ha reportado que la vida media de ArcA es de más de 1 h (Georgellis *et al.*, 1998).

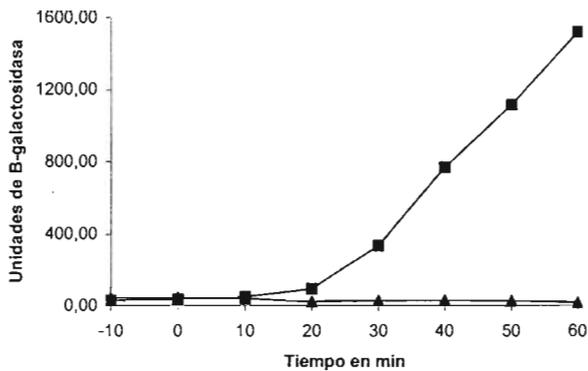


Fig 10. Comparación de la actividad β -galactosidasa de $\lambda\Phi$ (*ltdp-lacZ*) en cambio de condiciones redox. En el tiempo llamado 0, 50 ml de un cultivo fue transferido a condiciones aeróbicas de crecimiento, continuando el otro en condiciones anaeróbicas. ▲ Cultivo anaeróbico; ■ Cultivo transferido a condiciones aeróbicas de crecimiento.

La represión dependiente de ArcA fosforilada es anulada por la expresión de D₁-H₂ en crecimiento de cepas con *arcB* constitutiva. Los datos observados en el ensayo anterior, sugieren que el apagado del sistema Arc es por medio de una fosfatasa ajena a ArcA. En un estudio *in vitro* realizado por Georgellis *et al.* (1998), observaron que para el decaimiento de la señal en el sistema de Arc son necesarios tanto el dominio receptor D₁ como el dominio fosfotransmisor H₂ de ArcB. Con el objeto de determinar si estos son los responsables del decaimiento de la señal en el sistema de Arc *in vivo*, se construyeron una serie de plásmidos que expresan el fragmento D₁-H₂ de la proteína ArcB tipo silvestre y distintas mutantes (ver plásmidos utilizados en metodología). Estos vectores fueron transformados en la cepa ECL5047 $\lambda\Phi$ (*lldp-lacZ*) en la cual fue remplazado *arcB* silvestre por el híbrido *tar-arcB* que codifica para la proteína ArcB con actividad cinasa constitutiva. En esta cepa ArcB transfosforila a ArcA aún en condiciones aeróbicas, como resultado de esto la actividad del reportero siempre es baja, sin embargo con la expresión del fragmento D₁-H₂ de ArcB se espera que disminuya la cantidad de ArcA fosforilado y aumente así la actividad.

De cultivos frescos de las células transformantes, se realizaron subcultivos en 20 ml de medio LB y se incubaron en agitación a 37°C. Se dejaron crecer los cultivos a una DO₆₀₀ de 0.2 en donde se tomó la primer muestra en el minuto -15, una segunda muestra en el tiempo 0 e inmediatamente se adicionó arabinosa a una concentración final de 0.02% como inductor de los vectores, se tomaron muestras cada 10 min durante media hora, posteriormente cada 15 min durante media hora y cada 30 min hasta completar 180 min.

Los resultados obtenidos en este ensayo (Fig. 11) mostraron que la adición de arabinosa no alteró la actividad de los aislados que contienen pBAD30 y la expresión de D₁*-H₂*, mientras que en el aislado que contiene el plásmido que expresa el fragmento D₁-H₂ (pMX020), se observa un aumento inmediato en la expresión del reportero. En las cepas que contienen los plásmidos que expresan

D₁*-H₂ (pMX021) y D₁-H₂*(pMX022), la adición de arabinosa mostró moderada actividad del reportero, observándose valores mas altos D₁*-H₂ que D₁-H₂*. Estos resultados, sugieren que ArcA fosforilado es desfosforilado por la actividad cinasa de ArcB vía ArcA forforilado H₂ D₁, ya que al expresar el fragmento con cualquiera de los dominio mutados la actividad del reportero es menor que cuando se expresa el fragmento D₁-H₂.

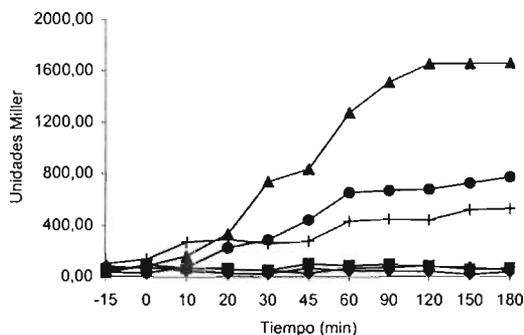
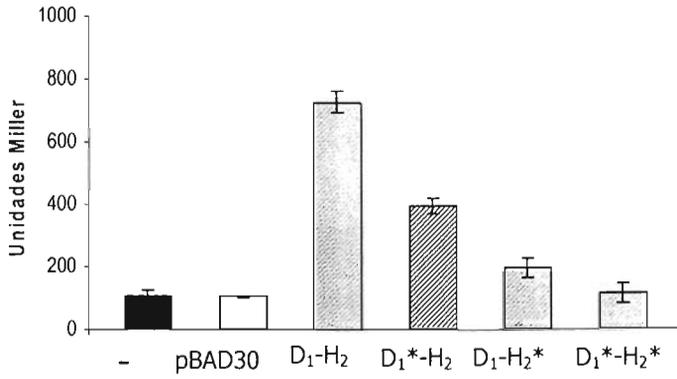


Fig 11. Liberación del control transcripcional de ArcA fosforilado por la expresión del fragmento D1-H2. Se realizó seguimiento de la actividad del reportero $\lambda\Phi(lldp-lacZ)$ en el aislado ECL5047 en el que fue remplazado *arcB* cromosomal por *tar-arcB* híbrido, el cual codifica para la proteína ArcB con actividad cinasa constitutiva. ♦ ECL5047; ■ ECL5047 pBAD30 (control negativo); ▲ ECL5047 pMX020 (codifica D₁-H₂); * ECL5047 pMX021 (codifica D₁*-H₂); + ECL5047 pMX022 (codifica D₁-H₂*); ● ECL5047 pMX023.

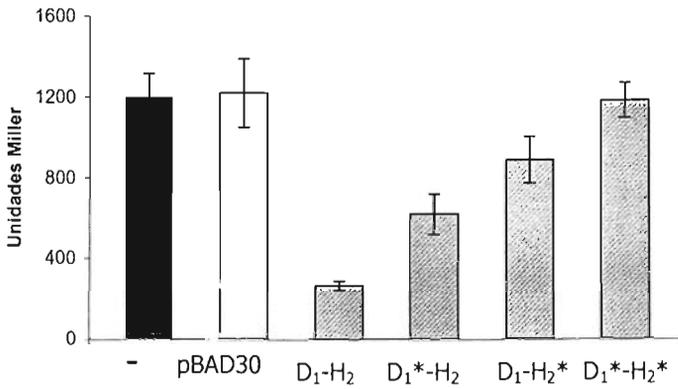
La expresión de D₁-H₂ anula la regulación transcripcional de ArcA fosforilada en aislados silvestres en crecimiento anaeróbico.

De acuerdo a los resultados anteriores, se puede sugerir que el decaimiento de la señal en el sistema de Arc está facilitado por la cinasa sensora por medio de la desfosforilación de ArcA fosforilado vía fosfo-relevo reverso. No se sabe si la misma conformación de ArcB permite catalizar la fosforilación y desfosforilación de ArcA fosforilado o existen cambios en la proteína dependiendo del estado redox de crecimiento. Si son necesarios dichos cambios conformacionales, bajo condiciones estimulantes la proteína se encuentra activa como cinasa a la vez que se inhibe su actividad fosfatasa y viceversa. Para explorar la posibilidad que sean distintas conformaciones que ArcB adopte, las que especifiquen si la reacción es de fosfo-relevo o fosfo-relevo reverso, se probó si la expresión de D₁-H₂ anula la regulación de ArcA fosforilado bajo condiciones estimulantes. Para este fin, fueron transformadas con los plásmidos pMX020, pMX021, pMX022 y pMX023 las cepas ECL5002 y ECL5003 las cuales acarrean los reporteros $\Phi\lambda(Ildp-lacZ)$ y $\Phi\lambda(cyd-lacZ)$ que se reprime y activa por ArcA fosforilado respectivamente. Todas las cepas se cultivaron en condiciones anaeróbicas en 5 ml de medio LB adicionado con ampicilina, arabinosa 0.02%, se adicionó también L-lactato 20 mM en el caso de las cepas que contienen el reportero $\Phi\lambda(Ildp-lacZ)$. Se dejaron crecer hasta una DO₆₀₀ de 0.4 para realizar el ensayo de β -galactosidasa.

En la figura 12a y b, se muestran los resultados obtenidos en este ensayo observándose que la presencia de D₁-H₂ anuló la expresión del reportero $\lambda\Phi(cyd-lacZ)$ así como la represión de $\lambda\Phi(Ildp-lacZ)$ durante crecimiento anaeróbico. La expresión de D₁*-H₂* no afectó la expresión de ninguno de los dos reporteros. Para el caso de las expresiones D₁*-H₂ y D₁-H₂*, como en los resultados anteriores se observó disminución en el control transcripcional dependiente de ArcA fosforilada.



12a. Expresión de $\lambda\Phi(Ildp-lacZ)$ en condiciones anaeróbicas.



12b. Expresión de $\lambda\Phi(cyd-lacZ)$ en condiciones anaeróbicas, en donde es activado por ArcA fosforilado.

Efecto de la adición de acetato en crecimiento aeróbico en la expresión del gen reportero $\lambda\phi(cyd-lacZ)$.

Previamente se reportó que ArcA cataliza su propia fosforilación a expensas de acetil fosfato o cabamil fosfato (Drapal y Sawers, 1995; Lynch y Lin 1996). En esta parte del trabajo fue explorado el efecto que puede tener el aumento del acetil fosfato intracelular en la expresión del reportero activado por ArcA fosforilado $\lambda\phi(cyd-lacZ)$ en presencia de la cinasa sensora ArcB.

Se realizaron ensayos de β -galactosidasa a dos cepas, una tipo silvestre ECL5001 $\lambda\phi(cyd-lacZ)$ y otra cepa ECL5336 $\lambda\phi(cyd-lacZ)$ la cual tiene como fondo genético la interrupción de los genes que codifican la acetato cinasa y transacetilasa con un cassette de tetraciclina (*pta::tet::ackA*) para evitar la producción de acetil fosfato endógeno. Ambos aislados fueron inoculados en 200 ml de medio mínimo e incubados en agitación a 37 °C durante 1 h, tiempo en el que se comenzaron a tomar muestras cada 30 min hasta que los cultivos entraron a fase estacionaria en la que se mantuvieron durante 5 h, posteriormente se adicionaron 20 mM de acetato siguiéndose la curva durante 2 h mas.

En la figura 13 se observa la comparación de crecimiento (densidad óptica=DO) entre las cepas observando que el máximo crecimiento de ambos aislados, fue a una DO_{600} de 0.25 aproximadamente y la diferencia en el tiempo que llega cada aislado a esta fase es entre 4 h para la cepa ECL5001 y 6 h para la cepa ECL5336. La actividad del reportero dada en Unidades Miller baja conforme sube la DO_{600} . Durante la fase estacionaria, se mantiene baja en ambas cepas aún después de haber adicionado el acetato, lo cual indica que en presencia de la cinasa sensora, la presencia del acetil fosfato no tiene ninguna relevancia fisiológica.

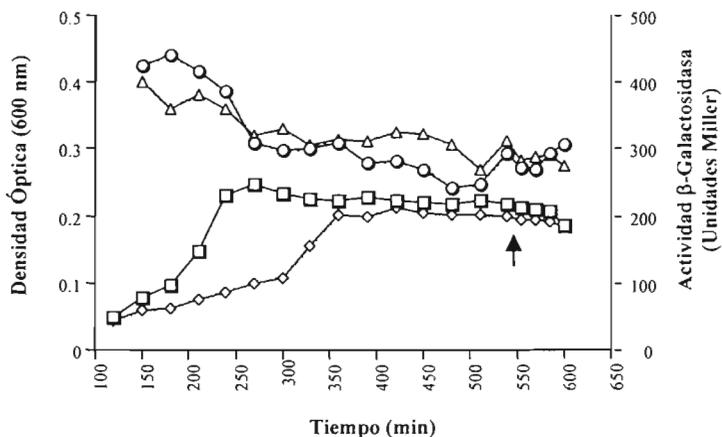


Fig 13. Expresión del gen reportero $\lambda\Phi(cyd-lacZ)$ en ayuno de glucosa en crecimiento aeróbico. La actividad del reportero se mantiene en ambas cepas, lo cual indica que la presencia del acetil fosfato no tiene ninguna relevancia fisiológica en presencia la ArcB.

□ DO₆₀₀ de la cepa ECL5001, ◇ DO₆₀₀ de la cepa ECL5336, ○ Actividad de β -galactosidasa de la cepa ECL5001, Δ Actividad de β -galactosidasa de la cepa ECL5336
La flecha indica la adición de acetato 20 mM.

Efecto de D₁-H₂ sobre ArcA fosforilada en aislados con genotipo $\Delta arcB$.

En los resultados anteriores se ha observado que D₁-H₂ tiene efecto en el control transcripcional mediante la desfosforilación de ArcA-P. Sin embargo no se puede excluir la posibilidad de que el fragmento D₁-H₂ de ArcB no este actuando sobre ArcA-P, sino que el grupo fosforilo sea transferido del dominio de autofosforilación (H₁) hacia el dominio receptor del fragmento D₁-H₂ y posteriormente se libere como Pi. Otra posibilidad es que en el caso de tener el dominio fosfotransmisor mutado (H₂*) se quede el grupo fosforilo en el dominio receptor.

En el experimento realizado con las cepas ECL5004 $\lambda\Phi$ (*cyd-lacZ*) y ECL5012 $\lambda\Phi$ (*lldp-lacZ*) las cuales contienen fondo genético $\Delta arcB$ se pueden observar dos cosas: 1) de acuerdo a los resultados de la figura 13 y previos reportes (Lukat, *et al.*, 1992; McCleary y Stock, 1994), se sugiere que *in vivo* los reguladores de respuesta son capaces de autofosforilarse a expensas de acetil fosfato sólo en ausencia de su cinasa sensora. 2) Con los resultados de este experimento se puede demostrar que D₁-H₂ es capaz de desfosforilar a ArcA fosforilado. Las cepas antes mencionadas, fueron transformadas con los vectores pMX020 (expresa D₁-H₂), pMX021 (expresa D₁*-H₂*), pMX022 (expresa D₁-H₂*) y pMX023 (expresa D₁*-H₂*). Se inocularon 50 μ l de cultivos madres de cada transformante en 5 ml de medio mínimo adicionado con piruvato 0.4%, ampicilina 100 μ g/ml, kanamicina 50 μ g/ml; como inductores del vector y del reportero $\lambda\Phi$ (*lldp-lacZ*), arabinosa 0.02% y L-lactato 20 mM respectivamente. Los cultivos fueron incubados en agitación a 37°C hasta obtener una DO₆₀₀ de 0.2.

Los resultados mostrados en las figuras 14a y b indican que ArcA reprimió y activó a los reporteros respectivamente en presencia del intermediario acetil fosfato. Por otro lado cuando se expresa D₁-H₂ se observa nuevamente la anulación de la regulación realizada por ArcA fosforilado sobre ambos reporteros, en cambio cuando se expresan D₁*-H₂* y D₁-H₂* no se ve efecto alguno. En la expresión de D₁*-H₂ se observa una disminución en el control ejercido por ArcA fosforilado.

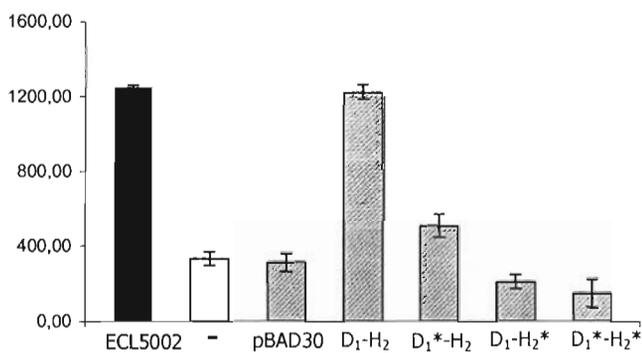


Fig 14a. La expresión de D₁-H₂ elimina el control transcripcional de ArcA fosforilado.

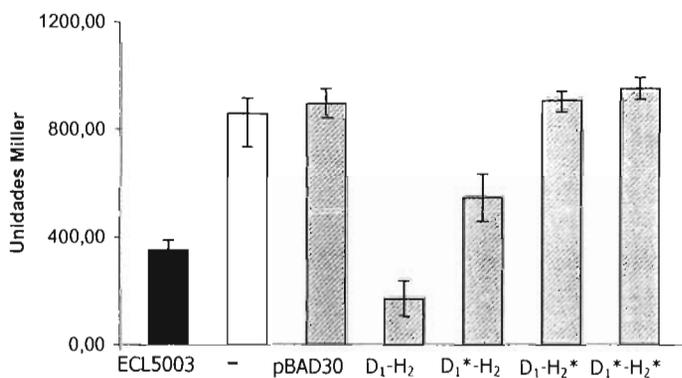


Fig 14b. Desfosforilación de ArcA fosforilado por las versiones del fragmento D₁-H₂ en cepas con genotipo $\Delta arcB$.

Discusión

Existen dos actividades primordiales que regulan la cantidad de regulador de respuesta fosforilado; la primera, es la actividad de autofosforilación de la cinasa sensora, por medio de esta acción se controla la disponibilidad del grupo fosforilo (Borkovich *et al.*, 1989). La segunda es la desfosforilación del regulador de respuesta que puede ser por tres diferentes vías: 1) Actividad autofosfatasa o labilidad inherente de la forma fosforilada de la proteína reguladora; 2) La desfosforilación catalizada por una tercera proteína auxiliar, la cual interviene en la hidrólisis del grupo acyl formado (Wright *et al.*, 1993); 3) La desfosforilación catalizada por la actividad bifuncional cinasa/fosfatasa de la cinasa sensora reconocida (Albanesi *et al.*, 2004; Hsing y Silhavy, 1997).

En los resultados obtenidos en el experimento, en donde células en crecimiento anaeróbico fueron cambiadas a condiciones aeróbicas, se observa que la actividad del reportero aumenta desde los primeros minutos de aereación (Fig 10). Lo anterior puede sugerir que en el sistema Arc, la inactivación de ArcA no es por labilidad inherente ya que ha sido previamente demostrado que *in vitro* ArcA fosforilada tiene una vida media mayor a 1 h (Georgellis *et al.*, 1998), lo anterior sugiere que el decaimiento de la señal debe ser realizado por medio de la actividad fosfatasa de una proteína ajena a ArcA.

Ha sido previamente reportado que en algunos sistemas, la desfosforilación del regulador de respuesta se encuentra auxiliada por fosfatasas, como es el caso de las proteínas del control flagelar, CheZ dimeriza e interacciona con CheY acelerando la desfosforilación (Cantwell *et al.*, 2003; Hess *et al.*, 1988; Blat y Eisenbach, 1994). Otro ejemplo es el sistema de dos componentes encargado de la esporulación en *B. subtilis*, en donde se involucran varias fosfatasas altamente reguladas (RapA, RapB y RapE) para la desfosforilación de Spo0F (Perego *et al.*, 1994), así mismo Spo0E es la autofosfatasa de Spo0A (Ohlsen *et al.*, 1994).

Previamente se ha reportado que en el sistema de Arc la cantidad de ArcA fosforilado puede ser controlada por una tercera proteína nombrada SixA, la cual

secuestra al grupo fosfato del dominio fosfotransmisor de ArcB, sin embargo en ensayos en los cuales sobreexpresaron la proteína *in vivo* no vieron ningún efecto fisiológico (Ogino *et al.*, 1998; Matsubara y Mizuno, 2000).

Se han reportado otros ejemplos en los cuales la proteína cinasa también tiene actividad de fosfatasa. En el sistema que regula la expresión de las porinas OmpF y OmpC, la cinasa sensora EnvZ es la encargada de la actividad fosfatasa de OmpR fosforilado (Hsing y Silhavy, 1997; Hsing *et al.*, 1998). En el sistema de Tor, la cinasa detecta la presencia de trimetilamina N-óxido (TMAO) en el medio transfosforilando al regulador de respuesta TorR vía His₄₄₃--Asp₇₂₃--His₈₅₀--Asp (TorR) pero en ausencia de este producto (TMAO) la proteína reguladora es desfosforilada por fosfo-relevo reverso vía Asp (TorR)--His₈₅₀--Asp₅₂₃ (Ansaldi *et al.*, 2001).

Otro ejemplo es FixL/J encontrado en *Rhizobium meliloti*, el cual responde a bajas concentraciones de oxígeno; la cinasa FixL es la encargada de fosforilar y desfosforilar al regulador de respuesta FixJ (Lois *et al.*, 1993). Un trabajo realizado *in vitro*, sugirió que el decaimiento de la señal en el sistema Arc también es realizado por fosfo-relevo reverso, en el cual está involucrado el Asp₅₄ de ArcA, el His₇₁₇ y Asp₅₇₆ de ArcB, con una subsecuente liberación de Pi (Georgellis *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos *in vivo* en este trabajo confirman los resultados previamente realizados *in vitro*, observándose que ArcA-P es desfosforilado por el dominio receptor y fosfotransmisor de ArcB en una vía reversa Asp₅₄--His₇₁₇--Asp₅₇₆.

En la figura 11 se observa mayor incremento de actividad del reportero sólo cuando es expresado el fragmento D₁-H₂ de ArcB aún en un aislado con genotipo *arcB* constitutivo, lo que indica que esta cinasa es responsable de la desfosforilación de su regulador de respuesta correspondiente. Nuestros resultados también concordaron con lo que sugirieron los ensayos realizados *in vitro*, que tanto el dominio D₁ como el H₂ son necesarios en el decaimiento de la señal, ya que cuando se expresaron los fragmentos de ArcB con alguna mutación ya sea

D₁*- H₂ o D₁-H₂*, tanto la expresión del gen $\lambda\Phi(\text{lldp-lacZ})$ como la activación de $\lambda\Phi(\text{cyd-lacZ})$ fueron menores que en el caso de D₁-H₂ tipo silvestre (ver figuras 11 además de las figs. 12a y b; 14a y b).

Cabe mencionar que el tiempo en que se comienza a observar la activación del reportero cuando se adiciona arabinosa, concuerda también con el observado en la figura 10 en donde sólo se cambió el cultivo a condiciones aeróbicas, siendo éste aproximadamente entre 10-20 min, posiblemente es el tiempo en el que la célula comienza a sentir la presencia de O₂ en el medio y ajusta la maquinaria a las nuevas condiciones.

A pesar de la fuerte evidencia de que el dominio receptor (D₁) y fosfotransmisor (H₂) de ArcB son los responsables de la desfosforilación de ArcA fosforilado, no se sabe si la actividad cinasa/fosfatasa de ArcB se debe a cambios en la conformación de estos dominios dependiendo del estado redox de crecimiento. De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo realizado con cepas silvestres se sugiere que no son los cambios conformacionales los que confieren actividad de cinasa o de fosfatasa a ArcB, sin embargo no se puede excluir esta hipótesis ya que posiblemente sea necesario el dominio H₁ para poder llevar a cabo dichos cambios.

Al contrario de los resultados previamente publicados (Nyström *et al.*, 1996), en este trabajo se muestra que en presencia de ArcB, el acetil fosfato no tiene ninguna relevancia fisiológica. En la figura 13 se observa que la adición de acetato no alteró la expresión de $\lambda\Phi(\text{cyd-lacZ})$ en cepas que contienen a ArcB silvestre.

En los resultados presentados en este trabajo, en los cuales se utilizaron cepas con genotipo ΔarcB se observaron dos cosas 1) en presencia de ArcB el acetil fosfato no modula el nivel de ArcA fosforilado (como se puede observar en el panel negro de las gráficas 14a y b), en cambio en su ausencia se observa represión y activación de $\lambda\Phi(\text{lldp-lacZ})$ y $\lambda\Phi(\text{cyd-lacZ})$ respectivamente (Fig 14a y b) en condiciones aeróbicas, evidenciando que ArcA está activo y que se

autofosforiló a expensas del acetil fosfato. Los resultados anteriores, concuerdan con publicaciones en los sistemas CheY y NtrC, en donde reportan que *in vivo* la autofosfoilación del regulador de respuesta a expensas de donadores de fosfatos de bajo peso molecular como el acetil fosfato sólo puede ocurrir en ausencia de la cinasa sensora respectiva (Dailey y Berg 1993; Feng *et al.*, 1992; Hsing y Silhavy, 1997).

A pesar de que los ensayos realizados en condiciones anaeróbicas en las cepas silvestres, proveen una fuerte evidencia de que ArcA-P es desfosforilada *in vivo* por D₁-H₂ de ArcB, no se puede descartar la posibilidad de que este fragmento mas bien interrumpa la transferencia del grupo fosforilo de ArcB hacia ArcA, mediante un fosfo-relevo que involucre a H₁ de ArcB silvestre y D₁ de ArcB plasmídico, sin embargo los ensayos realizados con las cepas que contienen genotipo $\Delta arcB$ mostraron que el efecto observado por la expresión de D₁-H₂ es realizado directamente sobre ArcA fosforilado y así ocurre el necesario apagado del sistema Arc bajo condiciones no estimulantes.

Perspectivas

ArcB es una proteína bifuncional que utiliza los dominios D₁ y H₂ en el fosfo-relevo para la transmisión de la señal cuando se encuentra activa como cinasa, así como para el decaimiento de la señal en su actividad fosfatasa, además de que el pico de su actividad cinasa se encuentra en condiciones de microaerobiosis (Alexeeva *et al.*, 2003) en las cuales se escasean los niveles de ATP, es difícil concebir un escenario en el cual operen las actividades de cinasa y fosfatasa al mismo tiempo por el costo energético que tendría la célula. En el trabajo futuro, se pretende encontrar los aspectos que controlan la dirección de la transferencia del grupo fosforilo mediante:

Examinar el efecto de la dimerización en la desfosforilación de ArcA

Como se ha reportado anteriormente, el sistema Arc se encuentra apagado en condiciones aeróbicas mediante la activación de un mecanismo silenciador de la actividad cinasa de ArcB en el que ocurre la oxidación de dos residuos de cisteínas (Cys¹⁸⁰ y Cys²⁴¹) los cuales participan en la formación de un enlace disulfuro intermolecular (Malpica *et al.*, 2004). Se espera que la formación de dímeros de ArcB a través de estos enlaces provoque cambios en la conformación de la proteína que permitan que adquiera actividad de fosfatasa de ArcA fosforilado. Por lo anterior, será explorada la hipótesis de que la forma reducida de ArcB tenga actividad de cinasa, mientras que la forma oxidada opere como fosfatasa. Para esto se determinará *in vitro* la tasa de desfosforilación del fragmento ArcA¹⁻¹³⁶ fosforilada, por la proteína ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ completamente reducida (mediante previo tratamiento con DTT) o completamente oxidada (con previo tratamiento con Q0 y cloramina T).

Si el resultado de lo anterior indica que efectivamente la forma oxidada de ArcB tiene mayor actividad fosfatasa que la forma reducida, se comparará la expresión $\Phi(\text{Ildp-lacZ})$ en los siguientes ensayos *in vivo*:

- 1) ECL5012 ($\Delta\text{acrB } \Phi\text{Ildp-lacZ}$). Previos resultados han indicado que en medio mínimo con piruvato como única fuente de carbono, la expresión del reportero es menor que el aislado silvestre, como resultado de la represión por ArcA-P formado por la autofosforilación del regulador de respuesta a expensas de acetil fosfato (Datos no publicados).
- 2) $\text{acrB}^{\text{H292Q}}$ (ECL5030) en el que se espera observar la expresión del reportero ($\Phi\text{Ildp-lacZ}$), lo que indicaría que la proteína mutante ArcB^{H292Q} actúa como fosfatasa de ArcA.
- 3) $\text{acrB}^{\text{C180A,C240A, H292Q}}$ este aislado doble mutante en los residuos de cisteínas es incapaz de formar el enlace disulfuro. Se ha demostrado anteriormente que en este aislado se mantiene el reportero reprimido

aún en condiciones aeróbicas (Malpica *et al.*, 2004). Si se obtiene represión del reportero, indicará que es necesario el enlace disulfuro para la actividad fosfatasa de ArcB sobre ArcA fosforilada. Además se realizará la inactivación de la actividad cinasa de ArcB introduciendo una mutación en el sitio de autofosforilación H₂₉₂.

Con los experimentos anteriores esperamos obtener valiosa información acerca del mecanismo con el cual se diferencian las actividades de cinasa y de fosfatasa de ArcB. Se espera que ArcB aumente su actividad fosfatasa en la aerobiosis, cuando dimeriza por la formación de enlaces disulfuro (Malpica *et al.*, 2004) y que la función como cinasa sea nula. Lo opuesto es esperado cuando la proteína se encuentra en condiciones reductoras, en las cuales los enlaces disulfuro son reducidos y ArcB monomeriza.

Estudios *in vitro* para identificar si la transferencia del grupo fosforilo es inter o intramolecular.

Previos estudios han sugerido que en la bifuncionalidad de ArcB están involucrados los dominios D₁ como H₂, lo que hace interesante la posibilidad de que el fosfo-relevo y el fosfo-relevo reverso no tengan el mismo patrón de reacción inter o intramolecular.

Para distinguir las reacciones intramoleculares de las intermoleculares serán generados una serie de péptidos mutantes bloqueados en pasos específicos del fosfo-relevo. Varias combinaciones de péptidos mutantes serán incubados con (³²Y)ATP y ArcA. Se probará su habilidad para completar el fosfo-relevo mediante la formación de ArcA en su forma fosforilada. Por ejemplo ni H₁^{His292Gln}-D₁-H₂ (bloqueada en el sitio de autofosforilación) y H₁^{Gln2470AlaGln472Ala}-D₁-H₂ (incapaz de unir ATP) podrán transfosforilar a ArcA a expensas de (³²Y)ATP, pero la mezcla de estos péptidos podrá resultar en la formación de ArcA fosforilada si la transferencia

del grupo fosforilo se involucra una reacción intermolecular. El mismo principio puede ser utilizado para investigar otros pasos del fosforelevo.

Se probarán distintas versiones de ArcB, ya sea solas o en la apropiada combinación para la formación o hidrólisis de ArcA-P.

- 1) $H_1-D_1-H_2 + ArcA$
- 2) $H_1^{H292Q}-D_1-H_2 + ArcA$
- 3) $H_1^{G470A,G472A}-D_1-H_2 + ArcA$
- 4) $H_1^{H292Q}-D_1-H_2 + ArcA + H_1^{G470A,G472A}-D_1-H_2 + ArcA$
- 5) $H_1-D_1^{D576A}-H_2^{H717A} + H_1^{H292Q}-D_1-H_2 + ArcA$
- 6) $H_1^{H292Q}-D_1-H_2^{H717A} + H_1-D_1^{D576A}-H_2 + ArcA$
- 7) $H_1-D_1^{D576A}-H_2 + H_1^{H292Q}-D_1-H_2^{H717A} + ArcA$
- 8) ArcA fosforilado + $H_1^{H292Q}D_1-H_2$
- 9) ArcA fosforilado + $H_1-D_1-H_2^{H717A} + H_1-D_1^{D576A}-H_2$

Los resultados *in vitro* serán verificados *in vivo* utilizando combinaciones de mutantes de ArcB en cromosoma y ArcB plasmídico.

La caracterización individual de los pasos de la fosfotransferencia puede dar señales de los mecanismos bioquímicos involucrados en la dirección en que es transferido el grupo fosforilo. Es posible que el fosfo-relevo y el fosfo-relevo reverso, tengan distintos patrones con respecto a las reacciones inter e intramoleculares. Si lo anterior es cierto, existe la posibilidad de que distintos metabolitos puedan influenciar el índice del fosfo-relevo y del fosfo-relevo reverso.

Literatura Citada

- Aiba H**, Mizuno T, Mizushima S. Transfer of phosphoryl group between two-regulatory proteins involves in osmoregulatory expression of the *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 1989, 264:8563-8567.
- Albanesi D**, Mansilla MC, Mendoza M. The membrane fluidity sensor DesK of *Bacillus subtilis* controls the signal decay of its cognate response regulator. J. Bacteriol. 2004, 189:2655-2663.
- Alexeeva S**, Hellingwerf KJ, Teixeira de Mattos MJ. Requirement of ArcA for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic conditions but not anaerobic or aerobic conditions. J. Bacteriol. 2003, 185:204-209.
- Ansaldi M**, Jourlin-Castelli Lepelletier M, Théraulaz L, Méjeans V. Rapid dephosphorylation of the TorR response regulator by the TorS unorthodox sensor in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 2001, 183:2691-2695.
- Backman KC**, Chen YM, Ueno-Nishio S, Magasanik B. The product of *glnL* is not essential for regulation of bacterial nitrogen assimilation. J. Bacteriol. 1993, 154:516-519.
- Beutin PL**, Achtman M. Two *Escherichia coli* chromosomal cistrons, *srfA* and *srfB*, which are needed for expression of F factor *tra* functions. J. Bacteriol. 1979, 139:730-737.
- Beutin PL**, Manning PA, Achtman M, Willets N. *srfA* and *srfB* products of *Escherichia coli* K-12 are transcriptional control factors. J. Bacteriol. 1981, 145:840-844.
- Blat Y**, Eisenbach M. Phosphorylation-dependent binding of the chemotaxis signal molecule CheY to its phosphatase, CheZ. Biochemistry. 1994, 33:902-906.
- Borkovich KA**, Kaplan N, Hess FJ, Simon MI. Transmembrane signal transduction in bacterial chemotaxis involves ligand-dependent activation of phosphate group transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989, 86:1208-1212.
- Bouché S**, Klauck E, Fischer D, Luccassen M, Jung K, Hengge-Aronis R. Regulation of RssB-dependent proteolysis in *Escherichia coli*: a role for acetyl phosphate in a response regulator-controlled process. Mol. Microbiol. 1998, 27:787-795.
- Burbuly D**, Trach KA, Hoch JA. Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by multicomponent phosphorelay. Cell. 1991, 64:545-552.
- Cantwell BJ**, Draheim RR, Weart RB, Nguyen C, Stewart RC, Manson MD. CheZ phosphatase localizes to chemoreceptor patches via CheA-Short. J. Bacteriol. 2003, 185:2354-2361.
- Chamngopol S**, Groisman EA. Acetyl phosphate-dependent activation of mutant PhoP response regulator that functions independently of its cognate sensor kinase. J. Mol. Microbiol. 2000, 300:291-305.

- Dailey FE**, Berg HC. Change in direction of flagellar rotation in *Escherichia coli* mediated by acetate kinase. *J. Bacteriol.* 1993, 175:3236-3239.
- Deteric V**, Leveau JHJ, Mohr CD, Hibler NS. In vitro phosphorylation of AlgR, a regulator of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* by a histidine protein kinase and effects of small phospho-donor molecules. *Mol. Microbiol.* 1992, 6:2761-2767.
- Drapal N**, Sawers G. Purification of ArcA and analysis of its specific interaction with the *pfl* promoter-regulatory region. *Mol. Microbiol.* 1995, 16:597-607.
- Feng J**, Atkinson MR, McCleary W, Stock JB, Warner BL, Ninfa AJ. Role of phosphorylated metabolic intermediates in the regulation of glutamine synthetase synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1992, 174:6061-6070.
- Foraje RG**, Lin ECC. *dha* system mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 1982, 151:591-599.
- Gaffney D**, Skurray R, Willets N. *J. Mol. Biol.* 1983, 168:103-122.
- Georgellis D**, Lynch AS, Lin ECC. In vitro phosphorylation study of the Arc two component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1997, 5429-5435.
- Georgellis D**, Kwon O, De Wulf P, Lin ECC. Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system. *J. Biol. Chem.* 1998, 273:32864-32869.
- Georgellis D**, Kwon O, Lin ECC. Amplification of signaling activity of the Arc two component system of *Escherichia coli* by anaerobic metabolites: An in vitro study with different protein modules. *J. Biol. Chem.* 1999, 274:35950-35954.
- Georgellis D**, Kwon O, Lin ECC. Quinones as the redox signal for the Arc two-component system of bacteria. *Science.* 2001, 292:2314-2316.
- Guzmán LM**, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. Tight regulation, modulation and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *J. Bacteriol.* 1995, 177:4121-4130.
- Hathaway BG**, Berquist PL. Temperature-sensitive mutations affecting the replication of F-prime factors in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* 1973, 127:297-306.
- Head CG**, Tardy A, Kenney LJ. Relative binding affinities of OmpR and OmpR-phosphate at the *ompF* and *ompC* regulatory sites. *J. Mol. Biol.* 1998, 281:857-870.
- Hess JF**, Bourret RB, Simon MI. Histidine phosphorylation and phosphoryl group transfer in bacterial chemotaxis. *Nature.* 1988, 336:139-143.
- Hiratsu K**, Nakata A, Shinagawa H, Makino K. Autophosphorylation and activation of transcriptional activator PhoB of *Escherichia coli* by acetyl phosphate *in vitro*. *Gene.* 1995, 161:7-10.

- Holman TR**, Wu Z, Wanner BL, Walsh CT. Identification of the DNA-binding site for the phosphorylated VanR protein required for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Biochemistry*. 1994, 33:4625-4631.
- Hsing W**, Silhavy T. Function of conserved histidine-243 in phosphatase activity of EnvZ, the sensor for porin osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1997, 179:3729-3735.
- Hsing W**, Russo FD, Bernd KK, Solhavy TJ. Mutations that alter the kinase and phosphatase activities of the two-component sensor EnvZ. *J. Bacteriol.* 1998, 180:4538-4546.
- Igo MM**, Ninfa AJ, Stock JB, Silhavy TJ. Phosphorylation and dephosphorylation of a bacterial transcriptional activator by a transmembrane receptor. *Genes Dev.* 3:1725-1734.
- Inoue H**, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 1990, 96:23-28.
- Ishige K**, Nagazawa S, Tokishita S, Mizuno T. A novel device of bacterial signal transducers. *EMBO J.* 1994, 13:5195-5202.
- Iuchi S**, Lin ECC. *ArcA (dye)* a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. 1988, 85:1888-1892.
- Iuchi S**, Cameron DC, Lin ECC. A second global regulator gene (*arcB*) mediating repression of enzymes in aerobic pathways of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1989, 171:86-873.
- Iuchi S**, Matsuda Z, Fujiwara T, Lin ECC. The *arcB* gene of *Escherichia coli* encodes a sensor regulator protein for anaerobic repression of the *arc* regulon. *Mol. Microbiol.* 1990, 4:715-727.
- Iuchi S**, Lin ECC. Mutational analysis of the signal transduction by ArcB, a membrane sensor protein responsible for anaerobic repression of operons involved in central aerobic pathways in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1992a, 174:3972-3980.
- Iuchi S**, Lin ECC. Purification and phosphorylation of the Arc regulatory components of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1992b, 174:5617-5623.
- Iuchi S**, Lin ECC. Adaptation of *Escherichia coli* to redox environments by gene expression. *Mol. Microbiol.* 1993, 9:9-15.
- Iuchi S**, Lin ECC. Signal transduction in the Arc system for control of operons encoding aerobic respiratory enzymes. 1995, *In Two-component signal transduction. Hoch JA, Silhavy T. 1995.*
- Jourlin C**, Ansaldi M, Méjean V. Transphosphorylation of the TorR response regulator requires the three phosphorylation sites of the TorS unorthodox sensor in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 1997, 267:770-777.
- Kaper JB**, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews/Microbiology.* 2004, 2:123-140.

- Kofoed EC**, Parkinson JS. Transmitter and receiver modules in bacterial signaling proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988, 85:4981-4985.
- Kwon O**, Georgellis D, Lin ECC. Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the Arc two-component system of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 2000, 182:3858-3862.
- Kwon O**, Georgellis D, Lynch S, Boyd D, Lin ECC. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region. J. Bacteriol. 2000a, 182:2960-2966.
- Kwon O**, Georgellis D, Lin ECC. Rotational On-off switching of a hybrid membrane sensor kinase Tar-ArcB in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 2003, 278:13192-13195.
- Lau PCK**, Wang Y, Patel A, Labbé D, Bergeron H, Brousseau R, Konishi Y, Rawlings M. A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997, 94:1453-1458.
- Lee YS**, Han JS, Jeon Y, Hwang DS. The Arc two-component signal transduction system inhibits the *in vitro* *Escherichia coli* chromosomal initiation. J. Biol. Chem. 2001, 276:9917-9923.
- Lengeler JW**, Drews G, Shlegel HG. *Biology of the prokaryotes*. Thieme Stuttgart. New York. 1999.
- Li J**, Swanson RV, Simon MI, Weis RM. Biochemistry. 1995, 34:14626-14636.
- Lois AF**, Weinstein M, Ditta GS, Helinski DR. Autophosphorylation and phosphatase activities of the oxygen sensing protein FixL, of *Rhizobium mulloti* are coordinately regulated by oxygen. J. Biol. Chem. 1993, 268:4370-4375.
- Lynch AS**, Lin ECC. Transcriptional control mediated by the Arc two-component response regulator protein of *Escherichia coli*. Characterization of DNA binding at target promoters. J. Bacteriol. 1996, 178:6238-6249.
- Lynch AS**, Lin ECC. Regulation of aerobic and anaerobic metabolism by the Arc system. In: *Lin δ Lynch. Regulation of gene expression in Escherichia coli*. Chapman and Hall, 1995.
- Lukat GS**, McCleary WR, Stock AM, Stock JB. Phosphorylation of bacterial response regulator protein by low molecular weight phosphor-donors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992, 89:718-722.
- Malpica R**, Franco B, Rodríguez C, Kwon O, Georgellis D. Identification of the quinone sensitive-redox switch in the ArcB sensor kinase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2004, 101:13318-13323.
- Matsubara M**, Mizunó T. The SixA phospho-histidine phosphatase modulates the ArcB phosphorelay signal transduction in *Escherichia coli*. FEBS Letters. 2000, 470:118-124.
- McCleary WR**, Stock J. Acetyl phosphate and the activation of Two-component response regulator. J. Biol. Chem. 1994, 269:31567-31572.
- McCleary WR**. The activation of PhoB by acetyl-phosphate. Mol. Microbiol. 1996, 20:1155-1163.

- McEwen J**, Silverman P. Chromosomal mutations of *Escherichia coli* that alter expression of conjugative plasmid functions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980, 77:513-517.
- Miller JH**. *Experiments in molecular genetics*. 1972. p. 352-355. CSHL Press. Cold Spring Harbor, NY.
- Mizuno T**. Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transduction in the genome of *Escherichia coli*. DNA Res. 1997, 4:161-168.
- Ninfa AJ**, Magazanik B. Covalent modification of the *glnG* product, NR₁, by the *glnL* product, NR₁₁, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986, 83:5909-5913.
- Nixon BT**, Ronson CW, Ausubel FM. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. 1986, 83:7850-7854.
- Nyström T**, Larsson C, Gustafsson L. Bacterial defense against aging: role of the *Escherichia coli* ArcA regulator in gene expression, readjusted energy flux and survival during stasis. Embo J. 1996, 15:3219-3228.
- Ogino T**, Matsubara M, Kato N, Nakamura Y, Mizuno T. An *Escherichia coli* protein that exhibits phosphohistidine phosphatase activity towards the Hpt domain of the ArcB sensor involved in the multistep His-Asp phosphorelay. Mol. Microbiol. 1998, 27:573-585.
- Ohlsen KL**, Grimsley JK, Hoch JA. Deactivation of the sporulation transcription factor Spo0A by the Spo0E protein phosphatase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994, 91:1756-1760.
- Parkinson JS**, Kofoed EC. Communication modules in bacterial signaling proteins. Annu. Rev. Genet. 1992, 26:71-112.
- Perego M**, Hanstein C, Welsh KM, Djavakhishvili T, Glaser P, Hoch JA. Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. Cell. 1994, 79:1047-1055.
- Reyrat JM**, David M, Blonski C, Boistard P, Batut J. Oxygen regulated *in vitro* transcription of *Rhizobium meliloti nifA* and *fixK* genes. J. Bacteriol. 1993, 175:6867-6872.
- Rodríguez C**, Kwon O, Georgellis D. Effect of D-lactate on the physiological activity of the ArcB sensor kinase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 2004, 186:2085-2090.
- Roeder W**, Somerville RL. Cloning the *trpR* gene. Molec. gen. Genet. 1979. 176:361-368.
- Ronson CW**, Nixon BT, Ausubel FM. Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. Cell. 1987, 49:579-581.
- Sambrook J**, Rusell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual. Appendix2: Media*. CSHL Press. Cold Spring Harbor, NY.

- Sawers RG**, Zehelein E, Bock A. Two dimensional gel electrophoretic analysis of *Escherichia coli* proteins: influence of various anaerobic growth conditions and the *fnr* gene product on cellular protein composition. *Arch. Microbiol.* 1988, 149:240-244.
- Schröder I**, Wolin CD, Cavicchioli R, Gunsalus RP. Phosphorylation of the NarQ, NarX, and LarL proteins of the nitrate dependent two-component regulatory system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1994, 176:4985-4992.
- Shaulski G**, Escalante R, Loomis W. Developmental signal transduction pathway uncovered by genetic suppressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996, 93:15260-15265.
- Simms SA**, Keane MG, Stock J. Multiple forms of the CheB methyltransferase in bacterial chemosensing. *J Biol Chem.* 1985, 260:10161-8.
- Stewart V**, Rabin RS. Dual sensors and dual response regulators interact to control Nitrate- and Nitrite-responsive gene expression. in *Escherichia coli*. In Hoch JA y Silhavy TJ. *Two-component signal transduction.* 1995, ASM Press. Washington DC.
- Stock AM**, Robinson VI, Gourdreau PN. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 2000, 69:183-215.
- Taylor BL**, Zhulin IB. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999, 63:479-506.
- Uhl MA**, Miller JF. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO.* 1996, 15:1028-1036.
- Welch M**, Oosawa K, Aizawa SI, Eisenbach M. Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993, 90:8787-8791.
- West AH**, Stock AM. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *TRENDS in Biochemical Sciences.* 2001, 26:369-376.
- Wright GD**, Holman TR, Walsh CT. Purification and characterization of VanR and the cytosolic domain of VanS: A two-component regulatory system required for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BMN4147. *Biochemistry.* 1993, 32:5057-5067.
- Yanish-Perron C**, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 1985, 33:103-119.

Requirement of the Receiver and Phosphotransfer Domains of ArcB for Efficient Dephosphorylation of Phosphorylated ArcA In Vivo

Gabriela R. Peña-Sandoval,¹ Ohsuk Kwon,² and Dimitris Georgellis^{1*}

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico,¹ and Laboratory of Metabolic Engineering, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 52 Oun-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-333, Korea²

Received 29 October 2004/Accepted 21 January 2005

The Arc two-component system, comprising the ArcB sensor kinase and the ArcA response regulator, modulates the expression of numerous genes in response to the respiratory conditions of growth. Under anoxic growth conditions, ArcB autophosphorylates and transphosphorylates ArcA, which in turn represses or activates its target operons. Under aerobic growth conditions, phosphorylated ArcA (ArcA-P) dephosphorylates and its transcriptional regulation is released. The dephosphorylation of ArcA-P has been shown to occur, at least in vitro, via an ArcA^{Asp54}-P → ArcB^{His717}-P → ArcB^{Asp576}-P → P_i reverse phosphorelay. In this study, the physiological significance of this pathway was assessed. The results demonstrate that the receiver and phosphotransfer domains of the tripartite sensor kinase ArcB are necessary and sufficient for efficient ArcA-P dephosphorylation in vivo.

The ability to respond to a vast array of environmental signals is vital for the growth and survival of microorganisms. The sensing and processing of these signals are carried out by molecular circuits within the cell, which detect, amplify, and integrate these signals into a specific response. In prokaryotes, these molecular circuits are typically organized by protein pairs, “sensory kinase” proteins and “response regulator” proteins, that belong to the large family of two-component systems. Two-component signal transduction systems that depend on histidine and aspartyl residues as phosphoryl group donors and acceptors have been reported to regulate diverse processes that include energy metabolism, symbiotic nitrogen fixation, chemotaxis, cell division, sporulation, and pathogenic interactions with both plant and animal hosts (1, 13, 29).

The prototypical system of this kind comprises a membrane-bound sensor kinase and a cytosol-located cognate response regulator. Upon signal reception, the sensor kinase undergoes an ATP-dependent autophosphorylation at a conserved His residue and subsequently transphosphorylates a conserved Asp residue in the cognate response regulator rendering it functional, in general as a transcriptional regulator. Upon cessation of signaling, both the cognate response regulator and the sensor kinase undergo dephosphorylation that results in silencing of the system.

The Arc (anoxic redox control) two-component system is a complex signal transduction system that plays a key role in regulating energy metabolism at the level of transcription in bacteria (23), including the pathogens *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Yersinia pestis*, and *Haemophilus influenzae* (2, 3, 12, 25). This system comprises the ArcB protein as the sensor kinase and the ArcA protein as the response regulator (15, 17). ArcA is a typical response regu-

lator comprising an N-terminal receiver domain with a conserved Asp residue (Asp54) and a C-terminal helix-turn-helix domain for DNA binding. By contrast, ArcB is unusually elaborate. First, there is no evident periplasmic domain (17, 20). Second, the cytosolic portion of the protein contains a putative leucine zipper (9) and a PAS (Per-Amt-Sim) domain (31). Third, ArcB possesses three cytosolic catalytic domains: an N-terminal transmitter domain (H1) with a conserved His residue at position 292, a central receiver domain (D1) with a conserved Asp residue at position 576, and a C-terminal transmitter domain (H2) with a conserved His residue at position 717 (14, 16).

Under reducing conditions, ArcB undergoes ATP-dependent autophosphorylation (10, 16), a process that is enhanced by certain anaerobic metabolites such as D-lactate, acetate, and pyruvate (7, 30), and transphosphorylates ArcA via a His292 → Asp576 → His717 → Asp54 phosphorelay (10, 18). Phosphorylated ArcA (ArcA-P), in turn, represses the expression of many operons involved in respiratory metabolism and activates a few operons encoding proteins involved in fermentative metabolism (23). Under aerobic conditions, the kinase activity of ArcB is inhibited by the quinone electron carriers that act as direct negative signals (8). In a recent study, it was demonstrated that the molecular mechanism of kinase silencing involves the oxidation of two cytosol-located redox-active cysteine residues (Cys180 and Cys241) that participate in intermolecular disulfide bond formation (24). Furthermore, dephosphorylation of ArcA-P, a reaction needed to curtail its regulatory activity, was previously shown to proceed, at least in vitro, via an ArcA^{Asp54}-P → ArcB^{His717}-P → ArcB^{Asp576}-P → P_i reverse pathway (9). However, no in vivo evidence was provided to support the physiological significance of such a pathway.

In this study, we address the question of whether the receiver (D1) and secondary transmitter (H2) of ArcB are involved in the in vivo dephosphorylation of ArcA-P.

A shift to nonstimulating conditions leads to immediate

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico. Phone: 52 55 3622 5738. Fax: 52 55 5622 5611. E-mail: dimitris@ifc.unam.mx.

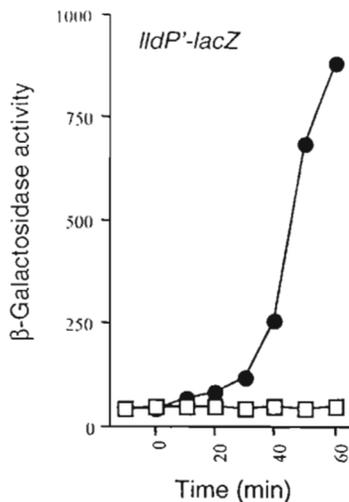


FIG. 1. A shift to nonstimulating conditions leads to immediate release of the Arc-dependent transcriptional control. The ArcA/B two-component system responds very rapidly to changes in redox conditions of growth. Strain ECL5002 carrying the $\lambda\Phi(lldP'-lacZ)$ reporter was grown anaerobically in LB containing 0.1 M MOPS (morpholinepropanesulfonic acid) (pH 7.4), 20 mM D-xylose, and 20 mM L-lactate as inducer. At an OD_{600} of 0.2, one aliquot was withdrawn for measuring the β -galactosidase activity (depicted as -10 min). At time 0 min, the cultures were divided in two: one of the subcultures continued growth under anaerobiosis, serving as control, while the other was shifted to aerobiosis. The β -galactosidase activity was monitored for 1 h with 10-min intervals. Open squares, anaerobic growth; closed circles, shift to aerobiosis.

release of the Arc-dependent transcriptional control. During anaerobic growth, the ArcA response regulator is activated upon phosphorylation by ArcB and regulates the transcription of some 40 operons. When oxygen becomes available, rapid dephosphorylation of both ArcB-P and ArcA-P is probably necessary for release of the Arc-dependent transcriptional control. To gain some insight into the mechanism of dephosphorylation, we examined the time lag for the response of the Arc system after a shift from anaerobic to aerobic conditions of growth. To this end, strain ECL5002 carrying the ArcA-P-repressible $\lambda\Phi(lldP'-lacZ)$ reporter (20) was grown anaerobically in buffered Luria broth (LB) supplemented with 20 mM L-lactate to induce expression of the reporter (5). At an optical density at 600 nm (OD_{600}) of ~ 0.25 , a sample was withdrawn and the expression level of the reporter, expressed in β -galactosidase units, was determined (depicted as -10 min). As expected, the expression of the reporter was very low, indicative of ArcA-P repression (Fig. 1). After an additional 10 min of growth, the culture was shifted to aerobiosis and the time course of the β -galactosidase activity was followed. As seen in Fig. 1, shifting the anaerobic culture to aerobiosis caused a rapid increase in reporter expression, suggesting that the Arc system responds quickly to changes in respiratory conditions. In this respect, it has to be mentioned that the presence of molecular oxygen leads to the oxidation of the quinone elec-

tron carriers that in turn inhibit ArcB phosphorylation (8) and thereby prevent further transphosphorylation of ArcA. The already formed ArcB-P dephosphorylates, most likely, by the intrinsic lability of the phospho-aspartyl bond in D1 (10). Also, the phosphohistidine phosphatase, SixA, which was previously reported to specifically dephosphorylate His⁷¹⁷ of ArcB (28), may contribute to the dephosphorylation of ArcB-P. However, rapid dephosphorylation of ArcA-P is also necessary for reporter expression to resume after the shift to aerobiosis. Generally, the rate of dephosphorylation of response regulators appears to be controlled by the inherent lability of the mixed anhydride phospho-aspartyl bond and/or a phosphatase-like activity embodied in the cognate sensor kinase or another protein. Considering the fact that the in vitro half-life of the phospho-aspartyl bond of ArcA-P exceeds 60 min (9), we postulated that an ArcA-P-specific phosphatase might be needed for its dephosphorylation during oxidizing conditions of growth.

ArcA-P-dependent repression is released upon expression of D1-H2 under nonstimulating conditions. It has been previously reported that, at least in vitro, ArcA-P dephosphorylates via an $ArcA^{Asp54}\text{-P} \rightarrow ArcB^{His717}\text{-P} \rightarrow ArcB^{Asp576}\text{-P} \rightarrow P_i$ reverse pathway (9). Since the receiver (D1) and secondary transmitter (H2) of ArcB are involved in the in vitro dephosphorylation of ArcA-P, we argued that in vivo overexpression of these two domains might release the ArcA-P-dependent transcriptional control in the absence of stimuli. To test this, we constructed a series of plasmids expressing wild-type and mutant D1-H2 (ArcB⁵²¹⁻⁷⁷⁸) proteins. The EcoRI-HindIII fragments of plasmids pQE30ArcB⁵²¹⁻⁷⁷⁸ (10), pQE30ArcB^{521-778, D576A} (9), pQE30ArcB^{521-778, H717Q} (9), and pQE30ArcB^{521-778, D576A, H717Q} (this study), containing the ribosomal binding site of the pQE30 vector and the *arcB* sequence that encodes the ArcB⁵²¹⁻⁷⁷⁸ fragment, were cloned downstream from the *ara* promoter of plasmid pBAD30 (11) to generate pMX020, pMX021, pMX022, and pMX023 encoding ArcB⁵²¹⁻⁷⁷⁸ (D1-H2), ArcB^{521-778, D576A} (D1*-H2), ArcB^{521-778, H717Q} (D1-H2*), and ArcB^{521-778, D576A, H717Q} (D1*-H2*), respectively. Induction by arabinose revealed that all resultant D1-H2 constructs overexpress a protein of the expected size at similar steady-state levels (Fig. 2A).

The generated plasmids were transformed into strain ECL5047 (19), in which the wild-type *arcB* has been replaced with a *tar-arcB* hybrid (*tab1*) that encodes a protein with constitutive ArcB kinase activity and also carries the $\lambda\Phi(lldP'-lacZ)$ reporter fusion. In this strain, ArcB autophosphorylates and transphosphorylates ArcA even during aerobic conditions of growth, and as a result, the β -galactosidase activity is always very low. Therefore, production of an ArcA-P phosphatase should lower the amount of ArcA-P and augment expression of the reporter. The transformants were grown aerobically in buffered LB to an OD_{600} of ~ 0.3 , and a sample for the β -galactosidase assay was withdrawn (depicted as -10 min). In agreement with previous results (19), the expression of the reporter was very low (Fig. 2B) in all tested strains. After an additional 10 min of growth, 1.3 mM arabinose was added in the cultures to induce transcription of the plasmid-encoded peptides, and the time course of β -galactosidase activity was monitored (Fig. 2B). It was found that addition of arabinose in the growth medium of the strain carrying either pBAD30 or

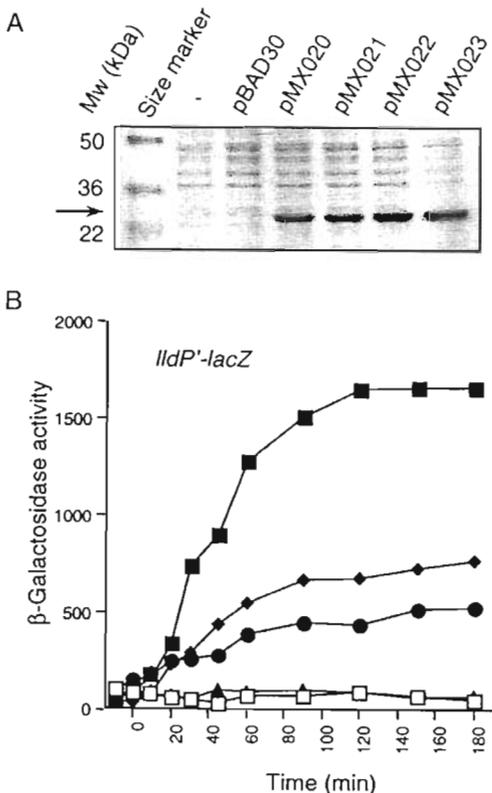


FIG. 2. ArcA-P-dependent repression is released upon expression of D1-H2 under nonstimulating conditions. (A) Strain ECL5003 carrying pBAD30, pMX020 (encodes D1-H2), pMX021 (encodes D1^{*}-H2), pMX022 (encodes D1-H2^{*}), or pMX023 (encodes D1^{*}-H2^{*}) was grown aerobically in LB containing 1.3 mM arabinose. At an OD₆₀₀ of ~0.4, a 1-ml sample was pelleted, washed with 1 ml of 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), and solubilized by incubation at 95°C for 5 min in 100 μ l of 2 \times sodium dodecyl sulfate sample buffer. Samples of 10 μ l were subjected to electrophoresis in a sodium dodecyl sulfate-12% polyacrylamide gel, and the resolved proteins were visualized by Coomassie blue staining. (B) Strain ECL5047 (19) carrying a chromosomal *tar-arcB* hybrid (*tab1*), which encodes a protein with constitutive ArcB kinase activity, the $\lambda\Phi$ (*lldP*'-lacZ) reporter fusion, and pBAD30, pMX020, pMX021, pMX022, or pMX023, was grown aerobically in LB containing 0.1 M MOPS (pH 7.4), 20 mM D-xylose, and 20 mM L-lactate. At an OD₆₀₀ of 0.2, one aliquot was withdrawn for measuring the β -galactosidase activity (depicted as -10 min). At time 0 min, 1.3 mM arabinose was added in each culture and the β -galactosidase activity was followed. Open squares, ECL5047 transformed with pBAD30; closed squares, ECL5047 transformed with pMX020; closed diamonds, ECL5047 transformed with pMX021; closed circles, ECL5047 transformed with pMX022; closed triangles, ECL5047 transformed with pMX023.

the D1^{*}-H2^{*}-expressing plasmid (pMX023) did not affect the expression of the reporter. In contrast, addition of arabinose in the growth medium of the strain carrying the D1-H2-expressing plasmid (pMX020) resulted in an immediate increase of reporter expression, which reached a steady-state level 25 times higher than in the strains carrying either pBAD30 or pMX023. Finally, addition of inducer in the growth medium of the strains carrying either the D1^{*}-H2- or the D1-H2^{*}-expressing plasmid (pMX021 or pMX022) resulted in a moderate release of reporter repression, with D1^{*}-H2 showing a stronger effect than D1-H2^{*}. The effect of D1^{*}-H2 is to be expected, if the reverse phosphorelay is the actual *in vivo* pathway for ArcA-P dephosphorylation, because the phosphoryl group will be transferred from ArcA-P to His717 of H2. An alternative should be that the mutant peptides attenuate the communication between ArcB and/or by sequestering ArcA and thereby blocking its transphosphorylation. Also, the possibility of intermolecular phosphoryl group transfer from H1 or H2 of ArcB to D1-H2^{*} with concomitant hydrolysis of the Asp⁵⁷⁶-P cannot be excluded. Nonetheless, the above results provide strong evidence that the presence of D1-H2 abolishes the ArcA-P-dependent transcriptional regulation under nonstimulating conditions.

Expression of D1-H2 abrogates the ArcA-P transcriptional regulation under stimulating conditions. It is of interest that in the cases where a sensor kinase facilitates dephosphorylation of its cognate response regulator, it is not known whether the same conformation of the sensor allows both the phosphorylation and dephosphorylation reactions to be catalyzed. If distinct conformations of the sensor are needed to specify whether the kinase or the phosphatase activity will be allowed, it can be assumed that under stimulating conditions activation of the kinase will be followed by concomitant inhibition of the phosphatase, while nonstimulating conditions will have the opposite effect. To explore the possibility that distinct conformations might specify the reaction catalyzed by D1-H2, that is either the forward phosphorylation cascade or the reverse phosphorelay, we tested whether expression of D1-H2 under stimulating (anaerobic) conditions also abolishes the ArcA-P-dependent transcriptional control. To this end, the plasmids that express the wild-type or mutant D1-H2 proteins were transformed into strains ECL5002 and ECL5003 carrying, respectively, the ArcA-P-repressed $\lambda\Phi$ (*lldP*'-lacZ) and the ArcA-P-activated $\lambda\Phi$ (*cydA*'-lacZ) reporter in the *lldPRD*⁺ and *cydAB*⁺ background. The transformants were grown anaerobically in the presence of arabinose to an OD₆₀₀ of ~0.4, and the β -galactosidase activity was determined (Fig. 3). It was found that while the presence of D1-H2 abolished the activation of $\lambda\Phi$ (*cydA*'-lacZ) and the repression of $\lambda\Phi$ (*lldP*'-lacZ) during anaerobiosis, the presence of D1^{*}-H2^{*} did not affect the expression of either reporter. Also, in agreement with the previous result, expression of either D1^{*}-H2 or D1-H2^{*} reduced the ArcA-P-dependent transcriptional control, although at a considerably lower degree than the wild-type peptide. Thus, a conformational change of the D1-H2 peptide per se does not seem to be a determinant favoring any of the two opposing reactions of phosphorylation and dephosphorylation. However, this does not exclude the possibility that the full-length wild-type ArcB maintains different folds dependent on

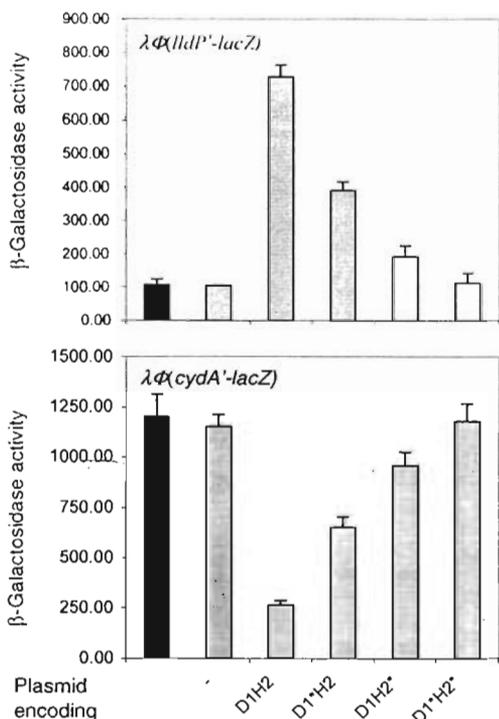


FIG. 3. Expression of D1-H2 abrogates the ArcA-P transcriptional regulation under stimulating conditions. The $\lambda\Phi(IldP'-lacZ)$ and the $\lambda\Phi(cydA'-lacZ)$ reporter strains ECL5002 and ECL5003 were transformed with either the wild-type or mutant D1-H2-expressing plasmid. The $\lambda\Phi(cydA'-lacZ)$ -bearing strains were cultured anaerobically in buffered LB containing 0.1 M MOPS (pH 7.4), 20 mM D-xylose, and 1.3 mM arabinose. For the growth of $\lambda\Phi(IldP'-lacZ)$ -bearing strains, the above medium was supplemented with 20 mM L-lactate. At an OD_{600} of 0.4, the cultures were harvested and the β -galactosidase activity was assayed and expressed in Miller units. The data are the average of four experiments, and the standard deviation values are indicated. Solid bars, untransformed strains; hatched bars, strains transformed with plasmids pBAD30, pMX020 (D1-H2), pMX021 (D1*H2), pMX022 (D1-H2*), or pMX023 (D1*H2*).

the redox state of the cell that could play a decisive role in dictating the direction of the phosphoryl group transfer.

D1-H2 acts directly on ArcA-P. As mentioned earlier, the effect of D1-H2 on reporter expression is most likely the result of ArcA-P dephosphorylation. However, interception of the phosphoryl group transfer from ArcB to ArcA by D1-H2 should cause the same effect. Therefore, we attempted to generate ArcB-independent ArcA-P in vivo and examine whether D1-H2 is able to directly dephosphorylate ArcA-P. In doing this, we took advantage of the facts that in the absence of their cognate kinases many response regulators undergo in vivo autophosphorylation at the expense of acetyl-phosphate (4, 6, 21, 32) and that the intracellular concentration of acetyl-phosphate is an order of magnitude higher in cells grown aerobi-

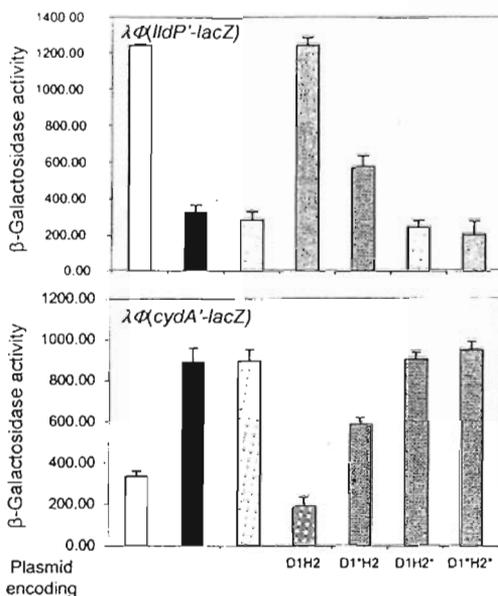


FIG. 4. Expression of D1-H2 annuls the acetyl-phosphate-dependent phosphorylation of ArcA in vivo. The $\lambda\Phi(IldP'-lacZ)$ and the $\lambda\Phi(cydA'-lacZ)$ reporter strains ECL5002 and ECL5003 and their $\Delta arcB$ isogenic strains ECL5012 and ECL5004 transformed with either the wild-type or mutant D1-H2-expressing plasmid were grown aerobically in defined medium [1 mM KH_2PO_4 , 40 mM KCl, 34 mM NaCl, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 1 μ M $FeSO_4$, 0.3 mM $MgSO_4$, 1 μ M $ZnCl_2$, 10 μ M $CaCl_2$, and 0.1 M MOPS, at a final pH of 7.6] supplemented with 20 mM pyruvate and 1.3 mM arabinose. For the growth of $\lambda\Phi(IldP'-lacZ)$ -bearing strains, the above medium was supplemented with 20 mM L-lactate. At an OD_{600} of 0.4, the cultures were harvested and the β -galactosidase activity was assayed. The data are the average of four experiments, and the standard deviation values are indicated. Empty bars, ECL5002 and ECL5003, carrying the wild-type ArcB; solid bars, untransformed ECL5004 ($\Delta arcB$) and ECL5012 ($\Delta arcB$); hatched bars, ECL5004 and ECL5012 transformed with plasmids pBAD30, pMX020 (D1-H2), pMX021 (D1*H2), pMX022 (D1-H2*), or pMX023 (D1*H2*).

cally on pyruvate than on glycerol as the sole carbon and energy source (26). The wild-type strains ECL5002 and ECL5003 and their isogenic $\Delta arcB$ strains ECL5004 and ECL5012, carrying either the $\lambda\Phi(IldP'-lacZ)$ or the $\lambda\Phi(cydA'-lacZ)$ reporters, were grown aerobically in defined medium supplemented with 20 mM pyruvate. At an OD_{600} of ~ 0.4 , the cultures were harvested and the β -galactosidase activity was determined (Fig. 4). It was found that the $\lambda\Phi(cydA'-lacZ)$ expression was 3.5-fold higher and the expression of $\lambda\Phi(IldP'-lacZ)$ was 3-fold lower in the $arcB$ -null background than in the wild-type $arcB^-$ background (Fig. 4). Thus, in the absence of its cognate sensor kinase, ArcA is able to autophosphorylate, most probably at the expense of acetyl phosphate, thus providing the means to examine the direct effect of the wild-type and mutant D1-H2 peptides on the dephosphorylation of ArcA-P. To this end, the $\Delta arcB$ strains ECL5004 and ECL5012

were transformed with plasmids pMX020 to -023, the transformants were grown aerobically in defined medium supplemented with pyruvate and arabinose, and at an OD₆₀₀ of ~0.4 the β-galactosidase activity was determined (Fig. 4). It was found that while the expression of D1-H2 abolished the activation of λPh(*cydA-lacZ*) and the repression of λPh(*ltdP-lacZ*), D1*-H2* did not affect the expression level of either reporter. Furthermore, the expression of D1*-H2 reduced the ArcA-P-dependent transcriptional control, in a similar fashion to that observed in Fig. 1 and 2, suggesting that the effect of D1*-H2 is the result of phosphoryl group transfer from ArcA-P to His⁷¹⁷ of D1*-H2. In contrast, the presence of D1-H2* in this setting failed to affect the expression of either reporter, indicating that D1-H2* interferes with the phosphoryl group transfer from ArcB to ArcA. However, more detailed studies are required to pinpoint the significance of such interference. Nonetheless, from the results presented here it can be concluded that the receiver and phosphotransfer domains of the ArcB sensor kinase are necessary and sufficient for efficient ArcA-P dephosphorylation *in vivo*. This result also has a bearing on the previously proposed hypothesis that the pivotal intermediate acetyl-P, containing carbon, phosphorus, and a high-energy bond, may be involved in maintaining and/or augmenting the basal level of many response regulators in the phosphorylated state (27). Such a hypothesis is attractive in view of the finding that acetyl-P levels in the cell can vary from <0.04 mM to 1.2 mM (26). However, this route of ArcA phosphorylation does not seem to be significant, as it is clear from our results that under physiological conditions the phosphatase activity of ArcB will nullify the acetyl-phosphate-dependent phosphorylation of ArcA.

Concluding remarks. Since the amplitude and duration of an adaptive response depend on the balance between the rates of phosphorylation and dephosphorylation of the response regulator, it will be important to characterize the factors that control the reaction rates in both directions. The FixL/FixJ system for the regulation of nitrogen fixation by *Rhizobium meliloti* provides an interesting illustration. O₂ deprivation stimulates autophosphorylation of the heme-binding sensor kinase but inhibits the FixJ phosphatase activity, thereby promoting the anaerobic expression of nitrogen fixation genes with great effectiveness (22). For His-Asp-His-Asp phosphorylation systems, it would be useful to determine the equilibrium constants of the various partial reactions. This may facilitate the pinpointing of kinetic controls, since they are likely to influence reactions proceeding in the thermodynamically favorable direction. Another goal would be to identify additional physiological factors that may influence the rates of signal transmission and decay.

We thank E.C.C. Lin for advice and B. Michel for critically reading the manuscript.

This work was supported by grant 37342-N from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), by NIH research grant no. R03 TW06003, and by the 21st Century Frontier R&D Program grant from the Korean Ministry of Science and Technology.

REFERENCES

- Barrett, J. F., and J. A. Hoch. 1998. Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1529-1536.
- Benson, D. A., I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, B. A. Rapp, and D. L. Wheeler. 2000. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 28:15-18.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-1474.
- Duilly, F. E., and H. C. Berg. 1993. Change in direction of flagellar rotation in *Escherichia coli* mediated by acetate kinase. *J. Bacteriol.* 175:3236-3239.
- Dung, J. M., J. S. Taylor, D. J. Latour, S. Luchi, and E. C. Lin. 1993. Three overlapping *lcr* genes involved in L-lactate utilization by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175:6671-6678.
- Feng, J., M. R. Atkinson, W. McCleary, J. B. Stock, B. L. Wanner, and A. J. Ninfa. 1992. Role of phosphorylated metabolic intermediates in the regulation of glutamine synthetase synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174:6061-6070.
- Georgellis, D., O. Kwon, and E. C. Lin. 1999. Amplification of signaling activity of the Arc two-component system of *Escherichia coli* by anaerobic metabolites. An *in vitro* study with different protein modules. *J. Biol. Chem.* 274:35950-35954.
- Georgellis, D., O. Kwon, and E. C. Lin. 2001. Quinones as the redox signal for the Arc two-component system of bacteria. *Science* 292:2314-2316.
- Georgellis, D., O. Kwon, P. De Wulf, and E. C. Lin. 1998. Signal decay through a reverse phosphorylation in the Arc two-component signal transduction system. *J. Biol. Chem.* 273:32864-32869.
- 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.* 179:5429-5435.
- Guzman, L.-M., D. Belin, M. J. Carson, and J. Beckwith. 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing arabinose pBAD promoter. *J. Bacteriol.* 177:4121-4130.
- Heidelberg, J. F., J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, L. Umayam, S. R. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. D. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Qin, L. Drngoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. D. Fleischmann, W. C. Niernan, and W. White. 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406:477-483.
- Hoch, J. A. 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:165-170.
- Ishige, K., S. Nagasawa, S. Tokishita, and T. Mizuno. 1994. A novel device of bacterial signal transducers. *EMBO J.* 13:5195-5202.
- Luchi, S., and E. C. Lin. 1988. *dvx*, a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1888-1892.
- Luchi, 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.* 174:3972-3980.
- Luchi, S., Z. Matzuda, T. Fujiwara, and E. C. Lin. 1990. The *arcB* gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the *arc* regulon. *Mol. Microbiol.* 4:715-727.
- 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.* 182:3888-3892.
- Kwon, O., D. Georgellis, and E. C. Lin. 2003. Rotational on-off switching of a hybrid membrane sensor kinase Tar-ArcB in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 278:13192-13195.
- 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.* 182:2960-2966.
- Lee, T. Y., K. Makino, H. Shinagawa, and A. Nakata. 1990. Overproduction of acetate kinase activates the phosphate regulon in the absence of the *phoR* and *phoM* functions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172:2245-2249.
- Lois, A. F., M. Weinstein, G. S. Ditta, and D. R. Helinski. 1993. Autophosphorylation and phosphatase activities of the oxygen-sensing protein FixL of *Rhizobium meliloti* are coordinately regulated by oxygen. *J. Biol. Chem.* 268:4370-4375.
- Lynch, A. S., and E. C. Lin. 1996. Responses to molecular oxygen. p. 1526-1538. *In* F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Malpica, R., B. Franco, C. Rodriguez, and D. Georgellis. 2004. Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:13318-13323.
- Manukhov, I. V., Y. V. Bertsova, D. Y. Trofimov, A. V. Bogachev, and V. P. Skulachev. 2000. Analysis of H10220 protein from *Haemophilus influenzae*, a novel structural and functional analog of ArcB protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry (Moscow)* 65:1321-1326.
- McCleary, W. R., and J. B. Stock. 1994. Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J. Biol. Chem.* 269:31567-31572.

27. McCleary, W. R., J. B. Stock, and A. J. Ninfa. 1993. Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *J. Bacteriol.* 175:2793-2798.
28. Ogino, T., M. Matsubara, N. Kato, Y. Nakamura, and T. Mizuno. 1998. An *Escherichia coli* protein that exhibits phosphohistidine phosphatase activity towards the HPT domain of the ArcB sensor involved in the multistep His-Asp phosphorelay. *Mol. Microbiol.* 27:573-585.
29. Parkinson, J. S., and E. C. Kofoid. 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* 26:71-112.
30. Rodriguez, 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.* 186:2085-2090.
31. Taylor, B. L., and I. B. Zhulin. 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:479-506.
32. Wanner, B. L., and M. R. Wilmes-Riesenberg. 1992. Involvement of phosphotransacetylase, acetate kinase, and acetyl phosphate synthesis in the control of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174:2134-2139.