



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE REGULACIÓN  
DE LA ACTIVIDAD CINASA DE ArcB**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**DOCTOR EN CIENCIAS**  
**PRESENTA**  
**ROXANA E. MALPICA CALDERÓN**

**DIRECTOR DE TESIS**  
**DR. DIMITRIS GEORGELLIS**

**MÉXICO, D.F.**

**OCTUBRE DEL 2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 226 Norte del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Dimitris Georgellis y la asesoría de la Dra. Laura Camarena y del Dr. Georges Dreyfus. Durante la realización del mismo, Roxana E. Malpica Calderón fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y recibió una beca complementaria de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.**

**La presente investigación contó con el apoyo económico de: CONACyT (proyectos 37342 N y 47799); PAPIIT (proyectos IN-218902, IN221106 e IX233404); y “National Institute of Health Research”(proyecto R03 TW06003).**

## **DEDICATORIAS**

**A Victor**

**A mis padres, Alfonso y Martha**

**A mis hermanos Berenice, Verónica y Angel**

**A mis chiquitos, Karen y Angel**

**Con profundo amor**

**A Araceli, Eloisa, Tatiana, Cecilia, Claudia Rodríguez Rangel, Lucy, Lety, Lulú, Natalia, Carlos de la Rosa, Miguel Ayala, Carlos Hdez. C., Claudia Romero, Israel, Karina Ramos, Claudia Rodríguez A.**

**Por su invaluable amistad**

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Dimitris Georgellis, por su tiempo, paciencia e invaluable y total apoyo brindado en mi formación profesional. Por su disposición y calidad humana. Por todas sus trascendentales enseñanzas.

A los Dres. Georges Dreyfus Cortes y Laura Camarena Mejía, miembros del comité tutorial; por su asesoría, aportaciones, valiosos comentarios y sugerencias que permitieron mejorar el contenido y la redacción de esta tesis.

A los Dres. Ma. Del Carmen Gómez Eichelman, Gloria Soberón Chávez, Jose Luis Puente García, Elda Guadalupe Espín Ocampo; miembros del jurado del examen de grado. Por su disposición en la revisión de esta tesis y por su valiosa crítica constructiva al presente trabajo.

A Bernardo Franco por su colaboración en la generación de las secuencias *arcB* mutantes en Cys-180 y Cys-241.

Al Dr. Diego González Halphen, por su apoyo.

A Claudia Rodríguez Rangel por su incondicional disposición técnica y humana

A Cecilia Ishida, Tatiana Olivares y Claudia Rodríguez R. por su tiempo dedicado a la lectura de esta tesis y por sus importantes sugerencias hechas al mismo.

A todos los que son o fueron miembros del laboratorio 226 Nte: Pedro, Claudita, Carlos, Gaby, Luis, Bernardo, Ricardo, Vero, Claudia R., Fabi, Anita; Yael, Aurora, por todos los momentos compartidos, por su apoyo y compañía.

## INDICE

	<b>Pag</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	2
<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
Sistemas de transducción de señales de dos componentes.....	5
Elementos de un SDC.....	6
El sistema de transducción de señales de dos componentes Arc.....	6
Elementos del SDC Arc.....	8
Transmisión y decaimiento de la señal en Arc.....	10
El control global mediado por el SDC Arc.....	12
Señalización por quinonas.....	13
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>OBJETIVOS</b> .....	14
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
Construcción de plásmidos y cepas.....	15
Mutación de los residuos Cys-180 y/o Cys-241 en la secuencia de <i>arcB</i> .....	15
Construcción de cepas de <i>E. coli</i> portadoras de los alelos <i>arcB</i> mutantes en Cys-180 y/o Cys-241.....	16
Purificación de los péptidos ArcB.....	17
Ensayos de fosforilación.....	17
Marcaje de ArcB con Metoxi-Polietilen Glicol Maleimida.....	17
Modificación de ArcB con 7-Cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.....	18
Estado Redox de ArcB <i>in vivo</i> . ....	18
Ensayo de la actividad de $\beta$ -galactosidasa.....	19
<b>RESULTADOS</b>	
Efecto de la oxido-reducción en la actividad cinasa de Arc.....	20
Efecto de la alquilación de los tioles de ArcB en la inhibición de su actividad cinasa.....	22
Participación de Cys-180 y Cys-241 en la actividad cinasa de ArcB.....	23

Oxidación dependiente de Q0 de Cys-180 y Cys-241 en ArcB .....	26
Identificación del producto de oxidación de Cys-180 y Cys-241.....	27
Formación de enlaces disulfuro en ArcB durante aerobiosis.....	28
<b>DISCUSIÓN</b> .....	30
<b>CONCLUSIONES</b> .....	35
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	35
<b>REFERENCIAS</b> .....	37
<b>ANEXO</b>	42

## RESUMEN

El sistema de transducción de dos componentes Arc de *Escherichia coli* modula el metabolismo de energía y otras funciones importantes, a nivel transcripcional, de acuerdo a la condición redox de crecimiento. Este sistema consta de ArcB como cinasa sensora y de ArcA como regulador de respuesta. En condiciones reductoras, ArcB experimenta autofosforilación dependiente de ATP y cataliza la fosforilación de ArcA mediante un fosforelevo His-292→Asp-576→His-717→Asp-54. ArcA fosforilada (ArcA-P) reprime la transcripción de numerosos operones involucrados en la respiración aerobia y activa un pequeño número de operones implicados en la fermentación. En condiciones oxidantes, la ubiquinona actúa como señal directa que inhibe la autofosforilación de ArcB, quien entonces cataliza la desfosforilación de ArcA-P a través del fosforelevo reverso Asp-54→His-717→Asp-576. Aunque ha sido identificada la señal detectada por ArcB y se tiene un amplio conocimiento sobre los pasos de la transmisión y decaimiento de la señal, los mecanismos de detección y modo de acción de la señal aún no se conocen. Por lo tanto los objetivos de este proyecto fueron localizar la porción de ArcB que participa en la regulación de la actividad cinasa de ArcB y definir el modo de acción de la señal. A través del análisis del efecto de agentes oxidantes como cloramina T y de agentes reductores como el ditiotreitól sobre la fosforilación *in vitro* de ArcB, del estudio de la respuesta *in vitro* e *in vivo* de las mutantes ArcB<sup>C180A</sup>, ArcB<sup>C241A</sup> y ArcB<sup>C180A,C241A</sup> a quinona-0, de la determinación del estado de oxidación de Cys-180 y Cys-241 en presencia de quinona-0, de la identificación de enlaces disulfuro como productos de oxidación, y de la observación de la dimerización de ArcB en aerobiosis, demostramos que el mecanismo molecular de inhibición de la actividad cinasa de ArcB involucra la oxidación de los residuos Cys-180 y Cys-241 en el “linker” de ArcB, lo cual conduce a la dimerización de ArcB por la formación de enlaces disulfuro intermoleculares, reacción en la cual las quinonas actúan como el agente oxidante específico.



## **ABSTRACT**

The Arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli* modulates, at the transcriptional level, the energy metabolism and other important functions according to the redox condition of growth. This system consists of the sensor kinase ArcB and the response regulator ArcA. Under reducing conditions of growth, ArcB undergoes ATP dependent autophosphorylation and catalyzes the phosphorylation of ArcA through a His-292→Asp-576→His-717→Asp-54 phosphorelay. Phosphorylated ArcA (ArcA-P) represses the transcription of several operons involved in aerobic respiration and activates the expression of few operons implicated in fermentation. Under oxidizing conditions, ArcB dephosphorylates ArcA-P through a reverse phosphorelay Asp-54→His-717→Asp-576.

The quinone electron carriers, which are predominantly oxidized under aerobic conditions of growth, act as the direct signal that inhibits the kinase activity of ArcB.

Here, we explore the molecular mechanism by which the oxidized forms of the quinone electron carriers inhibit the kinase activity of ArcB during aerobic growth. In this work we show that the molecular mechanism of inhibition of the kinase activity of ArcB involves the quinone-dependent oxidation of Cys-180 and Cys-241 residues in the linker region of ArcB that leads to ArcB dimerization through intermolecular disulfide bonds. Thus, thiol oxidation and reduction in the cytosolic portion of ArcB provides a pivotal link in the Arc signal transduction pathway that connects the redox state of the quinone pool to the transcriptional apparatus.

## INTRODUCCIÓN

### **Sistemas de transducción de señales de dos componentes.**

Los organismos poseen diversas estrategias de señalización para reconocer y responder a cambios en las condiciones ambientales. La fosforilación y desfosforilación de proteínas es un mecanismo clave en la transducción intracelular de señales tanto en células procarióticas como eucarióticas. En procariontes este proceso es catalizado principalmente por cinasas de histidinas que por su rol en la detección de señales son denominadas también cinasas sensoras. Un sistema de dos componentes (SDC), refiere a la transducción de señales mediada por dos proteínas: una cinasa sensora y un regulador de respuesta. A través de los SDC las bacterias responden eficazmente a un amplio espectro de señales de su ambiente, ya que les permiten generar respuestas adaptativas adecuadas a los estímulos de su entorno.

Si bien los SDC fueron descritos primero en bacterias, actualmente se sabe que se encuentran en los tres dominios de vida: bacteria, arquea y eucaria (Hoch, 2000; Stock et al., 2000). La distribución de los SDC en eucaria es limitada, sólo se han encontrado en algunas especies de hongos como *Saccharomyces cerevisiae* y *Neurospora crassa* (Alex et al., 1996; Ota and Varshavsky, 1993), en algunas plantas como *Arabidopsis thaliana* (Chang et al., 1993) y en el protozoo *Dictyostelium discoideum* (Schuster et al., 1996; Wang et al., 1996).

Los SDC bacterianos son muy diversos y ampliamente distribuidos; regulan una gran cantidad de procesos como la quimiotaxis y la adquisición de nutrientes (nitrógeno, fósforo, carbono), el metabolismo de energía (procesos de generación y utilización de energía), la adaptación a variables físicas y químicas del ambiente (pH, osmolaridad, calidad de luz), comunicación celular, interacciones simbióticas (fijación de nitrógeno) y patogénicas (transferencia de plásmidos, producción y secreción de toxinas, factores de adherencia), división celular y patrones de desarrollo complejo (esporulación, desarrollo de cuerpos fructíferos), entre otros (Barrett and Hoch, 1998; Hoch, 2000; Hoch and Silhavy, 1995; Parkinson, 1995; Parkinson and Kofoid, 1992; Stock et al., 2000; Yuk et al., 1996).

### **Elementos de un SDC**

La cinasa sensora y su correspondiente regulador de respuesta contienen dominios transmisores y receptores, respectivamente. Un dominio transmisor se caracteriza por poseer un núcleo de cinasa con un residuo de histidina altamente conservado, mientras que un dominio receptor es un dominio regulador con un residuo de aspartato constante. Una cinasa sensora prototipo es una proteína transmembranal que contiene en su extremo amino un dominio periplásmico de aproximadamente 150 residuos de aminoácidos (que puede funcionar como sitio de recepción de la señal), seguido de un dominio transmisor citoplásmico en su extremo carboxilo. Esta proteína se ancla a la membrana mediante los segmentos transmembranales, que a su vez delimitan al dominio periplásmico. Por su parte, un regulador de respuesta es una proteína citoplásmica que en su extremo amino tiene un dominio receptor y en su extremo carboxilo un dominio de respuesta.

Se considera que la detección de la señal por la cinasa sensora induce cambios conformacionales en la proteína que permiten la autofosforilación dependiente de ATP en el residuo de histidina del dominio transmisor. La cinasa sensora fosforilada transfiere su grupo fosforilo al residuo de aspartato del dominio receptor del regulador de respuesta que fosforilado funciona, generalmente, como regulador transcripcional. Cuando la señal decae, el sistema se inactiva por la desfosforilación de la cinasa sensora y del regulador de respuesta. El decaimiento de la señal ocurre ya sea por la liberación hidrolítica espontánea de  $P_i$  del regulador de respuesta fosforilado, o por un proceso catalizado que involucra ya sea a la cinasa sensora específica del SDC en cuestión, o a otra proteína.

Existen SDC más elaborados que el modelo descrito. Por ejemplo, la transmisión de la señal puede requerir cinasas sensoras multipartitas o híbridas que contienen tanto al dominio transmisor y al receptor, o a varias proteínas que participen en las reacciones de fosforelevo (Parkinson, 1995; Parkinson and Kofoid, 1992).

### **El sistema de transducción de señales de dos componentes Arc**

El SDC Arc (control anóxico redox) (Fig. 1) es un elemento crucial en la compleja red reguladora de la transcripción en *Escherichia coli* que desempeña un papel clave en la regulación del metabolismo de energía y de otras funciones importantes, de acuerdo a la condición redox de crecimiento.

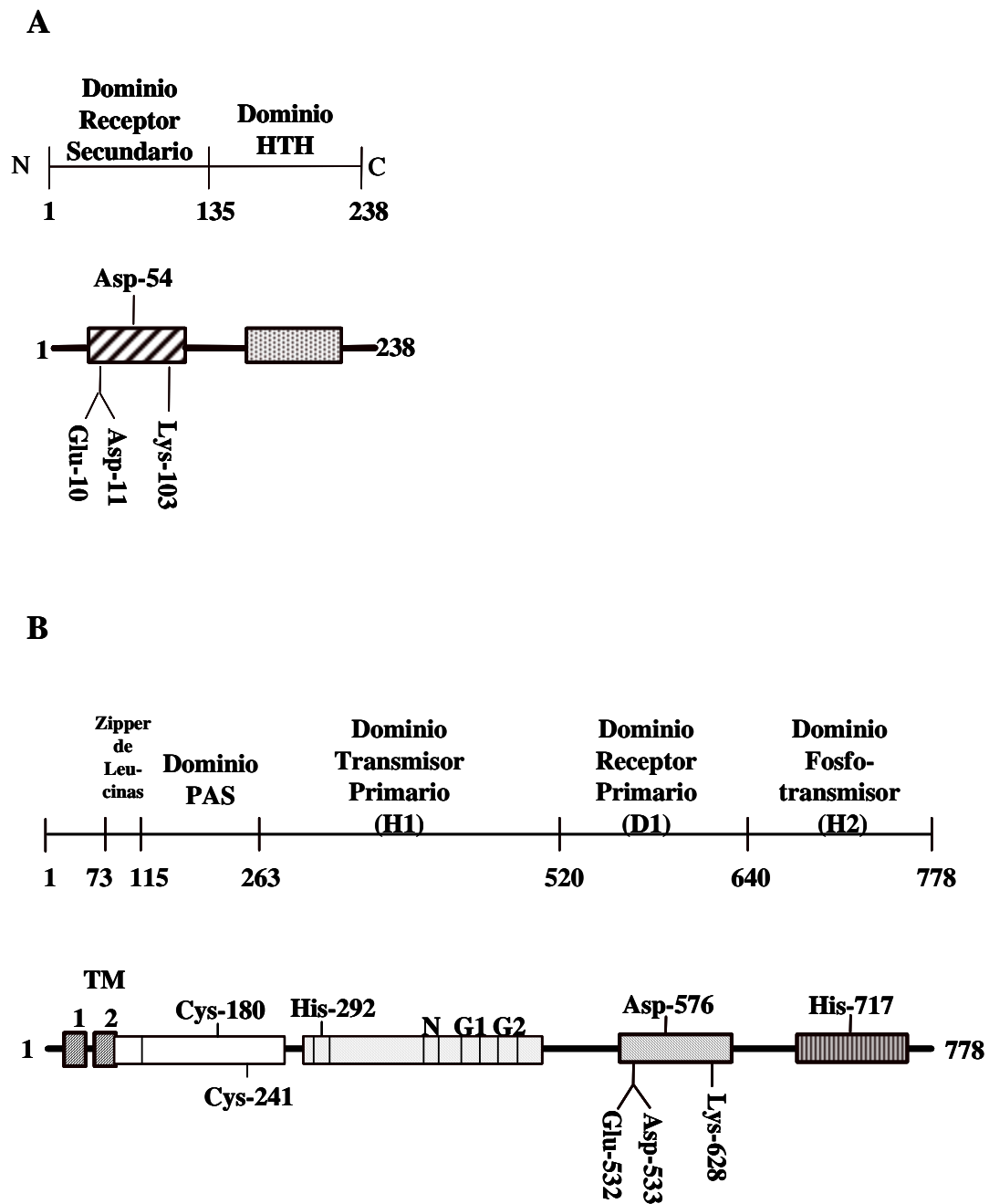


Fig 1. Estructura de los elementos del SDC Arc. (A) El regulador de respuesta ArcA. (B) La cinasa sensora ArcB.

Este sistema es activo en microaerobiosis y anaerobiosis. Es importante mencionar que en condiciones anaeróbicas, el SDC Arc controla el metabolismo de energía junto con el regulador transcripcional FNR y los SDC NarX/L y NarQ/P. FNR detecta la presencia de O<sub>2</sub> mediante su “cluster” [4Fe-4S]; en aerobiosis el O<sub>2</sub> oxida a [4Fe-4S] lo que resulta en la inactivación de FNR, mientras que en anaerobiosis el cluster [4Fe-4S] intacto favorece la dimerización de FNR, que entonces funciona como regulador transcripcional. FNR regula la expresión de genes que codifican para componentes de ramas alternas de la cadena de transporte de electrones, además de reprimir la expresión de genes con función aeróbica (Lambden and Guest, 1976; Unden and Trageser, 1991). Los SDC NarX/L (Stewart et al., 1989) y NarQ/P (Rabin et al., 1992) regulan la utilización del nitrato, que es el aceptor de electrones preferido durante anaerobiosis .

### **Elementos del SDC Arc**

Los elementos de este sistema fueron descritos por primera vez a finales de la década de 1980 por Iuchi y Lin, quienes considerando que la regulación de la síntesis de enzimas del metabolismo aerobio en *E. coli* debería ser a nivel transcripcional, realizaron un “tamizaje” genético de mutantes que expresaran a un nivel significativo operones con función aeróbica en condiciones de crecimiento anaeróbicas. Construyeron un merodiploide que contenía tanto al gen *sdh*, que codifica para la succinato deshidrogenasa, como al operon fusión  $\Phi(sdh-lacZ)$  en una cepa  $\Delta lac$ . Esta cepa fue crecida anaeróbicamente en un medio de MacConkey-lactosa-agar; después de varios días aparecieron mutantes que mostraban altos niveles de actividad de  $\beta$ -galactosidasa y succinato deshidrogenasa durante anaerobiosis. De esta forma identificaron a los genes *arcA*, localizado en el minuto 0 (Iuchi and Lin, 1988) y *arcB* en el minuto 69.5 (Iuchi et al., 1989a). Dado que mutaciones en cualquiera de estos dos genes conducían a niveles altos de actividad de enzimas aeróbicas durante anaerobiosis, designaron el acrónimo arc (aerobic respiration control) para nombrar a estos genes.

El gen *arcA* había sido previamente secuenciado como el gen *dye* ya que las mutaciones nulas tienen un fenotipo de crecimiento sensible a colorantes redox como azul de toluidina y azul de metileno (Drury and Buxton, 1985).

En el sistema Arc, ArcB es la cinasa sensora y ArcA el regulador de respuesta. ArcA es una proteína citoplásmica de 238 aminoácidos con la estructura típica de un regulador de respuesta (Fig. 1A). ArcA contiene un dominio receptor con el residuo conservado Asp-54 en su extremo amino y un dominio hélice-vuelta-hélice (para la unión a DNA) en su extremo carboxilo. Por su parte ArcB, proteína transmembranal de 778 aminoácidos, es una cinasa sensora muy peculiar (Fig 1B); es una proteína sensora atípica porque su región periplásmica, flanqueada por dos dominios transmembranales, es muy corta (16 residuos de aminoácidos) y no funciona como el dominio receptor de la señal (Kwon et al., 2000b). Asimismo, en comparación con la mayoría de las cinasas sensoras procarióticas que contienen sólo un dominio catalítico, ArcB es una cinasa híbrida con tres dominios catalíticos: un dominio transmisor (H1) amino-terminal con un residuo conservado His-292, un dominio receptor central (D1) con un residuo conservado Asp-576 y un dominio de fosfotransferencia (H2) carboxilo-terminal con un residuo conservado His-717 (Fig 1B) (Ishige et al., 1994; Iuchi et al., 1990). Cabe resaltar que la región “linker” de la proteína (región que conecta al dominio transmembranal con los dominios catalíticos) contiene dos elementos cuya relevancia fisiológica en ArcB está en estudio: un posible “zipper” de leucinas y un dominio PAS.

Un “zipper” de leucinas consiste en una hélice compuesta por residuos hidrofóbicos en una cara de la hélice y por residuos hidrofílicos en la otra cara, que característicamente posee cuatro residuos de leucina repetidos cada séptima posición ( $LX_6LX_6LX_6LX_6$ ). Son motivos involucrados en la formación de homo y heterodímeros a través de la interacción de las hélices de dos monómeros. Se han encontrado principalmente en proteínas reguladoras de unión a DNA, aunque también existen en proteínas membranales que no se unen a DNA (Abel and Maniatis, 1989; Buckland and Wild, 1989; Lau et al., 1997; Yaku and Mizuno, 1997). En el caso de ArcB, se han encontrado residuos conservados de leucina en posición 73, 80, 87 y 94 (Georgellis et al., 1998).

PAS es el acrónimo formado con los nombres de las proteínas en las que inicialmente se identificó este motivo: PER (“period clock protein” de *Drosophila*), ARNT (“aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator” de vertebrados) y SIM (“Single-minded protein” de *Drosophila*). En procariontes, varias de las proteínas que contienen motivos

PAS son cinasas sensoras, que sensan O<sub>2</sub>, potencial redox y luz (Taylor and Zhulin, 1999; Zhulin et al., 1997).

Mediante análisis de alineamiento (BLAST) se han identificado varios homólogos de ArcB en diferentes especies de bacterias como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Vibrio fischeri*, *Yersinia pestis*, *Erwinia carotovora* y *Haemophilus influenzae* (Manukhov et al., 2000). Es importante destacar que el homólogo de ArcB en *H. influenzae*, el único de los secuenciados que no posee el dominio PAS, puede complementar a mutantes en *arcB* de *E. coli* (Georgellis et al., 2001b).

### **Transmisión y decaimiento de la señal en Arc.**

En condiciones reductoras, ArcB es una cinasa activa que se autofosforila, a expensas de ATP, en el residuo conservado His-292. Posteriormente el grupo fosforilo es transferido sucesivamente al Asp-576 conservado, a la His-717 conservada y, finalmente, a ArcA en un fosforelevo His-292→Asp-576→His-717→Asp-54 (Georgellis et al., 1997; Kwon et al., 2000a). ArcA fosforilado (ArcA-P) funciona como un regulador transcripcional que reprime la transcripción de numerosos operones involucrados en la respiración aerobia y activa un pequeño número de operones implicados en la fermentación (Brondsted and Atlung, 1994; Iuchi and Lin, 1988; Lynch and Lin, 1996).

En condiciones oxidantes, ArcB es una cinasa inactiva que funciona como fosfatasa específica de ArcA-P al catalizar la transferencia reversa del grupo fosforilo de Asp-54 a His-717 y después a Asp-576, donde se libera el P<sub>i</sub> (Georgellis et al., 1998; Peña-Sandoval et al., 2005). Resulta interesante que varios productos de fermentación, como D-lactato y acetato, parecen amplificar la autofosforilación neta del dominio H1 de ArcB (Georgellis et al., 1999; Iuchi, 1993; Rodriguez et al., 2004), pero no tienen efecto en la desfosforilación de ArcA-P (Georgellis et al., 1998). Esta vía de señalización se representa en la Fig. 2.

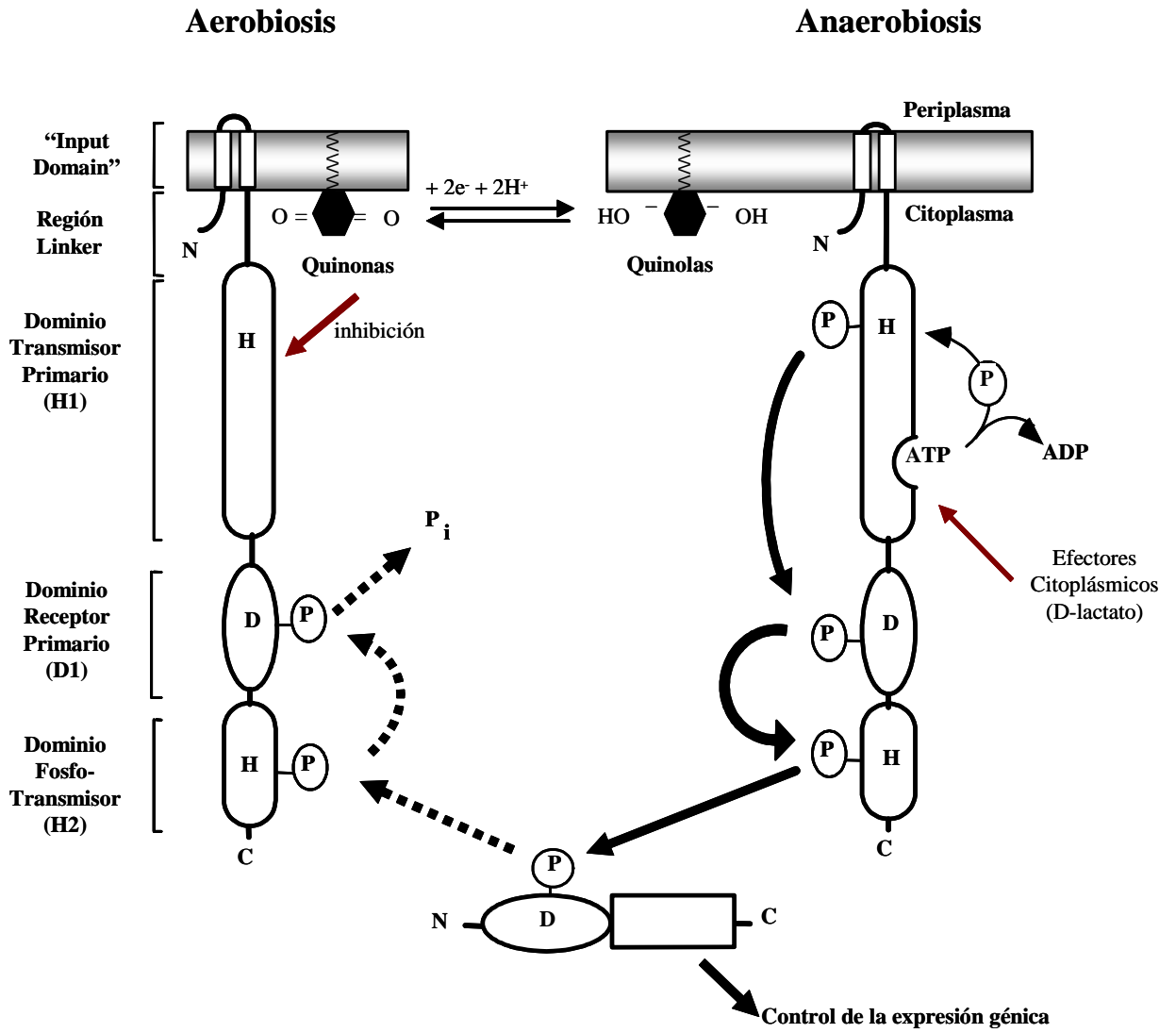


Fig 2. Patrón de transducción y decaimiento de la señal por el SDC Arc.



## El control global mediado por el SDC Arc

A través del análisis de fenotipos de mutantes en *arcA* o *arcB* y otros estudios genéticos (Iuchi and Lin, 1988; Lynch and Lin, 1996; Lynch, 1996), se ha encontrado que el sistema Arc controla cerca de 30 operones involucrados en el metabolismo redox. Éste SDC reprime la expresión de varios genes y operones cuyos productos tienen función aeróbica, tales como algunas enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, enzimas para degradación de ácidos grasos, deshidrogenasas como L-lactato deshidrogenasa y oxidasas de ubiquinonas, como la citocromo oxidasa bo (principal oxidasa terminal aeróbica que muestra baja afinidad al oxígeno) (Iuchi and Lin, 1988). El operón *cydAB*, que codifica para la citocromo oxidasa bd (oxidasa terminal de alta afinidad al oxígeno, que predomina en microaerobiosis) y el gen *pfl*, que codifica para la piruvato formato liasa, son ejemplos de genes cuya expresión es regulada positivamente por Arc (Cotter et al., 1990; Sawers and Suppmann, 1992).

Varios estudios indican que Arc es un sistema de regulación global importante que además de regular el metabolismo redox, controla otros procesos como la transferencia del plásmido F (Iuchi et al., 1989b; Silverman et al., 1991), la recombinación específica del sitio psi (Colloms et al., 1998) y la inhibición de la replicación cromosomal (Lee et al., 2001). Estudios bioquímicos y bioinformáticos han demostrado la existencia de una región consenso de unión de ArcA-P al DNA (Lynch and Lin, 1996; McGuire et al., 1999). Recientes estudios bioinformáticos y basados en microarreglos (Liu and De Wulf, 2004; Salmon et al., 2005) han utilizado esta secuencia consenso y predicen que el modulón Arc controla la transcripción de cerca de 300 operones que están asociados a funciones tan diversas como la síntesis y el control de la rotación del flagelo (*fliMN* y *fliE*), la división celular (*ftsZ*), la sobrevivencia inducida por estrés (*surA*) y el transporte de níquel (*nikABCDE*).

Además, en algunos patógenos importantes de humanos, Arc está implicado en la regulación directa o indirecta de la virulencia. Por ejemplo, en *S. enterica* serovar Enteritidis, se conoce que Arc controla la resistencia a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Lu et al., 2002); en *H. influenzae*, modula la expresión de proteínas membranales involucradas en la resistencia al suero (De Souza-Hart et al., 2003); y en *Vibrio cholerae*, regula la expresión de factores de virulencia (Sengupta et al., 2003).

### **Señalización por quinonas**

El paradigma de los SDC contempla que la detección de la señal ambiental activa los eventos de fosforilación entre la cinasa sensora y el regulador de respuesta y que en ausencia de la señal cesa la actividad “fosforilante” del sistema. En contraste a este modelo, la detección de la señal por ArcB conduce a la inactivación del SDC Arc.

Las quinonas son acarreadores de electrones en la cadena respiratoria que se encuentran en la membrana y cuyo estado redox oscila entre reducido en condiciones anaerobias y oxidado en condiciones aerobias. Las ubiquinonas son las quinonas más abundantes en aerobiosis (Unden and Bongaerts, 1997). En condiciones aerobias de crecimiento, la forma oxidada de las ubiquinonas actúa como la señal específica que inhibe la actividad cinasa de ArcB. Lo anterior fue demostrado *in vitro*, por la inhibición de la autofosforilación del péptido ArcB<sup>78-778</sup> (ArcB sin la región transmembranal) por las formas oxidadas de ubiquinona-0 (análogo soluble de la ubiquinona-8) y de menadiona (análogo soluble de la menaquinona-8). Además, mutantes *ubi* con bloqueo en la biosíntesis de ubiquinona-8, muestran alta expresión de un gen reportero activado por ArcA-P en condiciones aeróbicas de crecimiento (Georgellis et al., 2001a).

## **JUSTIFICACIÓN**

Se sabe que el dominio periplásmico de ArcB no participa en la recepción de la señal y que la supresión de su región transmembranal no interfiere en la inhibición de ArcB por las quinonas (Georgellis et al., 2001a; Kwon et al., 2000b). Lo anterior sugiere que la región transmembranal de ArcB funciona principalmente como punto de anclaje de esta cinasa sensora a la membrana, lo que le permite estar cerca de la fuente de la señal. Dado que ninguna de estas dos estructuras participan en la recepción de las quinonas oxidadas, buscamos conocer que parte de ArcB se involucra en la recepción de la señal y por lo tanto en la regulación de la actividad cinasa de ArcB.

El conocimiento del sitio en el que las quinonas oxidadas ejercen su efecto inhibitorio en ArcB, permitirá entender la forma en que las quinonas inhiben la actividad cinasa de ArcB. Esto es, podríamos determinar el tipo de interacción o comunicación que la señal tiene con esta cinasa sensora. Existe la posibilidad de que la interacción ocurra a través de la unión alostérica de las quinonas en un sitio específico en ArcB, o puede ser que las quinonas funcionen como un agente oxidante específico de cierto(s) residuo(s) de aminoácidos en ArcB (Datos no publicados del laboratorio sugieren que el  $E^{\circ}$  de las ubiquinonas es mayor que el de ArcB). Cada evento podría conducir a cambios conformacionales que evitarían la autofosforilación de ArcB. Incluso puede ser que se requieran ambas opciones, es decir, que las quinonas se unan de alguna manera específica a ArcB para poder actuar como agentes oxidantes.

## **OBJETIVOS**

Los propósitos de este trabajo son:

1. Identificar la porción de ArcB que participa en la regulación de la actividad cinasa de esta proteína.
2. Definir el mecanismo molecular de inhibición de ArcB por quinonas oxidadas

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Construcción de plásmidos y cepas

Los plásmidos y cepas utilizados en este trabajo se indican en la Tabla I.

**Tabla 1. Plásmidos y cepas utilizados en este trabajo**

Plásmidos	Características	Referencia
pQE30 ArcB <sup>1-778</sup>	His <sub>6</sub> -ArcB <sup>1-778</sup>	Cepario del laboratorio
pQE30 ArcB <sup>78-778</sup>	His <sub>6</sub> -ArcB <sup>78-778</sup>	Georgellis et al., 1997
pBOKO	<i>arcB</i> <sup>r</sup> ::Kan <sup>r</sup> en pIB3	Kwon et al., 2000
pKO3	Fragmento <i>Ecl</i> 136II- <i>EcoRV</i> de pMAK705som (Ori M13, polilinker de pBluescript II SK-, <i>sacB</i> <sup>+</sup> ) en pKO1 (Ori pSC101 <i>cat</i> <sup>+</sup> ) Cm <sup>r</sup>	Link et al., 1997
pMX403	pQE30ArcB <sup>78-778, C180A</sup> Amp <sup>r</sup>	Este trabajo
pMX415	pQE30ArcB <sup>78-778, C180A</sup> Amp <sup>r</sup>	Este trabajo
pMX405	pQE30ArcB <sup>78-778, C180A, C241A</sup> Amp <sup>r</sup>	Este trabajo
pMX431	pQE30ArcB <sup>1-778, C180A</sup> Amp <sup>r</sup>	Este trabajo
pMX432	pQE30ArcB <sup>1-778, C241A</sup> Amp <sup>r</sup>	Este trabajo
pMX433	pQE30ArcB <sup>1-778, C180A, C241A</sup> Amp <sup>r</sup>	Este trabajo
pMX434	Derivado de pKO3 (sitio <i>NdeI</i> inactivo), <i>arcB</i> <sup>1-778</sup> ::Kan <sup>r</sup>	Este trabajo
pMX435	pMX434, <i>arcB</i> <sup>1-778, C180A</sup> ::Kan <sup>r</sup>	Este trabajo
pMX436	pMX434, <i>arcB</i> <sup>1-778, C241A</sup> ::Kan <sup>r</sup>	Este trabajo
pMX437	pMX434, <i>arcB</i> <sup>1-778, C180A, C241A</sup> ::Kan <sup>r</sup>	Este trabajo
<b>Cepas</b>		
ECL5002	MC4100, Φ ( <i>lldP</i> <sup>-</sup> - <i>lacZ</i> )	Kwon et al., 2000
ECL5003	MC4100, Δ <i>fnr</i> ::Tn9(Cm <sup>r</sup> ) Φ( <i>cydA</i> <sup>-</sup> - <i>lacZ</i> )	Kwon et al., 2000
ECL5012	Δ <i>arcB</i> ::Tet <sup>r</sup> Φ ( <i>lldP</i> <sup>-</sup> - <i>lacZ</i> )	Kwon et al., 2000
IFC1001	<i>arcB</i> <sup>1-778, C180A</sup> ::Kan <sup>r</sup> Φ( <i>lldP</i> <sup>-</sup> - <i>lacZ</i> )	Este trabajo
IFC1002	<i>arcB</i> <sup>1-778, C241A</sup> ::Kan <sup>r</sup> Φ( <i>lldP</i> <sup>-</sup> - <i>lacZ</i> )	Este trabajo
IFC1003	<i>arcB</i> <sup>1-778, C180A, C241A</sup> ::Kan <sup>r</sup> Φ( <i>lldP</i> <sup>-</sup> - <i>lacZ</i> )	Este trabajo

### Mutación de los residuos Cys-180 y/o Cys-241 en la secuencia de *arcB*

La generación de las secuencias *arcB* mutantes C180A y/o C241A se realizó mediante mutagénesis por PCR. En la mayoría de las reacciones de PCR, el plásmido pQE30ArcB<sup>78-778</sup> (Georgellis et al., 1997) fue utilizado como DNA molde; en los casos donde no fue así, se especifica el origen del DNA empleado.

En la mutación del residuo Cys-180 primero se obtuvo por PCR el “megaprimer” mutagénico C180A. Para este fin, se usaron el oligonucleótido mutagénico C180A (5'-CCATCGCGCGGTTAGCGCCGGAAACTC-3') y el oligonucleótido 5'-AATATCGAGCAATGCTTCTG-3. El “megaprimer” C180A, purificado de la mezcla de la primera reacción de PCR, se ocupó junto con el oligonucleótido 5'-CCCGGATCCCATATGGAGCAACTGGAGGAGTCACGAC-3' en una segunda reacción de PCR. El producto de esta reacción se digirió con las enzimas *PstI* y *MluI* y el fragmento

purificado se empleó para sustituir el fragmento nativo *PstI-MluI* de pQE30ArcB<sup>78-778</sup>. El plásmido creado se denominó pMX403 (pQE30ArcB<sup>78-778, C180A</sup>).

Esta estrategia de mutación y clonación se siguió tanto en la sustitución individual de Cys-241, como en la sustitución doble de Cys-180 y Cys-241. En ambos casos se usó el oligonucleótido mutagénico C241A, pero el segundo caso requirió de pMX403 como DNA molde. De esta manera se generaron los plásmidos pMX415 (pQE30ArcB<sup>78-778, C241A</sup>) y pMX405 (pQE30ArcB<sup>78-778, C180A, C241A</sup>), respectivamente.

La verificación de las mutaciones introducidas en *arcB* se efectuó, mediante secuenciación, por la Unidad de Biología Molecular de este instituto.

### **Construcción de cepas de *E. coli* portadoras de los alelos *arcB* mutantes en Cys-180 y/o Cys-241**

Para determinar el efecto fisiológico de la o las mutaciones en Cys-180 y/o Cys-241 en la actividad cinasa de ArcB, los fragmentos mutantes *PstI-MluI* de pMX403 (ArcB<sup>78-778, C180A</sup>), pMX415 (ArcB<sup>78-778, C241A</sup>) y pMX405 (ArcB<sup>78-778, C180A, C241A</sup>) se usaron para reemplazar el fragmento nativo *PstI-MluI* de pQE30ArcB<sup>1-778</sup>. Así se crearon los plásmidos pMX431 (ArcB<sup>1-778, C180A</sup>), pMX432 (ArcB<sup>1-778, C241A</sup>) y pMX433 (ArcB<sup>1-778, C180A, C241A</sup>), respectivamente. El vector pKO3 se empleó en el reemplazo cromosomal de alelos. Para este fin, se inactivó su sitio *NdeI* mediante digestión y complementación de la secuencia con polimerasa T4. Posteriormente, el fragmento *BamHI* del plásmido pBOKO que contiene a *arcB* silvestre flanqueado por las regiones cromosomales 5' y 3' adyacentes a este gen, se insertó en pKO3 (con sitio *NdeI* inactivo). El vector resultante fue pMX434. Los fragmentos *NdeI-NruI* de los plásmidos pMX431, pMX432 y pMX433 se ocuparon para reemplazar el fragmento *NdeI-NruI* de pMX434. De esta forma se obtuvieron los plásmidos pMX435 (pMX434 ArcB<sup>1-778, C180A</sup>), pMX436 (pMX434 ArcB<sup>1-778, C241A</sup>) y pMX437 (pMX434 ArcB<sup>1-778, C180A, C241A</sup>).

Estos tres últimos plásmidos se transformaron en la cepa ECL5012 para integrar los alelos mutantes *arcB* en el cromosoma por recombinación homóloga (Link et al., 1997). Las cepas resultantes fueron IFC1001 (ECL5012 ArcB<sup>1-778, C180A</sup>), IFC1002 (ECL5012 ArcB<sup>1-778, C41A</sup>) y IFC1003 (ECL5012 ArcB<sup>1-778, C180A, C241A</sup>).

### **Purificación de los péptidos ArcB**

Los genes clonados en pQE30 (QIAGEN) son expresados como proteínas con una marca de His<sub>6</sub> en su extremo amino. La etiqueta His<sub>6</sub> permite la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad en una columna de Ni-NTA (QIAGEN).

Para la sobreexpresión de los péptidos ArcB<sup>78-778</sup> silvestre y mutantes, cepas MC4100 cotransformadas con pREP4 y con cada uno de los plásmidos que contienen las secuencias de *arcB* (pQE30ArcB<sup>78-778</sup>, pMX401, pMX415, pMX405) se cultivaron en medio de cultivo Luria-Bertani (LB) adicionado con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml). La sobreexpresión de las proteínas con la etiqueta His<sub>6</sub> se indujo con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 2 mM, añadido en la fase exponencial media de crecimiento (OD<sub>600</sub> ≈ 0.7). Después de 4 horas de inducción, los cultivos fueron centrifugados y las proteínas etiquetadas con His<sub>6</sub> fueron purificadas en condiciones nativas (no reductoras) como lo especifican los proveedores (QIAGEN, 2000).

### **Ensayos de fosforilación**

Los ensayos de fosforilación se realizaron a temperatura ambiente, en presencia de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP [actividad específica, 2 Ci/mmol (1Ci= 37 GBq)], Hepes 50 mM (pH 7.5), MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 0.1 mM y glicerol 10% (Iuchi and Lin, 1992). Donde se indica, los péptidos ArcB purificados (50 pmol) se preincubaron con quinona-0 (Q0) 0.25 mM, cloramina T 0.1 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM, ditioneitol (DTT) 5 mM, o *S*-metil metanotiosulfonato (MMTS) durante 30 min a 25°C. Las reacciones de fosforilación se iniciaron al añadir [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP y se detuvieron con la adición de un volumen igual de amortiguador de muestra SDS 2 X. Inmediatamente las muestras se colocaron en un gel de poliacrilamida al 10% y fueron sometidas a SDS/PAGE. La cantidad de radioactividad de las proteínas separadas se determinó cualitativamente por autoradiografía. El análisis cuantitativo se realizó por PhosphorImager (Molecular Dynamics).

### **Marcaje de ArcB con Metoxi-Polietilen Glicol Maleimida (MAL-PEG)**

En la determinación del estado redox de los péptidos ArcB se utilizó MAL-PEG ( $M_r$  = 5,000) para etiquetar tioles libres en los péptidos. Los péptidos ArcB purificados (50 pmol), que primero se trataron o no con Q0 0.5 mM, se incubaron en Tris·HCl 20 mM y EDTA 1

mM con MALPEG 1 mM a 25°C. Después de una hora, las reacciones se detuvieron con la adición de un volumen igual de amortiguador de muestra SDS 2X e inmediatamente las proteínas fueron sometidas a SDS/PAGE (poliacrilamida 10%). A través de un análisis “Western blot”, con anticuerpos policlonales específicos para ArcB, se evaluaron los cambios en la movilidad de los péptidos etiquetados (reducidos) o no etiquetados (oxidados).

#### **Modificación de ArcB con 7-Cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl).**

Primero, los péptidos ArcB purificados (10 nmol) se incubaron en un amortiguador de fosfato de potasio 50 mM (pH 7.2) con Q0 0.5 mM o DTT 10 mM a 25°C. Después de 30 min, se eliminaron tanto Q0 como DTT mediante concentración y redilución en el amortiguador anterior en una columna nanosep 10 K (PAll). Las reacciones de modificación se realizaron por la adición de NBD-Cl (disuelto en DMSO) a una concentración final de 1 mM durante una hora a 25°C. El NBD-Cl se eliminó mediante tres ciclos de concentración y redilución en el amortiguador ya mencionado. Finalmente se monitoreó el espectro de absorción (de 300 a 600 nm) de las muestras de ArcB tratadas con NBD-Cl.

#### **Estado Redox de ArcB *in vivo*.**

La cepa MC4100 se creció aeróbicamente con agitación (300 rpm) a 37°C en 50 ml de LB en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, y anaeróbicamente en un tubo de ensayo de tapa de rosca de 5 ml completamente lleno. A una OD<sub>600</sub> aproximada de 0.4 - 0.5, las células se trataron con 1/10 de volumen de ácido tricloroacético (TCA) para precipitar las proteínas y detener el intercambio tiol/disulfuro. Después de una hora de incubación en hielo las proteínas precipitadas se aislaron por centrifugación y las pastillas se lavaron con acetona para remover el TCA. La pastilla se disolvió en amortiguador de muestra SDS no reductor 5X y fue dividida en dos porciones iguales. Una porción se trató con DTT 100 mM, mientras que en la otra porción se agregó una cantidad equivalente de amortiguador de muestra. Las proteínas se separaron por SDS/PAGE no reductor y ArcB fue visualizado por análisis “Western blot” con anticuerpos policlonales dirigidos a esta proteína.



### Ensayo de la actividad de $\beta$ -galactosidasa

Para la detección de la expresión de  $\Phi(\text{cydA}'\text{-lacZ})$  o de  $\Phi(\text{lldP}'\text{-lacZ})$  se siguió el método de Miller (Miller, 1972) que cuantifica la hidrólisis de *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactósido (ONPG) por la  $\beta$ -galactosidasa. Los cultivos portadores de estos genes reporteros se crecieron aeróbicamente en LB adicionado con D-xilosa 20 mM, MOPS 0.1 M, y el antibiótico de selección. En los cultivos con  $\Phi(\text{lldP}'\text{-lacZ})$  se agregó también L-lactato 20 mM. A los tiempos indicados se registró la densidad celular de los cultivos por absorbancia a 600 nm y alícuotas de 0.1 ml de cada cultivo se agregaron a tubos de ensayo que contenían 0.9 ml de amortiguador Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.6 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.04 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.05 M), 1 gota de SDS al 10% y 2 gotas de cloroformo. Los tubos se vortexearon para lisar las células y se inició la reacción por adición de 0.2 ml de ONPG [4 mg/ml]; después de 15 min a temperatura ambiente se detuvo la reacción agregando 0.5 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M. Se registró la densidad óptica a 420 y 550 nm por cada tubo. La actividad  $\beta$ -galactosidasa se expresó en unidades Miller, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades Miller} = 1000 \times \frac{\text{OD}_{420} - (1.75 \times \text{OD}_{550})}{15 \times 0.1 \times \text{OD}_{600}}$$

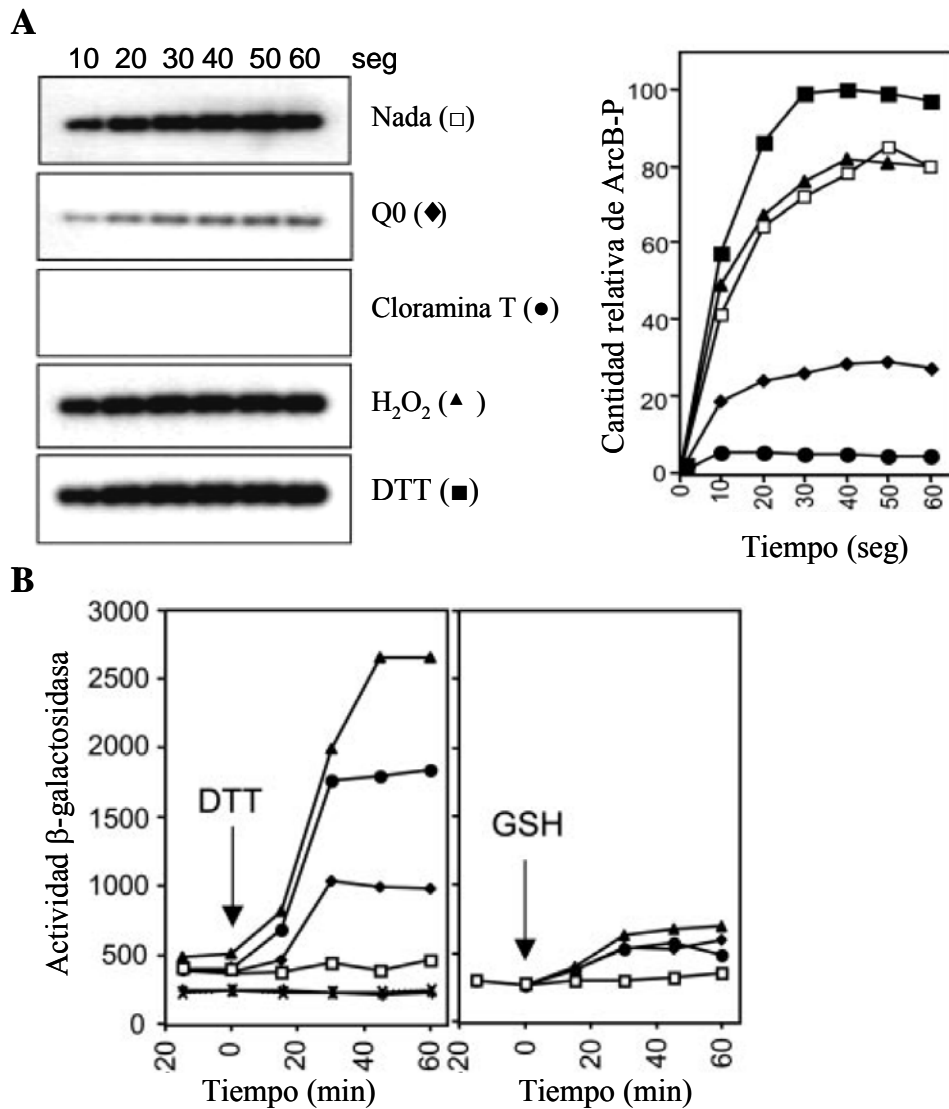
## RESULTADOS

### Efecto de la oxido-reducción en la actividad cinasa de ArcB

Con el fin de conocer si la actividad cinasa de ArcB depende de cambios de oxido-reducción de la proteína, se exploró el efecto *in vitro* de algunos agentes oxidantes conocidos (como cloramina T o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y del agente reductor DTT en la fosforilación de ArcB. Primero, el péptido ArcB<sup>78-778</sup> se purificó en condiciones nativas; condición en la que se conoce que ArcB se obtiene como cinasa activa (Fig 3A). Posteriormente ArcB<sup>78-778</sup> se incubó con cada uno de los siguientes compuestos: Q0, o cloramina T (agente oxidante de residuos de cisteínas y metioninas), o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o DTT. Mediante ensayos de fosforilación *in vitro*, seguidos de SDS/PAGE, se determinaron cualitativa y cuantitativamente los cambios en la cinética de fosforilación de ArcB<sup>78-778</sup> tratado con los agentes ya mencionados. Se observó que cloramina T y Q0 tienen el mismo efecto sobre ArcB: una drástica inhibición de la fosforilación; incluso cloramina T muestra un efecto más prominente al inhibir totalmente la fosforilación de ArcB. En contraste, el DTT aceleró y amplificó la cinética de fosforilación de ArcB. Curiosamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no afectó la fosforilación de ArcB (Fig 3A). Cabe destacar que de los dos agentes oxidantes probados cloramina T posee el mayor E<sup>o</sup> (900 mV), seguido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (E<sup>o</sup> de 295 mV); en comparación el E<sup>o</sup> de Q0 es de 162 mV. Al comparar la estructura molecular de estos tres elementos se observa que cloramina T y Q0 contienen un anillo aromático, mientras que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> carece de él. Lo anterior sugiere una relación entre la inhibición de la fosforilación de ArcB con el potencial redox y estructura del compuesto inhibidor. En conjunto, estos datos indican que la actividad cinasa de ArcB es sensible a la óxido-reducción y a su vez sugieren la relevancia de la estructura y E<sup>o</sup> de las quinonas en su habilidad como agente inhibidor .

Experimentos adicionales *in vivo*, sobre la influencia del DTT y GSH en la activación de ArcB en aerobiosis, aportaron mayor evidencia sobre la sensibilidad de ArcB a la oxidación reversible, además de proveer información sobre la localización de los eventos de oxido-reducción en ArcB. A cultivos aerobios de *E. coli*, que portan el gen reportero activado por ArcA-P  $\Phi$ (*cydA'*-*lacZ*), se adicionaron concentraciones crecientes de DTT o de glutatión (GSH) (un agente a una determinada concentración por cada cultivo) y

se evaluaron los niveles de expresión del gen reportero, mediante ensayos de actividad de  $\beta$ -galactosidasa, a diferentes tiempos de la adición de DTT o GSH. El gen reportero se



**Fig 3.** Sensibilidad de la actividad cinasa de ArcB a la óxido-reducción.

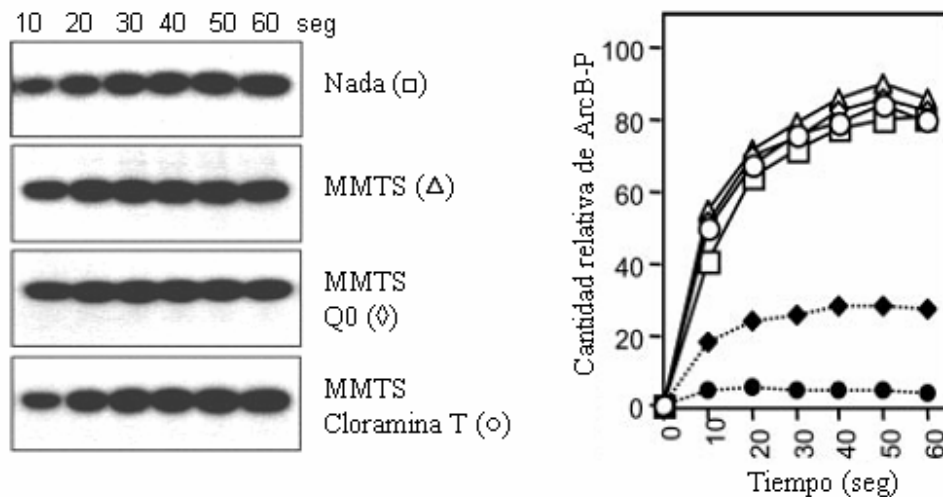
(A) Cinética de fosforilación de ArcB<sup>78-778</sup> purificada (50 pmol) e incubada con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP, en presencia o ausencia de Q0 (0.25 mM), cloramina T (0.1 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2mM), y DTT (5 mM). La fosforilación de la proteína se analizó por SDS/PAGE. Panel izquierdo: Autoradiografía de los geles. Panel derecho: Cuantificación del nivel de ArcB-P con respecto al tiempo en ausencia (□) o presencia (◆) de Q0, cloramina T (●), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (▲) o DTT (■). (B) Efecto del DTT o GSH en la expresión aerobia de  $\Phi$ (*cydA'*-*lacZ*). Cuatro cultivos paralelos de la cepa ECL5003 que contiene  $\Phi$ (*cydA'*-*lacZ*) fueron crecidos en condiciones aerobias en LB con MOPS 1M (pH 7.4) y D-xilosa (20 mM). A una OD<sub>600</sub> de 0.3 (tiempo -15) se tomó una alícuota para determinar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Al tiempo 0, se adicionó a los cultivos DTT o GSH en concentraciones finales de 2.5 mM (◆), 5 mM (●), 10 mM (▲), o nada (□); y se siguió la actividad de  $\beta$ -galactosidasa durante una hora más.

expresó significativamente sólo en los cultivos con DTT y de una manera dependiente de la concentración (Fig 3B, panel izquierdo). Esto muestra que en condiciones aeróbicas, el sistema Arc se activa por la adición de un agente reductor que es capaz de entrar al citoplasma. Por el contrario, la expresión de  $\Phi(\text{cydA}'\text{-lacZ})$  no fue significativa en los cultivos con GSH (Fig 3B, panel derecho), ya que es un agente reductor lipofóbico y por tanto incapaz de llegar al citoplasma. Lo anterior indica que la parte citoplásmica de ArcB posee residuos de aminoácidos sensibles a la oxido-reducción. Si a esto aunamos tres hechos importantes: 1) que el dominio periplásmico de ArcB no funciona como sitio receptor de la señal, por lo que el sitio de recepción debe ser citoplásmico (Kwon et al., 2000b); 2) que la cloramina T es un oxidante específico de cisteínas y metioninas que inhibe fuertemente la fosforilación de ArcB (Fig 3A); y 3) que en la región “linker” (de localización citoplásmica) de ArcB están los únicos residuos de cisteínas (en posición 180 y 241); entonces se propone que las quinonas inhiben la actividad cinasa de ArcB a través de la oxidación de los grupos tiol de Cys-180 y/o Cys-241.

#### **Efecto de la alquilación de los tioles de ArcB en la inhibición de su actividad cinasa.**

El grupo tiol (-SH) puede ser modificado a través de alquilación (sustitución del átomo de hidrógeno por un alquilo), dando por resultado la pérdida de la capacidad de oxidación y por tanto de formar puentes disulfuro entre cisteínas. El tratamiento de cisteínas con MMTS, que alquila específicamente su grupo tiol, resulta en el cambio de Cys-SH a Cys-SCH<sub>3</sub>. Para conocer el papel que desempeñan las cisteínas en la regulación de la actividad cinasa de ArcB, se evaluó la respuesta *in vitro* de ArcB modificada con MMTS a los agentes inhibidores Q0 y cloramina T. El péptido ArcB<sup>78-778</sup> previamente alquilado con MMTS, se trató con Q0 o cloramina T y a través de ensayos de fosforilación *in vitro*, seguidos de SDS/PAGE, se analizó de manera cualitativa y cuantitativa, el efecto de Q0 o cloramina T en la fosforilación de ArcB<sup>78-778</sup> alquilada (Fig 4). En primera instancia se observó que el proceso de alquilación por sí mismo no interfiere en la cinética de fosforilación de ArcB. Pero se encontró que la fosforilación de ArcB modificada con MMTS no se inhibió en presencia de Q0 o cloramina T (Fig 4). Es decir, la protección de los tioles de las cisteínas hace que ArcB sea refractaria a la inhibición por Q0, por lo que la proteína se mantiene en su estado activo. Estos resultados demuestran que los tioles libres

en ArcB se requieren para que las quinonas inhiban la actividad cinasa de esta proteína. Lo que implica a su vez, que el sitio de recepción de la señal es a través de una o ambas cisteínas.



**Fig 4.** Efecto de la alquilación en la inhibición de ArcB por Q0 y cloramina T. ArcB<sup>78-778</sup> purificada (50 pmol) se preincubó con MMTS (1 mM) durante 30 min, se siguió la cinética de fosforilación dependiente de ATP [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] en presencia o ausencia de Q0 (0.25 mM) y cloramina T (0.1 mM) por SDS/PAGE. Panel izquierdo: Autoradiograma de los geles. Panel derecho: Valores cuantitativos de la fosforilación de ArcB con respecto al tiempo en ausencia (□) o presencia (◆) de Q0, cloramina T (●), MMTS (Δ), MMTS y Q0 (◇), o MMTS y cloramina T (○).

### Participación de Cys-180 y Cys-241 en la actividad cinasa de ArcB

Para discernir la participación específica de Cys-180 y Cys-241 en la regulación de la actividad cinasa de ArcB ambos residuos fueron sustituidos por alanina. Se generaron tres péptidos mutantes; ArcB<sup>78-778, C180A</sup> (ArcB<sup>C1</sup>), ArcB<sup>78-778, C241A</sup> (ArcB<sup>C2</sup>) y ArcB<sup>78-778, C180A, C241A</sup> (ArcB<sup>CC</sup>); que se purificaron para evaluar su respuesta a Q0, mediante ensayos de fosforilación *in vitro* en ausencia o presencia de Q0. Cuando ArcB se trató con Q0, su actividad cinasa disminuyó drásticamente (como era de esperarse) ya que sólo mostró cerca del 25% de esta actividad (Fig 5A). Sorprendentemente, la actividad de fosforilación de ArcB<sup>C1</sup> prácticamente no fue afectada por Q0, ya que ésta se conservó en un 85% aproximadamente; por lo tanto Cys-180 desempeña una función crucial en la regulación de

la cinasa ArcB. Por su parte, ArcB<sup>C2</sup> mostró un 35 % de actividad cinasa aproximadamente, en presencia de Q0; este valor bajo de actividad cinasa que indica inhibición por Q0, fue ligeramente mayor que el mostrado por ArcB nativa en las mismas condiciones (Fig 5A). Por lo tanto, Cys-241 también participa en la regulación de la actividad cinasa de ArcB pero de manera más discreta. Finalmente, la actividad de ArcB<sup>CC</sup> no fue afectada en absoluto por Q0. Posteriormente se verificó la relevancia fisiológica de Cys-180 y Cys-241 en ArcB a través del monitoreo de los niveles aerobios del gen reportero  $\Phi(lldP'-lacZ)$ , que es reprimido por ArcA-P, en una cepa que contiene este gen reportero y en la cual se sustituyó el alelo *arcB* nativo por los alelos *arcB*<sup>C180A</sup> (*arcB*<sup>C1</sup>), *arcB*<sup>C241A</sup> (*arcB*<sup>C2</sup>) o *arcB*<sup>C180A, C241A</sup> (*arcB*<sup>CC</sup>). En comparación con los niveles de expresión altos del gen reportero en la cepa nativa, la expresión de  $\Phi(lldP'-lacZ)$  se reprimió significativamente en *arcB*<sup>C1</sup>; en contraste  $\Phi(lldP'-lacZ)$  sólo se reprimió ligeramente en *arcB*<sup>C2</sup>; finalmente,  $\Phi(lldP'-lacZ)$  se reprimió totalmente en *arcB*<sup>CC</sup> (Fig 5B). La sustitución de Cys-180 o de ambas cisteínas produce una cinasa ArcB constitutivamente activa, incluso en aerobiosis. Así, los datos *in vitro* e *in vivo* confirman que ambos residuos de cisteínas se requieren en la regulación de la actividad cinasa de ArcB, proceso en el que Cys-180 tiene una relevancia mayor que Cys-241.

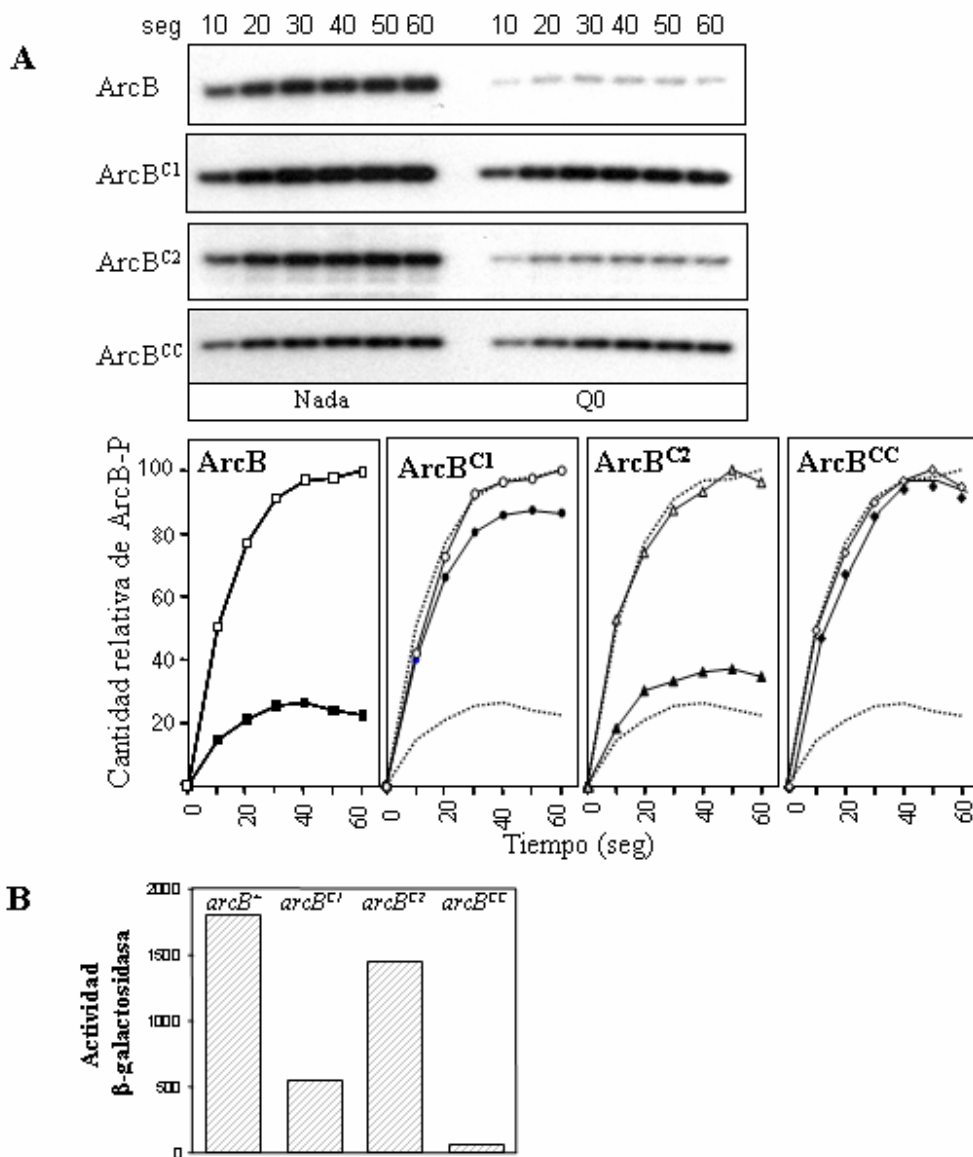


Fig 5. Relevancia de los dos residuos de cisteína en la inhibición de ArcB por Q0. (A) 50 pmol de ArcB<sup>78-778</sup> (ArcB), ArcB<sup>78-778, Cys180</sup> (ArcB<sup>C1</sup>), ArcB<sup>78-778, Cys241</sup> (ArcB<sup>C2</sup>) y ArcB<sup>78-778, Cys180, Cys241</sup> (ArcB<sup>CC</sup>) fueron incubados con ATP [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P], en presencia o ausencia de Q0 (0.25 mM) y la fosforilación de la proteína fue evaluada por SDS/PAGE. Panel superior: Autoradiogramas de los geles. Panel central: cuantificación de los niveles de ArcB-P con respecto al tiempo, en ausencia (símbolos claros) o presencia (símbolos oscuros) de Q0. La cinética de fosforilación de ArcB se muestra como líneas punteadas en las gráficas de los péptidos mutantes. (B) Expresión aeróbica de  $\Phi$ (*lldP*'-lacZ). Las cepas ECL5002 ( $\Phi$ (*lldP*'-lacZ)), IFC1001 (*arcB*<sup>C180A</sup> Kan<sup>r</sup>  $\Phi$ (*lldP*'-lacZ)), IFC1002 (*arcB*<sup>C241A</sup> Kan<sup>r</sup>  $\Phi$ (*lldP*'-lacZ)) y IFC1003 (*arcB*<sup>C180A, C241</sup> Kan<sup>r</sup>  $\Phi$ (*lldP*'-lacZ)) se crecieron en LB con MOPS 0.1 M (pH 7.4), D-xilosa (20 mM) y L-lactato como inductor. La actividad de  $\beta$ -galactosidasa de los cultivos se determinó y se expresó en unidades Miller. Los datos son promedios de cuatro experimentos (variaciones fueron <10% de la media)

### Oxidación dependiente de Q0 de Cys-180 y Cys-241 en ArcB

Para corroborar que el cambio de estado redox de las cisteínas de ArcB es por acción directa de las quinonas, se determinó el estado de oxidación de ArcB en presencia o ausencia de Q0. Para discernir entre la forma oxidada o reducida de ArcB se empleó MAL-PEG, que es un compuesto de alto peso molecular en el que una maleimida está unida a polietilén glicol. La maleimida puede unirse covalentemente al grupo tiol de las cisteínas lo que impide la posterior oxidación de estos residuos, mientras que la porción de polietilén glicol añade un peso considerable a la proteína tratada con MAL-PEG. Por lo tanto, los complejos formados por la unión de MAL-PEG a proteínas con cisteínas reducidas, se distinguen de proteínas con cisteínas oxidadas por su movilidad electroforética retardada que es visible por “Western blot” con anticuerpos dirigidos contra ArcB. Tanto el péptido nativo (ArcB) como los tres péptidos mutantes (ArcB<sup>C1</sup>, ArcB<sup>C2</sup> y ArcB<sup>CC</sup>), primero se incubaron con o sin Q0 y después se trataron o no con MAL-PEG; posteriormente se separaron por SDS/PAGE y se detectaron por “Western blot” (Fig 6). Observamos que el tratamiento de ArcB con MAL-PEG produjo tres complejos de migración distintos (denominados complejo i, ii y iii); por otra parte el tratamiento de ArcB<sup>C1</sup> o ArcB<sup>C2</sup> con MAL-PEG resultó en la formación de un sólo complejo aunque de distinta migración en cada mutante (complejo ii en ArcB<sup>C1</sup> y complejo i en ArcB<sup>C2</sup>); esta diferencia en la movilidad puede deberse a cambios en la conformación de los péptidos mutantes de acuerdo al residuo de cisteína al que se una MAL-PEG. Finalmente, como era de esperarse, el tratamiento de ArcB<sup>CC</sup> con MAL-PEG no produjo ningún complejo. Interessantemente, cuando los péptidos fueron tratados primero con Q0 y después con MAL-PEG, no hubo formación de ningún complejo. Estos datos confirman que ambos residuos de cisteínas experimentan oxidación dependiente de Q0.

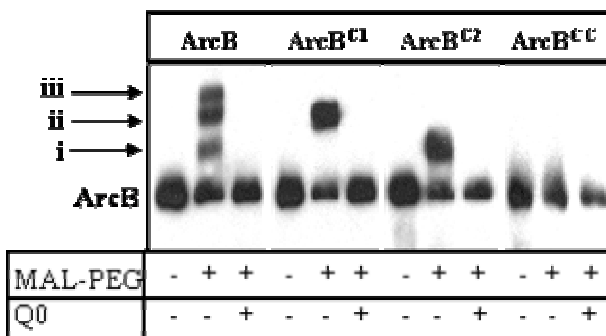


Fig 6. Estado redox de Cys-180 y Cys-241 en presencia de Q0 *in vitro*. Péptidos purificados de ArcB (50 pmol), pretratados o no con Q0 0.5 mM, fueron incubados con MAL-PEG 1 mM a 25°C. Después de una hora las reacciones se terminaron al añadir un volumen de amortiguador de muestra SDS 2X y las diferencias en la movilidad de las proteínas etiquetadas y no etiquetadas fueron visibles mediante análisis por “Western blot” con anticuerpos policlonales específicos para ArcB



### **Identificación del producto de oxidación de Cys-180 y Cys-241**

La oxidación de las cisteínas puede generar diferentes productos cuya estabilidad depende de las condiciones locales en que se forma. Uno de estos productos es el ácido sulfénico (RSOH) que es muy reactivo, por lo que generalmente es inestable y da lugar a derivados con un estado de mayor oxidación, que son más estables. El ácido sulfénico también puede oxidarse junto con otro tiol y así generar enlaces disulfuro. Los enlaces disulfuro pueden además ser generados por reacciones de intercambio directo de tiol a disulfuro entre cisteínas reducidas, dichas reacciones son rápidas y reversibles (Paget and Buttner, 2003). Es bien conocido que los enlaces disulfuro afectan la actividad catalítica de ciertas proteínas; por otra parte, el ácido sulfénico ha sido detectado como un intermediario estable que también regula la actividad de algunas proteínas (Claiborne et al., 1993). Por esta razón era necesario determinar cuál de estos dos productos de oxidación, enlaces disulfuro o ácido sulfénico, ocurre en ArcB. La presencia de ácido sulfénico en proteínas puede detectarse mediante el uso del compuesto electrofílico NBD-Cl que al reaccionar con ácido sulfénico, forma un derivado que tiene una absorbancia máxima a 347 nm. NBD-Cl también reacciona con grupos tiol, cuyo derivado tiene una absorbancia máxima a 420 nm (Ellis and Poole, 1997). El péptido ArcB nativo y los péptidos mutantes ArcB<sup>C1</sup>, ArcB<sup>C2</sup> y ArcB<sup>CC</sup> fueron tratados con DTT o con Q0; posteriormente se les añadió NBD-Cl y se examinó el espectro de absorción de cada péptido. Como era de esperarse, los péptidos ArcB<sup>78-778</sup>, ArcB<sup>C1</sup> y ArcB<sup>C2</sup> tratados con DTT mostraron un pico máximo de absorción a 420 nm, lo que corrobora la presencia de tioles libres en ArcB en estado reducido (Fig 7A). La especificidad de la reacción quedó demostrada por el efecto directamente proporcional entre los niveles de absorción a 420 nm de los péptidos reducidos y la cantidad de cisteínas presentes en los péptidos mutantes de ArcB; las mutantes ArcB<sup>C1</sup> y ArcB<sup>C2</sup> tienen la mitad del nivel de absorción presente en ArcB nativa, mientras que ArcB<sup>CC</sup> no absorbe a 420 nm. Por otra parte, los péptidos que fueron oxidados con Q0 no mostraron absorción a 347 nm ni a 420 nm (Fig 6B). Por lo tanto, el producto de oxidación de las cisteínas de ArcB no es ácido sulfénico, lo que sugiere que la acción oxidante de las quinonas conduce a la formación de enlaces disulfuro entre las cisteínas de ArcB.

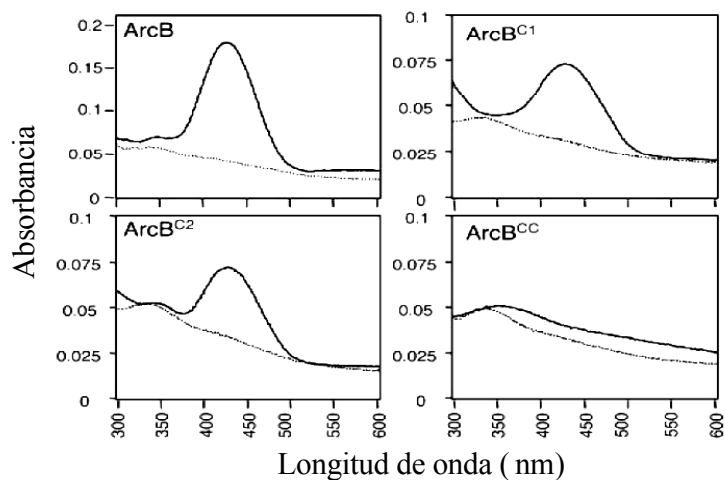
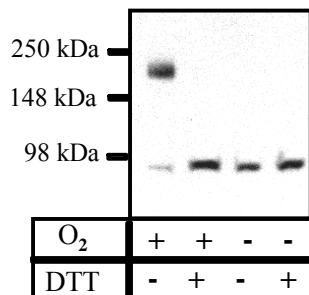
**A****B**

Fig 7. Dimerización de ArcB por la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. (A) Características espectroscópicas de ArcB modificado con NBD-Cl. Péptidos de ArcB purificados (10 nmol) se pretrataron ya sea con Q0 0.5 mM o DTT 10 mM y se incubaron con NBD-Cl (1 mM). El NBD-Cl se eliminó mediante tres ciclos de concentración y redilución en una columna nanosep 10K y posteriormente se registró el espectro final (300 a 600 nm). Línea continua, pretratamiento con DTT; línea punteada, pretratamiento con Q0. (B) Formación de enlaces disulfuro intermoleculares en ArcB, *in vivo*. Cultivos aerobios y anaerobios de *E. coli* se precipitaron al llegar a una OD<sub>600</sub> aproximada de 0.4-0.5 y se trataron con TCA (10%) para precipitar las proteínas y evitar posteriores intercambios tiol/disulfuro. Las proteínas precipitadas se disolvieron en amortiguador de muestra no reductor con SDS y se dividieron en dos partes iguales, una de las cuales se trató con DTT 100 mM. Las proteínas se separaron mediante SDS/PAGE no reductor y después se analizaron por “Western blot” con anticuerpos policlonales específicos para ArcB. La banda de 88-kDa corresponde al tamaño del monómero ArcB, mientras que la banda de 170-kDa al dímero de ArcB.

### Formación de enlaces disulfuro en ArcB durante aerobiosis

Una pregunta importante por responder es si los enlaces disulfuro formados entre las cisteínas de ArcB son intra o intermoleculares. Para este fin, cultivos aerobios y anaerobios de *E. coli* se trataron con TCA, el cual fija los grupos tiol en su estado actual de oxidación;

posteriormente los extractos celulares tratados con TCA fueron separados por SDS/PAGE, en condiciones no reductoras y analizados por “Western blot” con anticuerpos específicos para ArcB. Los extractos anaerobios mostraron una banda de aproximadamente 88 kDa, que corresponde al tamaño de ArcB en su forma monomérica. En contraste, los extractos aeróbicos mostraron una banda predominante de aproximadamente 170 kDa, que equivale a un dímero de ArcB y que en presencia de DTT desaparece y da lugar a la banda de 88kDa (Fig 7B). Por lo tanto, la oxidación de ambos residuos de cisteínas resulta en la formación de enlaces disulfuro intermoleculares que permiten la dimerización de ArcB, conformación en la que ArcB es una cinasa inactiva.

## DISCUSIÓN

La actividad catalítica de ciertas proteínas se regula por “interruptores redox” que activan o silencian, según el estado de oxido-reducción de grupos tioles en su estructura (Paget and Buttner, 2003). ArcB es un transductor cuya actividad de cinasa es controlada por un interruptor redox compuesto por sus residuos Cys-180 y Cys-241. Otros ejemplos de proteínas microbianas con interruptores redox basados en la reactividad de residuos cys son: OxyR, DsbB y Hsp33 en *E. coli*, Crtj y RegB en *Rhodobacter capsulatus*, OhrR en *Xanthomonas campestris* y Orp1-Yap1 en *Sacharomyces cerevisiae* (Paget and Buttner, 2003).

Las quinonas oxidadas son las encargadas de “apagar” la actividad cinasa de ArcB a través de la oxidación de su interruptor redox. En este trabajo se determinó que las quinonas al oxidar a Cys-180 y Cys-241 generan puentes disulfuro intermoleculares (Fig 4C). Generalmente, no se forman enlaces disulfuro estables en las proteínas citosólicas debido al ambiente altamente reductor del citoplasma. Por lo que proteínas citoplásmicas con interruptores redox como ArcB, no suelen estar en equilibrio con el ambiente intracelular. La estabilidad de tioles oxidados citoplásmicos podría depender de la presencia y acción continua del agente oxidante (quinonas oxidadas en el caso de ArcB), y por la formación de microambientes que permitan la existencia de dichos estados oxidados.

El papel particular que desempeñan Cys-180 y Cys-241 en la formación de los enlaces disulfuro intermoleculares se demostró por evidencia tanto *in vitro* como *in vivo*: la inhibición de la actividad cinasa en ArcB depende en gran medida (casi en un 85%) de la formación de éstos enlaces intermoleculares en Cys-180, sin embargo, se requiere de los puentes disulfuro intermoleculares entre Cys-241 (que contribuyen con aproximadamente el 15 % de inhibición) para lograr una completa inhibición (Fig 3).

Por otra parte, este trabajo determinó la especificidad de las quinonas como un agente oxidante directo de los tioles de las dos cisteínas en ArcB (Fig 4A). El uso de quinonas en la oxidación de cisteínas ha sido bien caracterizado en DsbB en *E. coli*. DsbB es una proteína membranal con un par de cisteínas en cada uno de sus dos dominios periplásmicos; junto con DsbA forman una importante vía de generación y transferencia de enlaces disulfuro a proteínas en el periplasma (Collet and Bardwell, 2002; Kadokura et al., 2003). Se ha demostrado que DsbB, que genera enlaces disulfuro *de novo* mediante su

actividad de quinona reductasa, contiene un sitio de unión a quinonas oxidadas de alta afinidad (Bader et al., 2000; Regeimbal et al., 2003). Además de DsbB, otros componentes de sistemas fotosintéticos y respiratorios unidos a la membrana, presentan un sitio de unión a quinonas (Fisher and Rich, 2000) que contiene el motivo L-(X<sub>3</sub>)-H-(X<sub>2</sub>)-T.

Considerando el efecto específico de Q<sub>0</sub> y cloramina T en la oxidación de ArcB (Fig 1A) y su relativa semejanza estructural (tienen en común un anillo aromático), contrastado con el efecto nulo del oxidante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a pesar de su alto E<sup>o</sup>), cabe la posibilidad de que ArcB contenga un dominio de unión específico a quinonas.

Dado que el péptido ArcB<sup>78-778</sup>, que carece de región transmembranal, es sensible a la oxidación por quinonas (Fig 1A), se sugiere que dicho sitio de unión a quinonas se localice en el “linker” o porción citoplásmica de esta proteína. Resulta interesante destacar que ArcB contiene un elemento similar al reportado por Fisher y cols (2000) con la secuencia L-(X<sub>3</sub>)-H-(X<sub>3</sub>)-T, en posición 386-394 (LPLPHQVIT). Por otra parte en ArcB existen grupos de residuos cuya hidrofobicidad sugiere que tengan contacto con la membrana. Al no conocer la estructura tridimensional de ArcB, podría especularse que estos segmentos hidrofóbicos (además de otros elementos que afectan la estructura terciaria de esta proteína) permitan ya sea el acercamiento de la secuencia L-(X<sub>3</sub>)-H-(X<sub>3</sub>)-T a la membrana, o la formación de un microambiente hidrofóbico fuera de la membrana en el que las quinonas puedan interactuar con este sitio. Además se esperaría que el plegamiento de la proteína acerque este probable dominio de unión a quinonas a los residuos redox Cys-180 y Cys-241, que son el blanco de la oxidación de las quinonas en ArcB. Para validar este argumento, primero sería importante determinar que la secuencia L-(X<sub>3</sub>)-H-(X<sub>3</sub>)-T es en verdad un sitio de unión a quinonas en ArcB.

La presencia de un dominio de unión a quinonas daría posibles elementos para explicar cómo las quinonas embebidas en la membrana pueden oxidar residuos de cisteínas periplásmicos (en el caso de DsbB) o citoplásmicos (en ArcB). Por otra parte, la posible existencia de un dominio para reconocimiento y unión de quinonas podría ser la razón por la que ArcB es insensible tanto a O<sub>2</sub> como a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, porque ha desarrollado un dispositivo diferente para detectar indirectamente la tensión de O<sub>2</sub> (la detección directa de O<sub>2</sub> involucra al grupo hemo o al “cluster” 4Fe4S de FNR). Además, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es más bien utilizado como

una señal común de estrés oxidativo (Toledano et al., 2004), mientras que pareciera que algunos componentes de la cadena respiratoria (su relación oxidado/reducido) son preferidos como indicadores del estado de energía celular.

La poza de quinonas es un componente central en las cadenas ramificadas de transferencia de electrones. Dado que el estado redox de la poza de quinonas está ligado al consumo de O<sub>2</sub>, su acumulación en un estado de oxidación determinado es específico a la condición redox de crecimiento; de un estado predominantemente oxidado en condiciones aeróbicas a un estado mayoritariamente reducido en condiciones anaeróbicas. Estas características la hacen un indicador eficaz de los cambios en la tensión de oxígeno ambiental y por lo tanto, del estado de energía de la célula.

Dentro del área de transducción de señales por sistemas de dos componentes, existen estudios que sugieren que las quinonas oxidadas podrían funcionar como una señal redox eficiente que inhibe la actividad cinasa de algunas cinasas sensoras transmembranales procarióticas, aparte de ArcB. Tal es el caso de RegB de *Rhodobacter capsulatus*, BvgS de *Bordetella pertussis* y EvgS de *E. coli*.

RegB en su conformación dimérica tiene actividad cinasa. La oxidación de su residuo Cys-265, que genera la formación de un enlace disulfuro intermolecular (reacción dependiente de metal), resulta en un tetrámero RegB carente de función cinasa (Swem et al., 2003). Recientemente se ha propuesto que la autofosforilación de RegB también es inhibida por ubiquinonas (Swem et al., 2006); sin embargo no existe evidencia directa de la conexión entre ambos elementos, es decir, de que las quinonas sean quienes oxiden a Cys-265. Este mismo trabajo encontró que RegB tiene un sitio de unión a quinonas, localizado en su segundo dominio periplásmico. Resulta difícil imaginar cómo las quinonas, que se unen en la región periplásmica de RegB, oxidan directamente el residuo Cys-265 localizado en la región citoplásmica de RegB entre el sitio de fosforilación y el dominio de cinasa. Por lo tanto, la oxidación del residuo Cys-265 y la inhibición por quinonas, parecen ser mecanismos independientes para regular la actividad cinasa de RegB.

Estudios *in vitro* con las cinasas sensoras EvgS de *E. coli* y BvgS de *Bordetella pertussis* demuestran que la actividad cinasa de ambas proteínas desaparece en presencia de quinonas oxidadas (Bock and Gross, 2002); sin embargo, aún no se ha descrito el mecanismo molecular de inhibición involucrado, ni la relevancia fisiológica de las quinonas

como indicador redox para estas proteínas sensoras. Además, EvgS y BvgS contienen un dominio periplásmico más grande que el de ArcB (que es de 16 aminoácidos) y existen trabajos *in vivo* que sugieren que el ácido nicotínico y los iones de sulfato, que modulan la actividad cinasa, funcionan como las señales recibidas por los dominios periplásmicos de estas cinasas (Utsumi et al., 1994).

Los SDC a los que pertenecen cada una de las cinasas sensoras anteriores, vinculan el estado de energía celular con procesos como la virulencia (BvgS) y fotosíntesis (RegB). Es notable destacar que el SDC Arc en *V. cholerae* también vincula el metabolismo redox con la síntesis de factores de virulencia.

En comparación con EvgS, BvgS y RegB, ArcB pareciera ser la primera cinasa sensora procariótica en la que se ha caracterizado que el mecanismo molecular de regulación de su actividad cinasa involucra la oxidación de residuos de cisteínas por quinonas. Más aún, la formación de enlaces disulfuro intermoleculares resulta en la formación de un dímero (no se descartan estados de asociación más complejos) carente de actividad cinasa (Fig 4C).

Estudios en la actividad de señalización de varias quimeras Tar-ArcB en las que segmentos de diferente longitud del dominio transmembranal de la proteína sensora Tar se fusionan a la porción citosólica de ArcB, muestran que la regulación de la actividad catalítica de ArcB es afectada por movimientos rotacionales que alteran la orientación de la porción citosólica de un monómero con respecto al otro dentro del homodímero de ArcB (Kwon et al., 2003). Esto sugiere que en condiciones aeróbicas la orientación de las cisteínas esté alineada cara a cara entre dos monómeros ArcB, de tal forma que permita la formación de enlaces disulfuro intermoleculares mediante acción de las quinonas, mientras que en condiciones anaeróbicas las cisteínas entre monómeros estarían alejadas unas de otras.

Finalmente, el mecanismo de inhibición molecular de la cinasa ArcB por efecto de quinonas oxidadas se representa en la Fig 8. A través de éste, la señal redox (quinonas oxidadas) es instantáneamente transducida para inactivar la función reguladora del SDC Arc sobre la maquinaria transcripcional de *E. coli*.

En el SDC Arc, la oxidación y reducción de tioles en la porción citoplásmica de ArcB es el nodo que conecta el estado redox de la poza de quinonas con el aparato transcripcional.

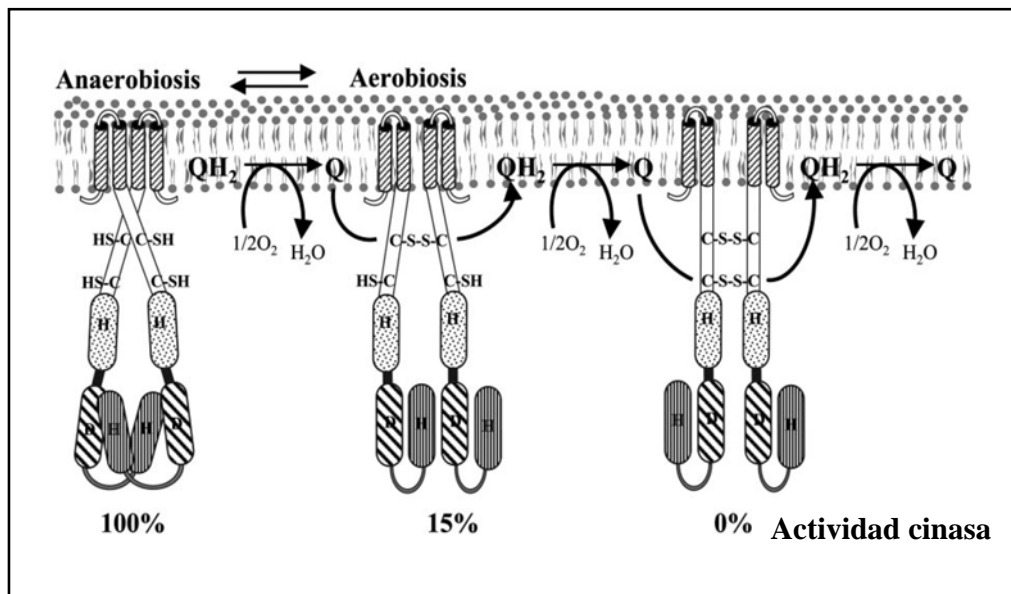


Fig 8. Modelo de la inactivación de la cinasa sensora ArcB. Por el cambio de condiciones de crecimiento anaeróbicas a aeróbicas la poza de quinonas se acumula en estado oxidado. Esto permite la transferencia de electrones de los residuos Cys-180 a las quinonas, generando enlaces disulfuro intermoleculares entre los residuos Cys-180 de dos monómeros, evento que reduce significativamente la actividad cinasa de ArcB. Conforme los electrones fluyen rápidamente hacia el  $O_2$  a través de la citocromo oxidasa bo o bd, las quinonas se mantienen oxidadas e inducen la formación de un segundo enlace disulfuro entre los dos residuos Cys-241 del homodímero, conduciendo a la total inhibición de la actividad cinasa de ArcB.



## CONCLUSIONES

- 1) La regulación de la actividad cinasa de ArcB involucra a los residuos Cys-180 y Cys-241, localizados en el “linker” de ArcB.
- 2) Las quinonas oxidan los tioles de los residuos Cys-180 y Cys-241 de ArcB
- 3) El mecanismo molecular de inhibición de la actividad cinasa de ArcB involucra la dimerización de ArcB por la formación de dos enlaces disulfuro intermoleculares:
  - a) El enlace disulfuro entre residuos Cys180 de dos monómeros, que reduce significativamente la actividad cinasa de ArcB
  - b) El enlace disulfuro entre residuos Cys241 de dos monómeros, que termina por inactivar totalmente la actividad cinasa de ArcB.

## PERSPECTIVAS

El conocimiento del mecanismo molecular de inhibición de la actividad cinasa de ArcB por quinonas oxidadas durante el crecimiento aeróbico de *E. coli*, aporta información muy valiosa sobre la regulación de la actividad de ArcB. Sin embargo, aún resta por conocer los elementos y/o mecanismos involucrados en la reducción de los enlaces disulfuro y por lo tanto en la activación de ArcB cuando *E. coli* entra en anaerobiosis. Las proteínas citoplasmáticas que forman enlaces disulfuro como parte de su ciclo catalítico o de regulación, son reducidas principalmente por la vía de las tiorredoxinas (Trx) y/o por la vía de las glutaredoxinas (Grx); estas principales vías reductoras en el citoplasma bacteriano usan el potencial reductor de NADPH. La forma reducida de las proteínas que conforman a estas vías poseen un sitio activo conservado: Cys-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-Cys, que cataliza la reacción redox disulfuro-tiol en sus proteínas sustrato (Holmgren, 1989; Prinz et al., 1997).

Resultados preliminares en nuestro laboratorio proponen que el E<sup>°</sup> de ArcB es de aproximadamente -20 mV; considerando que el E<sup>°</sup> de la tiorredoxina es de -270 mV y el de la glutaredoxina está entre -200 y -233 mV (Mossner et al., 1999), podría ser factible que las vías de tiorredoxina y glutatión puedan servir como donadores de electrones a ArcB, quien reactivaría su actividad cinasa por la reducción de sus enlaces disulfuro.

Actualmente, en el laboratorio se está estudiando el papel que desempeñan las tiorredoxinas y/o glutarredoxinas en la reducción y activación de ArcB. Resultados preliminares basados en los niveles de expresión del reportero  $\Phi(\text{cydA}'\text{-lacZ})$  en las dos cepas mutantes  $\Delta\text{trxB } \Delta\text{trxA } \Delta\text{trxC}::\text{Kn}$  (carece completamente de la vía Trx) y  $\Delta\text{gor } \Delta\text{grxA}::\text{Kn } \Delta\text{grxC}::\text{Cm}$  (carece casi por completo de la vía Grx, sólo posee el gen *grxC*), indican que mientras que el sistema Arc responde casi inmediatamente al cambio de aerobiosis a anaerobiosis en la cepa silvestre (denotado por el drástico incremento de la expresión del reportero), el sistema Arc parece no ser adecuadamente activado ni en la mutante de la vía *trx* ni en la mutante de la vía *grx* (que muestran una lenta y baja expresión del reportero). Lo anterior sugiere que ambas vías juegan un papel sinérgico en la reducción de ArcB y por ende, en su activación. Por tanto, sería necesario determinar los elementos precisos de cada una de las vías, que participen directamente en la reducción y activación de ArcB. Para lograr este objetivo, actualmente se está transduciendo el gen reportero  $\Phi(\text{cydA}'\text{-lacZ})$  en cepas con mutaciones sencillas y/o dobles de cada vía, y serán utilizadas en diferentes combinaciones en ensayos de  $\beta$ -galactosidasa similares a los hechos con las triples mutantes, hasta encontrar la combinación responsable de la activación de ArcB.

Por otra parte, sería importante determinar si se requiere que las quinonas se unan alostéricamente a ArcB para ejercer su efecto inhibitor. Esto implicaría identificar dentro de la estructura de esta proteína algún dominio de unión a quinonas.

Finalmente, el futuro esclarecimiento de la estructura tridimensional de ArcB permitirá entender mejor el modo de comunicación de Cys-180 y Cys-241 del “linker” citoplásmico de ArcB con las quinonas membranales, aparte de proporcionar información muy importante sobre los pasos de transferencia del grupo fosforilo entre los varios módulos de ArcB.

## REFERENCIAS

- Abel, T., and Maniatis, T. (1989). Gene regulation. Action of leucine zippers. *Nature* 341, 24-25.
- Alex, L. A., Borkovich, K. A., and Simon, M. I. (1996). Hyphal development in *Neurospora crassa*: involvement of a two-component histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3416-3421.
- Bader, M. W., Xie, T., Yu, C. A., and Bardwell, J. C. (2000). Disulfide bonds are generated by quinone reduction. *J Biol Chem* 275, 26082-26088.
- Barrett, J. F., and Hoch, J. A. (1998). Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 1529-1536.
- Bock, A., and Gross, R. (2002). The unorthodox histidine kinases BvgS and EvgS are responsive to the oxidation status of a quinone electron carrier. *Eur J Biochem* 269, 3479-3484.
- Brondsted, L., and Atlung, T. (1994). Anaerobic regulation of the hydrogenase 1 (*hya*) operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176, 5423-5428.
- Buckland, R., and Wild, F. (1989). Leucine zipper motif extends. *Nature* 338, 547.
- Chang, C., Kwok, S. F., Bleecker, A. B., and Meyerowitz, E. M. (1993). Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* 262, 539-544.
- Claiborne, A., Miller, H., Parsonage, D., and Ross, R. P. (1993). Protein-sulfenic acid stabilization and function in enzyme catalysis and gene regulation. *Faseb J* 7, 1483-1490.
- Collet, J. F., and Bardwell, J. C. (2002). Oxidative protein folding in bacteria. *Mol Microbiol* 44, 1-8.
- Colloms, S. D., Alen, C., and Sherratt, D. J. (1998). The ArcA/ArcB two-component regulatory system of *Escherichia coli* is essential for Xer site-specific recombination at *psi*. *Mol Microbiol* 28, 521-530.
- Cotter, P. A., Chepuri, V., Gennis, R. B., and Gunsalus, R. P. (1990). Cytochrome *o* (*cyoABCDE*) and *d* (*cydAB*) oxidase gene expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH, and the *fnr* gene product. *J Bacteriol* 172, 6333-6338.
- De Souza-Hart, J. A., Blackstock, W., Di Modugno, V., Holland, I. B., and Kok, M. (2003). Two-component systems in *Haemophilus influenzae*: a regulatory role for ArcA in serum resistance. *Infect Immun* 71, 163-172.
- Drury, L. S., and Buxton, R. S. (1985). DNA sequence analysis of the *dye* gene of *Escherichia coli* reveals amino acid homology between the Dye and OmpR proteins. *J Biol Chem* 260, 4236-4242.
- Ellis, H. R., and Poole, L. B. (1997). Novel application of 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole to identify cysteine sulfenic acid in the AhpC component of alkyl hydroperoxide reductase. *Biochemistry* 36, 15013-15018.
- Fisher, N., and Rich, P. R. (2000). A motif for quinone binding sites in respiratory and photosynthetic systems. *J Mol Biol* 296, 1153-1162.

- Georgellis, D., Kwon, O., De Wulf, P., and Lin, E. C. (1998). Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system. *J Biol Chem* 273, 32864-32869.
- Georgellis, D., Kwon, O., and Lin, E. C. (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., Kwon, O., and Lin, E. C. (2001a). Quinones as the redox signal for the Arc two-component system of bacteria. *Science* 292, 2314-2316.
- Georgellis, D., Kwon, O., Lin, E. C., Wong, S. M., and Akerley, B. J. (2001b). Redox signal transduction by the ArcB sensor kinase of *Haemophilus influenzae* lacking the PAS domain. *J Bacteriol* 183, 7206-7212.
- Georgellis, D., Lynch, A. S., and Lin, E. C. (1997). *In vitro* phosphorylation study of the Arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179, 5429-5435.
- Hoch, J. A. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* 3, 165-170.
- Hoch, J. A., and Silhavy, T. J., eds. (1995). *Two-Component Signal Transduction* (Washington, D.C.: American Society for Microbiology).
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 264, 13963-13966.
- Ishige, K., Nagasawa, S., Tokishita, S., and Mizuno, T. (1994). A novel device of bacterial signal transducers. *Embo J* 13, 5195-5202.
- Iuchi, S. (1993). Phosphorylation/dephosphorylation of the receiver module at the conserved aspartate residue controls transphosphorylation activity of histidine kinase in sensor protein ArcB of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268, 23972-23980.
- Iuchi, S., Cameron, D. C., and Lin, E. C. (1989a). A second global regulator gene (*arcB*) mediating repression of enzymes in aerobic pathways of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171, 868-873.
- Iuchi, S., Furlong, D., and Lin, E. C. (1989b). Differentiation of *arcA*, *arcB*, and *cpxA* mutant phenotypes of *Escherichia coli* by sex pilus formation and enzyme regulation. *J Bacteriol* 171, 2889-2893.
- Iuchi, S., and Lin, E. C. (1988). *arcA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 1888-1892.
- Iuchi, S., and Lin, E. C. (1992). Purification and phosphorylation of the Arc regulatory components of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174, 5617-5623.
- Iuchi, S., Matsuda, Z., Fujiwara, T., and Lin, E. C. (1990). The *arcB* gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the Arc modulon. *Mol Microbiol* 4, 715-727.
- Kadokura, H., Katzen, F., and Beckwith, J. (2003). Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem* 72, 111-135.
- Kwon, O., Georgellis, D., and Lin, E. C. (2000a). Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the Arc two-component system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182, 3858-3862.

- Kwon, O., Georgellis, D., and Lin, E. C. (2003). Rotational on-off switching of a hybrid membrane sensor kinase Tar-ArcB in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 278, 13192-13195.
- Kwon, O., Georgellis, D., Lynch, A. S., Boyd, D., and Lin, E. C. (2000b). The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region. *J Bacteriol* 182, 2960-2966.
- Lambden, P. R., and Guest, J. R. (1976). Mutants of *Escherichia coli* K12 unable to use fumarate as an anaerobic electron acceptor. *J Gen Microbiol* 97, 145-160.
- Lau, P. C., Wang, Y., Patel, A., Labbe, D., Bergeron, H., Brousseau, R., Konishi, Y., and Rawlings, M. (1997). A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1453-1458.
- Lee, Y. S., Han, J. S., Jeon, Y., and Hwang, D. S. (2001). The Arc two-component signal transduction system inhibits *in vitro* *Escherichia coli* chromosomal initiation. *J Biol Chem* 276, 9917-9923.
- Link, A. J., Phillips, D., and Church, G. M. (1997). Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol* 179, 6228-6237.
- Liu, X., and De Wulf, P. (2004). Probing the ArcA-P modulon of *Escherichia coli* by whole genome transcriptional analysis and sequence recognition profiling. *J Biol Chem* 279, 12588-12597.
- Lu, S., Killoran, P. B., Fang, F. C., and Riley, L. W. (2002). The global regulator ArcA controls resistance to reactive nitrogen and oxygen intermediates in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Infect Immun* 70, 451-461.
- Lynch, A. S., and Lin, E. C. (1996). Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters. *J Bacteriol* 178, 6238-6249.
- Lynch, A. S. a. L., E.C.C. (1996). Regulation of Aerobic and anaerobic metabolism, In *Regulation of gene expression in Escherichia coli*, E. C. C. a. L. Lin, A.S., ed. (Georgetown: R.G. Landes Company), pp. 361-382.
- Manukhov, I. V., Bertsova, Y. V., Trofimov, D. Y., Bogachev, A. V., and Skulachev, V. P. (2000). Analysis of HI0220 protein from *Haemophilus influenzae*, a novel structural and functional analog of ArcB protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc)* 65, 1321-1326.
- McGuire, A. M., De Wulf, P., Church, G. M., and Lin, E. C. (1999). A weight matrix for binding recognition by the redox-response regulator ArcA-P of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 32, 219-221.
- Miller, J. H. (1972). In *Experiments in molecular genetics*. (N.Y: Cold Spring Harbor), pp. 352-355.
- Mossner, E., Huber-Wunderlich, M., Rietsch, A., Beckwith, J., Glockshuber, R., and Aslund, F. (1999). Importance of redox potential for the *in vivo* function of the cytoplasmic disulfide reductant thioredoxin from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 274, 25254-25259.
- Ota, I. M., and Varshavsky, A. (1993). A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science* 262, 566-569.
- Paget, M. S., and Buttner, M. J. (2003). Thiol-based regulatory switches. *Annu Rev Genet* 37, 91-121.

- Parkinson, J. S. (1995). Genetic approaches for signaling pathways and proteins, In Two-component signal transduction, J. A. Hoch, and T. J. Silhavy, eds. (Washington, D.C.: ASM press), pp. 9-24.
- Parkinson, J. S., and Kofoed, E. C. (1992). Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet* 26, 71-112.
- Peña-Sandoval, G. R., Kwon, O., and Georgellis, D. (2005). Requirement of the receiver and phosphotransfer domains of ArcB for efficient dephosphorylation of phosphorylated ArcA in vivo. *J Bacteriol* 187, 3267-3272.
- Prinz, W. A., Aslund, F., Holmgren, A., and Beckwith, J. (1997). The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem* 272, 15661-15667.
- Rabin, R. S., Collins, L. A., and Stewart, V. (1992). *In vivo* requirement of integration host factor for *nar* (nitrate reductase) operon expression in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8701-8705.
- Regeimbal, J., Gleiter, S., Trumpower, B. L., Yu, C. A., Diwakar, M., Ballou, D. P., and Bardwell, J. C. (2003). Disulfide bond formation involves a quinhydrone-type charge-transfer complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13779-13784.
- Rodriguez, C., Kwon, O., and Georgellis, D. (2004). Effect of D-lactate on the physiological activity of the ArcB sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186, 2085-2090.
- Salmon, K. A., Hung, S. P., Steffen, N. R., Krupp, R., Baldi, P., Hatfield, G. W., and Gunsalus, R. P. (2005). Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: effects of oxygen availability and ArcA. *J Biol Chem* 280, 15084-15096.
- Sawers, G., and Suppmann, B. (1992). Anaerobic induction of pyruvate formate-lyase gene expression is mediated by the ArcA and FNR proteins. *J Bacteriol* 174, 3474-3478.
- Schuster, S. C., Noegel, A. A., Oehme, F., Gerisch, G., and Simon, M. I. (1996). The hybrid histidine kinase DokA is part of the osmotic response system of *Dictyostelium*. *Embo J* 15, 3880-3889.
- Sengupta, N., Paul, K., and Chowdhury, R. (2003). The global regulator ArcA modulates expression of virulence factors in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 71, 5583-5589.
- Silverman, P. M., Wickersham, E., and Harris, R. (1991). Regulation of the F plasmid *traY* promoter in *Escherichia coli* by host and plasmid factors. *J Mol Biol* 218, 119-128.
- Stewart, V., Parales, J., Jr., and Merkel, S. M. (1989). Structure of genes *narL* and *narX* of the *nar* (nitrate reductase) locus in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 171, 2229-2234.
- Stock, A. M., Robinson, V. L., and Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69, 183-215.
- Swem, L. R., Gong, X., Yu, C. A., and Bauer, C. E. (2006). Identification of a ubiquinone-binding site that affects autophosphorylation of the sensor kinase RegB. *J Biol Chem* 281, 6768-6775.
- Swem, L. R., Kraft, B. J., Swem, D. L., Setterdahl, A. T., Masuda, S., Knaff, D. B., Zaleski, J. M., and Bauer, C. E. (2003). Signal transduction by the global regulator RegB is mediated by a redox-active cysteine. *Embo J* 22, 4699-4708.

- Taylor, B. L., and Zhulin, I. B. (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 479-506.
- Toledano, M. B., Delaunay, A., Monceau, L., and Tacnet, F. (2004). Microbial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends Biochem Sci* 29, 351-357.
- Unden, G., and Bongaerts, J. (1997). Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta* 1320, 217-234.
- Unden, G., and Trageser, M. (1991). Oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*: control of anaerobic respiration by the FNR protein. *Antonie Van Leeuwenhoek* 59, 65-76.
- Utsumi, R., Katayama, S., Taniguchi, M., Horie, T., Ikeda, M., Igaki, S., Nakagawa, H., Miwa, A., Tanabe, H., and Noda, M. (1994). Newly identified genes involved in the signal transduction of *Escherichia coli* K-12. *Gene* 140, 73-77.
- Wang, N., Shaulsky, G., Escalante, R., and Loomis, W. F. (1996). A two-component histidine kinase gene that functions in *Dictyostelium* development. *Embo J* 15, 3890-3898.
- Yaku, H., and Mizuno, T. (1997). The membrane-located osmosensory kinase, EnvZ, that contains a leucine zipper-like motif functions as a dimer in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 417, 409-413.
- Yuk, M. H., Cotter, P. A., and Miller, J. F. (1996). Genetic regulation of airway colonization by *Bordetella* species. *Am J Respir Crit Care Med* 154, S150-154.
- Zhulin, I. B., Taylor, B. L., and Dixon, R. (1997). PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem Sci* 22, 331-333.

## Lista de Abreviaturas

DTT	Ditiotreitol
$E^{\circ}$	Potencial redox standard
GSH	Glutación reducido
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MAL-PEG	Metoxi-polietilen glicol maleimida
MMTS	S-metil metanotiosulfonato
MOPS	Acido morfolinopropanosulfónico
Ni-NTA	Ácido nitrilo-tri-acético acoplado a Ni <sup>2+</sup> .
NBD-Cl	7-Cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
ONPG	<i>o</i> -nitrophenyl- $\beta$ -D-galactósido
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P <sub>i</sub>	Fosforo inorgánico
Q0	Quinona-O, análogo soluble de ubiquinona
SDC	Sistemas de transducción de señales de dos componentes
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS/PAGE	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
TCA	Ácido tricloroacético



## Lista de Figuras

	<b>Pag</b>
1. Estructura de los elementos del SDC Arc	7
2. Patrón de transducción y decaimiento de la señal por el SDC Arc	11
3. Sensibilidad de la actividad cinasa de ArcB a la óxido-reducción.	21
4. Efecto de la alquilación en la inhibición de ArcB por Q0 y cloramina T	23
5. Relevancia de los dos residuos de cisteína en la inhibición de ArcB por Q0	25
6. Estado redox de Cys-180 y Cys-241 en presencia de Q0 <i>in vitro</i> .	26
7. Dimerización de ArcB por la formación de enlaces disulfuro intermoleculares	28
8. Modelo de la inactivación de la cinasa sensora ArcB	34

**Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase**

Roxana Malpica, Bernardo Franco, Claudia Rodriguez, Ohsuk Kwon, and Dimitris Georgellis

*PNAS* 2004;101;13318-13323; originally published online Aug 23, 2004;  
doi:10.1073/pnas.0403064101**This information is current as of October 2006.**

<b>Online Information &amp; Services</b>	High-resolution figures, a citation map, links to PubMed and Google Scholar, etc., can be found at: <a href="http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/36/13318">www.pnas.org/cgi/content/full/101/36/13318</a>
<b>References</b>	This article cites 33 articles, 21 of which you can access for free at: <a href="http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/36/13318#BIBL">www.pnas.org/cgi/content/full/101/36/13318#BIBL</a>  This article has been cited by other articles: <a href="http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/36/13318#otherarticles">www.pnas.org/cgi/content/full/101/36/13318#otherarticles</a>
<b>E-mail Alerts</b>	Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article or <a href="#">click here</a> .
<b>Rights &amp; Permissions</b>	To reproduce this article in part (figures, tables) or in entirety, see: <a href="http://www.pnas.org/misc/rightperm.shtml">www.pnas.org/misc/rightperm.shtml</a>
<b>Reprints</b>	To order reprints, see: <a href="http://www.pnas.org/misc/reprints.shtml">www.pnas.org/misc/reprints.shtml</a>

Notes:

# Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase

Roxana Malpica\*, Bernardo Franco\*, Claudia Rodriguez\*, Ohsuk Kwon†, and Dimitris Georgellis\*\*

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

Edited by Susan Gottesman, National Institutes of Health, Bethesda, MD, and approved July 21, 2004 (received for review May 3, 2004)

***Escherichia coli* senses and signals anoxic or low redox conditions in its growth environment by the Arc two-component system. Under anaerobic conditions, the ArcB sensor kinase autophosphorylates and transphosphorylates ArcA, a global transcriptional regulator that controls the expression of numerous operons involved in respiratory or fermentative metabolism. Under aerobic conditions, the kinase activity of ArcB is inhibited by the quinone electron carriers that act as direct negative signals. Here, we show that the molecular mechanism of kinase silencing involves the oxidation of two cytosol-located redox-active cysteine residues that participate in intermolecular disulfide bond formation, a reaction in which the quinones provide the source of oxidative power. Thus, a pivotal link in the Arc signal transduction pathway connecting the redox state of the quinone pool to the transcriptional apparatus is elucidated.**

Two-component signal transduction systems are widespread in prokaryotes and play extensive roles in adaptation to environmental changes (1, 2). The Arc (anoxic redox control) two-component system is an important element in the complex transcriptional regulatory network that allows facultative anaerobic bacteria, such as *Escherichia coli*, to sense various respiratory growth conditions and adapt their gene expression accordingly (3). This system comprises the cytoplasmic response regulator ArcA and the transmembrane sensor kinase ArcB (4, 5). ArcA is a typical response regulator possessing an N-terminal receiver domain with a conserved Asp residue at position 54 and a C-terminal helix–turn–helix DNA binding domain. In contrast, ArcB is an unorthodox sensor kinase as manifested by its unusually elaborate architecture. As a sensor, ArcB is deviant because in contrast to typical sensor kinases that have a substantial periplasmic domain for environmental sensing, ArcB has a very short periplasmic sequence of only 16 amino acid residues delimited by two canonical transmembrane segments. Interestingly, the ArcB transmembrane domain (amino acids 22–77) does not directly participate in signal sensing but rather serves as an anchor that keeps the protein close to the source of the signal (6). As a kinase, ArcB is atypical because it contains three catalytic domains: an N-terminal transmitter domain with a conserved His-292 residue, a central receiver domain with a conserved Asp-576 residue, and a C-terminal phosphotransfer domain with a conserved His-717 residue (5, 7). Moreover, in the linker that is the region connecting the catalytic domains with the transmembrane domain, there are a putative leucine zipper (8) and a Per-Arnt-Sim (PAS) domain (9).

Under reducing conditions, ArcB undergoes ATP-dependent autophosphorylation, a process shown to be enhanced by certain anaerobic metabolites such as D-lactate, acetate, and pyruvate (10, 11), and transphosphorylates ArcA via a His-292 → Asp-576 → His-717 → Asp-54 phosphorelay (12, 13). 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 (4, 14, 15). Under nonstimulating conditions, ArcB acts as a specific ArcA-P phosphatase that catalyzes the dephosphorylation of ArcA-P by a reverse Asp-54 → His-717 → Asp-576 → Pi

phosphorelay (8). Recently, we reported that the quinone electron carriers act as the primary signals that silence the kinase activity of ArcB under aerobic conditions of growth (16). It was shown that the autophosphorylation of an N-terminally truncated ArcB protein (ArcB<sup>78–778</sup>) was inhibited by ubiquinone-0 (Q0, a soluble analog of ubiquinone-8) and less efficiently by menadione (a soluble analog of menaquinone-8). In agreement, in a *ubi* mutant blocked in the biosynthesis of ubiquinone-8, ArcB was active under aerobic growth conditions.

Here, we explore the molecular mechanism by which the oxidized forms of the quinone electron carriers inhibit the kinase activity of ArcB during aerobic growth.

## Materials and Methods

**Plasmids and Oligonucleotides.** Construction of plasmid pQE30ArcB<sup>78–778</sup> has been described earlier (12). To create pMX403 (ArcB<sup>78–778</sup>, C180A), the mutagenic primer 5'-CCATCGCGGGTTAGCGCCGGAAACTC-3' and primer 5'-AATATCGAGCAATGCTTCTG-3' were used in the PCR with pQE30ArcB<sup>78–778</sup> as template. The PCR product of this reaction was purified and used as a megaprimer in combination with primer 5'-CCCGATCCCATATGGAGCAACTGGAGGAGTACGAC-3' and pQE30ArcB<sup>78–778</sup> as template. The product of the second PCR was digested with *Pst*I and *Mlu*I, and the purified fragment was used to replace the *Pst*I and *Mlu*I wild-type fragment of pQE30ArcB<sup>78–778</sup>. To create pMX415 (ArcB<sup>78–778</sup>, C241A) and pMX405 (ArcB<sup>78–778</sup>, C180A, C241A), a similar strategy was followed, but with primer 5'-CGGATTTCAAAGGCGGCTTTGCGCCCG-3' and either pQE30ArcB<sup>78–778</sup> or pMX403 as template. Sequence verification of PCR-amplified DNA was performed by the Molecular Biology Unit, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

**Strain Construction.** Strains IFC 1001, IFC1002, and IFC1003 were constructed as follows. Plasmids pMX403 (ArcB<sup>78–778</sup>, C180A), pMX415 (ArcB<sup>78–778</sup>, C241A), and pMX405 (ArcB<sup>78–778</sup>, C180A, C241A) were digested with *Pst*I and *Mlu*I, and the mutation containing fragments were used to replace the *Pst*I and *Mlu*I fragment of pQE30ArcB<sup>1–778</sup> creating plasmids pMX431, pMX432, and pMX433, respectively. The *Bam*HI fragment of plasmid pIB3 (13) was cloned into plasmid pKO3 (17), in which the *Nde*I site had been inactivated by digestion and subsequent fill in reaction with T4 polymerase to create plasmid pMX434. The *Nde*I–*Nru*I fragment from plasmids pMX431, pMX432, and pMX433 were used to replace the *Nde*I–*Nru*I fragment of plasmid pMX434 creating plasmids pMX435, pMX436, and pMX437. These pKO3 derivatives were used to replace the chromosomal *arcB* allele of ECL5012 as described in ref. 17.

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

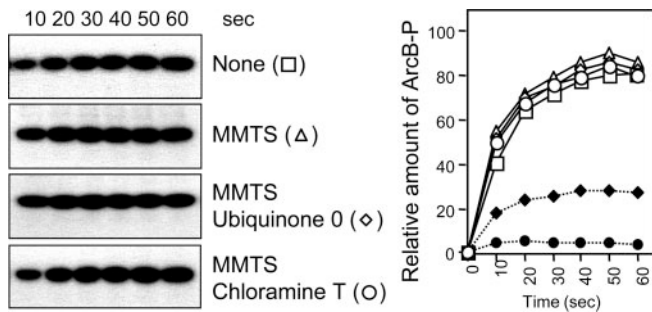
Abbreviations: Q0, ubiquinone-0; MMTS, S-methyl methanethiosulfonate; MAL-PEG, methoxy-polyethylene glycol maleimide; NBD-Cl, 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole.

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: dimitris@ifc.unam.mx.

© 2004 by The National Academy of Sciences of the USA





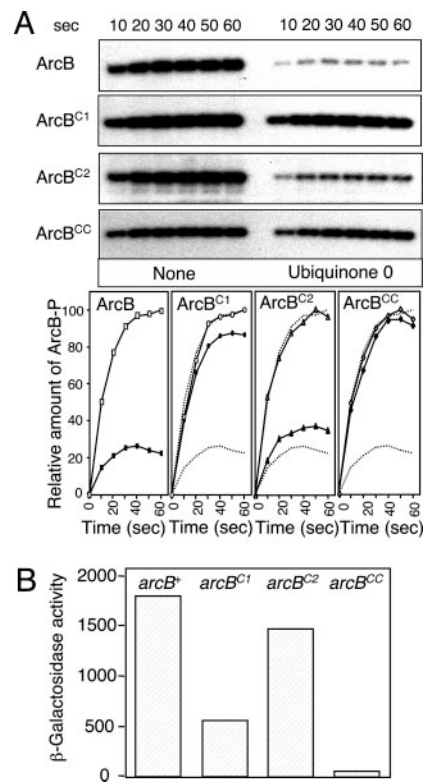


**Fig. 2.** Effect of alkylation on the inhibition of ArcB by Q0 and chloramine T. Purified ArcB<sup>78-778</sup> (50 pmol) was preincubated with MMTS (1 mM) for 30 min, and the kinetics of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP-dependent phosphorylation in the presence or absence of Q0 (0.250 mM) and chloramine T (0.1 mM) were assayed by SDS/PAGE. (Left) Autoradiograms of the gels. (Right) Time course of ArcB phosphorylation in the absence (□) or presence of Q0 (◆), chloramine T (●), MMTS (Δ), MMTS and Q0 (◇), or MMTS and chloramine T (○).

the membrane-permeating thiol-reductants during aerobiosis, and it has two unique cysteine residues (Cys-180 and Cys-241) in the linker region, we postulated that it might respond to changes in redox conditions through thiol oxidation and reduction. It is important to point out that both Cys-180 and Cys-241 are conserved in the ArcB homologues of different bacterial species including *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Yersinia pestis*, *Erwinia carotovora*, and *Photobacterium luminescens* (20–23). However, the ArcB homologue of *Haemophilus influenzae* represents an intriguing exception because it lacks almost the entire linker region, corresponding to amino acid residues 93–271 of *E. coli* ArcB (24), and therefore the two conserved cysteine residues. Nevertheless, in contrast with most other homologues that possess only two cysteine residues, ArcB of *H. influenzae* possesses five cysteine residues that are located at positions 47, 268, 472, 574, and 596 of the protein.

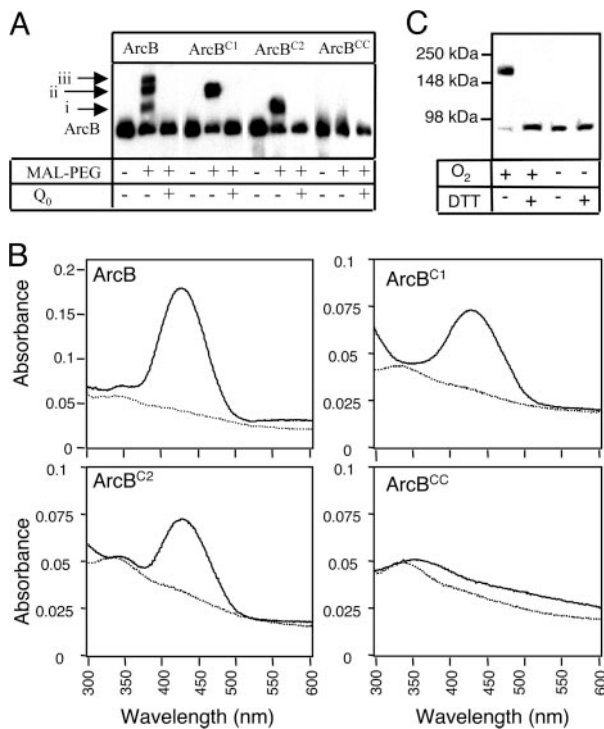
**Cys-180 and Cys-241 of ArcB Are Required for Kinase Silencing.** To test whether the two cysteine residues participate in the mechanism that controls the activity of ArcB, we took advantage of the fact that upon alkylation, cysteine residues are protected from further oxidation and are also unable to form disulfide bonds. Therefore, the effect of MMTS, which is a small, neutral, highly soluble molecule that reacts specifically with the free sulfhydryl groups on cysteine side chains to form Cys-S-CH<sub>3</sub>, was examined on the *in vitro* response of ArcB to Q0 and chloramine T (Fig. 2). MMTS *per se* did not affect the phosphorylation kinetics of ArcB, indicating that the ligand does not interfere with the activity of the protein. However, in contrast to the significant inhibition of the unprotected protein by Q0 and chloramine T (Fig. 1A), the MMTS-blocked protein was unresponsive to both Q0 and chloramine T (Fig. 2). It thus appears that free cysteine thiols are required for the action of the inhibiting agents, supporting the involvement of Cys-180 and/or Cys-241 in the mechanism for ArcB regulation.

To provide definite evidence for the participation of the two cysteine residues in the above mechanism, Cys-180 and/or Cys-241 were mutated to Ala. The resulting mutant peptides ArcB<sup>78-778, C180A</sup> (ArcB<sup>C1</sup>), ArcB<sup>78-778, C241A</sup> (ArcB<sup>C2</sup>), and ArcB<sup>78-778, C180A, C241A</sup> (ArcB<sup>CC</sup>) were purified and tested for their response to Q0 by *in vitro* [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP-dependent phosphorylation (Fig. 3A). In agreement with earlier results, Q0 drastically inhibited the phosphorylating activity of ArcB, which decreased to  $\approx$ 25%, compared with the one in the absence of Q0. In contrast, ArcB<sup>C1</sup> was barely affected by Q0 as it retained  $>$ 85% of its activity, confirming that Cys-180 plays a central role in the regulation of ArcB. On the other



**Fig. 3.** Requirement of the two cysteine residues for ArcB silencing by Q0. (A) A total of 50 pmol of purified ArcB<sup>78-778</sup> (ArcB), ArcB<sup>78-778, C180A</sup> (ArcB<sup>C1</sup>), ArcB<sup>78-778, C241A</sup> (ArcB<sup>C2</sup>), and ArcB<sup>78-778, C180A, C241A</sup> (ArcB<sup>CC</sup>) were incubated with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP in the presence or absence of Q0 (0.250 mM), and the net phosphorylation of the protein was assayed by SDS/PAGE. (Upper) Autoradiograms of the gels. (Lower) Net increase of protein-P with time in the absence (open symbols) or presence of Q0 (filled symbols). The kinetics of ArcB phosphorylation are depicted in all panels as dotted lines. (B) Aerobic expression of  $\lambda\Phi$ (*lldP'*-*lacZ*). Strains ECL5002 ( $\lambda\Phi$ [*lldP'*-*lacZ*] (6), IFC1001 (*arcB*<sup>C180A</sup> Kan<sup>r</sup>  $\lambda\Phi$ [*lldP'*-*lacZ*]), IFC1002 (*arcB*<sup>C241A</sup> Kan<sup>r</sup>  $\lambda\Phi$ [*lldP'*-*lacZ*]), and IFC1003 (*arcB*<sup>C180A, C241A</sup> Kan<sup>r</sup>  $\lambda\Phi$ [*lldP'*-*lacZ*]) were grown in Luria–Bertani broth containing 0.1M MOPS (pH 7.4) and 20 mM D-xylitol supplemented with 20 mM L-lactate as an inducer.  $\beta$ -Galactosidase activity was assayed and expressed in Miller units. The data are averages from four experiments (variations were  $<$ 10% from the mean).

hand, ArcB<sup>C2</sup> was significantly inhibited by Q0, retaining  $\approx$ 35% of its activity. However, despite the high degree of Q0-dependent inhibition, ArcB<sup>C2</sup> retained more of its activity than the wild-type ArcB, suggesting that Cys-241 might participate in the regulation of ArcB. Finally, no Q0-dependent inhibition was observed in the case of ArcB<sup>CC</sup>. Hence, our results confirm the requirement of at least Cys-180 for silencing the phosphorylating activity of ArcB and also indicate a probable involvement of Cys-241 in this process. They also suggest that there are no other oxidizable residues in the protein that are essential for its regulation. To verify the involvement of Cys-180 and Cys-241 in the *in vivo* regulation of ArcB, we replaced the chromosomal *arcB*<sup>+</sup> allele by *arcB*<sup>Cys180Ala</sup> (*arcB*<sup>C1</sup>), *arcB*<sup>Cys241Ala</sup> (*arcB*<sup>C2</sup>), or *arcB*<sup>Cys180Ala, Cys241Ala</sup> (*arcB*<sup>CC</sup>) in a strain bearing the ArcA-P-repressible  $\lambda\Phi$ (*lldP'*-*lacZ*) reporter, and their aerobic  $\beta$ -galactosidase activity levels were assayed (Fig. 3B). In agreement with the *in vitro* results, the expression of the reporter was slightly repressed in the *arcB*<sup>C2</sup> mutant strain but strongly repressed in the *arcB*<sup>C1</sup> and *arcB*<sup>CC</sup> mutant strains, as the  $\beta$ -galactosidase activity dropped, respectively, to  $\approx$ 84%,  $\approx$ 32%, and  $\approx$ 3.5% of its level in the wild-type strain. Thus, replacement of the



**Fig. 4.** Redox state of ArcB. (A) Tagging ArcB with MAL-PEG. Purified ArcB peptides (50 pmol), untreated or pretreated with 0.5 mM Q<sub>0</sub>, were incubated with 1 mM MAL-PEG at 25°C. After 1 h, the reactions were terminated and differences in the mobility of the tagged and the untagged proteins were visualized by Western blot analysis with specific ArcB polyclonal antibodies. (B) Spectroscopic characteristics of NBD-modified ArcB. Purified ArcB peptides (10 nmol) were pretreated with either 0.5 mM Q<sub>0</sub> or 10 mM DTT and incubated with NBD-Cl (1 mM). Final spectra (600 to 300 nm) were monitored after free NBD-Cl was removed by three cycles of concentration and redilution in a nanosep 10K. Solid line, pretreatment with DTT; dotted line, pretreatment with Q<sub>0</sub>. (C) Immunoblot analysis. Aerobically or anaerobically grown *E. coli* cells were harvested at an OD<sub>600</sub> ≈ 0.4–0.5 and treated with trichloroacetic acid to precipitate the proteins and stop further thiol/disulfide exchange. Precipitated proteins were dissolved in nonreducing SDS sample buffer and divided into two equal portions, one of which was treated with 100 mM DTT. Proteins were separated on nonreducing SDS/PAGE, followed by Western blot analysis with specific ArcB polyclonal antibodies. The 88-kDa band corresponds to the size of full-length ArcB monomer, and the 170-kDa band corresponds to an ArcB dimer.

cysteine residues in ArcB results in a highly active kinase even under aerobic conditions of growth. Hence, our *in vitro* and *in vivo* data confirm the requirement of the two cysteine residues for ArcB regulation, although Cys-180 appears to play a more decisive role in this process than Cys-241.

#### Both Cysteine Residues of ArcB Undergo Q<sub>0</sub>-Dependent Oxidation.

The oxidation status of the purified ArcB before and after treatment with Q<sub>0</sub> was then determined. The large molecular mass compound MAL-PEG ( $M_r = 5,000$ ), which forms covalent adducts with free thiol groups, was used to covalently tag ArcB that was reduced at cysteine residues. It is noteworthy that, although maleimides react also with amino groups, the reaction with SH groups is ≈ 1,000 times more rapid at neutral pH. The wild type and the three mutant ArcB peptides (ArcB, ArcB<sup>C1</sup>, ArcB<sup>C2</sup>, and ArcB<sup>CC</sup>) were treated with MAL-PEG and fractionated by SDS/PAGE, and the protein was detected by Western blot analysis (Fig. 4A). It was found that treatment of ArcB with MAL-PEG resulted in three shifted complexes (i, ii, and iii), indicating pegylation of ArcB at more than one site. However, treatment of ArcB<sup>C1</sup> with MAL-PEG yielded only one

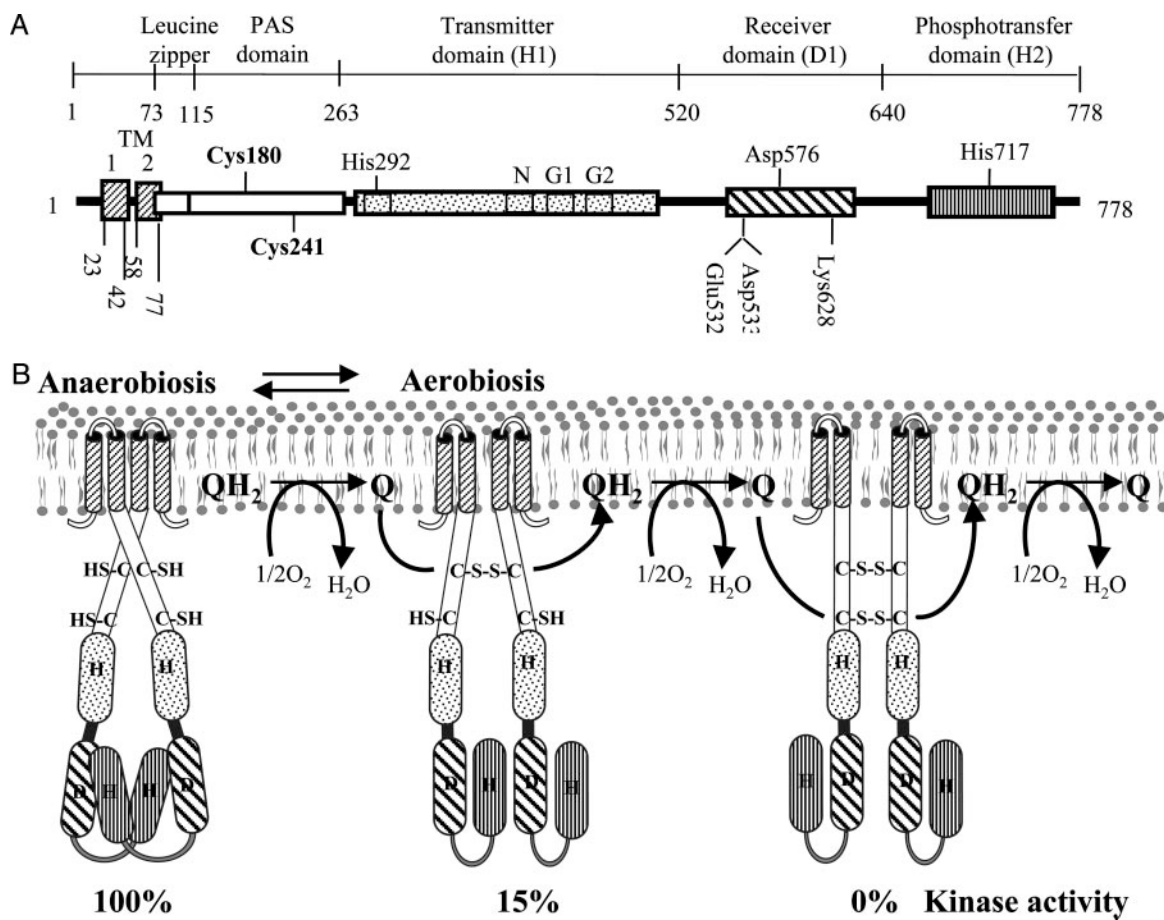
complex with the same apparent mobility as complex ii. Likewise, treatment of ArcB<sup>C2</sup> with MAL-PEG yielded a complex migrating at the same position as complex i. In contrast, treatment of ArcB<sup>CC</sup> with MAL-PEG did not yield any complex, confirming the specificity of the reaction. Thus, ArcB pegylated at both cysteine residues corresponds to complex iii, in accord with the expectation to exhibit the slowest mobility. The anomalous mobility of ArcB<sup>C1</sup>-PEG and ArcB<sup>C2</sup>-PEG is most likely due to changes in the fold of the two adducts resulted by the different positioning of MAL-PEG on the mutant peptides. Finally, when the proteins were first treated with Q<sub>0</sub> and then incubated with MAL-PEG, no complex formation was attained, verifying that both cysteine residues undergo Q<sub>0</sub>-dependent oxidation that readily blocks formation of covalent adducts with MAL-PEG.

#### ArcB Dimerizes Through Intermolecular Disulfide Bond Formation.

We next attempted to identify the chemical nature of the oxidized cysteine intermediates. The pathway for thiol oxidation begins with the formation of sulfenic acid (-SOH), which rapidly condenses to form disulfide bonds (-S-S-). In proteins, however, steric hindrance may prevent an oxidized thiol from forming a disulfide, and a stable sulfenic acid intermediate is sustained. Cysteine sulfenic acids have been proposed as intermediates in a number of catalytic and regulatory proteins (25) but have been difficult in identifying because of their inherent instability (26). Nevertheless, reaction between the electrophilic reagent NBD-Cl with reduced thiols and sulfenic acids in proteins have been shown to lead to the covalent incorporation of spectroscopically detectable conjugates with absorption maxima at 420 and 347 nm, respectively (27). Therefore, to examine whether a stable sulfenic acid is formed in ArcB, DTT-reduced or Q<sub>0</sub>-treated ArcB was reacted with NBD-Cl, and the absorbance characteristics of the resulting NBD adducts were determined (Fig. 4B). As expected, the reaction of NBD-Cl with the DTT-treated protein formed a conjugate with maximal absorbance at 420 nm, characteristic for Cys-S-NBD. On the other hand, when NBD-Cl was incubated with the Q<sub>0</sub>-treated ArcB, the spectra showed neither the Cys-S-NBD peak at 420 nm nor the Cys-S(O)-NBD species at 347 nm. This is consistent with the formation of either an intramolecular or two intermolecular disulfide bonds that result in the blockage of the thiols of both cysteine residues from reacting with NBD-Cl. In agreement, the DTT-treated ArcB<sup>C1</sup> and ArcB<sup>C2</sup> both formed the Cys-S-NBD adduct with maximal absorbance at 420 nm, but the Q<sub>0</sub>-treated proteins failed to form a detectable adduct with NBD-Cl (Fig. 4B). In contrast, neither the DTT- nor the Q<sub>0</sub>-treated ArcB<sup>CC</sup> formed a detectable adduct with NBD-Cl, confirming the specificity of the reaction. Thus, it appears that the two cysteine residues participate in intermolecular disulfide-bond formation.

We therefore examined whether disulfide-bond formation in ArcB occurs *in vivo*. To this end, anaerobic or aerobic grown *E. coli* cells were treated with 10% trichloroacetic acid to denature the cellular proteins, a process that effectively fixes ArcB sulfhydryls into their oxidized or reduced states. Subsequently, the cellular proteins were subjected to nonreducing SDS electrophoresis followed by Western blot analysis with ArcB-specific antibodies. The extracts from anaerobically grown cells revealed a single ≈ 88-kDa band, corresponding to the size of full-length ArcB monomer. However, in the aerobic extracts, the predominant portion of ArcB migrated as an ≈ 170-kDa dimer, the mobility of which was shifted to that of the monomer upon treatment with DTT (Fig. 4C). Hence, the two cysteine residues in ArcB participate in intermolecular disulfide bond formation, leading to dimerization and thereby silencing of its kinase activity.





**Fig. 5.** The ArcB sensor kinase and a model for its redox regulation. (A) Schematic representation of ArcB. The linker region contains a putative leucine zipper (8) and a Per-Arnt-Sim (PAS) domain (9). Depicted, in the linker region, are also the cysteine residues 180 and 241. The primary transmitter domain (H1) contains the conserved His-292 and the catalytic determinants N, G1, and G2. The G1 and G2 sequences typify nucleotide-binding motifs. The receiver domain (D1) contains the conserved Asp-576, and the phosphotransfer domain (H2) contains the conserved His-717. (B) A simplified model for ArcB inactivation. Upon a shift from anaerobic to aerobic conditions of growth, the quinone pool shifts to its oxidized state. This allows the electron transfer from the Cys-180 of ArcB to quinones that leads to the formation of an intermolecular disulfide bond between the Cys-180 of two monomers, and results in a significant reduction of the kinase activity of ArcB. As the electrons rapidly flow toward  $O_2$  via either cytochrome *bd* or *bo* oxidase, the quinone pool maintains its oxidized state and induces the formation of a second disulfide bond between the two Cys-241, resulting in the complete silencing of the ArcB kinase activity.

**ArcB Is Oxidized Specifically by Quinones.** Because the activity of many redox-regulated proteins appears to be controlled by  $H_2O_2$ -induced disulfide bond formation, we examined the effect of this oxidant on the activity of ArcB. Curiously,  $H_2O_2$  did not affect the *in vitro* phosphorylation of ArcB (Fig. 1A). Also, addition of elevated  $H_2O_2$  concentrations (0.1–2 mM) in an anaerobic culture did not affect the expression of the ArcA-P repressible  $\lambda\Phi(lldP'-lacZ)$  reporter, verifying the *in vitro* result (data not shown). On the other hand, shifting the anaerobic culture to aerobiosis led to an instantaneous increase in reporter expression (data not shown). In this respect, it has to be mentioned that although molecular oxygen *per se* does not have a direct effect on the activity of ArcB (28), its presence leads to the oxidation of the quinone electron carriers that in turn inhibit ArcB phosphorylation. In fact, quinones have been shown to efficiently oxidize the periplasmic located cysteine residues of DsbB, a membrane-bound protein that is a central component in thiol oxidation reactions (29). Hence, ArcB is not only insensitive to molecular oxygen but also to the aerobic byproduct  $H_2O_2$  and therefore seems to have evolved to specifically sense the oxidized forms of the quinone electron carriers.

## Discussion

We have provided evidence that the molecular event of redox signaling by ArcB is intermolecular disulfide bond formation and

reduction, a reaction in which quinones act as direct oxidants. Despite that the cytosol of both prokaryotic and eukaryotic cells provides a highly reducing environment, which is almost untenable for disulfide bond formation (30, 31), a number of cytoplasmic proteins that are regulated by reversible disulfide bond formation are known. Some examples include the transcriptional factors Yap1p in *Saccharomyces cerevisiae*, OxyR and the chaperone Hsp33 in *E. coli*, and the CtrJ and the membrane-bound kinase RegB in *Rhodobacter capsulatus* (31–36). However, our *in vivo* and *in vitro* analyses indicate that disulfide bond formation in ArcB may differ from that of the other redox regulators in that it appears to respond specifically to the oxidized forms of quinones rather than to molecular oxygen or to reactive-oxygen species such as  $H_2O_2$ .

*E. coli* expresses branched electron-transfer chains that can deal with various electron donors and several alternative electron acceptors. A central component in these networks is the quinone pool that acts as a redox mediator. That is to act both as collector of electrons from dehydrogenases and as donor to reductases and oxidases, thereby serving as the crossroad of electron transfer. As such, its redox state will change rapidly in response to variations in external conditions that affect electron flow in the electron-transfer chains, for example a shift from anaerobiosis to aerobiosis. In this case, the electrons will rapidly

flow toward O<sub>2</sub>, and the quinone pool will shift to its oxidizing state. This will enable the electron transfer from the cysteine residues of ArcB to quinones, which will result in disulfide bond formation and immediate silencing of the kinase activity of the protein (Fig. 5). This apparently simple mechanism will allow a rapid response of bacterial cells to their environment, as the redox signals will be instantly transduced into the transcriptional apparatus.

Thus, thiol oxidation and reduction in the cytosolic portion of ArcB provides a pivotal link in the Arc signal transduction

pathway that connects the redox state of the quinone pool to the transcriptional apparatus.

We thank E. C. C. Lin, F. Åslund, D. González-Halphen, R. Pérez-Montfort, A. Gómez-Puyou, N. Sánchez, A. Peña, and B. Michel for advice and/or for critically reading the manuscript. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant 37342-N, National Institutes of Health Research Grant R03 TW06003, and Korean Ministry of Science and Technology Grant M1-0311-00-0081.

- Parkinson, J. S. & Kofoid, E. C. (1992) *Annu. Rev. Genet.* **26**, 71–112.
- Hoch, J. A. & Silhavy, T. J. (1995) *Two-Component Signal Transduction* (Am. Soc. Microbiol., Washington, DC).
- Lynch, A. S. & Lin, E. C. (1996) in *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, eds. Neidhardt, F. C., Curtis, R., III, Ingraham, A. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., & Umberger, H. E. (Am. Soc. Microbiol., Washington, DC), pp. 1526–1538.
- Iuchi, S. & Lin, E. C. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1888–1892.
- Iuchi, S., Matzuda, Z., Fujiwara, T. & Lin, E. C. (1990) *Mol. Microbiol.* **4**, 715–727.
- Kwon, O., Georgellis, D., Lynch, A. S., Boyd, D. & Lin, E. C. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 2960–2966.
- Ishige, K., Nagasawa, S., Tokishita, S. & Mizuno, T. (1994) *EMBO J.* **13**, 5195–5202.
- Georgellis, D., Kwon, O., De Wulf, P. & Lin, E. C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 32864–32869.
- Taylor, B. L. & Zhulin, I. B. (1999) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 479–506.
- Georgellis, D., Kwon, O. & Lin, E. C. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 35950–35954.
- Rodríguez, C., Kwon, O. & Georgellis, D. (2004) *J. Bacteriol.* **186**, 2085–2090.
- Georgellis, D., Lynch, A. S. & Lin, E. C. (1997) *J. Bacteriol.* **179**, 5429–5435.
- Kwon, O., Georgellis, D. & Lin, E. C. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 3858–3862.
- Brondsted, L. & Atlung, T. (1994) *J. Bacteriol.* **176**, 5423–5428.
- Lynch, A. S. & Lin, E. C. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 6238–6249.
- Georgellis, D., Kwon, O. & Lin, E. C. (2001) *Science* **292**, 2314–2316.
- Link, A. J., Phillips, D. & Church, G. M. (1997) *J. Bacteriol.* **179**, 6228–6237.
- Gelman, M. S. & Prives, J. M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10709–10714.
- Lodish, H. F. & Kong, N. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 20598–20605.
- McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., *et al.* (2001) *Nature* **413**, 852–856.
- Jin, Q., Yuan, Z., Xu, J., Wang, Y., Shen, Y., Lu, W., Wang, J., Liu, H., Yang, J., Yang, F., *et al.* (2002) *Nucleic Acids Res.* **30**, 4432–4441.
- Parkhill, J., Wren, B. W., Thomson, N. R., Titball, R. W., Holden, M. T., Prentice, M. B., Sebaihia, M., James, K. D., Churcher, C., Mungall, K. L., *et al.* (2001) *Nature* **467**, 523–527.
- Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., Bocs, S., Boursaux-Eude, C., Chandler, M., Charles, J. F., *et al.* (2003) *Nat. Biotechnol.* **11**, 1307–1313.
- Manukhov, I. V., Bertsova, Y. V., Trofimov, D. Y., Bogachev, A. V. & Skulachev, V. P. (2000) *Biochemistry (Moscow)* **65**, 1321–1326.
- Claiborne, A., Miller, H., Parsonage, D. & Ross, R. P. (1993) *FASEB J.* **7**, 1483–1490.
- Kice, J. L. (1980) *Adv. Phys. Org. Chem.* **17**, 65–181.
- Ellis, H. R. & Poole, L. B. (1997) *Biochemistry* **36**, 15013–15018.
- Iuchi, S., Chepuri, V., Fu, H. A., Gennis, R. B. & Lin, E. C. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 6020–6025.
- Bader, M., Muse, W., Ballou, D. P., Gassner, C. & Bardwell, J. C. (1999) *Cell* **98**, 217–227.
- Gilbert, H. F. (1990) in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, ed. Meister, A. (Wiley, New York), pp. 69–172.
- Hwang, C., Sinksy, A. J. & Lodish, H. F. (1992) *Science* **257**, 1496–1502.
- Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y. & Nomoto, A. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6139–6150.
- Zheng, M., Åslund, F. & Storz, G. (1998) *Science* **279**, 1718–1721.
- Jakob, U., Muse, W. & Bardwell, J. C. A. (1999) *Cell* **96**, 341–352.
- Masuda, S., Dong, C., Swem, D., Setterdahl, A. T., Knaff, D. B. & Bauer, C. E. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 7078–7083.
- Swem, L. R., Kraft, B. J., Swem, D. L., Setterdahl, A. T., Masuda, C., Knaff, D. B., Zaleski, J. M. & Bauer, C. E. (2003) *EMBO J.* **22**, 4699–4708.