



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE REGULACIÓN DE
ArcB: PAPEL DE LAS VÍAS REDUCTORAS DE TIORREDOXINAS Y
GLUTARREDOXINAS EN LA ACTIVACIÓN DE LA CINASA ArcB**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

LUIS ALBERTO NÚÑEZ OREZA

TUTOR PRINCIPAL

**DR. DIMITRIS GEORGELLIS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DRA. CÁRMEN GÓMEZ EICHELMANN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**DR. FELIPE CRUZ GARCÍA
FACULTAD DE QUÍMICA**

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2014



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. Carmen Gómez Eichelmann y del Dr. Felipe Cruz Gómez. Durante la realización del mismo, Luis Alberto Núñez Oreza fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de becario195605).

Este trabajo fue financiado por los donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT 178033 y la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (PAPIIT-UNAM IN206412).

Agradezco al Dr. en C. Adrián Álvarez, a la M. en C. Claudia Rodríguez Rangel y al Sr. Pedro Hernández Trujillo por la asistencia técnica otorgada durante la realización de este trabajo.

Agradezco a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por la síntesis de oligonucléotidos y secuenciación.

Dedicatorias

A la memoria de Mamá **Elsy**, por tus bendiciones y apoyo incondicional en cada una de las metas emprendidas y por tus sabios consejos. Gracias mamá

A la memoria de Papá **Alberto**, porque desde el cielo me alientas a continuar siempre hacia adelante.

A la memoria de mi hermano **Adrián**, un ser humano noble y honesto en la vida y que siempre conté con tu ayuda y amistad.

A **Fabiola**, por todo lo que has dado a nuestra vida. Gracias amor

A **Mariana, Gabriel y Leonardo**, mis niños que son los amores más importantes en mi vida y que me llenan de energía para continuar siempre hacia adelante. Gracias niños

Agradecimientos

Al Dr. Dimitris Georgellis, por la oportunidad brindada, su invaluable y total apoyo, así como las enseñanzas durante todo el programa, por lo cual logré culminar el doctorado. Gracias Dimitris.

A los Dres. Cármen Gómez Eichelmann y Felipe Cruz García, miembros del Comité Tutorial; por su asesoría, aportaciones, valiosos comentarios y sugerencias durante mi estancia en el posgrado.

A los Dres. Elda Guadalupe Espín Ocampo, Bertha González Pedrajo, Roberto Coria Ortega, Herminia Loza Tavera y Jesús Javier Espinosa Aguirre; 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.

Al Dr. González Halphen, por sus consejos siempre importantes, apoyo otorgado, calidad humana y enseñanzas.

Al Dr. Adrián Álvarez, porque su apoyo y solidaridad fue de enorme ayuda para la culminación de este proyecto. Gracias Adrián

A la M. en C. Claudia Rodríguez Rangel y Q.F.B. Miriam Vázquez Acevedo por su incondicional disposición técnica y humana.

A todos mis compañeros miembros del laboratorio: Claudia, Itzel, Roxana, Gaby, Claudita, Vero, Anita, Adrián, Pedro, Carlos, Ricardo, Óscar, Yael, Alexa, Aracely, Francisco, Valentín, Alaín, y a todos los que me hicieron falta, gracias por las vivencias inolvidables que pasamos juntos.

Índice

	Página
Resumen	7
Abstract.....	8
Introducción	9
Sistemas de transducción de señales de dos componentes en bacterias	9
Elementos de un sistema de dos componentes típico	10
Modelo de señalización de un sistema de dos componentes típico	10
El Sistema de dos componentes Arc	11
El control global mediado por el SDC Arc.....	12
La proteína reguladora de respuesta ArcA.....	13
La proteína sensora ArcB	13
Segmentos transmembranales de ArcB	14
El “zipper” de leucinas.....	15
El dominio PAS	17
Dominios catalíticos	17
El modelo de señalización de ArcB.....	18
Vía de las tiorredoxinas y glutarredoxinas en <i>Escherichia coli</i>	23
Justificación.....	25
Objetivos.....	26
Materiales y Métodos	27
Plásmidos y oligonucleótidos	27
Construcción de cepas mutantes en vías Trx y/o Grx.	30
Medios y condiciones de crecimiento.	32
Preparación de células competentes.....	33
Transformación	33
Construcción de cepas simples o dobles mutantes en las vías de las Trx o Grx.	34
Mantenimiento de cepas bacterianas.....	34
Preparación de las vesículas de membrana enriquecidas con ArcB	34
Ensayos de fosforilación de ArcB.....	35
Análisis Western Blot.....	36
Ensayos de complementación de las cepas mutantes en ArcB <i>in vivo</i>	36

Ensayos de cepas mutantes en Trx y/o Grx.....	36
Ensayos de la actividad de β -galactosidasa	37
Modelo estructural del “zipper” de leucinas.....	38
Resultados.....	39
Análisis de secuencia de la región transmembranal de ArcB	39
Análisis <i>in vivo</i> de la mutación de ArcB ^{P67A}	40
Análisis de la secuencia del “zipper” de leucinas de ArcB	42
Análisis <i>in vivo</i> de la funcionalidad del “zipper” de leucinas.....	44
Análisis Western Blot.....	52
Ensayos de fosforilación de ArcB.....	53
Análisis de los fenotipos dominante negativo	54
Análisis de la actividad de fosfatasa	57
Las tiorredoxinas y/o glutarredoxinas no tienen efecto en la activación de ArcB	59
Discusión	62
Conclusiones	67
Perspectivas	67
Artículo	68
Referencias Bibliográficas.....	77

Resumen

El sistema de dos componentes Arc está compuesto por la cinasa sensora ArcB y el regulador de respuesta ArcA. En *Escherichia coli*, este sistema regula la red transcripcional implicada en el metabolismo energético, acorde a las condiciones de óxido-reducción del medio. En condiciones anóxicas de crecimiento, ArcB se autofosforila y transfosforila a ArcA, el cual reprime o activa la expresión de sus operones blanco. En condiciones aeróbicas, ArcB actúa como una fosfatasa, catalizando la defosforilación de ArcA-PO₃²⁻ e inactivándolo como regulador transcripcional.

Este estudio demuestra que el segmento de la proteína ArcB, que abarca los residuos de aminoácidos 70-121, cumple con las características moleculares de un “zipper” de leucinas que contiene una estructura super-enrollada. Además, el análisis mutacional de este segmento revela tres efectos fenotípicos diferentes, distribuidos a lo largo de la estructura super-enrollada de ArcB, demostrándose que este motivo es esencial para la apropiada señalización de la proteína. Asimismo, el residuo iminoácido de prolina, localizado en el segundo segmento transmembranal de la proteína, es necesario para su adecuada regulación redox. Finalmente, las proteínas de la vía de las tiorredoxinas y/o glutarredoxinas que reducen los puentes disulfuro en el citosol de la bacteria, no están involucradas en la activación de la cinasa sensora ArcB.

Abstract

The Arc two-component system comprises the sensor kinase ArcB and the response regulator ArcA. In *Escherichia coli*, this system regulates the transcriptional network involved in energy metabolism according to the redox conditions of its environment. Under anoxic growth conditions, ArcB autophosphorylates and transphosphorylates ArcA, which in turn represses or activates the expression of its target operons. Under aerobic conditions, ArcB acts as a phosphatase that catalyzes the dephosphorylation of ArcA-PO₃²⁻ and thereby releasing its transcriptional regulation.

This study shows that the ArcB protein segment covering residues 70-121, fulfills the molecular characteristics of a leucine zipper containing α coiled coil structure. Also, mutational analyses of this segment reveal three different phenotypical effects to be distributed along the coiled coil structure of ArcB, demonstrating that this motif is essential for proper ArcB signaling. In addition, the iminoacid residue of proline located into the second transmembrane segment of the protein, shown to be required for its correct redox regulation. Finally, the thioredoxins and/or glutaredoxins pathways that reduce disulfide bonds in the cytosol of the bacteria are not involved in the activation of kinase sensor ArcB.

Introducción

Sistemas de transducción de señales de dos componentes en bacterias

En las células procariotas, la adaptación adecuada para sobrevivir a las diversas condiciones ambientales que enfrentan, la realizan mediante estrategias de señalización que les permite reconocer y responder ante ellas (33, 91), a través de los sistemas de transducción de señales de dos componentes (SDC). Los SDC están formados por una cinasa sensora encargada de detectar la señal, y por una proteína reguladora de respuesta, cuyo control lo realiza a nivel transcripcional, procesos que requieren de la fosforilación y desfosforilación de las dos proteínas del sistema (71, 72).

Actualmente, estos sistemas han sido encontrados en los tres dominios de la vida: bacteria, arquea y eucaria (33, 91). Aunque en las bacterias están ampliamente distribuidos, en eucaria su distribución es limitada, y sólo se han encontrado en hongos como *Saccharomyces cerevisiae* y *Neurospora crassa* (2, 71), en plantas como *Arabidopsis thaliana* (14) y en el protozoo *Dictyostelium discoideum* (83, 107).

En bacterias, los SDC regulan una gran cantidad de procesos como quimiotaxis y captación de nutrientes (nitrógeno, fósforo, carbono), metabolismo energético, adaptación a variables físicas y químicas del ambiente (pH, osmolaridad, calidad de luz), entre otros (9, 32, 33, 72, 91, 110). En *E. coli*, se han reportado 29 cinasas y 32 proteínas reguladoras de respuesta (68).

Elementos de un sistema de dos componentes típico

Un SDC típico está formado por una cinasa sensora (CS) y una proteína reguladora de respuesta (RR). Una proteína sensora típica, se encuentra anclada a la membrana interna de la célula por su extremo amino terminal a través de dos segmentos transmembranales que delimitan un dominio periplásmico de aproximadamente 150 residuos de aminoácidos, y que la separa de su dominio carboxilo terminal, el cual se proyecta dentro del citoplasma, donde contiene un dominio transmisor caracterizado por un núcleo cinasa que posee un residuo aminoacídico conservado de histidina. Con relación a la proteína reguladora de respuesta típica, ésta se encuentra en el citosol y está formada en su extremo amino por un dominio receptor con un residuo aminoacídico conservado de aspartato, y en su extremo carboxilo por un dominio de respuesta (71, 72).

Modelo de señalización de un sistema de dos componentes típico

En un modelo canónico de transducción de señales, cuando la cinasa sensora capta su señal mediante el “puente” periplásmico, la proteína sensora sufre de cambios conformacionales que estimulan su autofosforilación dependiente de ATP en el residuo de histidina de su dominio transmisor. La cinasa fosforilada transfiere su grupo fosforilo al residuo de aspartato del dominio receptor de la proteína reguladora de respuesta, el cual una vez fosforilado funciona como regulador transcripcional. Cuando la señal decae, ambas proteínas del SDC se desfosforilan, silenciando al sistema. Hoy en día, se conocen sistemas de dos componentes de mayor complejidad que un SDC típico, donde la señalización involucra cinasas sensoras híbridas o multipartitas, que contienen tanto al dominio transmisor como al receptor, o a proteínas adicionales que participan como componentes del fosforelevo (72, 73, 92).

El Sistema de dos componentes Arc

En *E. coli*, la respiración aeróbica es preferida porque el oxígeno tiene un alto potencial redox ($E^{\circ'}=+820$ mV), siendo las ubiquinonas ($E^{\circ'}=+100$ mV) el acarreador de electrones entre el donador y el aceptor de electrones. En ausencia de oxígeno, los aceptores de electrones son el nitrato ($E^{\circ'}=+420$ mV), fumarato ($E^{\circ'}=+31$ mV), nitrito, o trimetil-amina-N-óxido ($E^{\circ'}=+0.013$ mV) usando las menaquinonas ($E^{\circ'}=-74$ mV) y dimetil-menaquinonas ($E^{\circ'}=+36$ mV) como intermediarios. Cuando no existe ningún aceptor de electrones, *E. coli* genera su energía vía fermentativa, produciendo metabolitos como D-Lactato, acetato, formato, fumarato, etanol y CO₂ (10, 100).

El SDC Arc, denominado así por el acrónimo “Anoxic Redox Control”, regula transcripcionalmente a más de 300 operones y es crucial en la regulación del metabolismo de energía y de otras funciones importantes, acorde a la condiciones redox de crecimiento de la bacteria (52). En anaerobiosis, el sistema ArcA/B (37, 38) en conjunto con el regulador transcripcional FNR (48) y los SDC NarX/L y NarQ/P (90), controlan el metabolismo de energía. La regulación de la utilización del nitrato, que es el aceptor de electrones preferido en condiciones anóxicas es modulada por los SDC NarX/L (88) y NarQ/P (77). La regulación transcripcional está mediada por FNR, proteína formada por un dominio carboxilo-terminal de unión a ADN y un dominio amino-terminal, con cuatro residuos de cisteína capaces de unirse al centro [4Fe-4S] que en condiciones aeróbicas es oxidado por el O₂, generando su inactivación (99); mientras que en condiciones anaeróbicas, su centro [4Fe-4S] se mantiene intacto, favoreciendo su dimerización, y en consecuencia su funcionamiento como regulador transcripcional (101). De esta forma, FNR regula la expresión de genes que codifican componentes de la cadena de transporte de electrones y con función aeróbica.

El control global mediado por el SDC Arc

El sistema Arc (52), controla numerosos operones involucrados en el metabolismo redox. Este sistema reprime la expresión de varios genes y operones cuyos productos tienen función aeróbica, tales como algunas enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos, 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) (38). 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 a la piruvato formato liasa, son ejemplos de genes cuya expresión es regulada positivamente por Arc (18, 82).

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 (41, 85), la recombinación específica del sitio psi (15) y la inhibición de la replicación cromosomal (50). Estudios bioquímicos y bioinformáticos han demostrado la existencia de una región consenso de unión de ArcA-PO₃²⁻ al DNA (54, 60).

Recientes estudios bioinformáticos y basados en microarreglos 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*) (52, 81).

Además, en algunos patógenos importantes de humanos, Arc está implicado en la regulación directa o indirecta de la virulencia. Por ejemplo, en *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, se conoce que Arc controla la resistencia a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (53); en *Haemophilus influenzae*, modula la expresión de proteínas membranales involucradas en la resistencia al suero (19); y en *Vibrio cholerae*, regula la expresión de factores de virulencia (84).

La proteína reguladora de respuesta ArcA

El gen *arcA* anteriormente conocido como gene *dye* (20), codifica un polipéptido de 238 aminoácidos (29 kDa). Al comparar su secuencia con la de otras proteínas bacterianas, ésta corresponde a la de una proteína reguladora de respuesta típica que consiste en el extremo amino de un dominio receptor y en el extremo carboxilo de un dominio de unión a DNA hélice-vuelta-hélice (H-V-H) (38). El dominio receptor de ArcA contiene los residuos Glu10, Asp11 y Asp54, que en la estructura cristalizada de la proteína homóloga CheY forman un compartimiento ácido; también contiene la Lys103, que se encuentra en todas las proteínas reguladoras de respuesta (105). El sitio de fosforilación de ArcA se ubica en el residuo Asp54.

La estructura cristalizada amino terminal del dominio receptor de ArcA demostró que mientras el dominio receptor no fosforilado existe como un monómero en solución, ArcA fosforilado tiene tendencia por la dimerización. Asimismo, se observó que su dominio de unión a ADN se asocia en oligómeros más grandes que los tetrámeros, permitiendo sugerir, que la dimerización de la proteína ArcA, puede al menos en parte estar mediada por el dominio de unión a ADN y que el dominio regulador no fosforilado puede inhibir la oligomerización (97). La expresión de *arcA* es cuatro veces mayor durante la anaerobiosis que en aerobiosis (38), lo cual es un efecto directamente dependiente de la proteína reguladora Fnr (16).

La proteína sensora ArcB

ArcB, es una cinasa sensora híbrida tripartita de 778 aminoácidos (88 KDa), formada por dos segmentos transmembranales unidos por un puente periplásmico (42), un “zipper” de leucinas putativo (26), un dominio PAS (95) y los dominios catalíticos citosólicos H1, D1 y H2 (36, 40). Esta cinasa pertenece a la subclase de cinasas sensoras híbridas que también incluyen a BarA, BvgS, EvgS, LemA (GacS), RteA y TorS (5, 35, 67, 86, 87, 104).

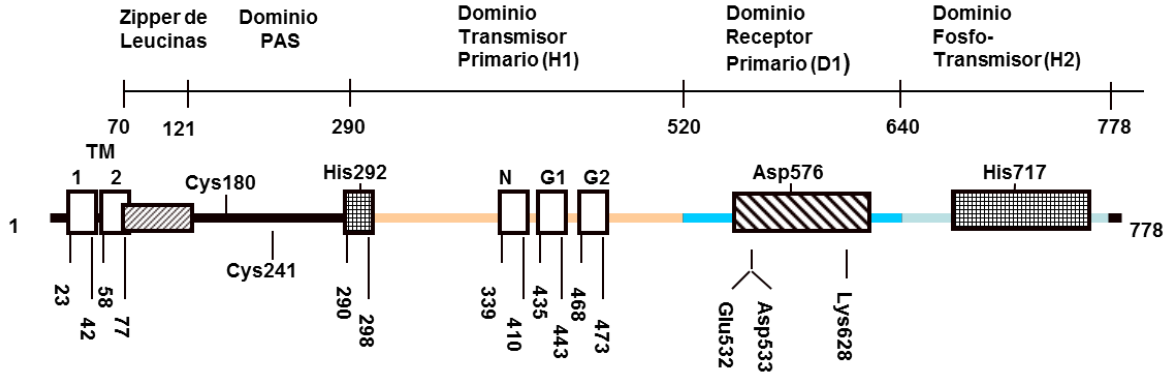


Figura 1. Representación esquemática de la proteína sensora ArcB (Modificado de 24). ArcB contiene la región linker formada por un zipper de leucina putativo y un dominio PAS. En esta región también están los residuos Cys180 y Cys241. El dominio transmisor primario (H1) contiene al residuo conservado His292 y los determinantes catalíticos N, G1 y G2. El dominio receptor (D1) contiene el residuo conservado Asp576 y el dominio de fosfo-transferencia (H2) que contiene al residuo conservado His717.

Segmentos transmembranales de ArcB

El análisis hidrofóbico computarizado de la secuencia de la cinasa muestra dos segmentos transmembranales (residuos 23-41 y 58-77) (42), que funcionan como anclaje, para mantener a la proteína ArcB unida a la membrana interna de la célula. Ambos segmentos transmembranales están separados por un puente periplásmico de 16 residuos de aminoácidos (42, 47), el cual no participa en la recepción de la señal (47). Después del segundo segmento transmembranal, se encuentra una región "linker" que contiene un zipper de leucinas putativo (26) y un dominio PAS (95). Esta región "linker" se conecta con el primer dominio catalítico de los tres que contiene la cinasa sensora.

El “zipper” de leucinas

Un dominio denominado “zipper” de leucinas contiene cuatro secuencias heptapeptídicas, donde en cada una de las repeticiones se encuentra un residuo de leucina en la primera posición (L-X₆-L-X₆-L-X₆-L-X₆) formando una hélice anfipática con los residuos aminoácidos hidrofóbicos agrupados en una cara y los residuos hidrofílicos en la cara opuesta. Aunado a lo anterior, si cada una de las posiciones de los aminoácidos de estas repeticiones heptapeptídicas es indicada por las letras “abcdefg”, las posiciones “a” y “d” corresponderán a los residuos no polares, en donde la leucina ocupa la posición “d”, mientras que en las posiciones “e” y “g” están ocupadas por residuos polares que están expuestos al disolvente (57). También ha sido demostrado en estudios anteriores que los “zipper” de leucinas están involucrados en la formación de homo- o hetero-dímeros a través de la interacción de las hélices de dos monómeros, mediante sus caras hidrofóbicas paralelas, originando una estructura dimérica super-enrollada (105).

En general, los zipper de leucinas se han encontrado en proteínas reguladoras que se unen a ADN (1, 13), aunque también están presentes en las proteínas de membrana que no se unen a ADN (49, 65, 10). Un análisis bioinformático de la estructura secundaria de ArcB, utilizando el programa 2zip (11) reveló que los aminoácidos del segmento 73 a 94 cumplen con las características de un “zipper” de leucinas, cuyos residuos de leucina conservados se encuentran en la secuencia VEQLSVVVEQLLEESRQRLSRLVQKLEEM (26).

La funcionalidad de este motivo se exploró mediante el remplazo de las Leu80, Leu87 y Leu94 por Ala. Se observó que la sustitución de la Leu80 y Leu94, no alteraron la señalización de ArcB manteniendo su regulación *in vivo* e *in vitro*, mientras que el remplazo de la Leu87, resultó en un fenotipo de ArcB nulo *in vivo*, aunque conservando su actividad *in vitro*. Los autores concluyeron que el “zipper” de leucinas no es funcional (58).

Tar de *E. coli* pertenece a la familia de proteínas de membrana interna, que median la respuesta quimiotáctica a través de su dominio receptor periplásmico. Esta proteína contiene dos segmentos transmembranales, unidos por su porción periplásmica, la cual se une a varios ligandos como el aminoácido aspartato. La unión del dominio receptor periplásmico al aspartato, se realiza mediante un desplazamiento de pistón entre sus segmentos transmembranales (70). El mecanismo de pistón fue demostrado en la cinasa sensora ortodoxa EnvZ, donde al sustituir los dominios transmembranales de EnvZ por los de Tar, se encontró que la actividad cinasa sensora híbrida Tar-EnvZ quedó bajo el control del aspartato periplásmico (103; 109). En contraste con la cinasa sensora EnvZ, el dominio periplásmico de ArcB es muy pequeño, pero se pensó que la propagación de su señal, podría implicar un mecanismo de pistón. Lo anterior fue esclarecido mediante quimeras Tar-ArcB, donde se demostró que la señalización de ArcB era diferente al mecanismo de pistón (46).

Así, los indicios de un “zipper” funcional surgen de los ensayos de señalización realizados en quimeras Tar-ArcB, en las que segmentos de diferente longitud del dominio transmembranal de la proteína sensora Tar se fusionaron a la porción citosólica de ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸, de forma que en cada nueva quimera construida se anexaba un residuo más al segmento transmembranal de Tar en su extremo carboxilo-terminal, logrando así, la extensión progresiva dentro del citosol y la rotación de aproximadamente 100° sobre su propio eje. Las proteínas Tar-ArcB mostraron tres fenotipos diferentes: una actividad redox regulada, una actividad constitutiva y una actividad nula catalíticamente (46).

De estos ensayos concluyeron que la afectación de la funcionalidad de las quimeras Tar-ArcB por la adición de un aminoácido, se debe a la alteración de la orientación de la porción citosólica de ArcB, necesaria para la apropiada regulación de la cinasa sensora. Estos hallazgos no concuerdan con un “zipper” de leucinas no funcional, reportado por Matsushika y col. (58).

El dominio PAS

En las células procariotas, la mayoría de los motivos PAS se encuentran en proteínas con función de cinasas sensoras y se ha demostrado que estos motivos se unen a diversas moléculas pequeñas como el grupo hemo, la flavina y a un cromóforo 4-hidroxi-cinamil, los cuales detectan oxígeno molecular, potencial redox y luz, respectivamente (95).

En la región linker de ArcB, se propone que existe un dominio PAS (residuos 115 a 263), el cual conecta su dominio transmembranal con el primer dominio catalítico (113). Reportes de la eliminación de una amplia secuencia del dominio PAS de ArcB (desde la Glu151 a Arg264) muestran que la proteína ArcB pierde su habilidad para reprimir al operon *sdh* en condiciones anaeróbicas. Además, que dos mutantes ArcB^{N181A} y ArcB^{C241G} también afectaron la señalización de ArcB (58).

Dominios catalíticos

ArcB es una cinasa sensora híbrida que posee tres dominios catalíticos citosólicos: en su extremo amino, un dominio transmisor primario (H1) con un residuo de histidina conservado en la posición 292; en la parte central, un dominio receptor (D1) con un residuo de aspartato conservado en la posición 576; y en el extremo carboxilo, un dominio transmisor secundario (H2), también llamado dominio de fosfotransferencia (HPt), que contiene a la histidina en la posición 717 (36, 40).

En el dominio transmisor H1, a su vez, se definen 4 subdominios esenciales para la señalización, que son las cajas H, N, G1 y G2 (72, 94). En la caja H se encuentra localizado un residuo His292, que corresponde al sitio de autofosforilación, mientras que las siguientes cajas N, G1 y G2 definen la cavidad para la unión de los nucleótidos.

El dominio D1 con 120 residuos de aminoácidos, es homólogo al dominio receptor de ArcA. Sus residuos Glu532, Asp533 y Asp576 son equivalentes a los residuos Glu10, Asp11 y Asp54 de ArcA, que se cree substituyen al “pocket ácido” canónico. También tiene el residuo Lys628, el cual corresponde a Lys103 de ArcA, aminoácido que se encuentra conservado en todas las proteínas reguladoras de respuesta. El residuo de aspartato conservado en la posición 576 es el sitio aceptor del grupo fosfato en el dominio D1.

Por último, el dominio H2 o HPt de fosfo-transferencia consta de 125 aminoácidos que contienen a His717, que participa en las reacciones de transferencia del grupo fosforilo (36). La estructura de rayos X de este dominio reveló que forma un motivo de cuatro hélices empaquetadas, en la cual la Histidina 717 se encuentra sobre la cara helicoidal expuesta a solventes (44).

El modelo de señalización de ArcB

ArcB, cuya expresión es constitutiva (39), se activa durante la transición del crecimiento aeróbico a anaeróbico (98). Tras su activación, ArcB sufre la autofosforilación en el residuo His292 aceptando el grupo γ - PO_3^{2-} del ATP (40). Así, el grupo fosforilo del residuo His292 es transferido al Asp576, el cual es capaz de transferirlo reversiblemente a la His717 o irreversiblemente al H_2O (28). El grupo $-\text{PO}_3^{2-}$ de la His717 es transferido al Asp54 de ArcA (fosforelevo His-292 \rightarrow Asp-576 \rightarrow His-717 \rightarrow Asp-54) (28, 45).

En contraste a la mayoría de las histidina-cinasas homodiméricas, ArcB se autofosforila a través de una reacción intramolecular, requiriendo que el sitio de unión del ATP y el de autofosforilación (His292) estén presentes en la misma molécula de ArcB (74). ArcA fosforilado (ArcA-PO_3^{2-}) 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 (12, 26, 38, 54).

Para entender la activación e inhibición de ArcB, es necesario saber que las quinonas sintetizadas por *E. coli* son: la ubiquinona (Q), la menaquinona (M) y la dimetil-menaquinona (DMK), las cuales funcionan como adaptadores entre varios complejos de enzimas donadoras yceptoras de electrones (31, 62, 102). La célula predominantemente utiliza la ubiquinona en la respiración aeróbica. Cuando el nitrato es el aceptor de electrones, la menaquinona y la dimetil-menaquinona sirven como adaptadores durante la respiración anaeróbica. Es importante mencionar que las quinonas (Q) y menaquinonas (MK) conforman el 60% y 3% de las quinonas totales aeróbicas y el 10% y 74 % respectivamente, cuando las células están creciendo anaeróbicamente en presencia de fumarato. El resto de la poza de quinonas se debe a las dimetil-menaquinonas (DMK) (23).

Recientemente, se ha dilucidado cómo las menaquinonas reducidas son requeridas para la activación apropiada de ArcB durante la transición de condiciones aeróbicas a anaeróbicas. Para ello, primero estimaron el potencial redox de ArcB, mediante la inhibición de la fosforilación de ArcB utilizando análogos de quinonas como 1,4-benzoquinona ($E^{\circ'}=+274$ mV), 1,2-naftoquinona ($E^{\circ'}=+134$ mV), 1,4-naftoquinona ($E^{\circ'}=+69$ mV), junglona ($E^{\circ'}=+30$ mV), menadiona ($E^{\circ'}=\pm 0$ mV), plumbagina ($E^{\circ'}=-29$ mV), lawsona ($E^{\circ'}=-137$ mV) y antroquinona-2-sulfonato ($E^{\circ'}=+225$ mV); encontrando que los análogos de quinonas con potencial redox positivo fueron buenos inhibidores de la actividad de cinasa, mientras que los análogos con potenciales redox negativos no tuvieron efecto. Posteriormente, determinaron el potencial redox estándar de ArcB en -42 mV, mediante ensayos de fosforilación *in vitro* en presencia de mezclas redox de cisteína/cistina con diferentes potenciales. Como este potencial es mucho mayor que el potencial redox del menaquinol (-76 mV), hipotetizaron que el flujo de electrones del menaquinol hacia ArcB ocasiona la reducción de los puentes disulfuro y la activación de la proteína. En segundo lugar, construyeron una mutante en *menFDHBCE*, que no es capaz de producir menaquinonas, en la cual observaron que la cinasa ArcB no se activó durante el cambio de aerobiosis a anaerobiosis; pero

cuando complementaron la cepa mutante con un plásmido de bajo número de copias que portaba el operón *menFDHBCE*, la actividad de cinasa ArcB se restauró. Lo anterior permitió a los autores concluir que las menaquinonas son los acarreadores de electrones necesarios para la reactivación de la actividad de cinasa de ArcB durante la transición de crecimiento aeróbico a anaeróbico (3). El papel de la DMK sobre ArcB, aún no se ha esclarecido.

En el sistema Arc, al cambiar de condiciones de crecimiento reductoras a oxidativas, la señal decae silenciando al SDC liberándose el control transcripcional dependiente de Arc (75). Así cuando la señal decae, ArcB es ahora una cinasa inactiva porque no se autofosforila pero actúa como fosfatasa específica de ArcA-PO₃²⁻, catalizando la transferencia reversa del grupo fosforilo de Asp54 de ArcA a la His717 y después a Asp576 de ArcB. El grupo fosforilo de ArcB es liberado entonces como Pi (fosforelevo reverso Asp-54→His-717→Asp-576) (26, 43, 75). En el cambio de condiciones de anaerobiosis a aerobiosis, las ubiquinonas oxidadas son la señal inhibitoria de la cinasa ArcB (25), oxidando los residuos de cisteína de la proteína, localizados en el citosol, lo que da lugar a la formación de dos puentes disulfuro (Figura 2) (55).

La inhibición de la actividad de ArcB de *E. coli* por la formación de dos puentes disulfuro intermoleculares, mediante la oxidación de las Cys180 y Cys241, por acción de las ubiquinonas, tiene varios antecedentes importantes. En primer lugar, el conocimiento de la activación constitutiva de ArcB en una mutante en *ubiCA*, que no sintetiza ubiquinonas en condiciones de crecimiento aeróbicas y la inhibición de la autofosforilación de la proteína truncada ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ por la ubiquinona-0 (Q0) (25). En segundo lugar, el descubrimiento de que la adición al medio de cultivo aeróbico de agentes reductores como el ditioneitol (DTT) y el β-mercaptoetanol, capaces de permear la membrana interna, activan a la cinasa ArcB, mientras que la adición de glutatión (GSH), un tripéptido que reduce los enlaces disulfuro de proteínas citosólicas pero que no es capaz de permear la membrana plasmática por su naturaleza lipofóbica, no tiene efecto; y finalmente en tercer lugar, que en la región linker de ArcB se encuentran localizados sus dos únicos residuos de cisteína de ArcB, la Cys180 y Cys241 (55).

Con base lo anterior, mediante experimentos realizados *in vivo* en condiciones aeróbicas, usando cepas que expresaron: ArcB, ArcB^{C180A} (ArcB^{C1}), ArcB^{C241A} (ArcB^{C2}) o ArcB^{C180A-C241A} (ArcB^{CC}), demostraron una inhibición leve de ArcB^{C2} y falta de inhibición significativa de ArcB^{C1} y ArcB^{CC}; mientras que *in vitro*, mediante ensayos de fosforilación con proteínas ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸, la actividad de fosforilación en presencia de QO prácticamente no fue afectada en ArcB^{C1} (85% de su actividad), pobremente para ArcB^{C2} (15% aproximadamente) y sin efecto en el caso de ArcB^{CC}.

Así, para corroborar que el cambio de estado redox de las cisteínas de ArcB se debe a la acción directa de las quinonas en forma oxidada, hicieron reaccionar ArcB, ArcB^{C1}, ArcB^{C2} y ArcB^{CC} pretratados o no con QO, con maleimida (MAL) unida a polietilenglicol (PEG). La MAL se une covalentemente a los grupos tiol de las cisteínas reducidas y el PEG le añade un aumento de peso a los complejos ArcB-MAL-PEG. La separación electroforética por SDS/PAGE no reductor y el análisis "Western blot" con anticuerpos policlonales específicos para ArcB, les permitió determinar que las proteínas ArcB, ArcB^{C1}, ArcB^{C2} en ausencia de QO originaron tres complejos de movilidad diferente acorde al residuo de cisteína al que se une MAL-PEG, mientras que ArcB^{CC} no produjo ningún complejo. En presencia de QO y después del tratamiento con MAL-PEG, no hubo formación de ningún complejo. De estos resultados confirmaron que ambos residuos de cisteínas experimentan oxidación dependiente de QO (55).

Finalmente para determinar que los enlaces disulfuro formados entre las cisteínas de ArcB son intramoleculares, realizaron cultivos aerobios y anaerobios de *E. coli* tratados con ácido tricloroacético (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, en los extractos aeróbicos observaron una banda predominante de aproximadamente 170 kDa, que equivale a un dímero de ArcB y que en presencia de DTT desapareció dando lugar a la banda de 88kDa (55).

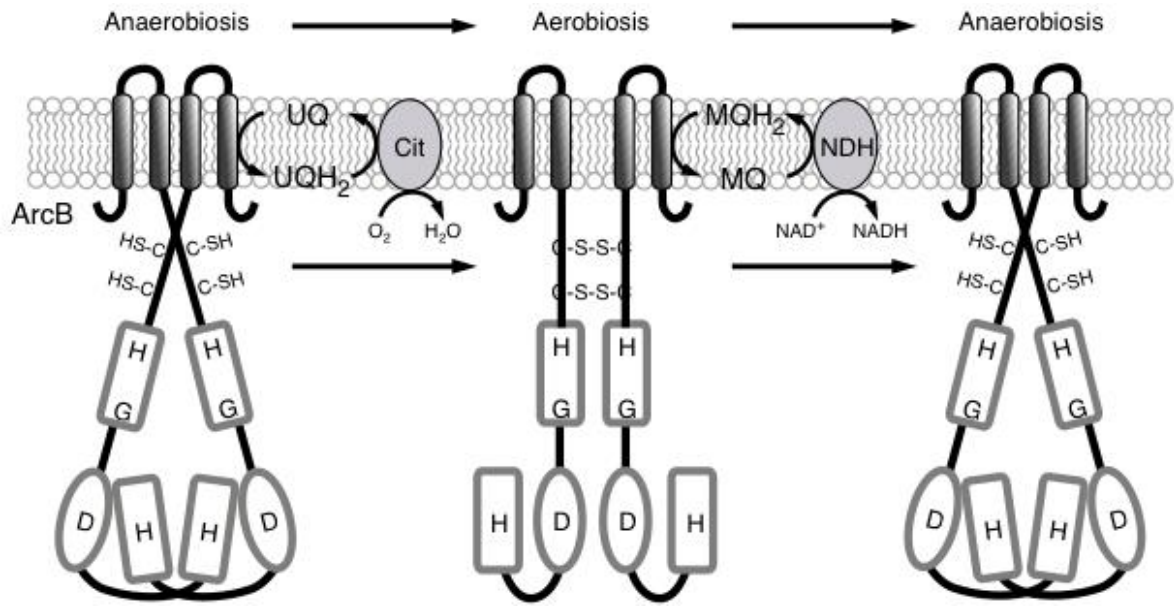


Figura 2. Un modelo simplificado de activación e inactivación de ArcB. Cuando la bacteria cambia sus condiciones de crecimiento anaeróbicas a aeróbicas, las quinonas se oxidan. Esto permite la transferencia de electrones desde la Cys-180 de ArcB a las quinonas, lo que conduce a la formación de un enlace disulfuro intermolecular entre las Cys-180 de los dos monómeros, resultando en una disminución significativa de la actividad de la cinasa ArcB. Como los electrones rápidamente fluyen hacia el oxígeno más próximo vía Citocromo Oxidasa b_d o b_o , las quinonas mantienen su estado oxidado e inducen la formación de un segundo enlace disulfuro entre los dos residuos Cys-241, dando como resultado el completo silenciamiento de la actividad de la cinasa ArcB. Por el contrario, cuando las condiciones son microaeróbicas o cuando cambian la condición de aeróbica a anaeróbica, las ubiquinonas son gradualmente reemplazadas por menaquinonas, que en estado reducido (menaquinol) son capaces de reducir los puentes disulfuro de ArcB, restaurando su conformación activa como cinasa y activando el sistema.

Así, la reducción de los puentes disulfuro de ArcB, durante la transición de aerobiosis a anaerobiosis, origina su autofosforilación y el fosforelevo His-292→Asp-576→His-717→Asp-54 (28, 45). En el cambio de anaerobiosis a aerobiosis, se oxidan las cisteínas generando los puentes disulfuro y el grupo fosforilo de ArcB es liberado entonces como Pi, a través del fosforelevo reverso Asp-54→His-717→Asp-576 (26, 43, 75). De esta manera, la oxidación y reducción de las cisteínas en ArcB, a través de

la poza de ubiquinonas y menaquinonas representa un mecanismo redox mediante el cual las señales son transducidas al aparato transcripcional, permitiendo a la bacteria una rápida adaptación a los cambios ambientales redox.

Vía de las tiorredoxinas y glutarredoxinas en *Escherichia coli*

Al estar involucrado un mecanismo redox en la activación e inactivación de ArcB, resultaba de vital importancia conocer el agente que podría actuar como señal directa en la regulación del sistema Arc durante el cambio de condiciones aeróbicas a anaeróbicas. La existencia de proteínas frecuentemente extra-citoplasmáticas y raramente citoplásmicas debido a las condiciones reductoras del citosol, que forman puentes disulfuro como parte de su ciclo catalítico y su reducción posterior para mantener su funcionalidad (76, 78, 88), crearon una enorme expectativa sobre las tiorredoxinas (Trx) y/o glutarredoxinas (Grx) con relación a ArcB.

Por esta razón, con base en el conocimiento que las Trx y/o Grx son proteínas citosólicas solubles capaces de catalizar la reacción redox disulfuro-tiol en sus proteínas sustrato mediante su sitio activo conservado, el cual contiene dos residuos de cisteína separados por dos aminoácidos (C-X₁-X₂-C) (1, 2), con secuencias de aminoácidos diferentes y con diferentes potenciales redox (6) y añadiendo que en la vía Trx y/o Grx, sólo la tiorredoxina A (TrxA), tiorredoxina C (TrxC) y glutarredoxina A (GrxA) tienen la capacidad de mantener reducida eficientemente a la enzima ribonucleótido reductasa (de importancia en la síntesis de ADN) (6, 8), mientras que los otros miembros, mantienen activa catalíticamente la vía, a través de la tiorredoxina reductasa (TrxB) que dona electrones a TrxA y TrxC para reducir las y por la glutatión oxido-reductasa (GorA) que reduce al glutatión (GSH), el cual a su vez reduce a GrxA, la glutarredoxina B (GrxB) y la glutarredoxina C (GrxC) (7, 34, 64, 66, 112), nos sugiere evaluar si ArcB es un sustrato para una o varias de estas enzimas reductoras, como sucede con la ribonucleótido reductasa (Figura 3).

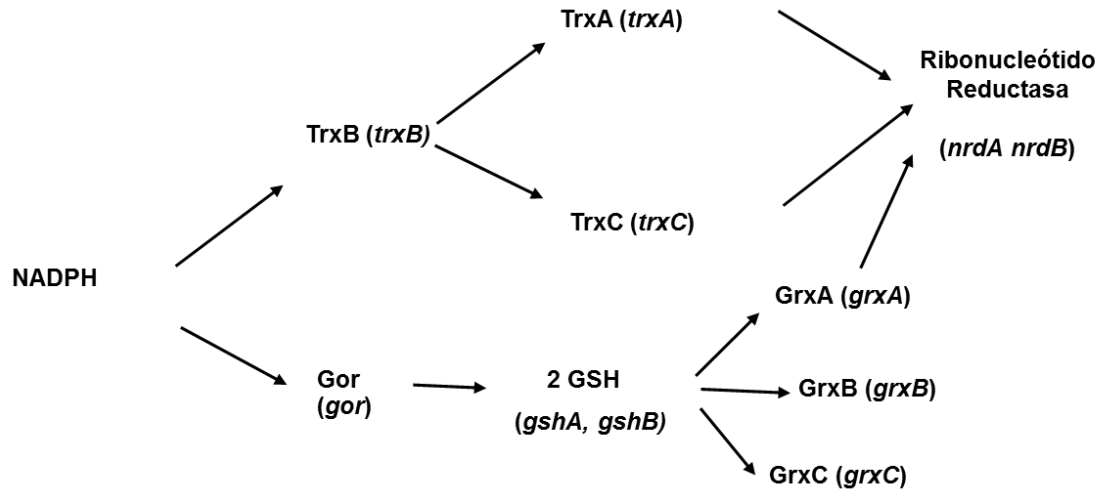


Figura 3. Vías de las tiorredoxinas (Trx) y glutarredoxinas (Grx). Se muestran los nombres de las enzimas y los genes (entre paréntesis), conocidos de los dos sistemas (6).

Justificación

Se sabe que el dominio periplásmico de ArcB no participa en la recepción de la señal y que la eliminación supresión de su región transmembranal no interfiere en la inhibición de ArcB por las quinonas (25, 47); sino que funciona como punto de anclaje de esta cinasa sensora a la membrana, permitiéndole estar cerca de la fuente de la señal. También, ha sido reportado que la regulación de la actividad catalítica de ArcB está afectada por el movimiento rotacional de la proteína en la membrana, lo que altera la orientación de la porción citosólica de ArcB (46) y que la regulación involucra la oxidación de dos residuos de cisteína localizados en el citosol, que participan en la formación intermolecular de dos puentes disulfuro, reacción en la cual las quinonas actúan como oxidantes directos (25, 54, 55).

Debido a que está generalmente aceptado que el dominio transmisor de las cinasas sensoras puede promover la dimerización de estas proteínas (96), la existencia de un “zipper” de leucinas putativo en la región linker de ArcB (26) y el conocimiento de que estos motivos han sido implicados en la formación de homo y heterodímeros en varias proteínas, nos permiten hipotetizar que este motivo puede actuar como un dominio de dimerización para la proteína ArcB, el cual es necesario para la apropiada regulación de su actividad.

Asimismo, dado que las quinonas son la señal específica que inhibe la actividad cinasa de ArcB (25) involucrando la oxidación de las cisteínas 180 y 241 (55), es importante determinar si las proteínas citosólicas tiorredoxinas y/o glutarredoxinas están involucradas en la reducción de los puentes disulfuro de ArcB, participando en su activación, tomando en cuenta que estas proteínas contienen un motivo Cys-X₁-X₂-Cys que les permite reducir a sus proteínas sustrato.

Objetivos

Los propósitos de este trabajo son:

1. Determinar si el zipper de leucinas es un motivo funcional en la regulación de la proteína ArcB.
2. Determinar *in vivo* si las tiorredoxinas y/o glutarredoxinas están involucradas en la reducción de los puentes disulfuro de ArcB.

Materiales y Métodos

Plásmidos y oligonucleótidos

El plásmido pMX712 se construyó por digestión del plásmido pBW (47) con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III. El fragmento purificado que incluye el sitio de restricción *Bam*HI, el promotor de *arcB*, el sitio de unión del ribosoma, un sitio *Nde*I que involucra el codón de inicio del gene *arcB*, el marco de lectura del gene de *arcB* y el codón de paro seguido de un sitio *Hind*III se insertó en el plásmido de alto número de copias pBlueScript II KS+.

El plásmido pBlueScript II KS+ con el gen *ArcB*^{L87V}, se construyó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos 5'-CCCGGATCCCATATGAAGCAAATTCGTCTGCTGGCGC-3' y 5'-CAGCCGTGACACACGTTGTCG-3' (oligonucleótido mutagénico) y el plásmido pMX712 como molde. Este primer producto de PCR se purificó y utilizó como mega-oligonucleótido en combinación con el oligonucleótido 5'-CTCAGACCGACGATACCGTT-3', usando nuevamente como molde el plásmido pMX712 para realizar una segunda PCR. El producto de esta segunda PCR se digirió con las enzimas *Nde*I y *Nru*I y el fragmento purificado se usó para sustituir el fragmento silvestre *Nde*I y *Nru*I del plásmido pMX712 generando el plásmido pMX716. Para construir los plásmidos con el gene de *arcB* con dos o más mutaciones puntuales en el “zipper” de leucinas, se emplearon los plásmidos previamente construidos con una simple, doble o triple mutación como molde según fuese necesario, en lugar del pMX712. De esta forma, se contruyó la serie de plásmidos mediante mutaciones sitio-dirigidas, generando la serie pMX713 a pMX731.

Para obtener el plásmido pMX736, el pMX716 se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III y el fragmento de interés purificado se insertó en el plásmido pEXT22 (de una copia), para generar el correspondiente promotor *arcB*-sitio de unión de ribosoma-gene *arcB* con la mutación L87V en el “zipper” de leucinas. Los plásmidos

pMX732 a pMX735, pMX737 a pMX748 y pMX528 a pMX530 se construyeron de igual forma utilizando la serie pMX712 a pMX715 y pMX717 a pMX728.

Los plásmidos pMX517, pMX520 y pMX521 se construyeron por sustitución del fragmento *NdeI-HindIII* del plásmido pMX020 (74) con el fragmento *NdeI-HindIII* del plásmido pMX712, pMX715 y pMX716. Todos los plásmidos se verificaron por secuenciación, mediante la amplificación de DNA por PCR, realizado por la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tabla I. Lista de plásmidos y oligonucleótidos

Plásmido	Característica relevante	Fuente
pBluescript KS II (+)	Vector de clonación, Amp ^r	Stratagene
pEXT22	Low copy number vector, Kan ^r	(21)
pMX712	<i>arcB</i> ⁺ en pBluescript SK II (+)	Este estudio
pMX713	<i>arcB</i> ^{P67A} en pBluescript SK II (+)	Este estudio
pMX714	<i>arcB</i> ^{L73V} en pBluescript SK II (+)	Este estudio
pMX715	<i>arcB</i> ^{L80V} en pBluescript SK II (+)	Este estudio
pMX716	<i>arcB</i> ^{L87V} en pBluescript SK II (+)	Este estudio
pMX717	<i>arcB</i> ^{L94V} en pBluescript SK II (+)	Este estudio
pMX718	<i>arcB</i> ^{L73V-L80V} en pBluescript SK II (+)	Este estudio
pMX719	<i>arcB</i> ^{L73V-L87V} en pBluescript SK II (+)	Este estudio
pMX720	<i>arcB</i> ^{L73V-L94V} en pBluescript SK II (+)	Este estudio
pMX721	<i>arcB</i> ^{L80V-L87V} en pBluescript SK II (+)	Este estudio
pMX722	<i>arcB</i> ^{L80V-L94V} en pBluescript SK II (+)	Este estudio
pMX723	<i>arcB</i> ^{L87V-L94V} en pBluescript SK II (+)	Este estudio
pMX724	<i>arcB</i> ^{L73V-80V-L87V} en pBluescript SK II (+)	Este estudio
pMX725	<i>arcB</i> ^{L73V-80V-L94V} en pBluescript SK II (+)	Este estudio
pMX726	<i>arcB</i> ^{L73V-87V-L94V} en pBluescript SK II (+)	Este estudio
pMX727	<i>arcB</i> ^{L80V-L87V-L94V} en pBluescript SK II (+)	Este estudio

pMX728	<i>arcB</i> ^{L73V-L80V-L87V-L94V} en pBluescript SK II (+)	Este estudio
pMX729	<i>arcB</i> ^{L102V} en pBluescript SK II (+)	Este estudio
pMX730	<i>arcB</i> ^{L108V} en pBluescript SK II (+)	Este estudio
pMX731	<i>arcB</i> ^{L115V} en pBluescript SK II (+)	Este estudio
pMX732	<i>arcB</i> ⁺ en pEXT22	Este estudio
pMX733	<i>arcB</i> ^{P67A} en pEXT22	Este estudio
pMX734	<i>arcB</i> ^{L73V} en pEXT22	Este estudio
pMX735	<i>arcB</i> ^{L80V} en pEXT22	Este estudio
pMX736	<i>arcB</i> ^{L87V} en pEXT22	Este estudio
pMX737	<i>arcB</i> ^{L94V} en pEXT22	Este estudio
pMX738	<i>arcB</i> ^{L73V-L80V} en pEXT22	Este estudio
pMX739	<i>arcB</i> ^{L73V-L87V} en pEXT22	Este estudio
pMX740	<i>arcB</i> ^{L73V-L94V} en pEXT22	Este estudio
pMX741	<i>arcB</i> ^{L80V-L87V} en pEXT22	Este estudio
pMX742	<i>arcB</i> ^{L80V-L94V} en pEXT22	Este estudio
pMX743	<i>arcB</i> ^{L87V-L94V} en pEXT22	Este estudio
pMX744	<i>arcB</i> ^{L73V-L80V-L87V} en pEXT22	Este estudio
pMX745	<i>arcB</i> ^{L73V-L80V-L94V} en pEXT22	Este estudio
pMX746	<i>arcB</i> ^{L73V-L87V-L94V} en pEXT22	Este estudio
pMX747	<i>arcB</i> ^{L80V-L87V-L94V} en pEXT22	Este estudio
pMX748	<i>arcB</i> ^{L73V-L80V-L87V-L94V} en pEXT22	Este estudio
pMX020	<i>arcB</i> ⁵²¹⁻⁷⁷⁸ bajo el control del promotor <i>ara</i> , Amp ^r	(75)
pMX517	<i>arcB</i> ^{WT} bajo el control del promotor <i>ara</i> , Amp ^r	Este estudio
pMX520	<i>arcB</i> ^{L80V} bajo el control del promotor <i>ara</i> , Amp ^r	Este estudio
pMX521	<i>arcB</i> ^{L87V} bajo el control del promotor <i>ara</i> , Amp ^r	Este estudio
pMX528	<i>arcB</i> ^{L102V} en pEXT22	Este estudio
pMX529	<i>arcB</i> ^{L108V} en pEXT22	Este estudio
pMX530	<i>arcB</i> ^{L1152V} en pEXT22	Este estudio

Oligonucléotido	Secuencia
ArcB-Ini	5'-CCCGGATCCCATATGAAGCAAATTCGTCTGCTGGCGC-3'
ArcB-67Ala	5'-GACCGCCCACGCGTAATCAGC-3'
ArcB-73Val	5'-GACGACCACCGACACAAAGTAGACCGC-3'
ArcB-80Val	5'-CGTGACTCCTCCACTTGCTCGAGC-3'
ArcB-87Val	5'-CAGCCGTGACACACGTTGTCG-3'
ArcB-94Val	5'-GCGCATCTCCTCCACTTTTTGCACCAGCCG-3'
ArcB-102Val	5'-CTGAACGTTGAGGCTCACATCGCGCTCGCGC-3'
ArcB-108Val	5'-GCTGGGCAATATTATCTTTTACCTGAACGTTGAGGCTC-3'
ArcB-115Val	5'-CGAACGGCAATTTCTGATTTACCTGGGCAATATTATC-3'
ArcB-X	5'-CTCAGACCGACGATACCGTT-3'

Construcción de cepas mutantes en vías Trx y/o Grx.

Para determinar si las proteínas Trx y/o Grx eran responsables de la reducción de los enlaces disulfuro de ArcB durante la transición de las condiciones aeróbicas a anaeróbicas en ArcB, obtuvimos diversas cepas mutantes simples o dobles en el caso de las vías de las Trx o Grx, mediante transducción utilizando el fago P1 $\Phi(\text{cydA}'\text{-lacZ})$.

Así, por ejemplo, para obtener la cepa ECL5001 *trxB::km* $\Phi(\text{cydA}'\text{-lacZ})$, se preparó el fago P1 (*trxB::km*) a partir de la cepa mutante 335 (*trxB::km*), el cual se transdujo en la cepa ECL5001 que porta el gen reportero $\Phi(\text{cydA}'\text{-lacZ})$ y seleccionada por su resistencia a la kanamicina. Todas las mutantes simples de interés se obtuvieron de igual forma. En el caso de las mutantes dobles, por ejemplo la mutante ECL5001 *trxB::km grxC::cm* $\Phi(\text{cydA}'\text{-lacZ})$, el fago P1 (*grxC::cm*) se transdujo en la cepa mutante 5001 *trxB::km* $\Phi(\text{cydA}'\text{-lacZ})$ siendo seleccionada por la resistencia a kanamicina y cloranfenicol; un procedimiento similar se realizó para cada una de las dobles mutantes obtenidas.

Tabla 2. Lista de cepas

Cepa	Característica relevante	Fuente
ECL5001	MC4100 Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	(47)
ECL5004	MC4100 Δ <i>arcB</i> ::Te Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	(47)
ECL5012	MC4100 Δ <i>arcB</i> ::Te Φ (<i>IldP'</i> - <i>lacZ</i>)	(47)
IFC700	MC4100 <i>trxB</i> :: <i>cm</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC701	MC4100 <i>trxB</i> :: <i>Km</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC702	MC4100 <i>trxA</i> :: <i>tet</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC703	MC4100 <i>trxA</i> :: <i>tet</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC704	MC4100 <i>trxC</i> :: <i>tet</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC705	MC4100 <i>go522</i> :: <i>tet</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC706	MC4100 <i>gor</i> :: <i>cm</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC707	MC4100 <i>grxA</i> :: <i>Km</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC708	MC4100 <i>grxB</i> :: <i>km</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC709	MC4100 <i>grxC</i> :: <i>Cm</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC710	MC4100 <i>gor522</i> :: <i>tet grxA</i> :: <i>Km</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC711	MC4100 <i>trxB</i> :: <i>cm trxA</i> :: <i>tet</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC712	MC4100 <i>trxB</i> :: <i>cm trxC</i> :: <i>tet</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC713	MC4100 <i>gor</i> :: <i>cm trxA</i> :: <i>tet</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC714	MC4100 <i>gor</i> :: <i>cm trxC</i> :: <i>tet</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC715	MC4100 <i>trxB</i> :: <i>cm grxB</i> :: <i>Km</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC716	MC4100 <i>trxB</i> :: <i>Km grxC</i> :: <i>cm</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC717	MC4100 <i>trxA</i> :: <i>tet grxB</i> :: <i>Km</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC718	MC4100 <i>trxA</i> :: <i>tet grxC</i> :: <i>cm</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC719	MC4100 <i>trxC</i> :: <i>tet grxB</i> :: <i>Km</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC720	MC4100 <i>trxC</i> :: <i>tet grxC</i> :: <i>cm</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio
IFC721	MC4100 <i>trxC</i> :: <i>tet grxC</i> :: <i>cm</i> Φ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	Este estudio

Medios y condiciones de crecimiento.

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se cultivaron en agar o caldo Luria-Bertani (LB) que contiene triptona 10 g/L y NaCl 8 g/L. Cuando fue necesario se adicionó ampicilina, kanamicina, tetraciclina o cloranfenicol a las concentraciones de 100, 50, 12.5 o 34 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. En el crecimiento de cultivos madre y colonias bacterianas transformantes se utilizó caldo LB adicionado con el antibiótico de selección. Para la selección de células transformantes se utilizaron placas de agar LB enriquecido con glucosa 0.02 % y antibiótico de selección. La obtención de cultivos ricos en vesículas de membranas ricas en ArcB, se realizó en caldo LB adicionado con L-arabinosa 0.13 mM, para inducir la expresión de los genes controlados por el promotor *ara*.

Con relación a los ensayos de β -galactosidasa, de cepas portadoras del gen reportero $\lambda\Phi$ (*cydA'*-*LacZ*) se cultivaron en caldo LB adicionado con MOPS 0.1 M (ácido morfolinopropano-sulfónico; pH 7.4), D-xilosa 20 mM y el antibiótico de selección necesario. Si el gen reportero fue $\lambda\Phi$ (*IldP'*-*LacZ*), además se adicionó como inductor el L-lactato en una concentración 20 mM. Si las células crecieron aeróbicamente se agitaron a 300 rpm a 37 °C. En condiciones anaeróbicas las bacterias se cultivaron con agitación mediante magneto, en tubos saturados con medio y con tapa de rosca.

El cultivo bacteriano para la determinación de la actividad de ArcB mutante en Pro67 o Leu del “zipper”, se realizó en condiciones aeróbicas y anaeróbicas hasta una fase exponencial media equivalente a una $\text{DO}_{600\text{nm}} \approx 0.5$. Posteriormente a ambas condiciones se le determinó su actividad de β -galactosidasa.

Para los ensayos realizados en mutantes de las proteínas de las vías Trx y Grx, las células se cultivaron aeróbicamente hasta un crecimiento $\text{DO}_{600} \approx 0.1$, una vez alcanzada esta densidad celular, se tomaron alícuotas para también ser cultivadas en condiciones anaeróbicas. Posteriormente, en ambas condiciones se determinó su actividad de β -galactosidasa al alcanzar una $\text{DO}_{600} \approx 0.5$.

Preparación de células competentes.

Las células competentes fueron preparadas adicionando 20 μL de un cultivo madre a 20 mL de caldo LB. Se incubó a 18°C hasta una $\text{DO}_{600} \approx 0.4$ y posteriormente se colocó 10 min en hielo. Se centrifugó a 1800 g durante 15 min a 4°C. Se resuspendió la pastilla bacteriana en amortiguador TB frío (PIPES 10 mM pH 6.7, MnCl_2 55 mM, CaCl_2 15 mM y KCl 250 mM), incubándolo 30 min en hielo y centrifugándolo durante 15 min a 4°C. Este último paso se repite nuevamente. Finalmente la pastilla se resuspendió en 1.6 mL de amortiguador TB con 7% de DMSO, haciendo alícuotas de la suspensión celular de 200 μL en tubos eppendorf. Inmediatamente se procedió a la congelación con N_2 líquido y se almacenaron las alícuotas a -70°C hasta su utilización para ser transformadas con los plásmidos.

Transformación

Se incubaron las células durante 10 min en hielo hasta su descongelación. Se adicionó 1.0 μL del plásmido y la mezcla fue incubada 30 min en hielo. Posteriormente se le dio un choque térmico durante 30 s a 43°C. Inmediatamente se le adicionó a cada tubo 1 mL de medio de recuperación (Caldo LB adicionado con glucosa al 0.02%) y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Las células recuperadas se centrifugaron a 1200 g para posteriormente ser sembradas en placas de agar LB (adicionadas con el antibiótico de selección codificado en el plásmido), e incubadas a 37°C durante 18 horas. Las colonias aisladas se inocularon en 5.0 mL de caldo LB con el antibiótico de selección, hasta tener un cultivo con la densidad bacteriana adecuada.

Construcción de cepas simples o dobles mutantes en las vías de las Trx o Grx.

Las cepas mutantes simples o dobles en las vías de las Trx y/o Grx se obtuvieron por transducción mediante el fago P1. Así, para obtener la mutante simple ECL 5001 *trxB::km* $\lambda\Phi(\text{cydA}'\text{-lacZ})$, se preparó el fago P1 (*trxB::km*) a partir de una cepa mutante $\Delta\text{trxB}::\text{km}$, el cual fue transducido en la cepa 5001 que porta el gen reportero $\lambda\Phi(\text{cydA}'\text{-lacZ})$ y seleccionada por su resistencia a kanamicina. De esta forma fueron contruidas todas las mutantes simples. En el caso de las mutantes dobles, como la mutante 5001 *trxB::km grxC::cm* $\lambda\Phi(\text{cydA}'\text{-lacZ})$, el fago P1 (*grxC::cm*) fue transducido en la cepa mutante 5001 *trxB::km* $\lambda\Phi(\text{cydA}'\text{-lacZ})$ siendo seleccionada por la resistencia a kanamicina y cloranfenicol. Un procedimiento similar se realizó para cada una de las dobles mutantes obtenidas.

Mantenimiento de cepas bacterianas

Para la conservación de las cepas de interés de este estudio, fue inoculada una colonia bien aislada proveniente de una placa de agar LB adicionada con el antibiótico de selección, en un tubo con 5.0 mL de caldo LB también adicionado con el mismo antibiótico de selección. Cada cultivo se mantuvo con agitación constante durante 12 horas. Después se tomó una alícuota de 1400 μL de la suspensión bacteriana y se le adicionaron 450 μL de glicerol estéril al 80% e inmediatamente se conservaron a -70°C.

Preparación de las vesículas de membrana enriquecidas con ArcB

La cepa ECL5012 portadora del plásmido pMX517, pMX520 o pMX521 se cultivó en 250 ml de medio LB que contiene ampicilina a 37 °C hasta una DO_{600} de 0.5. Posteriormente, la expresión de ArcB fue inducida por la adición de L-arabinosa a una

concentración final de 0.5 mM. Las células se cosecharon 4 horas después de la inducción, se resuspendieron en 6 mL de amortiguador MOPS (MOPS 50 mM, pH 7.0, MgSO₄ 5 mM y KCl 100 mM) y se rompieron en una prensa French. El lisado celular se aclaró por centrifugación a 10,000 g durante 15 min y la proteína ArcB embebida en las membranas internas se obtuvo por una centrifugación posterior a 32,500 g durante 40 min a 4 °C. Finalmente, las vesículas de membrana obtenidas ricas en ArcB, se solubilizaron en 500 µL de amortiguador MOPS que contenía 30% de glicerol y se almacenaron a -20 °C.

Ensayos de fosforilación de ArcB

Los ensayos de fosforilación se llevaron a cabo a temperatura ambiente en la presencia de [γ -³²P] ATP 40 µM (actividad específica, 2 Ci/mMol, 1 Ci= 37 GBq, New England Nuclear), HEPES 33 mM (pH 7.5), KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0.1 mM, glicerol al 10%, y 1 mg de la proteína total (vesículas de membrana) ricas en ArcB^{WT} o ArcB^{L80V} o ArcB^{L87V}; en presencia de ditioneitol (DTT) 5 mM o QO 250 mM, como se ha descrito previamente (25). Las reacciones de fosforilación se iniciaron al añadir [γ -³²P] ATP y se detuvieron con la adición de un volumen igual de amortiguador de muestra SDS 2X. Inmediatamente las muestras se colocaron en un gel de poliacrilamida al 10% y se sometieron a SDS/PAGE. Al finalizar la electroforesis el gel se tiñó con solución de tinción (Azul de Coomassie 0.125%, metanol 50%, ácido acético 10%) hasta que las bandas de proteínas fueron visibles y decolorados hasta eliminar el exceso de azul de Coomassie con solución desteñidora (metanol 40% y ácido acético 10%). Posteriormente, cada gel se secó durante 30 min a 80 °C y expuestos a un autorradiograma (Kodak) durante toda la noche a -70 °C, para que la señal radioactiva fuese mas visible. La cantidad de radioactividad de las proteínas separadas se cuantificó mediante el Phosphor Imager (Molecular Dynamics).

Análisis Western Blot

Las cepas se cultivaron aeróbicamente y cosechadas por centrifugación (5,000 g) durante la fase media-exponencial de crecimiento ($DO_{600} \approx 0.5$). La pastilla celular se resuspendió en amortiguador SDS-5X e hirvió durante 10 min, para después separar las proteínas por SDS-PAGE (geles de poliacrilamida al 10%) durante 90 min. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (ECL-Hybond Amersham Biosciences). Posteriormente, la membrana fue equilibrada con amortiguador TTBS (Tris 2.5 mM, NaCl 150 mM, y Tween 20 al 0.05%) durante 10 min e incubada en amortiguador de bloqueo (leche descremada al 1% en TTBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo anti-ArcB⁷⁸⁻⁵²⁰-His₆ policlonal (45), se adicionó en una dilución 1:10,000 a la membrana de transferencia e incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos unidos a la proteína ArcB se detectaron utilizando anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano y visualizados mediante el sistema de detección ECL (Amersham Biosciences).

Ensayos de complementación de las cepas mutantes en ArcB *in vivo*

Para determinar si la sustitución de la prolina 67 por alanina o de las leucinas del “zipper” por valina, afectan la actividad de ArcB, se utilizaron las cepas mutantes en *arcB* ECL5004 $\lambda\Phi$ (*cydA'*-*lacZ*) y ECL5012 $\lambda\Phi$ (*lldP'*-*lacZ*), complementadas con uno de los plásmidos de la serie pMX732-pMX748 o pMX528-pMX530. En todos los casos, se cultivaron aeróbicamente y anaeróbicamente hasta alcanzar un crecimiento $DO_{600} \approx 0.5$. Después se determinó la actividad de β -galactosidasa.

Ensayos de cepas mutantes en Trx y/o Grx

En los ensayos realizados para determinar si alguna de las vías Trx y/o Grx es responsable de la reducción de los enlaces disulfuro durante la activación de ArcB, se

usó la cepa ECL5001 $\lambda\Phi(\text{cydA}'\text{-lacZ})$. La cepa con fondo genético ECL5001 con mutaciones simples o dobles en los genes que codifican para las vías de las Trx y/o Grx se cultivaron aeróbicamente hasta un crecimiento $\text{DO}_{600} \approx 0.1$. Una vez alcanzada esta densidad celular, se tomaron alícuotas y se cultivaron también en condiciones anaeróbicas hasta 60 min para después determinar la actividad de β -galactosidasa.

Ensayos de la actividad de β -galactosidasa

Para la detección de la expresión de $\lambda(\text{cydA}'\text{-lacZ})$ o de $\lambda(\text{IldP}'\text{-lacZ})$ se siguió el método de Miller (63) que cuantifica la hidrólisis de *o*-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG) por la enzima β -galactosidasa. En el tiempo de crecimiento a evaluar se determinó la densidad celular de los cultivos a una DO_{600} y se tomaron alícuotas de 0.1 mL del cultivo para adicionarse 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, β -mercaptoetanol 0.05 M), 1 gota de SDS al 10% y 2 gotas de cloroformo. Los tubos se agitaron en el vórtex para lisar las células y se inició la reacción por adición de 0.2 mL de ONPG a una concentración de 4 mg/mL. Se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y se detuvo la reacción agregando 0.5 mL de Na_2CO_3 1 M. Después se determinó la densidad óptica a 420 nm y 550 nm para cada tubo. La actividad β -galactosidasa se expresó en unidades Miller, de acuerdo a la siguiente fórmula: Unidades Miller = $1000 [\text{DO}_{420} - (1.75)(\text{DO}_{550})] / [(15)(0.1)(\text{DO}_{600})]$.

Modelo estructural del “zipper” de leucinas

El modelo estructural de la región súper enrollada del “zipper” de leucinas se infirió utilizando los resultados con la mas alta normalidad del score-Z, proporcionado por el I-TASSER server (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (79). La predicción del modelo está basada sobre la hélice monomérica que cubre los residuos de aminoácidos 70-89, derivada de la estructura del dominio transmembranal PDB code 2 ksd y utilizando las coordenadas originales del motivo dimérico súper enrollado PDB code 3he5 como molde.

Resultados

Los resultados describen el análisis de alineamientos (BLAST) realizado a la secuencia de homólogos de la proteína ArcB, que incluyen a sus dos segmentos transmembranales y el análisis *in vivo* correspondiente al único iminoácido conservado en el BLAST de esta porción de la proteína en *Escherichia coli*. También muestra el análisis de la secuencia del “zipper de leucinas”, con la correspondiente predicción de alineamientos de diversos homólogos, la predicción de los motivos super-enrollados en la proteína y un modelo dimérico superenrollado del “zipper”. De igual forma, se detalla la actividad de las cinasas mutadas en una o varias leucinas del “zipper”, mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*, el análisis de los fenotipos dominantes negativos y el análisis de la actividad de fosfatasa. Finalmente, se hace referencia a los experimentos *in vivo* realizados a cepas mutantes en la vía de las tiorredoxinas y glutarredoxinas.

Análisis de secuencia de la región transmembranal de ArcB

Genes ArcB ortólogos con diferentes grados de homología con ArcB de *E. coli* se encuentran en géneros de las familias Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Pasteurellaceae y Alteromonadaceae. Por ello, con la finalidad de encontrar residuos conservados se realizó el análisis de alineamientos (BLAST) de la secuencia de homólogos de ArcB que incluyó a *Escherichia coli*, *Shigella boydii*, *Salmonella enterica*, *Photobacterium luminescens*, *Yersinia pestis*, *Erwinia carotovora*, *Vibrio cholerae*, *Photobacterium profundum* (tipo I); y *Mannheimia succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Haemophilus influenzae* y *Pasteurella multocida* (tipo II). El resultado mostró que todas ellas contienen el residuo conservado de prolina en la posición 67, localizado en el segundo segmento transmembranal de ArcB en *E. coli* (Figura 4).


```

EC (1-70) MKQIRLLAQYYVDLMMKLGIVRFSMLLALALVVLAIVVQMAVTMVLHGQVESIDVIRSIFFGLLITPWAVYF
SB (1-70) MKQIRLLAQYYVDLMMKLGIVRFSMLLALALVVLAIVVQMAVTMVLHGQVESIDVIRSIFFGLLITPWAVYF
SE (1-70) MKQIRMLAQYYVDLMMKLGIVRFSMLLALALVVLAIVVQMAVTMVLHGQVESIDVIRSIFFGLLITPWAVYF
PL (1-70) MKLLRGLAQYYVDLMMKLGIVRFSLLLASALVLLAMGVQMVVTFLLQGGVQSIDLVRISIFFGLLITPWAVYF
YP (1-70) MKQIRVLAQYYVDLMVKLGIVRFSLLLASALVLLAMVVQMAVTFVLRGSVETLIDLVRISIFFGLLITPWAVYF
ER (1-70) MKQIRLLAQYYVDLMVKLGIVRFSLLLASVLVLLAMVVQMAVTTLLSGEVENIDVVRISIFFGLLITPWAVYF
VC (1-70) MKPMPKLAQYYVDLLVVKLGILRFSILLALALVALAVVVQVGITLIILNGFVDDIDIIRSVEFFGLLITPWAVYF
PP (1-52) -----MRFSLLLALALVALAVVVQIGVTLVLQGEVHNIDIVRSVFFGLLITPWAVYF
MS (1-72) MKNVFFAQRYIDWVTKLGRKFSLLGFILIAIALCTHIFLSLMITGQIHWESLLYSVVFGLVISAPFVIYF
AS (1-72) MKNVRHFTQRYIDWVIKLGRIKFSVLGFLVLAFAFALLTHIILSFIVIGGIHWESLGYSIIFGLISAPFVIYF
HI (1-72) MKNFKYFAQSYVDWVIRLGRRLRFSLLGVMILAVLALCTQILFSLFIVHQISWVDIFRSVTFGLLITAPFVIYF
PM (1-72) MKNIKYFAQKYVDWVIRLGRRLRFSLLGVIVLAILALCTQALLSLFIIGEVYVDMIRSVVFGLISAPFVIYF

```

Figura 4. Alineamientos de los residuos 73-157 de homólogos de ArcB. EC) *Escherichia coli*, SB) *Shigella boydii*, SE) *Salmonella enterica*, PL) *Photorhabdus luminescens*, YP) *Yersinia pestis*, ER) *Erwinia carotovora*, VC) *Vibrio cholerae*, PP) *Photobacterium profundum*, MS) *Mannheimia succiniciproducens*, AS) *Actinobacillus succinogenes*, HI) *Haemophilus influenzae*, y PM) *Pasteurella multocida*. Se muestra en magenta el residuo de prolina conservado.

Análisis *in vivo* de la mutación de ArcB^{P67A}

El hallazgo de que el iminoácido Pro67 era un residuo conservado en diversos homólogos de ArcB fue de enorme interés para determinar su importancia en la regulación redox de la proteína. Así, fue necesario transformar a la cepa ECL5004 $\Delta arcB::Te$ que porta el gen reportero $\lambda\Phi(cydA'-lacZ)$ y ECL5012 $\Delta arcB::Te$ con el reportero $\lambda\Phi(ildP'-lacZ)$, con el plásmido pMX733 (plásmido de una sola copia, que codifica para ArcB^{P67A}). Al comparar la expresión de los genes reporteros en condiciones aeróbicas, en las cepas mutantes (ArcB^{P67A}) contra las cepas silvestres (ArcB⁺), se observó que la actividad de β -galactosidasa para $cydA'-lacZ$ y $ildP'-lacZ$ fue 3.8 veces mayor y 2.8 veces menor respectivamente, en la proteína mutante con relación a la proteína silvestre (Figura 5).

Lo anterior, nos indicó que la proteína ArcB^{P67A} tiene una actividad “semi-constitutiva”, porque probablemente la prolina es importante para mantener la orientación de la porción citosólica de ArcB, requerida en la adecuada interacción de los “zipper” de leucinas para la formación de los puentes disulfuro de la región “linker”.

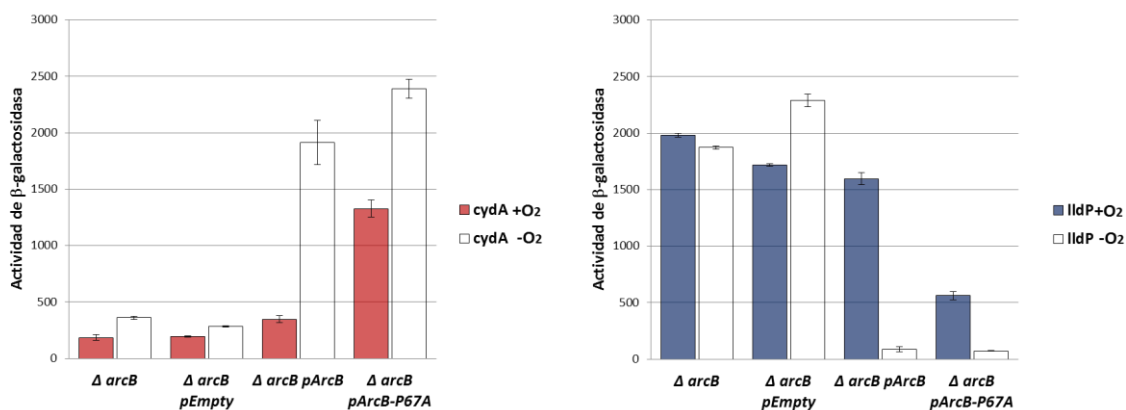


Figura 5. Efecto de la mutación ArcB^{P67A}. Se muestra la expresión de la cepa mutante en la cinasa con sus respectivos genes reporteros. Todas las cepas se crecieron aeróbicamente (barras sólidas color rojo o azul) o anaeróbicamente (barras vacías) en caldo Luria-Bertani con 0.1 M de MOPS (ácido morfolin-propano-sulfónico; pH 7.4), 20 mM D-xilosa. Para *E. coli* $\Delta arcB$ $\lambda\Phi$ (*IldP' lacZ*) se adiciona además 20 mM de L-lactato. En la fase de crecimiento media exponencial (DO_{600nm} , 0.5), las células se cosecharon y ensayaron para determinar la actividad de β -galactosidasa y expresada en unidades Miller. Todos los datos son resultado del promedio de tres experimentos independientes y su desviación estándar se indicada en cada una de las barras de la gráfica.

Análisis de la secuencia del “zipper” de leucinas de ArcB

El análisis bioinformático de la estructura secundaria de ArcB, utilizando el programa 2zip (11) reveló que los aminoácidos del segmento 73 a 94 cumplieron con las características de un “zipper” de leucinas, cuyos residuos de leucina conservados se encuentran en la secuencia VEQLSVVVEQLLEESRQRLSRLVQKLEEM. Por otra parte, al continuar con el análisis de los alineamientos de los homólogos pertenecientes al tipo I, se observa que en la secuencia de aminoácidos de los homólogos de ArcB, las leucinas están conservadas en las posiciones 73, 80, 87, 94, 108, 115, 136, 150 y 157; así en este grupo, el “zipper” de leucinas aparentemente se continúa hasta el residuo aminoácido de Leu157 (Figura 6).

EC (73-150)	L	S	V	V	V	E	Q	L	L	E	E	S	R	Q	R	L	S	R	L	V	Q	K	L	E	E	M	R	E	R	D	L	S	L	N	V	Q	L	K	D	N	I	A	Q	L	N	Q	E	I	A	V	R	E	K	A	E	A	E	L	Q	E	T	F	G	Q	L	K	I	E	I	K	E	R	E	T	Q	I	Q	L	
SB (73-150)	L	S	V	V	V	E	Q	L	L	E	E	S	R	Q	R	L	S	R	L	V	Q	K	L	E	E	M	R	E	R	D	L	S	L	N	V	Q	L	K	D	N	I	A	Q	L	N	Q	E	I	A	V	R	E	K	A	E	A	E	L	Q	E	T	F	G	Q	L	K	I	E	I	K	E	R	E	T	Q	I	Q	L	
SE (73-150)	L	S	V	V	V	E	Q	L	L	E	E	S	R	Q	R	L	S	R	L	V	Q	K	L	E	E	M	R	E	R	D	L	K	L	N	V	Q	L	K	D	N	I	A	Q	L	N	Q	E	I	V	D	R	E	K	A	E	A	E	L	Q	E	T	F	G	Q	L	K	V	E	I	K	E	R	E	E	A	Q	I	Q	L
PL (73-150)	L	S	V	V	V	E	Q	L	L	E	E	S	R	Q	R	L	S	R	L	V	E	K	L	E	V	M	R	H	R	D	L	E	L	N	V	Q	L	K	D	N	I	I	K	L	N	Q	E	I	S	E	R	E	K	A	E	Q	A	H	L	I	L	L	D	K	L	K	E	E	M	K	H	R	E	Q	T	Q	I	E	L
YP (73-150)	L	S	V	V	V	E	Q	L	L	E	E	S	R	Q	R	L	S	R	L	V	D	K	L	E	V	M	R	H	R	D	L	E	L	N	V	Q	L	T	E	N	I	T	Q	L	N	Q	E	I	V	E	R	E	K	A	E	K	A	H	L	Q	V	V	D	K	L	K	E	E	M	G	H	R	E	Q	A	Q	I	E	L
ER (73-150)	L	S	V	V	V	E	Q	L	L	E	E	S	R	Q	R	L	S	K	L	V	A	K	L	E	E	M	R	H	R	D	L	E	L	N	V	Q	L	Q	E	N	I	A	Q	L	N	Q	E	I	A	D	R	I	K	A	E	E	A	R	V	L	V	M	S	R	L	K	E	E	M	S	R	R	E	Q	A	Q	I	E	L
VC (73-150)	L	S	V	V	V	D	Q	L	L	E	E	S	R	Q	R	L	S	K	L	V	S	K	L	K	D	M	R	S	R	D	Q	E	L	N	V	Q	L	Q	Q	N	I	V	K	L	N	Q	E	I	E	E	R	I	K	A	E	E	A	R	E	E	A	M	A	D	L	E	N	E	V	Y	Q	R	E	K	T	Q	V	E	L
PP (73-150)	L	S	V	V	V	D	Q	L	L	E	D	S	R	Q	R	L	S	K	L	V	S	K	L	E	E	M	R	S	R	D	M	Q	L	N	T	Q	L	Q	M	N	I	T	Q	L	N	Q	E	I	E	E	R	E	K	A	E	E	A	R	E	I	A	M	H	D	L	E	N	E	V	Y	Q	R	E	N	A	Q	L	E	L

Figura 6. Alineamientos de los residuos 73-150 de homólogos de ArcB tipo I y II. EC) *Escherichia coli*, SB) *Shigella boydii*, SE) *Salmonella enterica*, PL) *Photorhabdus luminescens*, YP) *Yersinia pestis*, ER) *Erwinia carotovora*, VC) *Vibrio cholerae*, PP) *Photobacterium profundum*. Se muestran los residuos de leucina conservados de color magenta.

Para complementar la información obtenida por los alineamientos, se determinó la predicción de los motivos súper enrollados encontrados en la secuencia de ArcB obtenida por el método COILS/PCOILS (30). El resultado obtenido involucra a las repeticiones hepta-peptídicas de leucinas y además se continúa hasta el aminoácido 157 (Figura 7A).

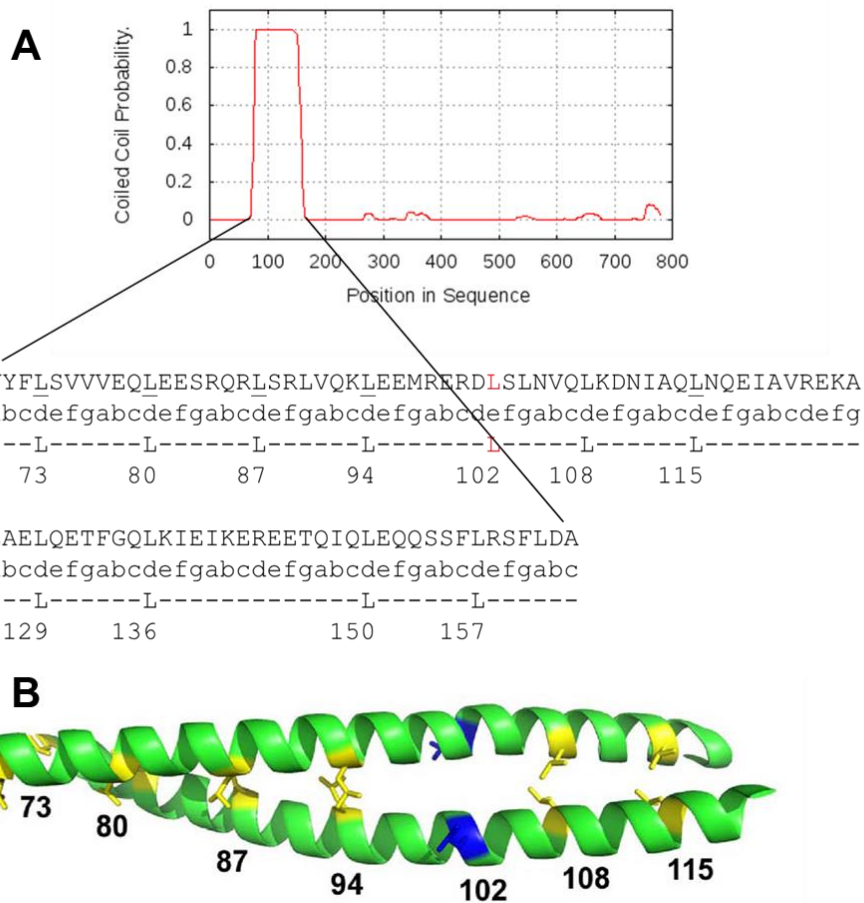


Figura 7. A. Predicción de los motivos súper enrollados encontrados en la secuencia de ArcB obtenida por la herramienta COILS/PCOILS. Abajo se presenta la secuencia del motivo de ArcB, con repeticiones hepta-peptídicas de leucinas. La L102 no se encuentra iniciando una repetición heptapeptídica. **B.** Modelo de ArcB de la secuencia 73 a 121, generado sobre la estructura cristalina de un modelo dimérico súper enrollado (Código PDB 3he5). Los residuos de leucina en las posiciones 73, 80, 87, 94, 108 y 115 están indicados en color amarillo y la posición de la leucina 102 de color azul (68).

Asimismo, con la finalidad de determinar si los residuos de leucina desde la posición 73 a 121 se encuentran en la misma cara hidrofóbica del “zipper”, se realizó un modelo basado en la estructura cristalina de un dímero súper enrollado de ArcB (código PDB 3he5). El modelo del segmento de ArcB nos demostró que coincide con las características de un “zipper”, donde los residuos de leucina 73, 80, 87, 94, 108 y 115 se encuentran orientados en la cara hidrofóbica de la hélice entre dos monómeros (Figura 7B), a diferencia de la leucina 102 (68).

Análisis *in vivo* de la funcionalidad del “zipper” de leucinas

Con los datos bioinformáticos anteriormente obtenidos, realizamos los ensayos para determinar la funcionalidad del “zipper” de leucinas de ArcB. Para esto, utilizamos los plásmidos pMX732, pMX734-pMX748 y pMX528-pMX530, que expresan la proteína ArcB silvestre o ArcB con una o más sustituciones en los residuos de leucina por valina. La valina fue escogida porque proporciona una sustitución moderada del residuo aminoácido, produciendo una débil disrupción en la estructura superenrollada del “zipper” de leucinas. Con estos plásmidos complementamos a las cepas ECL5004 $\Delta arcB::Te \lambda \Phi(cydA'-lacZ)$ y ECL5012 $\Delta arcB::Te \lambda \Phi(IldP'-lacZ)$, para determinar la actividad de cada una de las proteínas. Todas las cepas mutantes complementadas con los plásmidos utilizados se cultivaron en presencia y ausencia de oxígeno hasta una $DO_{600} \approx 0.5$.

La expresión de los genes reporteros permitió evaluar la activación o inactivación de la expresión en las diferentes cinasas ArcB mutantes. Los fenotipos encontrados correspondieron a una actividad semi-constitutiva o una actividad nula catalíticamente. Las cinasas ArcBL^{73V} y ArcBL^{80V} presentaron una actividad semi-constitutiva, ya que, en condiciones aeróbicas los valores de β -galactosidasa fueron 2.3 y 3.4 veces mayores para el gene reportero *cydA'-lacZ* (Figura 8) y 1.5 y 2.7 veces menores para *IldP'-lacZ* (Figura 9), respectivamente, en comparación con la cepa

silvestre (Figura 8). Estas cinasas aún cuando tuvieron actividad “semi-constitutiva” tuvieron regulación redox.

En contraste, las proteínas ArcBL^{87V} y ArcBL^{94V} presentaron fenotipos nulos, mostrando actividades de β -galactosidasa similares a la cepa mutante en *ArcB* (Figura 8). Con base en el modelo de la estructura cristalina de un dímero súper enrollado de ArcB (Código PDB 3he5), las Leu108 y Leu115 se encuentran en la misma cara hidrofóbica de la hélice, por lo que también se generaron y se ensayaron las proteínas mutantes ArcBL^{108V} y ArcBL^{115V}.

En el caso de Leu108 no se obtuvo actividad catalítica, mientras que para Leu115, que corresponde a la leucina más inmersa en la porción citosólica de todas las evaluadas, al ser contrastada su actividad contra la proteína silvestre, mostró en condiciones aeróbicas para los genes reporteros *cydA'-lacZ* y *IldP' lacZ*, valores de 1.4 y 1.7 veces menores, indicando que esta proteína mutante está parcialmente inactiva. Con relación a la mutante en Leu102 utilizada como control, porque no se encuentra en la misma cara hidrofóbica de la hélice del “zipper”, los valores obtenidos están acordes a una actividad redox regulada.

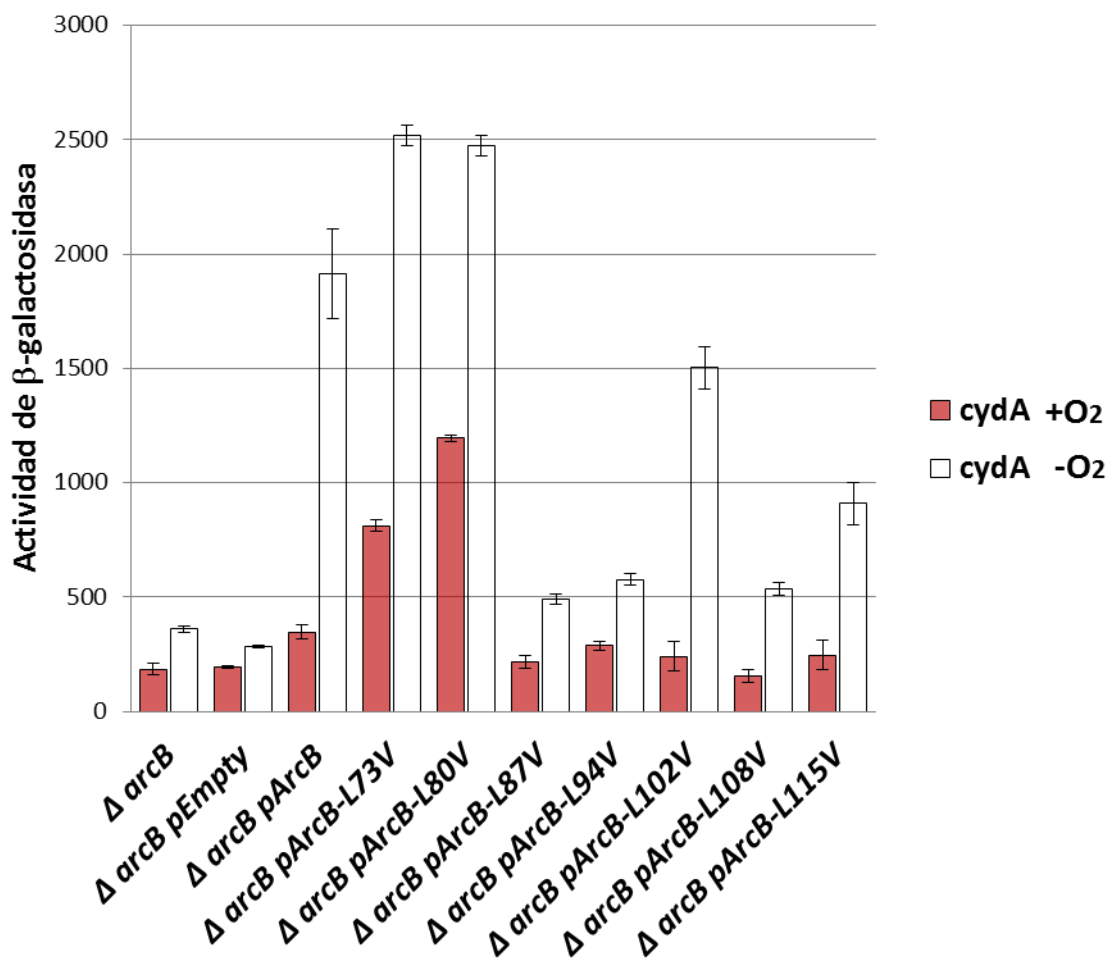


Figura 8. Ensayo de β -galactosidasa de las cepas mutantes simples en ArcB con el gen reportero $\lambda\Phi$ (*cydA'*-*lacZ*). Los plásmidos utilizados codifican proteínas ArcB con mutaciones puntuales simples en Leu73, Leu80, Leu87, Leu94, Leu102 (control), Leu108 y Leu115. Todas las cepas se crecieron aeróbicamente (barras sólidas color rojo) o anaeróbicamente (barras vacías) en caldo Luria-Bertani con 0.1 M de MOPS (ácido morfolin-propano-sulfónico; pH 7.4) y 20 mM D-xilosa. En la fase de crecimiento media exponencial (DO_{600nm} , 0.5), las células se cosecharon y ensayaron para determinar la actividad de β -galactosidasa y expresarla en unidades Miller. Todos los datos son resultado del promedio de tres experimentos independientes y su desviación estándar es indicada en cada una de las barras de la gráfica.

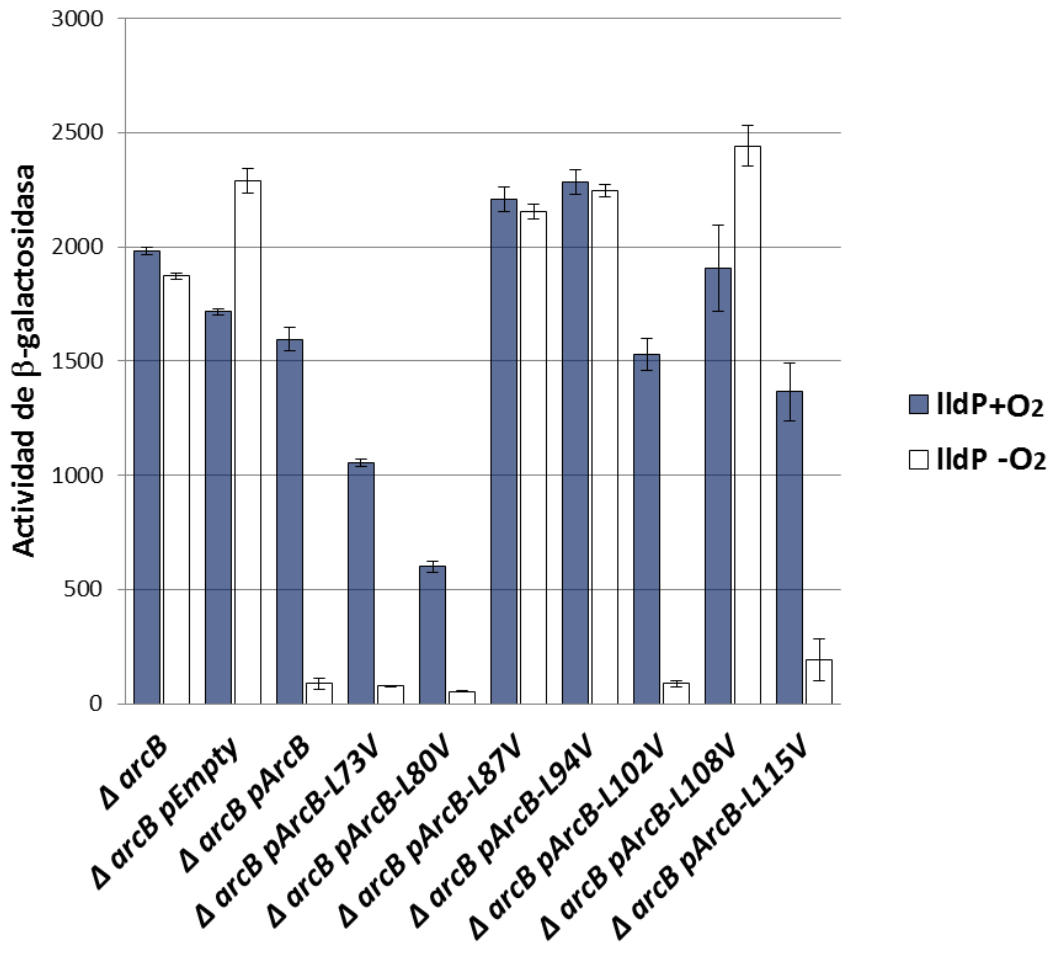


Figura 9. Ensayo de β -galactosidasa de las cepas mutantes simples en ArcB con el gen reportero $\lambda\Phi(IldP'-lacZ)$. Los plásmidos utilizados codifican proteínas ArcB con mutaciones puntuales simples en Leu73, Leu80, Leu87, Leu94, Leu102 (control), Leu108 y Leu115. Todas las cepas se crecieron aeróbicamente (barras sólidas color azul) o anaeróbicamente (barras vacías) en caldo Luria-Bertani con 0.1 M de MOPS (pH 7.4), 20 mM D-xilosa y 20 mM de L-lactato. En la fase de crecimiento media exponencial (DO_{600nm} , 0.5), las células se cosecharon y ensayaron para determinar la actividad de β -galactosidasa y expresada en unidades Miller. Todos los datos son resultado del promedio de tres experimentos independientes y su desviación estándar es indicada en cada una de las barras de la gráfica.

Al evaluar las proteínas ArcB con dos mutaciones puntuales y las combinaciones posibles, sólo ArcB con las sustituciones en la Leu73 y Leu80 mostró una mayor actividad “semi-constitutiva” en condiciones aeróbicas, que la anteriormente encontrada en las mutantes simples Leu73Val o Leu80Val, con una expresión de β -galactosidasa de 4.3 veces mayor que en la proteína silvestre para el gen reportero *cydA'-lacZ* y 7 veces menor para el reportero *lldP'-lacZ*; aunque sujeta a regulación redox. Todas las demás proteínas ArcB con dobles mutaciones, que involucraron una sustitución en la Leu87 o Leu94, rindieron una actividad catalítica nula, congruente con un fenotipo nulo (Figura 10).

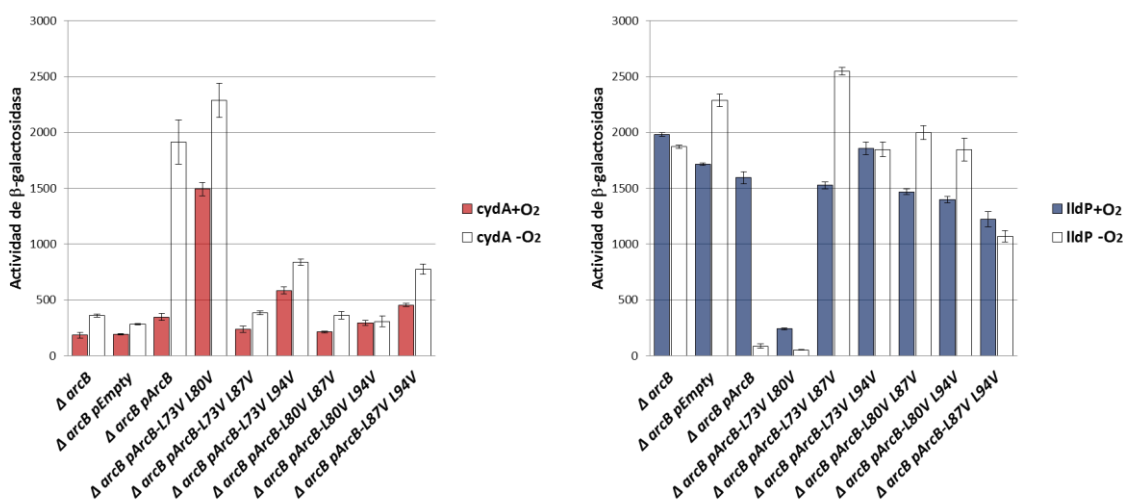


Figura 10. Ensayo de β -galactosidasa de las cepas mutantes en ArcB con el gen reportero $\lambda\Phi$ (*cydA'-lacZ*) y $\lambda\Phi$ (*lldP'-lacZ*). Los plásmidos utilizados codifican para proteínas ArcB con mutaciones dobles que involucran a Leu3, Leu80, Leu87 y Leu94. Todas las cepas se crecieron aeróbicamente (barras sólidas color rojo o azul) o anaeróbicamente (barras vacías) en caldo Luria-Bertani con 0.1 M de MOPS pH 7.4, 20 mM D-xylosa. Para *E. coli* $\Delta arcB$ $\lambda\Phi$ (*lldP' lacZ*) se adiciona además 20 mM de L-lactato. En la fase de crecimiento media exponencial (DO_{600nm}, 0.5), las células fueron cosechadas y ensayadas para determinar la actividad de β -galactosidasa y expresada en unidades Miller. Todos los datos son resultado del promedio de tres experimentos independientes y su desviación estándar es indicada en cada una de las barras de la gráfica.

Para finalizar, las proteínas con tres o la de cuatro sustituciones en los residuos Leu73, Leu80, Leu87 y Leu94 se comportaron como fenotipos nulos, confirmando que si alguna de las sustituciones es realizada en la Leu87 o Leu94, la proteína mutante no tienen actividad catalítica y por ende no tienen regulación redox (Figura 11 y 12).

Así, La exploración realizada al “zipper” de leucinas de ArcB *in vivo*, nos indica que esta cinasa es un motivo funcional necesario para su apropiada regulación redox. El hecho de que la regulación de la señalización de ArcB involucre la formación intermolecular de enlaces disulfuro entre dos monómeros de ArcB, sugiere que su mecanismo de regulación requiere la adaptación de la proteína para funcionar como un dímero y poder, en esta conformación, promover la proximidad de los dos residuos de cisteína.

Con base en lo anterior, el candidato idóneo para promover la formación de un dímero en esta región de unión de ArcB parece ser el “zipper” de leucinas. Lo que explica como el debilitamiento de la interacción hidrofóbica hélice-hélice, debido a las sustituciones Leu73 y Leu80, parece afectar la conformación de la proteína río abajo atrapándola parcialmente en la conformación de cinasa; mientras que las alteraciones de la segunda mitad del “zipper” que corresponden a Leu87V, Leu94V y Leu108V se traducen en una cinasa inactiva o parcialmente inactiva como es el caso de L115V.

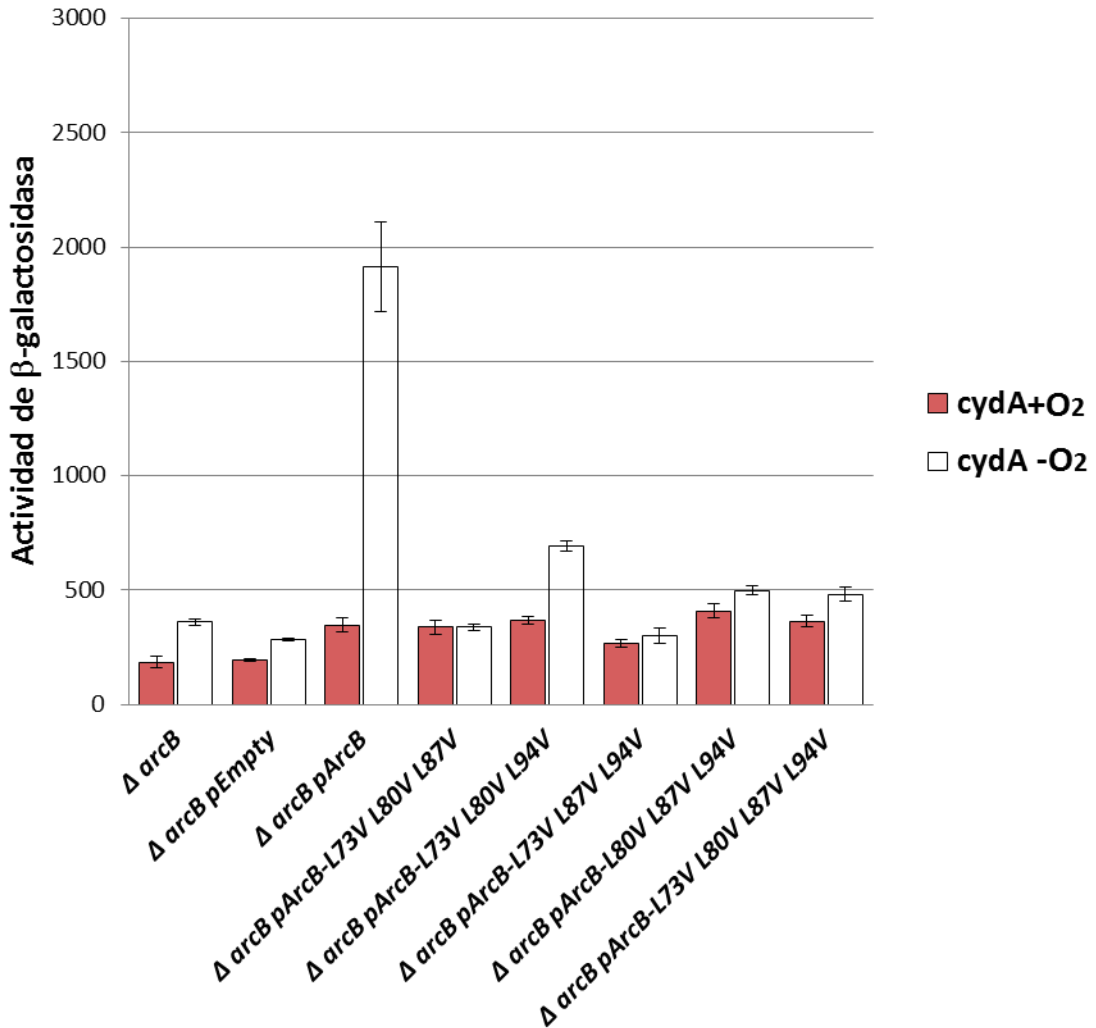


Figura 11. Ensayo de β -galactosidasa de las cepas mutantes en ArcB con el gen reportero $\lambda\Phi(\text{cydA}'\text{-}lacZ)$. Los plásmidos utilizados codifican para proteínas ArcB con mutaciones triples o la cuádruple posible, que involucran a las Leu73, Leu80, Leu87 y Leu94). Todas las cepas se cultivaron aeróbicamente (barras sólidas color rojo) o anaeróbicamente (barras vacías) en caldo Luria-Bertani con 0.1 M de MOPS pH 7.4 y 20 mM D-xilosa. En la fase de crecimiento media exponencial (DO_{600nm} , 0.5), las células se cosecharon y ensayaron para determinar la actividad de β -galactosidasa y expresarla en unidades Miller. Todos los datos son resultado del promedio de tres experimentos independientes y su desviación estándar es indicada en cada una de las barras de la gráfica.

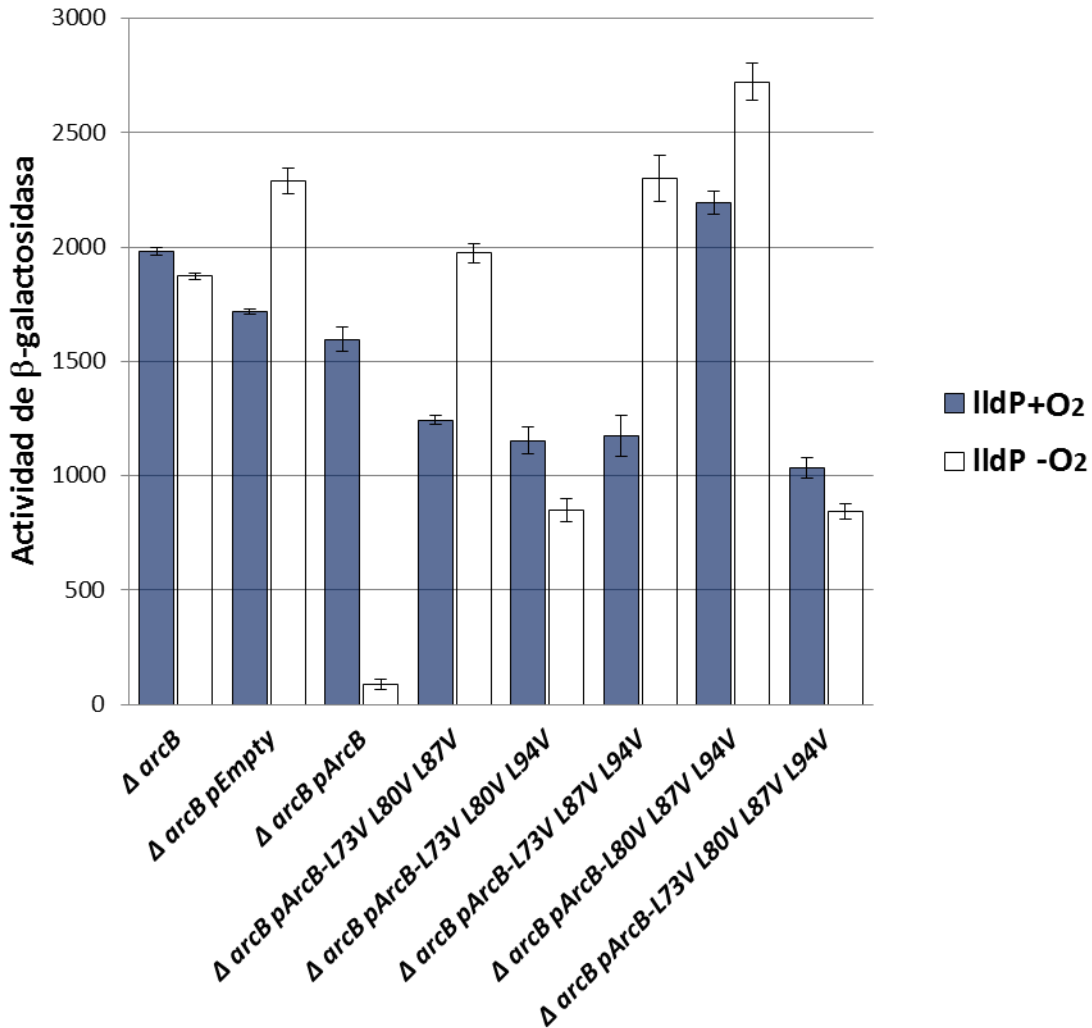


Figura 12. Ensayo de β -galactosidasa de las cepas mutantes en ArcB con el gen reportero y $\lambda\Phi(IldP^- - LacZ)$. Los plásmidos utilizados codifican para proteínas ArcB con mutaciones triples o la cuádruple posible, que involucran a las Leu73, Leu80, Leu87 y Leu94). Todas las cepas se cultivaron aeróbicamente (barras sólidas color azul) o anaeróbicamente (barras vacías) en caldo Luria-Bertani con 0.1 M de MOPS pH 7.4, 20 mM D-xilosa y 20 mM de L-lactato. En la fase de crecimiento media exponencial (DO_{600nm} , 0.5), las células se cosecharon y ensayaron para determinar la actividad de β -galactosidasa y expresarla en unidades Miller. Todos los datos son resultado del promedio de tres experimentos independientes y su desviación estándar es indicada en cada una de las barras de la gráfica.

Análisis Western Blot

Los extractos celulares obtenidos de los cultivos aeróbicos de las cepas que expresan la proteína ArcB silvestre o ArcB sustituido en una o varias de las leucinas del zipper, fueron analizados por análisis Western blot, para determinar que los resultados de actividad catalítica nula no se debe a inestabilidad de las proteínas. Para ello, se utilizó en la detección de la proteína ArcB, anticuerpos policlonales anti-ArcB⁷⁸⁻⁵²⁰ con una etiqueta His6. El resultado demostró que todos los plásmidos produjeron una expresión similar a los niveles de la cepa silvestre ArcB indicando que las sustituciones de la leucina por valina no afectaron la estabilidad de las proteínas con una o más mutaciones puntuales en el “zipper” (Figura 13).

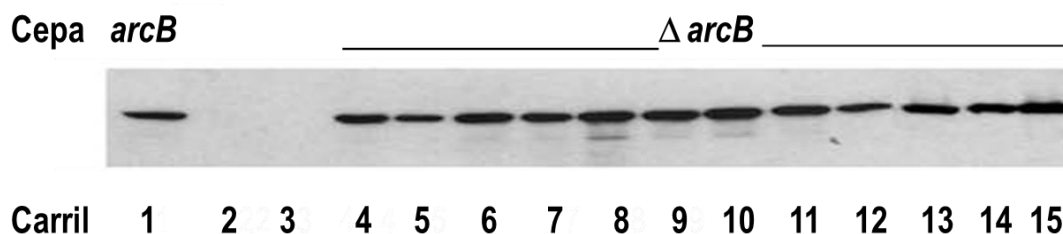


Figura 13. Análisis Western blot de las proteínas ArcB detectadas en los extractos de cultivos aeróbicos. Carril 1. ArcB^{WT}, carril 2. Sin plásmido, carril 3. Plásmido pEXT22, carril 4. pMX732 (*arcB*⁺ en pEXT22), carril 5. pMX734 (*arcB*^{L73V} en pEXT22), carril 6. pMX735 (*arcB*^{L80V} en pEXT22), carril 7. pMX736 (*arcB*^{L87V} en pEXT22), carril 8. pMX737 (*arcB*^{L94V} en pEXT22), carril 9. pMX738 (*arcB*^{L73V-L80V} en pEXT22), carril 10. pMX739 (*arcB*^{L73V-L87V} en pEXT22), carril 11. pMX741 (*arcB*^{L80V-L87V} en pEXT22), 12. pMX744 (*arcB*^{L73V-L80V-L87V} en pEXT22), 13. pMX528 (*arcB*^{L102V} en pEXT22), 14. pMX529 (*arcB*^{L108V} en pEXT22) y 15. pMX530 (*arcB*^{L115V} en pEXT22).

Ensayos de fosforilación de ArcB

La demostración *in vitro* de la funcionalidad del “zipper” la realizamos mediante ensayos de fosforilación. Por esta razón, con base en el conocimiento de que la actividad de la cinasa ArcB es inhibida por la ubiquinona-0 (Q0), un análogo soluble de la ubiquinona-8 (25, 55), evaluamos el efecto de Q0 sobre la actividad de las proteínas ArcB silvestre contenida en vesículas de membrana enriquecidas. El resultado demostró, que la proteína ArcB silvestre es rápidamente fosforilada en la presencia de DTT, e inhibida en presencia de Q0 (Figura 12), indicando que la sobre-expresión de la proteína en las fracciones de membranas preserva su actividad y regulación redox. Lo anterior, nos permitió determinar la fosforilación *in vitro* de las proteínas ArcB^{L80V} y ArcB^{L87V}, proteínas seleccionadas como representantes de las mutantes con actividad “semi-constitutiva” y nula.

Los resultados de la curva de cinética de fosforilación de las mutantes empleadas mostraron una tasa de fosforilación similar a la de la cinasa ArcB silvestre, en presencia de DTT. Sin embargo, ArcB^{L80V} que *in vivo* tuvo un comportamiento “semi-constitutivo” fue significativamente más resistente a la inhibición dependiente de Q0 que la cinasa ArcB silvestre. Por otra parte, la proteína ArcB^{L87V} no fue fosforilada indicando que la sustitución de la leucina 87 por valina origina una proteína inactiva, explicando el comportamiento de las cepas con fenotipo nulo al ser transformadas por el plásmido pMX736.

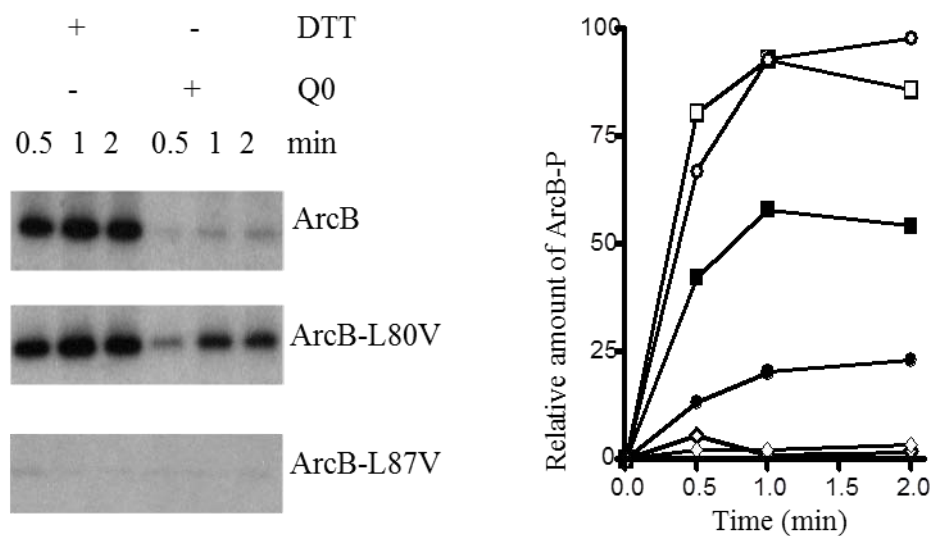


Figura 14. Efecto del DTT y la ubiquinona-Q0 sobre la tasa neta de fosforilación de ArcB. Las vesículas de membrana (1.0 μg) que contienen altas cantidades de ArcB (círculos), ArcB^{L80V} (cuadros) o ArcB^{L87V} (diamantes) fueron incubadas a temperatura ambiente con 40 μM ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ en la presencia de 5.0 mM de DTT (símbolos os blancos) o 250 μM Q0 (símbolos negros) en una mezcla de 20 μL . En los intervalos de tiempo indicados una muestra de 5 μL fue analizada en un SDS-PAGE. Panel de la izquierda muestra el autoradiograma del gel. En el panel derecho podemos observar el incremento neto de ArcB- PO_3^{2-} con relación al tiempo, cuantificado mediante PhosphorImager.

Análisis de los fenotipos dominante negativo

Para determinar si los fenotipos “semi-constitutivos” (L73V y L80V) o nulos (L87V y L94V, L108V) o parcialmente nulo (L115V) son dominantes en una cepa que exprese la proteína silvestre, utilizamos la cepa ECL5003 ArcB⁺ $\lambda\Phi(\text{cydA}'\text{-lacZ})$ transformada con los plásmidos mutantes pMX734 o pMX735 o pMX736 o pMX737 o pMX529 o pMX530. Las cepas fueron cultivadas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en caldo LB hasta una $\text{DO}_{600\text{nm}} \approx 0.500$, y posteriormente se determinó su actividad de β -galactosidasa.

Los ensayos mostraron que la cepa ECL5003 ArcB⁺ complementada con los plásmidos que expresan las cinasas L87V o L94V, para que se formen heterodímeros (un monómero ArcB silvestre y el otro ArcB^{L87V} o ArcB^{L94V}), fallaron para activar la expresión del reportero *cydA'-lacZ* en condiciones anaeróbicas.

Con relación a las cepas con los plásmidos con sustituciones L73V, L80V que exhibieron actividad “semi-constitutiva”; así como con la sustitución L102V utilizada como control, no tuvo ningún efecto sobre la expresión de *cydA' lacZ*, mostrando una regulación redox similar a la expresión de ArcB⁺ silvestre.

Finalmente, ECL5003 con los plásmidos pMX529 (ArcB^{L108V}) y pMX530 (ArcB^{L115V}) dió en condiciones anaeróbicas una actividad de β -galactosidasa para L108V y L115V de 2.2 y 1.5 veces menor para *cydA'-lacZ*, en comparación con la cepa silvestre (Figura 15). De esta forma, la formación de los heterodímeros mediante un monómero silvestre y el otro mutante, mostró que las sustituciones del residuo Leu por Val que producen un fenotipo nulo o con menor actividad cinasa que ArcB silvestre, generan un fenotipo dominante negativo.

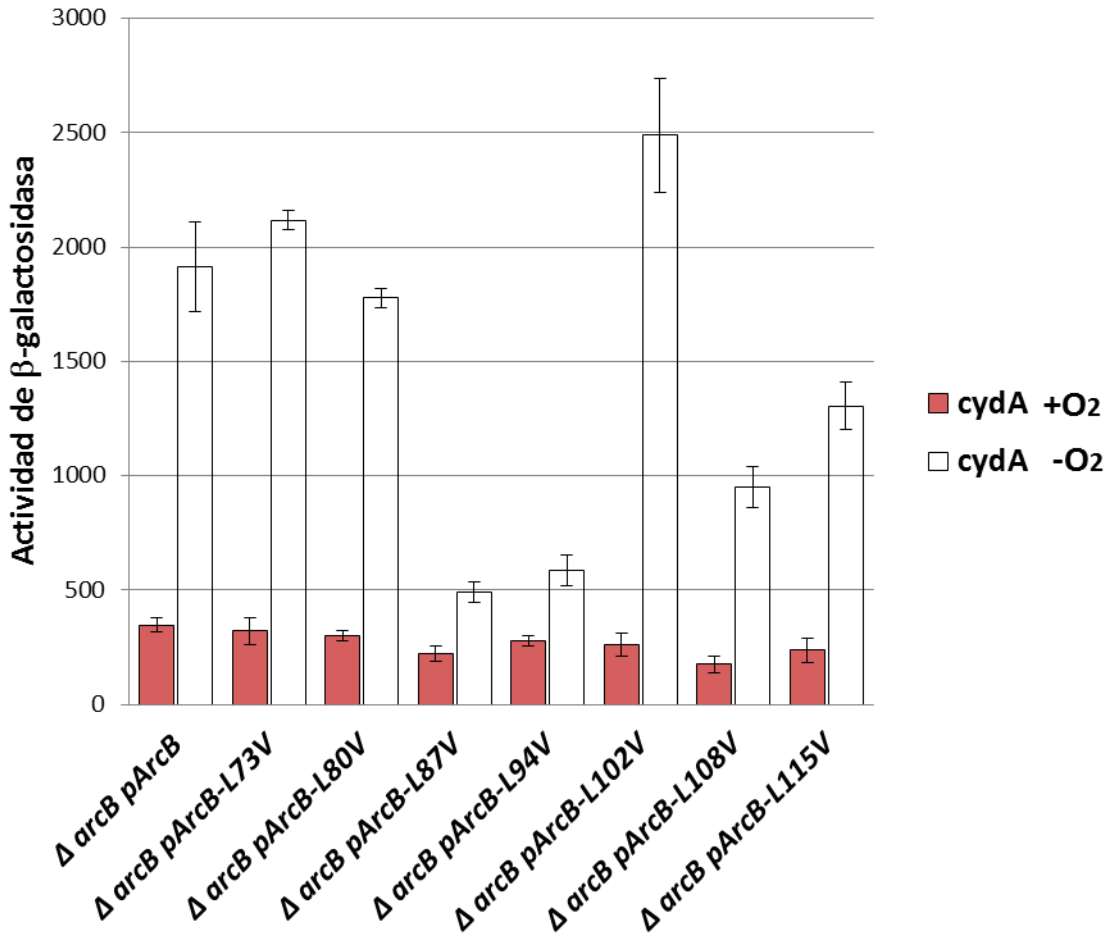


Figura 15. Ensayo de los fenotipos negativo dominantes obtenidas de la cepa ECL5003 ArcB⁺ $\lambda\Phi$ (*cydA'*-*lacZ*) transformadas con los plásmidos pMX732, pMX734-737 y pMX528-530, que codifican para ArcB con sustituciones simples en Leu73, Leu80, Leu87, Leu94V, Leu102V, Leu108V y Leu115V. Todos los ensayos fueron realizados en condiciones aeróbicas (barras sólidas color rojo) y anaeróbicas (barras vacías) en caldo Luria-Bertani con 0.1 M de MOPS pH 7.4, 20 mM D-xilosa. En la fase de crecimiento media exponencial (DO_{600nm}, 0.500), las células fueron cosechadas y ensayadas para determinar la actividad de β -galactosidasa y expresada en unidades Miller. Todos los datos son resultado del promedio de tres experimentos independientes y su desviación estándar se indica en cada una de las barras de la gráfica.

Análisis de la actividad de fosfatasa

Para determinar si el fenotipo dominante negativo observado en las proteínas con sustituciones simples en el “zipper” de leucinas, no se debe a la actividad de la fosfatasa de la proteína ArcB, al quedar atrapadas en un estado cinasa⁽⁻⁾/fosfatasa⁽⁺⁾, decidimos realizar ensayos *in vivo* utilizando la cepa ECL5004 $\Delta arcB::Te \lambda \Phi(cydA'-lacZ)$ complementadas con los plásmidos de una sola copia expresando ArcB silvestre o algunas de las mutantes simples (pMX712, pMX714-717, pMX528-pMX530). Todas las células se cultivaron hasta $DO_{600nm} \approx 0.500$, utilizando el piruvato como única fuente de energía porque bajo esta condición la concentración intracelular de acetil-fosfato es mayor que en las células cultivadas aeróbicamente en glicerol como fuente de energía y carbono (59), y porque en ausencia de su proteína cinasa sensora, muchos reguladores de respuesta sufren *in vivo* su autofosforilación a expensas del acetil-fosfato (22, 51, 108).

De acuerdo a un reporte previo (75), se encontró que el reportero *cydA'-lacZ* se expresa adecuadamente en la cepa mutante en ArcB, indicando una deficiencia en la desfosforilación de ArcA- PO_3^{2-} , donde la expresión del reportero fue 6 veces mas baja en la cepa que porta el plásmido que expresa ArcB silvestre (pMX732), mostrando una desfosforilación específica de ArcA- PO_3^{2-} por ArcB en condiciones de crecimiento aeróbicas.

Los ensayos realizados determinaron que las mutantes ArcB^{L73V} y ArcB^{L80V}, que presentaron actividad de cinasa “semi-constitutiva”, exhibieron casi el mismo nivel de actividad en la expresión del reportero que la mutante en ArcB, indicando una completa pérdida de la actividad de fosfatasa. En contraste, las mutantes ArcB^{L87V} y ArcB^{L94V} mostraron una actividad 1.4 veces menor que la mutante en ArcB, y 4.5 veces mayor que la expresión de ArcB silvestre, demostrando no únicamente la pérdida de la actividad de cinasa, sino también una severa deficiencia en su actividad de fosfatasa en condiciones de crecimiento aeróbicas (Figura 16).

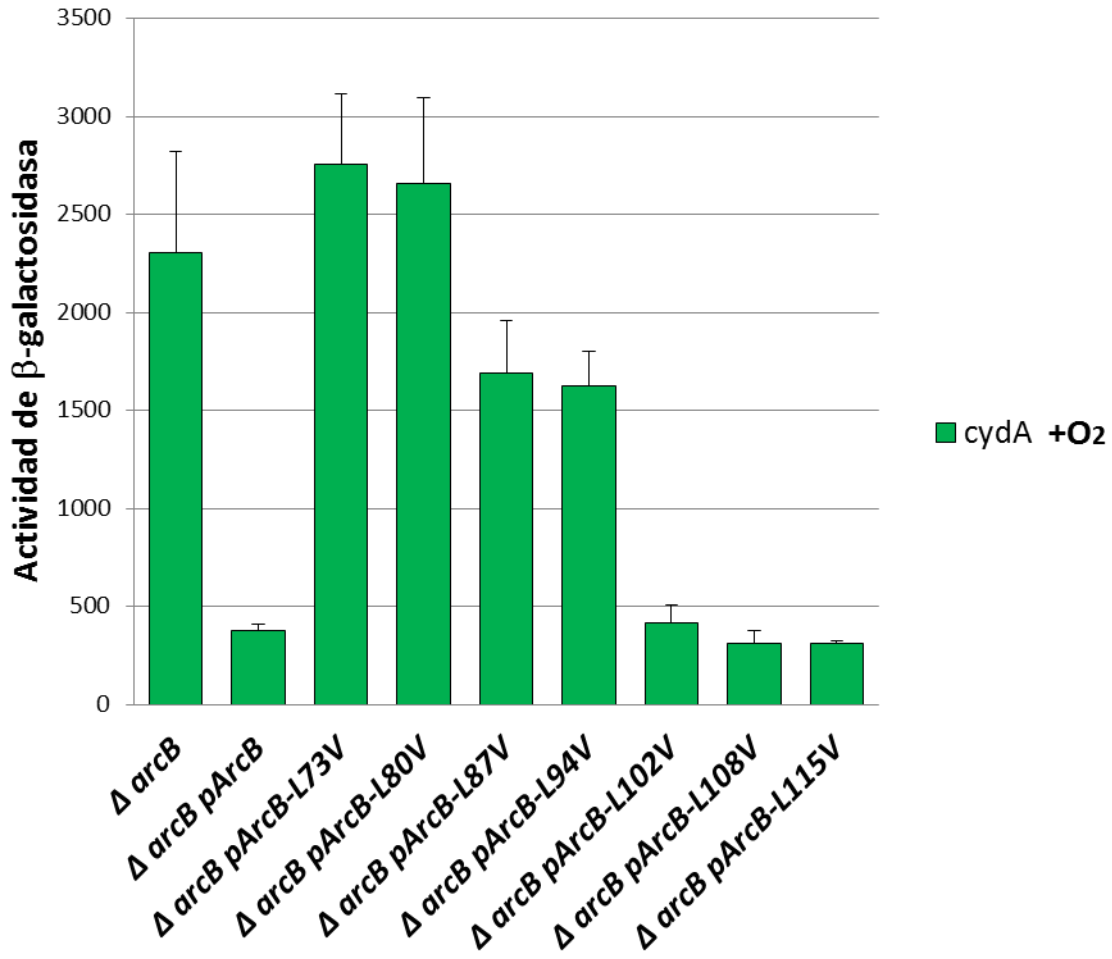


Figura 16. Efecto de la sustitución de las leucinas en ArcB sobre la actividad de fosfatasa. La cepa ECL5004 $\Delta ArcB \lambda\Phi(cydA'-lacZ)$ transformada con los plásmidos de número de bajo copia que expresan ArcB silvestre o las variantes mutantes simples en leucinas fue crecida aeróbicamente en medio mínimo con piruvato 20 mM como fuente de carbono. En la fase de crecimiento media exponencial (DO_{600nm} , 0.500), las células fueron cosechadas y ensayadas para determinar la actividad de β -galactosidasa y expresada en unidades Miller. Todos los datos son resultado del promedio de tres experimentos independientes y su desviación estándar se indica en cada una de las barras de la gráfica.

De esta forma, la posibilidad de que la conformación ArcB quedase atrapada en un estado de cinasa⁽⁻⁾/fosfatasa⁽⁺⁾ quedo descartada. En lugar de ello, la formación de los heterodímeros entre ArcB silvestre expresado cromosómicamente y ArcB inactivo expresado por los plásmidos correspondientes, podría proveer una posible explicación para el resultado de los ensayos de fenotipos dominantes negativos. Finalmente, la sustitución en Leu102 tuvo niveles de expresión del reportero, similares a los de ArcB silvestre, mientras que las mutantes en Leu108 y Leu115V mostraron una expresión levemente más baja que la ArcB silvestre indicando que estas dos últimas mutantes podrían tener una mayor actividad de fosfatasa que ArcB silvestre.

Las tiorredoxinas y/o glutarredoxinas no tienen efecto en la activación de ArcB

Como había sido reportado anteriormente que la proteína ArcB es silenciada por las quinonas que oxidan los residuos de cisteína de dos monómeros formándose dos puentes disulfuro, y dado que en el citosol de *E. coli* existen enzimas que son oxidadas formando puentes disulfuro y posteriormente son reducidas para mantener su actividad catalítica mediante enzimas de la vía de las tiorredoxinas (Trx) y la de las glutarredoxinas (Grx), se decidió evaluar si estas enzimas eran capaces de reducir los puentes disulfuro de ArcB *in vivo*. De tal forma que se construyeron las mutantes simples y dobles que fuesen viables, teniendo como fondo genético a la cepa ECL5001 que porta el gen reportero $\lambda\Phi(\text{cydA}^{-1}\text{-lacZ})$.

Como las Trx y las Grx son proteínas solubles capaces de catalizar la reacción redox disulfuro-tiol en sus proteínas sustrato mediante su sitio activo conservado que consiste en dos residuos de cisteína separados por dos aminoácidos (C-X₁-X₂-C) (1, 2), decidimos evaluar la transición de condiciones aeróbicas a aneróbicas, porque en presencia de oxígeno ArcB está oxidado mediante los dos puentes disulfuro, y así determinar si estas enzimas, con su poder catalítico para romper los enlaces disulfuro en sus proteínas sustrato, tendrían ese efecto sobre la proteína. Por esta razón, para realizar estos ensayos, las células mutantes de las proteínas de las vías Trx y Grx

fueron cultivadas aeróbicamente hasta un crecimiento $DO_{600} \approx 0.1$, y una vez alcanzada esta densidad celular, se tomaron alícuotas para también ser cultivadas en condiciones anaeróbicas. Posteriormente cuando ambas condiciones alcanzaron una $DO_{600} \approx 0.5$ se determinó su actividad de β -galactosidasa. Al comparara la expresión del gen reportero en condiciones anaeróbicas, en las cepas mutantes simples en TrxB, TrxA, TrxC, Gor, GrxA, GrxB y GrxC contra la cepa silvestre ECL5001 ArcB⁺, se observó que la actividad de β -galactosidasa para *cydA'-lacZ* fue de 1.2 a 1.4 veces menor en las mutantes con relación a la cepa silvestre. Sin embargo, pese a la menor expresión del reportero *cydA'-lacZ*, todas las mutantes simples en ambas vías mantuvieron su regulación redox.

Sin embargo, para descartar que la vía Trx pueda remplazar su actividad catalítica reductora cuando se afecta la vía Grx, y viceversa, se construyeron dobles mutantes mutando una enzima de cada vía. Así, se obtuvieron las dobles mutantes: TrxB-GrxB, TrxB-GrxC, TrxA-GrxB, TrxA-GrxC, TrxC-GrxB, TrxC-GrxC, Gor-TrxA, Gor-TrxC. No fue posible obtener todas las combinaciones de las dos vías, porque algunas no fueron viables como la doble mutante TrxB - Gor. Al comparara La expresión del gen reportero en condiciones anaeróbicas, en todas las cepas mutantes dobles contra la cepa silvestre ECL5001 ArcB⁺, se encontró que la actividad de β -galactosidasa para *cydA'-lacZ* fue de 1.2 a 1.7 veces menor en las mutantes con relación a la cepa silvestre aunque conservando su regulación redox (Figura 17).

Una posible explicación para la disminución de la expresión del reportero *cydA'-lacZ* en las cepas mutantes evaluadas, es que las actividades catalíticas de las enzimas de ambas vías Trx/Grx son necesarias para mantener eficientemente las condiciones reductoras del citosol de la bacteria; afectando la actividad catalítica probablemente de los acarreadores de electrones o de alguna otra enzima involucrada directamente en la reducción de la proteína ArcB.

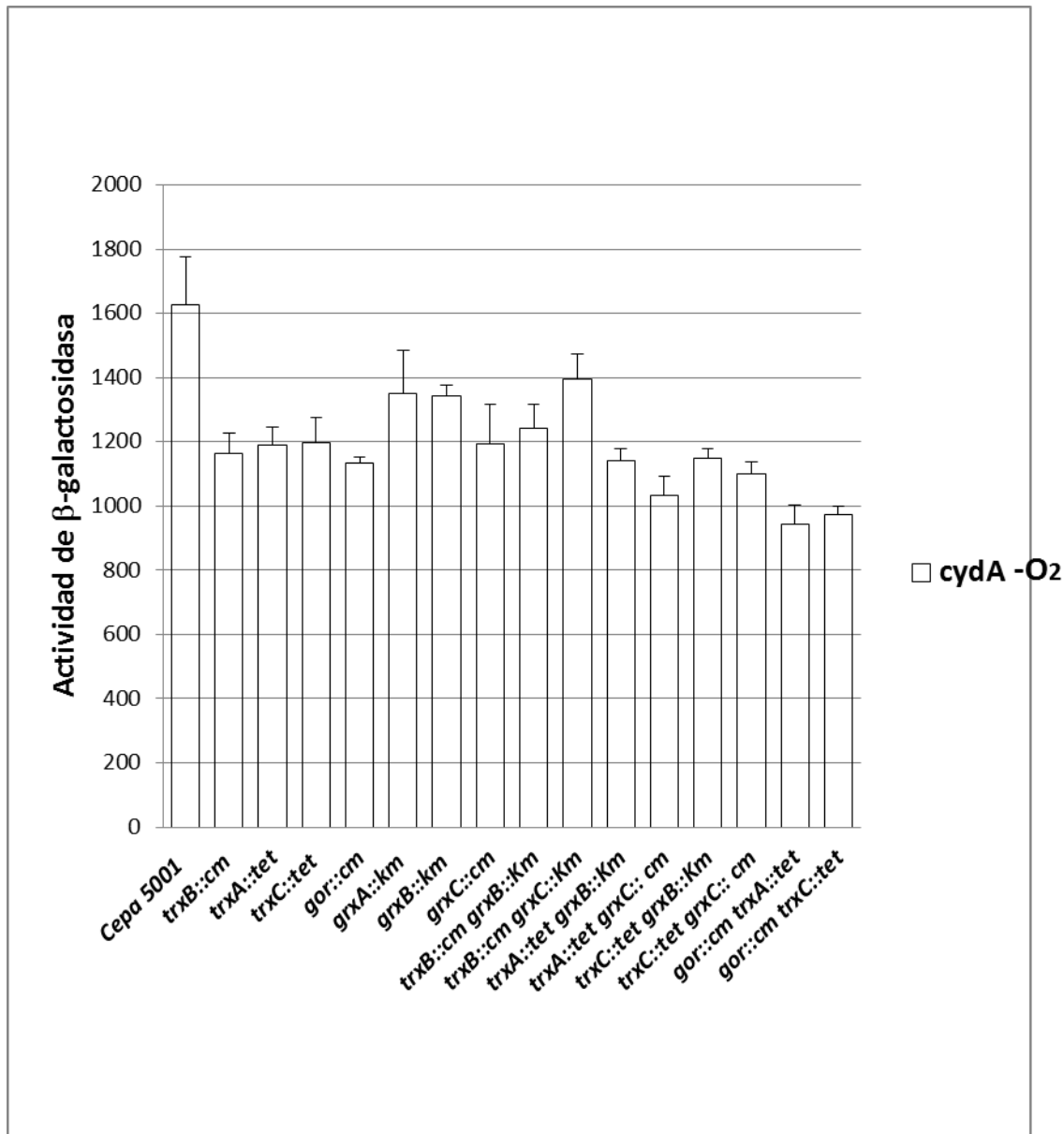


Figura 17. Ensayo de β -galactosidasa de las cepas mutantes simples y dobles en la vía Trx y/o Grx. Todas las cepas fueron cultivadas en aerobiosis a 37°C hasta alcanzar un crecimiento medio exponencial $DO_{600} \approx 0.1$. Posteriormente, los cultivos fueron cambiados a anaerobiosis e incubados durante 1 hora a 37°C. En la fase de crecimiento media exponencial (DO_{600nm} , 0.5), las células fueron cosechadas y ensayadas para determinar la actividad de β -galactosidasa y expresada en unidades Miller. Todos los datos son resultado del promedio de tres experimentos independientes y su desviación estándar se indicada en cada una de las barras de la gráfica.

Discusión

Se ha demostrado que los zippers de leucinas están involucrados en la formación de homo o heterodímeros mediante las interacciones anfipáticas entre dos monómeros de proteínas, con lo cual sus caras hidrofóbicas quedan paralelas entre sí, formando una estructura dimérica super-enrollada. En la cinasa ArcB, el zipper de leucinas está localizado después del segundo dominio transmembranal, donde las leucinas se encuentran en las posiciones 73, 80, 87 y 94. En un trabajo previo, la funcionalidad de esta estructura fue explorada reemplazando los residuos de leucina 80, 87 y 94 por alanina. La sustitución de Leu80 o Leu94 por Ala no alteró la habilidad para la señalización de ArcB *in vivo*, ni su actividad de fosforilación *in vitro*; mientras que la sustitución de Leu87 a Ala dio como resultado un fenotipo nulo de *arcB in vivo*, pero conservando su actividad *in vitro* (58). Sin embargo, los autores concluyeron que la Leu87 puede estar implicada en la propagación de la señal, pero descartaron la posibilidad de que ArcB contenga un zipper de leucinas funcional.

En contraste, en este trabajo, demostramos que el “zipper” de leucinas es un motivo esencial en la apropiada regulación de ArcB. Para ello, se reemplazó Leu73, Leu80, Leu87 o Leu94 por Val, encontrando que los cambios de Leu73 o Leu80 afectaron la actividad *in vivo*, volviendo activa a la cinasa ArcB en condiciones aeróbicas, mientras que los cambios de Leu87 o Leu94 dieron como resultado una proteína censora inactiva. Cuando se ensayó una mutante doble en Leu73 y Leu80, esta cinasa también estuvo activa en condiciones aeróbicas.

De igual forma, con la proteína truncada ArcB78-778, la cual además de ser soluble, en presencia de DTT es rápidamente fosforilada, y en presencia de QO se inhibe su fosforilación, demostrando que aunque la proteína esté truncada preserva su actividad catalítica y su capacidad de regulación; se realizaron ensayos *in vitro*, en los cuales se utilizó además de la proteína truncada silvestre, la proteína ArcB78-778^{L80V} y ArcB78-778^{L87V}. Los resultados probaron que la sustitución en Leu80 por Val fue significativamente más resistente a la inhibición dependiente de QO que la proteína

silvestre; mientras que Leu87 por Val no fue capaz de fosforilarse en presencia de DTT. Estos resultados sugieren que *in vivo* e *in vitro*, la integridad de la estructura del “zipper” de leucinas es esencial para la correcta orientación de los monómeros dentro del dímero para una apropiada regulación de la proteína ArcB (68).

En un estudio previo basándose en que el dominio transmembranal de Tar es helicoidal, rígido y forma un dímero estable en la membrana citoplásmica (80), se utilizaron varias quimeras Tar-ArcB, en las cuales el dominio transmembranal de la proteína sensora Tar fue fusionada a la porción citosólica de ArcB78-778. Las quimeras contenían el segmento transmembranal de Tar, cuyas regiones carboxilo terminal se extendían progresivamente en el citoplasma, y se fusionaba a una porción citosólica constante de ArcB78-778, que incluía a las leucinas del zipper putativo 80, 87 y 94 y los residuos de cisteína 180 y 241. Por cada residuo de Tar extra adicionado en el citosol a la quimera Tar-ArcB, se originó una rotación en aproximadamente 100° de la proteína ArcB adjunta (46). Las quimeras Tar-ArcB reportadas presentaron tres tipos diferentes de fenotipos: una actividad redox regulada, una actividad constitutiva, y una cinasa ArcB inactiva catalíticamente, lo que sugiere que las rotaciones afectan la estabilidad del zipper y por ende la adecuada regulación redox de la proteína. Nuestros resultados, concuerdan con estos fenotipos encontrados, dado que *in vivo* encontramos fenotipos nulos, con actividad catalítica (L102V) y actividad redox regulada con actividad “semi-constitutiva”.

Además, el homólogo ArcB de *Haemophilus influenzae*, que no contiene los residuos de aminoácidos 93 a 134 y 153 a 271 (no existe el dominio PAS) (56), fue capaz de complementar una mutante en ArcB de *E. coli*, con una actividad similar a la proteína silvestre, bajo cierto rango de condiciones redox (27, 56). Este homólogo de ArcB_{HI} tiene las leucinas 80, 87 y 94 como la ArcB_{Ec}, lo que nos sugiere que este motivo es necesario para la activación de la cinasa de *H. influenzae*.

Las estructuras súper enrolladas están involucradas en interacciones importantes para la célula como el control transcripcional (4). Son motivos estructurales comunes, originadas por el empaquetamiento de dos a cinco α -hélices, donde cada una se envuelve alrededor de otra, originando un súper enrollamiento. Generalmente, una α -hélice contiene 3.6 residuos por cada vuelta completa, pero la distorsión impuesta por cada una de las hélices dentro del súper-enrollamiento disminuye este valor a 3.5 (17).

De esta manera, una repetición heptapeptídica ocurre en cada dos vueltas de la hélice y los aminoácidos en las repeticiones son comúnmente denominados “a”, “b”, “c”, “d”, “e”, “f” y “g”. Las posiciones “a” y “d” corresponde a aminoácidos no polares (leucina, valina e isoleucina), para estabilizar la dimerización de la hélice a través de interacciones hidrofóbicas y de van der Waals. Los aminoácidos “e” y “g” son polares como el glutamato o la lisina, que originan especificidad entre dos hélices mediante interacciones electrostáticas. Los residuos “b”, “c” y “f” son hidrofílicos para forma la superficie enrollada expuesta al disolvente. Los residuos en la posición “d” en homodímeros paralelos corresponden a la leucina (“zipper” de leucinas). Cabe mencionar que pueden existir en la estructura súperenrollada algunos residuos que no se encuentren cumpliendo con las propiedades anteriormente mencionadas (57, 62). Así, los aminoácidos del segmento 73 a 121 de la proteína ArcB que corresponde al “zipper” de leucinas, cumplen con las características anteriormente mencionadas para las estructuras súper-enrolladas .

El hecho de que la regulación de la señalización de ArcB implica la formación intermolecular de puentes disulfuro entre dos monómeros de ArcB, sugiere que la evolución de un mecanismo de este tipo requiere la adaptación de la proteína para funcionar como un dímero para promover la proximidad de los dos residuos de cisteína. Un candidato idóneo para promover la formación de un dímero de este tipo en la región de unión de ArcB parece ser el “zipper” de leucinas. En consecuencia, la sustitución por valina de cualquiera de los residuos de leucina en este motivo súper enrollado produjo un fenotipo mutante. Interesantemente la sustitución de los dos primeros residuos de leucina, Leu73 y Leu80, resultaron en una cinasa ArcB semi-

constitutiva con una pérdida concomitante de su actividad de desfosforilación ArcA- PO_3^{2-} .

Así, el debilitamiento de la interacción hidrofóbica hélice – hélice por las sustituciones por valina de Leu73 y Leu80 puede afectar la conformación corriente abajo de tal manera que la proteína queda atrapada en la conformación de cinasa, lo cual evoca el efecto de la mutación de la región de interacción de los quimiorreceptores Tar y Tsr (93). Por otra parte, la alteración de la segunda mitad del “zipper” de leucinas, Leu87 y Leu94 resultaron en proteínas ArcB inactivas, no sólo como cinasas, sino también como fosfatasas. Finalmente, un tercer grupo fenotípico está formado por Leu108 y Leu115, donde mientras la actividad de cinasa de ArcB está total y parcialmente perdida por las sustituciones en esos residuos por valina, la actividad de fosfatasa de estas mutantes no se vió afectada. Incluso aunque es difícil determinar directamente los efectos de cierto truncamiento sobre la estabilidad del embalaje de la hélice, los tres diferentes efectos fenotípicos están distribuidos a lo largo de la estructura súper enrollada de ArcB, desde el segundo segmento transmembranal hasta los residuos de cisteína.

Cabe mencionar, que en un estudio previo basado en experimentos *in vitro* e *in vivo* se sugirió que el “zipper” de leucinas de ArcB no es un motivo funcional. Esta conclusión se basó en el hecho de que la sustitución de Leu94 por Alanina no tuvo efecto (58). Las diferencias entre la sustitución de Leu94 por alanina o valina no es clara, la mayor capacidad de las alaninas en comparación con las valinas para formar una α -hélice podría proporcionar una adecuada explicación (29). Interesantemente, las sustituciones de Leu o Val, que dan como resultado un valor nulo o una baja actividad de cinasa exhibieron un fenotipo dominante cuando se expresaron en una cepa ArcB⁺. Este efecto podría ocurrir si las mutantes ArcB quedaran atrapadas en una conformación cinasa⁽⁻⁾/fosfatasa⁽⁺⁾, que parece ser el caso de las mutantes ArcB^{L108V} y ArcB^{L115V} contrarrestando la actividad de la cinasa de la proteína ArcB codificada en el cromosoma. Por otra parte, la formación del heterodímero entre la proteína ArcB codificada en el cromosoma y las variantes de ArcB inactivas, podría proporcionar una

posible explicación para el fenotipo dominante negativo de las mutantes ArcB^{L87V} y ArcB^{L94V}.

Recientemente un estudio dilucidó como las menaquinonas reducidas son requeridas para la activación apropiada de ArcB durante el cambio de aerobiosis a anaerobiosis (3). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo respecto a las proteínas Trx y/o Grx que aunque disminuyen la actividad de cinasa de ArcB en condiciones anaeróbicas no están involucradas en la regulación de mecanismo redox-tiol de la proteína.

Finalmente, el silenciamiento de la proteína ArcB durante la transición del crecimiento anaeróbico a aeróbico, involucra que los electrones de las cisteínas de la región “linker” fluyan a las quinonas, originando dos puentes disulfuro y el fosforelevo reverso; mientras que cuando las condiciones cambian y el oxígeno está ausente o en un ambiente de microaerobiosis, entonces las menaquinonas transfieren sus electrones a los enlaces de cistina, reduciéndolos y activando a la cinasa ArcB, desencadenando el fosforelevo para que ArcA-PO₃²⁻, funcione como un regulador transcripcional. La adecuada regulación de la proteína ArcB, se requiere de la integridad de su “zipper” de leucinas, el cual es un motivo funcional para la correcta orientación entre dos monómeros y el eficiente silenciamiento de la cinasa. De esta manera, la oxidación y reducción de las cisteínas en ArcB, a través de la poza de quinonas y menaquinonas representa un mecanismo redox mediante el cual las señales son transducidas al aparato transcripcional, permitiendo a la bacteria una rápida adaptación a los cambios ambientales redox.

Conclusiones

1. El zipper de leucinas es un motivo funcional necesario para la apropiada regulación de ArcB.
2. La prolina 67 es importante para la correcta orientación de la porción citosólica de ArcB en su regulación redox
3. Las Trx y/o Grx disminuyen la actividad de ArcB pero no afectan su regulación redox.

Perspectivas

1. Determinar que conformación estructural adquiere la proteína ArcB en estado activo e inactivo.
2. Comprobar que la funcionalidad del “zipper” de leucinas está directamente ligada a la formación de los puentes disulfuro de la región linker.
3. Determinar si la conformación dimérica mediante el zipper de leucinas está vinculada a los sitios de unión de quinonas y/o menaquinonas en la regulación redox de la proteína.

Artículo

The ArcB Leucine Zipper Domain Is Required for Proper ArcB Signaling

Luis Alberto Núñez Oreza¹, Adrián F. Alvarez¹, Imilla I. Arias Olguin², Alfredo Torres Larios², Dimitris Georgellis¹.

1 Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. México,

2 Departamento de Fisiología Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. México,

3 Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. México

Abstract.

The Arc two-component system modulates the expression of numerous genes in response to respiratory growth conditions. This system comprises ArcA as the response regulator and ArcB as the sensor kinase. ArcB is a tripartite histidine kinase whose activity is regulated by the oxidation of two cytosol-located redox-active cysteine residues that participate in intermolecular disulfide bond formation. Here, we report that the ArcB protein segment covering residues 70-121, fulfills the molecular characteristics of a leucine zipper containing coiled coil structure. Also, mutational analyses of this segment reveal three different phenotypical effects to be distributed along the coiled coil structure of ArcB, demonstrating that this motif is essential for proper ArcB signaling.

The ArcB Leucine Zipper Domain Is Required for Proper ArcB Signaling

Luis Alberto Nuñez Oreza¹, Adrián F. Alvarez¹, Imilla I. Arias-Olguín², Alfredo Torres Larios³, Dimitris Georgellis^{1*}

¹ Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Mexico, ² Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Mexico, ³ Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Mexico

Abstract

The Arc two-component system modulates the expression of numerous genes in response to respiratory growth conditions. This system comprises ArcA as the response regulator and ArcB as the sensor kinase. ArcB is a tripartite histidine kinase whose activity is regulated by the oxidation of two cytosol-located redox-active cysteine residues that participate in intermolecular disulfide bond formation. Here, we report that the ArcB protein segment covering residues 70–121, fulfills the molecular characteristics of a leucine zipper containing coiled coil structure. Also, mutational analyses of this segment reveal three different phenotypical effects to be distributed along the coiled coil structure of ArcB, demonstrating that this motif is essential for proper ArcB signaling.

Citation: Nuñez Oreza LA, Alvarez AF, Arias-Olguín I, Torres Larios A, Georgellis D (2012) The ArcB Leucine Zipper Domain Is Required for Proper ArcB Signaling. PLoS ONE 7(5): e38187. doi:10.1371/journal.pone.0038187

Editor: Alejandra Bravo, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, Mexico

Received: March 2, 2012; **Accepted:** May 1, 2012; **Published:** May 30, 2012

Copyright: © 2012 Nuñez Oreza et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Grants 80684 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), IN219709 from DGAPA-PAPIIT, UNAM, and CRPMEX008-02 from the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB). A. F. Alvarez is indebted to DGAPA-UNAM for the award of a postdoctoral fellowship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: dimitris@ic.unam.mx

Introduction

The Arc (anoxic redox control) two-component system plays an important role in the complex transcriptional regulatory network that allows facultative anaerobic bacteria, such as *Escherichia coli*, to sense changes in respiratory growth conditions and adapt their gene expression accordingly [1–3]. This system consists of ArcB as the sensor kinase and ArcA as the response regulator [4,5]. The ArcB protein belongs to a subfamily of tripartite hybrid kinases; in addition to the canonical pair of transmembrane segments and the orthodox transmitter domain (H1), it possesses a central receiver domain (D1) and a secondary C-terminal transmitter domain (H2 or HPr) [5,6] (Fig. 1A). Moreover, in the linker region, that is the region connecting the catalytic domains with the transmembrane domain, there is a putative leucine zipper [7] and a PAS domain [8].

Under reducing conditions, ArcB autophosphorylates through an intramolecular reaction [9], a process that is enhanced by anaerobic metabolites such as D-lactate and acetate [10,11], and transphosphorylates ArcA via a His292 → Asp576 → His717 → Asp54 phosphorelay [12,13]. Phosphorylated ArcA represses the expression of many operons involved in respiratory metabolism, and activates a few operons encoding proteins involved in fermentative metabolism and micro-aerobic respiration [14–17]. Under non-stimulating conditions ArcB acts as a phosphatase that catalyzes the dephosphorylation of ArcA-P by a reverse Asp54 → His717 → Asp576 → Pi phosphorelay [7,18].

Previously, it was reported that regulation of the catalytic activity of ArcB is set by rotational movements that alter the orientation of the cytosolic portion of ArcB [19], and that the molecular event for

ArcB regulation involves the oxidation of two cytosol-located redox-active cysteine residues that participate in intermolecular disulfide bond formation, a reaction in which quinones act as direct oxidants [20,21]. The evolution of such a mechanism, involving intermolecular disulfide bond formation, would require that the ArcB protein evolved to operate as a homo-dimer, in order to promote the proximity of the two cysteine-residues. Although, it is generally accepted that the conserved transmitter domain of sensor kinases may promote dimerization of these proteins [22], the existence of a putative leucine zipper-like motif in the linker region of ArcB [7], and the fact that leucine zipper motifs have been implicated in homo- and hetero-dimer formation of various proteins, prompted us to hypothesize that this motif may also act as a dimerization domain for the ArcB protein. It has to be noted that in a previous study addressing this question, it was concluded that this putative leucine zipper is not a functional motif [23]. However, the results presented here indicate that the putative leucine zipper motif in the linker region of ArcB [7] fulfills the molecular characteristics of a *bona fide* leucine zipper, and that its structural integrity is required for proper regulation of ArcB activity.

Results

Sequence Analysis of the ArcB Linker Region Suggests a Coiled Coil Fold that Fulfills the Theoretical Characteristics of a Leucine Zipper

The transmembrane domain of ArcB is immediately followed by a stretch of amino acids, which appears to have a feature characteristic of the well-documented leucine zipper motif [24].

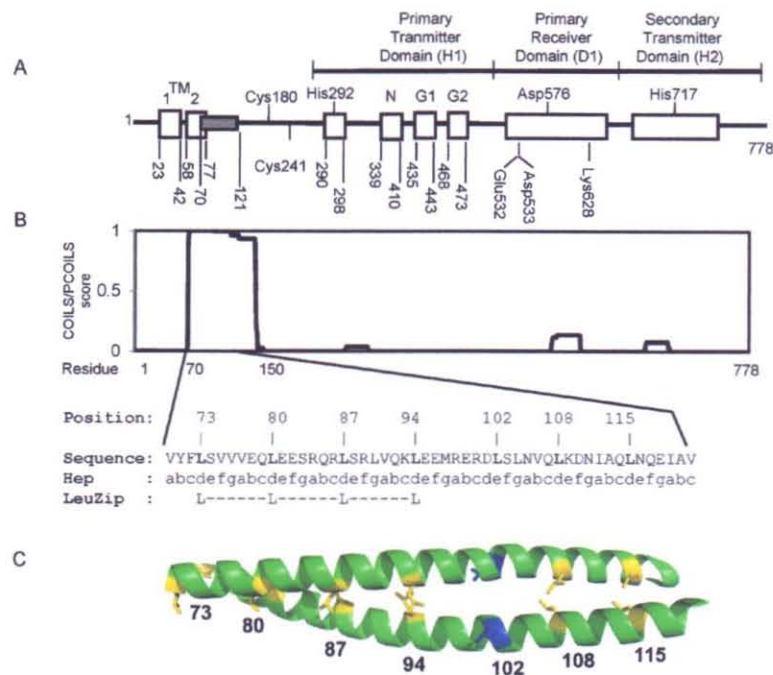


Figure 1. Schematic representation of domain composition in ArcB and coiled coil prediction. **A**) The ArcB sensor kinase is attached to the plasma membrane by TM1 corresponding to residues 23 to 41 and TM2 corresponding to residues 58 to 77. The linker region contains a coiled coil motif with a putative leucine-zipper (gray filled block) and two redox-active cysteine residues 180 and 241. The primary transmitter domain (H1) contains the conserved His292 and the catalytic determinants N, G1, and G2. The G1 and G2 sequences typify nucleotide-binding motifs. The receiver domain (D1) contains the conserved Asp576, and the histidine phosphotransfer domain (Hpt/H2) contains the conserved His717. Adapted from [7] but with some modifications. **B**) Prediction of coiled coil motifs along the ArcB amino acid sequence. Above is plotted the probability of coiled coil structure occurrence along the ArcB sequence, as predicted by the COILS/PCOILS tool. Below is presented the sequence of the ArcB coiled-coil motif with its heptad repeats, and the leucine zipper as predicted by the program 2ZIP. **C**) Model of the ArcB coiled coil section covering residues 73–121. The structure prediction was generated based on the crystal structure of a model dimeric coiled coil (PDB code 3he5). The positions of leucine residues 73, 80, 87, 94, 108 and 115 are indicated in yellow and the position of Leu 102, which was used as an experimental control, is shown in blue. doi:10.1371/journal.pone.0038187.g001

The diagnostic feature of this motif has been defined as an amphipathic helix with hydrophobic residues clustered on one face and hydrophilic residues on the opposite face, and a leucine residue at the first position in each of four contiguous heptad-repeats (LX₆LX₆LX₆LX₆). In each of these coiled coil heptad-repeats that are denoted “abcdefg”, positions “a” and “d” are occupied by non-polar residues, having the leucine in position “d”, whereas positions “e” and “g” are occupied by polar residues that are solvent-exposed [25]. It is clear from previous studies that such a motif is involved in homo- or hetero-dimer formation through interaction of the helices from two monomers, via their parallel hydrophobic faces, to give a coiled coil dimeric structure [26]. Computer-aided analysis of the secondary structure of ArcB, using the program 2zip [27], revealed that the proposed protein section fulfills the characteristics of this well-documented motif, having the conserved leucine residues at position 73, 80, 87, and 94 (Fig. 1B). Moreover, the COILS/PCOILS prediction method [28] suggested that the coiled coil structure continues to amino acid 150 with a

significant score (Fig. 1B), having the leucines 108 and 115 in the same face of the helix as the ones of the upstream leucine zipper. In Fig. 1C it is presented a structural model of the dimeric coiled coil motif of ArcB, where the proximity of the hydrophobic chains of leucine 73, 80, 87, 94, 108 and 115, but not of leucine 102 is indicated. In general, leucine zippers are found in DNA-binding regulatory proteins [29], but are also present in membrane proteins that do not bind to DNA [22,30–33].

The Integrity of the Leucine-zipper is Required for Proper *in vivo* ArcB Signaling

The functionality of the predicted leucine zipper motif in ArcB was explored by constructing a series of low copy number plasmids (pMX 734–748) expressing ArcB proteins in which each of the four leucine residues, or combinations of them, were substituted to valine. Valine was chosen because it provides the most moderate

amino acid substitution, producing a weakness of the coiled coil bundle without disrupting the helicity of this region of the protein.

The consequences of ArcB modifications were then analyzed by monitoring the *in vivo* levels of phosphorylated ArcA, as indicated by the expression of the positively controlled *cydA'-lacZ* and negatively controlled *lldP'-lacZ* target operons. To this end, the generated plasmids were transformed into the $\Delta arcB$ strains ECL5004 and ECL5012, carrying a $\lambda\Phi(cydA'-lacZ)$ operon fusion and a $\lambda\Phi(lldP'-lacZ)$ operon fusion, respectively [34]. All plasmid born *arcB* alleles produced wild-type levels of ArcB (Fig. 2B), as judged by Western blot analysis of the cell extracts with polyclonal antiserum raised against purified His₆-ArcB⁷⁸⁻⁵²⁰ (Fig. 2B), indicating that the L to V substitutions do not affect the stability of the mutant proteins.

The transformants were grown aerobically or anaerobically in buffered Luria-Bertani broth (LB) to an OD₆₀₀ of ~0.5, and their β -galactosidase activity was determined (Fig. 2A). It was found that substitution of L73V resulted in a 2-fold lower *lldP'-lacZ* expression and a 2.8-fold higher *cydA'-lacZ* expression under aerobic growth, indicating a partially constitutive active ArcB. Likewise, substitution L80V, having a more drastic effect, showed an almost 3-fold lower *lldP'-lacZ* expression and 3.5-fold higher *cydA'-lacZ* expression. Moreover, this aerobic activity was more profound in the double L73V-L80V substitution, showing a 7-fold lower *lldP'-lacZ* expres-

sion and a 4.3-fold higher *cydA'-lacZ* expression. However, no significant difference was observed on the anaerobic β -galactosidase activities, indicating that these ArcB mutants are still subjected to redox regulation. On the other hand, substituting L87 or L94 to V, and all combination mutants involving either of L87V or L94V resulted in an *arcB* null phenotype (Fig. 2, and data not shown). It has to be mentioned that in a previous study it was reported that substitution of L94 to A, in contrast to the L94 to V mutant, resulted in a wild type ArcB activity [23]. In an attempt to confirm this result, the effect of substituting either of L73, L80, L87 and L94 to A on the activity of ArcB was tested. All L to A mutants had the same effect as the L to V mutants on the activity of ArcB, except the L94 to A, which in accordance to the previous report, resulted in a wild type ArcB activity (data not shown).

As mentioned earlier, L108 and L115 are predicted to be in the same face of the helix as the ones of the upstream leucine zipper. To test whether these leucine residues are of importance for the activity/regulation of ArcB, they were substituted to valine and their aerobic and anaerobic reporter expression was monitored (Fig. 2). It was found that the L108V mutation rendered ArcB inactive, whereas the L115V mutation exhibited lower anaerobic ArcB activity. Finally, substitution of L102 to V was used as a control, because it was predicted to not be in the same face of the

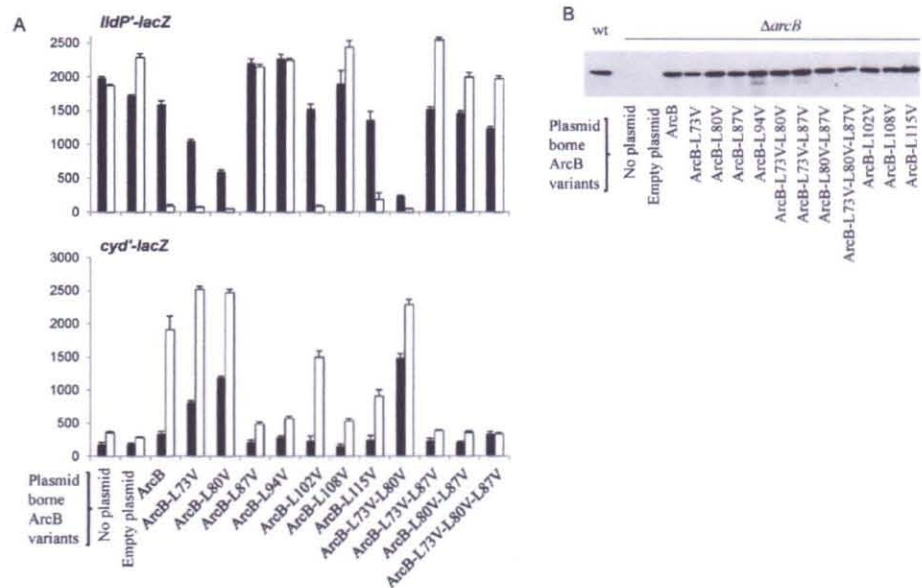


Figure 2. Effect of mutations in the leucine zipper of ArcB on the expressions of $\lambda\Phi(cydA'-lacZ)$ and $\lambda\Phi(lldP'-lacZ)$ operon fusions. (A) Strains ECL5012 [$\lambda\Phi(lldP'-lacZ)$] and ECL5004 [$\lambda\Phi(cydA'-lacZ)$] carrying low copy plasmids that harbor the *arcB* mutant variants were grown aerobically (solid bars) or anaerobically (empty bars) in Luria-Bertani broth containing 0.1 M MOPS (morpholinepropanesulfonic acid; pH 7.4) and 20 mM D-xylose. In the case of the $\lambda\Phi(lldP'-lacZ)$ -bearing strains the growth medium was supplemented with 20 mM L-lactate as an inducer. At mid-exponential growth phase (OD₆₀₀ ~ 0.5) the cells were harvested and the β -Galactosidase activity was assayed and expressed in Miller units. The data are averages from three independent experiments and the standard deviations are indicated. **(B)** Equal number of bacteria of the above aerobic cultures were analyzed by Western blot analysis, using ArcB polyclonal antibodies as previously described [34]. doi:10.1371/journal.pone.0038187.g002

helix as the ones of the upstream leucine zipper. As expected this mutant exhibited almost wild type ArcB activity.

The Integrity of the Leucine-zipper is Required for Proper *in vitro* ArcB Activity

It has been previously shown that the kinase activity of ArcB is inhibited by ubiquinone-0 (Q0), a soluble analog of ubiquinone-8) [20]. We, therefore, tested the effect of Q0 on the activity of the wild type ArcB, and the mutant ArcB^{L80V} and ArcB^{L87V} proteins in isolated membrane vesicles containing high amounts of either the three ArcB variant proteins. ArcB^{L80V} and ArcB^{L87V} were selected as representatives for mutants with increased or no ArcB activity, respectively.

SDS-PAGE analysis of the membrane fractions followed by Coomassie Blue staining revealed that ArcB was the major component in the membrane preparations (data not shown). Subsequently, 1 µg of total protein (membrane vesicles), carrying either the wild type or the mutant ArcB proteins, were incubated with [γ -³²P]ATP in the presence of dithiothreitol (DTT) or Q0, as described previously [20]. In agreement with the previous report using a truncated form of ArcB (ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸), the full length ArcB protein was rapidly phosphorylated in the presence of DTT, and its phosphorylation was inhibited in the presence of Q0 (Fig. 3), indicating that the over-expressed protein in the membrane fractions preserves its activity and regulation. However, although the net-phosphorylation kinetics of the ArcB^{L80V} mutant were similar to the one of the wild type ArcB in the presence of DTT, the ArcB^{L80V} mutant was significantly more resistant to Q0-dependent inhibition than the wild type ArcB protein (Fig. 3). Thus, in agreement with the *in vivo* results, the L80V substitution renders the protein partially insensitive to Q0. On the other hand, no phosphorylation was observed for the ArcB^{L87V} mutant (Fig. 3), indicating that the L87V mutation renders the protein inactive.

The ArcB Mutants Exhibit a Dominant Negative Phenotype

Because the above described *in vivo* and *in vitro* analyses of the leucine-zipper ArcB mutants revealed either a semi-constitutive ArcB kinase (L73V and L80V) or an inactive ArcB kinase (L87V and L94V), we asked whether these phenotypes are dominant in a wild-type strain. To this end, the *arcB*⁺ strain ECL5003 was

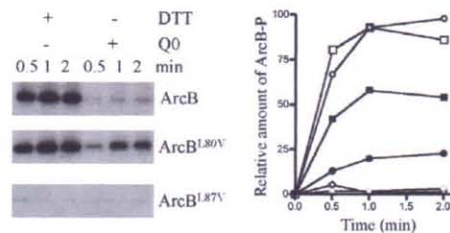


Figure 3. Effect of DTT and ubiquinone-0 on the rate of ArcB net-phosphorylation. Membrane vesicles (1 µg) containing high amounts of wild type ArcB¹⁻⁷⁷⁸ (circles) or the mutant ArcB variants (ArcB^{L80V} (squares) and ArcB^{L87V} (diamonds)) were incubated at room temperature with 40 µM [γ -³²P]ATP in the presence of 5 mM DTT (open symbols) or 250 µM Q0 (closed symbols) in a 20 µl reaction mixture. At the indicated time intervals a 5 µl sample was withdrawn for SDS-PAGE analysis. Left panel: autoradiograms of the gels. Right panel: net increase of ArcB-P with time, as quantitated with a PhosphorImager. doi:10.1371/journal.pone.0038187.g003

transformed with the mutant ArcB expressing plasmids, and the expression of the $\lambda\Phi$ (*cydA*⁺-*lacZ*) operon fusion was monitored. The transformants were grown aerobically or anaerobically in buffered Luria-Bertani broth (LB) to an OD600 of ~ 0.5, and their β -galactosidase activities were determined (Fig. 4A). It was found that the *arcB*⁺ strain carrying either the L87V or the L94V ArcB mutant expressing plasmids failed to activate *cydA*⁺-*lacZ* expression under anaerobic conditions (Fig. 4A). Also, expression of the plasmid borne L108V and the L115V ArcB mutants in an *arcB*⁺ strain resulted, respectively, in a 2.2-fold and a 1.5-fold reduction of *cydA*⁺-*lacZ* expression under anaerobic conditions (Fig. 4A).

On the other hand, the substitution L73V and L80V that exhibit a semi-constitutive ArcB activity, and also the substitution L102V, which was used as a control, had no effect on the *cydA*⁺-*lacZ* expression under the above mentioned conditions (Fig. 4A). It thus appears that the L to V substitutions that result to either lower or no ArcB kinase activity, cause a dominant negative phenotype.

The Dominant Negative Phenotype of the Leucine Zipper Mutants is Not Due to the Phosphatase Activity of ArcB

The above results led us to consider the possibility that the inactive ArcB variants could be trapped in a kinase⁻/phosphatase⁺ state, counteracting the kinase activity of the chromosomally expressed wild type ArcB. To test this possibility, we generated ArcB-independent ArcA-P *in vivo*, and examined whether the ArcB mutant variants were able to dephosphorylate ArcA-P [18]. To this end, the ECL5004 strain (Δ *arcB*, *cydA*⁺-*lacZ*) harboring the low copy number plasmids expressing either the wild type ArcB or the various ArcB mutants, was grown aerobically in defined minimal medium supplemented with 20 mM pyruvate as the sole carbon and energy source, to an OD600 of ~ 0.5, and the β -galactosidase activity was determined. Growth on pyruvate was chosen because it has been shown that under this condition the intracellular concentration of acetyl-phosphate is an order of magnitude higher than in cells grown aerobically on glycerol as the sole carbon and energy source [35], and because in the absence of their cognate sensor kinase, many response regulators undergo *in vivo* autophosphorylation at the expense of acetyl-phosphate [36–39]. In agreement with a previous report [18], it was found that the *cydA*⁺-*lacZ* reporter was suitably expressed in the Δ *arcB* strain, indicating a deficiency in ArcA-P dephosphorylating activity, whereas reporter expression was 6-fold lower in the strain carrying the wild type ArcB expressing plasmid (pMX732), indicating specific ArcA-P dephosphorylation by ArcB under aerobic growth conditions (Fig. 4B). Moreover, it was found that the L73V and L80V semi-constitutive ArcB mutants exhibited almost the same level of reporter expression as the Δ *arcB* strain, indicating a complete loss of phosphatase activity. On the other hand, the L87V and L94V ArcB mutants resulted in approximately 1.4-fold lower reporter expression than the one observed in the Δ *arcB* mutant strain, and ~4.5-fold higher reporter expression than the wild type ArcB, indicating not only loss of kinase activity (Fig. 2) but also a severe deficiency in their phosphatase activity under aerobic growth. Thus, the possibility of an ArcB conformation trapped in a kinase⁻/phosphatase⁺ state can be discarded. Instead, formation of heterodimers between chromosomally expressed wild type ArcB and plasmid borne inactive ArcB proteins, could provide a possible explanation for the above result. Finally, the L102V substitution resulted in reporter expression levels similar to those of the wild type ArcB, whereas L108V and L115V mutations resulted to a slight lower reporter expression than the wild type ArcB, indicating that these two latter mutants might have higher phosphatase activity than the wild type ArcB.

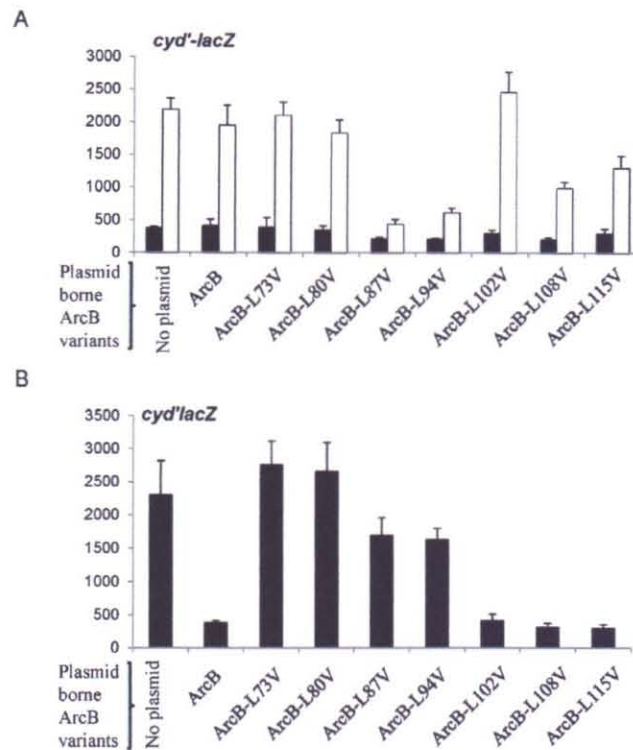


Figure 4. Effect of mutations in the leucine zipper of ArcB on its phosphatase activity and their dominant phenotypes. A) Strain ECL5003 [*arcB*^{lacZ}; $\lambda\Phi$ (*cydA-lacZ*)] carrying low copy plasmids with the *arcB* mutant variants was grown aerobically (solid bars) or anaerobically (empty bars) to mid-exponential growth phase ($OD_{600} \sim 0.5$), and the β -Galactosidase activity was assayed and expressed in Miller units. The data are averages from three independent experiments and the standard deviations are indicated. **B)** Effect of Leu replacements on the phosphatase activity of ArcB. Strain ECL5004, transformed with low-copy plasmids carrying different *arcB* forms, was grown aerobically to mid-exponential growth phase ($OD_{600} \sim 0.5$), on minimal medium with pyruvate as sole carbon source, and β -Galactosidase activity was assayed and expressed in Miller units. The data are averages from three independent experiments and the standard deviations are indicated. doi:10.1371/journal.pone.0038187.g004

Discussion

Coiled coils are common structural motifs, resulting from the packing of two to five α -helices, one wrapped around the other into a left-handed helix, to form a supercoil [40]. Each helix consists of multiple copies of a heptad-repeating unit (denoted abcdefg), containing a similar configuration of residues [41]. Coiled coil motifs are often found in sensor kinases and in many cases they have been shown to play a significant role in the signaling mechanisms. For example, the HAMP domain, which is present in $\sim 31\%$ of the sensor kinases, is usually located immediately after the transmembrane region and is of main importance for signal transmission [42]. Another common functional coiled coil motif in sensor kinases is the signaling helix (S-helix), which was suggested to function as a switch that prevents constitutive activation of downstream signaling domains [43].

Leucine zippers constitute a subtype of coiled coil structures, in which the amino acid leucine is predominant at the "d" position of the heptad repeat [24]. Although leucine zippers have been best characterized in DNA binding proteins, they also exist in many other signaling proteins [30–33]. Recently, it was reported that the leucine zipper of the cell-cycle regulated Nek2 kinase is important for its dimerization and activation [44].

The fact that the regulation of ArcB signaling involves intermolecular disulfide-bonds formation between two ArcB proteins, suggests that the evolution of such a mechanism would require adaptation of the protein to function as a dimer to promote the proximity of the two cysteine residues. A suitable candidate to promote such a dimer-formation in the linker region of ArcB appears to be the leucine zipper. Accordingly, substitution to valine of any of the leucine residues in this coiled coil motif produced a mutant phenotype. Interestingly, substitution of the

first two leucine residues, L73 and L80, resulted in a semi-constitutive ArcB kinase with concomitant loss of its ArcA-P dephosphorylating activity. Thus, the weakness of the hydrophobic helix-helix interaction by the L73V and L80V substitutions may affect the downstream conformation in such a manner that it partially traps the protein in the kinase conformation, which is reminiscent to the effect of mutating the interaction region of the *E. coli* chemoreceptors Tar and Tsr [45]. On the other hand, alterations of the second half of the leucine zipper, L87 and L94, resulted in an inactive ArcB protein, not only as kinase but also as a phosphatase. Finally, a third phenotypical group is formed by L108 and L115. While the kinase activity of ArcB was totally and partially lost by the L108 and L115 substitutions to valine, the phosphatase activity of these mutants was not affected. Even though it is difficult to directly determine the effects of a given "knob" truncation on helix packing stability, the three different phenotypical effects are distributed along the coiled coil structure of ArcB, from the second TM region to the redox active cysteine residues.

Noteworthy, in a previous study, based on *in vivo* and *in vitro* experiments, it was suggested that the leucine zipper of ArcB is not a functional motif. This conclusion was based on the fact that the L94A substitution was without effect, a result confirmed in our study (data not shown), but overlooking the fact that a L80A substitution showed a semi-constitutive kinase activity and a L87A substitution resulted in an *arcB* null phenotype [23]. Although the reasons of the difference between the L94V and L94A substitution are not clear, the higher capability of alanines in comparison to valines to form an α -helix could provide a suitable explanation [46]. Interestingly, the L to V substitutions, resulting in null or lower ArcB kinase activity, were shown to exhibit a dominant phenotype when expressed in an *arcB*⁻ strain. Such an effect could occur if the ArcB mutants were trapped in a kinase⁻/phosphatase⁺ conformation, which appears to be the case of the ArcB^{L108V} and ArcB^{L115V} mutants, thereby counteracting the kinase activity of the chromosomal encoded ArcB protein. On the other hand, heterodimer formation between the chromosomal encoded ArcB protein and the inactive ArcB variants, could provide a possible explanation for the dominant negative phenotype of the ArcB^{L87V} and ArcB^{L94V} mutants.

Taken together, our experimental results clearly indicate that the structural integrity of not only the leucine zipper but also the overall coiled coil fold of ArcB is essential for the correct orientation of the monomers within a dimer, and thereby required for proper ArcB signaling.

Materials and Methods

Bacterial Strains, Plasmids and Oligonucleotides

Escherichia coli strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Plasmid pMX712 was constructed by cloning the *Bam*HI-*Hind*III fragment from plasmid pLBW [34], which carries the *arcB* promoter, the *arcB* ribosome binding site, an introduced *Nde*I site that includes the initiation codon of *arcB*, and the *arcB* ORF and stop codon, into pBlueScript II KS⁺. Plasmids pMX734-737 and pMX528-530 were constructed by site-directed mutagenesis of plasmid pMX712, substituting either of leucine 73, 80, 87, 94, 102, 108 or 115 to valine and subsequent cloning of the resulting modified *arcB* gene into plasmid pEXT22. For example, to construct the plasmid expressing ArcB^{L73V}, primers 5'-CCC GGATCCGATATGAAG-CAAATTCGCTGCTGGCGC-3' and 5'-GACGACCACCGACACAAAGTAGACCGC-3' were used in PCR with plasmid pMX712 as template. The product of this reaction was purified

and used as a megaprimer in a PCR together with primer 5'-CTCAGACCGACGATACCGTT-3' and pMX712 as template. The product of this second PCR was digested with *Nde*I and *Nru*I, and used to substitute the *Nde*I - *Nru*I wild-type fragment of pMX712. Finally, the *Bam*HI - *Hind*III fragment of the resultant plasmid was inserted into the *Bam*HI and *Hind*III sites of the one-copy number plasmid pEXT22 [47] to generate plasmid pMX734. A similar strategy was employed to generate the other single mutants but with the corresponding mutagenic primer (Leu 80:5'-CGTGACTCCTCCACTTGTCTCGAGC-3', Leu 87:5'-CAGCCGTGACACAGCTTGTCTCG-3', Leu 94:5'-GGCATCTCTCCACTTTTTGCACCAGCGC-3', Leu 102:5'-CTGAACGTTGAGGCTCACATCGCGCTCGCGC-3', Leu 108:5'-GCTGGCAATATATCTTTTACCTGAACGTTGAGGCTC-3', Leu 115:5'-CGAACGGCAATTTCCCTGATTTACCTGGGCAATATATC-3'). To construct plasmids with double, triple or quadruple mutations in the leucine zipper we employed the same strategy but with single, double or triple mutant plasmids as the template. All plasmids were verified by DNA sequencing. Plasmids pMX517, pMX520 and pMX521 were constructed by substituting the *Nde*I-*Hind*III fragment of pMX020 [18] with the *Nde*I-*Hind*III fragment of plasmids pMX712 (wild type ArcB), pMX715 (ArcB^{L80V}), and pMX716 (ArcB^{L87V}).

Growth Conditions

Escherichia coli strains were routinely grown in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C. When necessary, ampicillin, kanamycin, tetracycline or chloramphenicol was used at final concentrations of 100, 50, 12.5 or 34 μ g ml⁻¹, respectively. To induce expression of the *ara* promoter controlled genes, arabinose was added to a final concentration of 0.13 mM. To estimate *in vivo* phosphatase activity of the ArcB variants, ArcB-independent ArcA-P was generated by growing cells in a defined minimal medium [1 mM KH₂PO₄, 40 mM KCl, 34 mM NaCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 1 μ M FeSO₄, 0.3 mM MgSO₄, 1 μ M ZnCl₂, 10 μ M CaCl₂, and 0.1 M MOPS, at a final pH of 7.4] supplemented with 20 mM pyruvate as described previously [9].

ArcB-enriched Inverted Vesicles Preparation and Phosphorylation Assays

Strain ECL5012 carrying pMX517, pMX520 or pMX521, was grown in 250 ml of ampicillin containing LB medium at 37°C until an OD₆₀₀ of 0.5. Then, expression of ArcB was induced by addition of L-arabinose to a final concentration of 0.13 mM. Cells were harvested 4 hours after induction, resuspended in 6 ml of ice-cold MOPS buffer (50 mM K-MOPS, pH 7.0, 5 mM MgSO₄, and 100 mM KCl), and broken by passing through a French Press. The cell lysate was cleared by centrifugation at 10,000 g for 15 min, and the ArcB embedded into inner membranes was centrifuged at 32,500 g for 40 min at 4°C. Finally, the membranes were solubilized in 500 μ l of MOPS buffer containing 30% glycerol, and stored at -20 °C. Phosphorylation assays were carried out at room temperature in the presence of 40 mM [γ -³²P]ATP (specific activity, 2 Ci mmol⁻¹; New England Nuclear), 33 mM HEPES (pH 7.5), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, and 10% glycerol. 1 μ g of the total protein (membrane vesicles), carrying either the wild type or the mutant ArcB proteins, was used in phosphorylation assays in the presence of 5 mM dithiothreitol (DTT) or 250 mM Q0, as described previously [48].

Table 1. *Escherichia coli* strains and plasmids used in this study are listed.

Strain	Relevant characteristics	Source
ECL5004	$\Delta arcB::Tet^r \lambda\Phi(cydA^-lacZ) \Delta fnr::Tn9(Cm^r)$	[34]
ECL5012	$\Delta arcB::Tet^r \lambda\Phi(lldP^-lacZ)$	[34]
ECL5003	$arcB^+ \lambda\Phi(cydA^-lacZ) \Delta fnr::Tn9(Cm^r)$	[34]
Plasmids		
pBluescript SK II Cloning vector, Amp ^r (+)		Stratagene
pEXT22	Low copy number vector, Kan ^r	[47]
pMX712	$arcB^+$ in pBluescript KS II (+)	This study
pMX715	$arcB^{80V}$ in pBluescript KS II (+)	This study
pMX716	$arcB^{80V}$ in pBluescript KS II (+)	This study
pMX732	$arcB^+$ in pEXT22	This study
pMX734	$arcB^{73V}$ in pEXT22	This study
pMX735	$arcB^{80V}$ in pEXT22	This study
pMX736	$arcB^{80V}$ in pEXT22	This study
pMX737	$arcB^{94V}$ in pEXT22	This study
pMX528	$arcB^{102V}$ in pEXT22	This study
pMX529	$arcB^{108V}$ in pEXT22	This study
pMX530	$arcB^{113V}$ in pEXT22	This study
pMX738	$arcB^{73V+80V}$ in pEXT22	This study
pMX739	$arcB^{73V+80V}$ in pEXT22	This study
pMX741	$arcB^{80V+LKV}$ in pEXT22	This study
pMX744	$arcB^{73V+80V+LKV}$ in pEXT22	This study
pMX020	$arcB^{21-77R}$ under control of <i>ara</i> promoter, Amp ^r	[18]
pMX517	$arcB^{97T}$ under control of <i>ara</i> promoter, Amp ^r	This study
pMX520	$arcB^{80V}$ under control of <i>ara</i> promoter, Amp ^r	This study
pMX521	$arcB^{87V}$ under control of <i>ara</i> promoter, Amp ^r	This study

doi:10.1371/journal.pone.0038187.t001

β -Galactosidase Activity Assay

The $\lambda\Phi(cydA^-lacZ)$ bearing strains were grown in Luria-Bertani broth containing 0.1 M MOPS (morpholinepropanesulfonic acid; pH 7.4) and 20 mM D-xylose. The $\lambda\Phi(lldP^-lacZ)$ -bearing strains were grown in the above medium supplemented with 20 mM L-

lactate as an inducer. For aerobic growth, cells were cultured in 10 ml of medium in 250-ml baffled flasks at 37°C with shaking (300 rpm). For anaerobic growth, cells were cultured in a screw-capped tube filled with medium up to the rim at 37°C and stirred by a magnet. β -Galactosidase activity was assayed with exponentially growing cultures and expressed in Miller units as described previously [49].

Western Blot Analysis

Aerobically grown cultures were harvested by centrifugation during mid-exponential growth. The cell pellet was resuspended in 5X-SDS sample buffer and separated by SDS-PAGE (10% polyacrylamide gel), and the proteins were transferred to a Hybond-ECL filter (Amersham Biosciences). The filter was equilibrated in TTBS buffer (25 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20) for 10 min and incubated in blocking buffer (1% milk in TTBS) for 1 h at room temperature. ArcB polyclonal antibodies, raised against His₆-ArcB⁷⁸⁻⁵²⁰ [12], were added at a dilution of 1:10,000 to the filter and incubated for 1 h at room temperature. The bound antibody was detected by using anti-rabbit IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase and the ECL detection system (Amersham Biosciences).

Structural Model of the ArcB Coiled Coil Linker Region

The structural model was inferred using the results, with the highest normalized Z-score, provided by the I-TASSER server (<http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) [50]. The predicted model is based on the monomeric helix (covering amino acid residues 70–89) derived from the solution structure of the ArcB transmembrane domain (PDB code 2 ksd), and using the original coordinates of the dimeric coiled coil motif from PDB code 3hc5 as a template.

Acknowledgments

We thank Claudia Rodriguez and Miriam Vazquez-Acevedo for technical assistance, and the Unidad de Biología Molecular from the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México for oligonucleotide synthesis and sequencing.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DG. Performed the experiments: LANO AFA. Analyzed the data: AFA DG. Contributed reagents/materials/analysis tools: ATL IIAO. Wrote the paper: AFA DG. Computer-aided analysis and modeling of the ArcB coiled coil: ATL IIAO.

References

- Georgellis D, Kwon O, Lin EC, Wong SM, Akerley BJ (2001) Redox signal transduction by the ArcB sensor kinase of *Haemophilus influenzae* lacking the PAS domain. *J Bacteriol* 183: 7206–7212.
- Jung WS, Jung YR, Oh DB, Kang HA, Lee SY, et al. (2008) Characterization of the Arc two-component signal transduction system of the capnophilic rumen bacterium *Manduca sexta*. *FEMS Microbiol Lett* 284: 109–119.
- Malpica R, Sandoval GR, Rodriguez C, Franco B, Georgellis D (2006) Signaling by the Arc two-component system provides a link between the redox state of the quinone pool and gene expression. *Antioxid Redox Signal* 8: 781–795.
- Iuchi S, Lin EC (1988) *arcA* (*dfr*), 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, Matsuda Z, Fujiwara T, Lin EC (1990) The *arcB* gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the Arc regulon. *Mol Microbiol* 4: 715–727.
- Ishige K, Nagasawa S, Tokishita S, Mizuno T (1994) A novel device of bacterial signal transducers. *EMBO J* 13: 5195–5202.
- Georgellis D, Kwon O, De Wulf P, Lin EC (1998) Signal decay through a reverse phosphorylation in the Arc two-component signal transduction system. *J Biol Chem* 273: 32864–32869.
- Zhuilin IB, Taylor BL, Dixon R (1997) PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem Sci* 22: 331–333.
- Peña-Sandoval GR, Georgellis D (2010) The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli* autophosphorylates by an intramolecular reaction. *J Bacteriol* 192: 1735–1739.
- Rodriguez C, Kwon O, Georgellis D (2004) Effect of D-lactate on the physiological activity of the ArcB sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186: 2085–2090.
- Georgellis D, Kwon O, Lin EC (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.
- Kwon O, Georgellis D, Lin EC (2000) Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the arc two-component system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182: 3858–3862.
- Georgellis D, Lynch AS, Lin EC (1997) *In vitro* phosphorylation study of the Arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179: 5429–5435.
- Gunsalus RP, Park SJ (1994) Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: control by the ArcAB and Fur regulons. *Res Microbiol* 145: 437–450.
- Liu X, De Wulf P (2004) Probing the ArcA-P modulation of *Escherichia coli* by whole genome transcriptional analysis and sequence recognition profiling. *J Biol Chem* 279: 12588–12597.

16. Lynch AS, Lin EC (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.
17. Alvarez AF, Malpica R, Contreras M, Escamilla E, Georgellis D (2010) Cytochrome *d* but not cytochrome *s* rescues the toluene blue growth sensitivity of *arc* mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 192: 391–399.
18. Peña-Sandoval GR, Kwon O, 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.
19. Kwon O, Georgellis D, Lin EC (2003) Rotational on-off switching of a hybrid membrane sensor kinase Tar-ArcB in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 278: 13192–13195.
20. Georgellis D, Kwon O, Lin EC (2001) Quinones as the redox signal for the Arc two-component system of bacteria. *Science* 292: 2314–2316.
21. Malpica R, Franco B, Rodriguez C, Kwon O, Georgellis D (2004) Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13318–13323.
22. Tomonori C, Tanaka T, Dutta R, Park H, Saha SK, et al. (1999) Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ. *Nature structural biology* 6: 729–734.
23. Matsushika A, Mizuno T (2000) Characterization of three putative sub-domains in the signal-input domain of the ArcB hybrid sensor in *Escherichia coli*. *J Biochem* 127: 855–860.
24. Landshulz WH, Johnson PF, McKnight SL (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240: 1759–1764.
25. Mason JM, Arndt KM (2004) Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *ChemBiochem* 5: 170–176.
26. Vison C, Acharya A, Taparowsky EJ (2006) Deciphering B-ZIP transcription factor interactions *in vitro* and *in vivo*. *Biochim Biophys Acta* 1759: 4–12.
27. Bornberg-Bauer E, Rivola E, Vingron M (1998) Computational approaches to identify leucine zippers. *Nucleic acids res* 26: 2740–2746.
28. Gruber M, Soding J, Lupas AN (2005) REPPER—repeats and their periodicities in fibrous proteins. *Nucleic acids res* 33: 239–243.
29. Buckland R, Wild F (1989) Leucine zipper motif extends. *Nature* 338: 547.
30. Mukai H, Ono Y (1994) A novel protein kinase with leucine zipper-like sequences: its catalytic domain is highly homologous to that of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Co* 199: 897–904.
31. Lau PC, Wang Y, Patel A, Labbe D, Bergeron H, et al. (1997) A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1453–1458.
32. Yaku H, 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.
33. Fry AM, Arnaud I, Nigg EA (1999) Activity of the human centrosomal kinase, Nek2, depends on an unusual leucine zipper dimerization motif. *J Biol Chem* 274: 16304–16310.
34. Kwon O, Georgellis D, Lynch AS, Boyd D, Lin EC (2000) The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region. *J Bacteriol* 182: 2960–2966.
35. McCleary WR, Stock JB (1994) Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J Biol Chem* 269: 31567–31572.
36. Lee TY, Makino K, Shinagawa H, Nakata A (1990) Overproduction of acetate kinase activates the phosphate regulon in the absence of the *phoR* and *phoM* functions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172: 2245–2249.
37. Wanner BL, Wimes-Riesenberg MR (1992) Involvement of phosphotransacylase, acetate kinase, and acetyl phosphate synthesis in control of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174: 2124–2130.
38. Dailey FE, Berg HC (1993) Change in direction of flagellar rotation in *Escherichia coli* mediated by acetate kinase. *J Bacteriol* 175: 3236–3239.
39. Feng J, Atkinson MR, McCleary W, Stock JB, Wanner BL, et al. (1992) Role of phosphorylated metabolic intermediates in the regulation of glutamine synthetase synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174: 6061–6070.
40. Crick FHC (1953) The packing of α -helices: simple coiled-coils. *Acta Crystallogr* 6: 689–697.
41. McLachlan AD, Stewart M (1975) Tropomyosin coiled-coil interactions: evidence for an unstaggered structure. *J Mol Biol* 98: 293–304.
42. Gao R, Stock AM (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* 63: 133–154.
43. Anantharaman V, Balaji S, Aravind L (2006) The signaling helix: a common functional theme in diverse signaling proteins. *Biol Direct* 1: 25.
44. Crossdale R, Ivins FJ, Maskett F, Davier T, Scott DJ, et al. (2011) An undecided coiled coil: the leucine zipper of Nek2 kinase exhibits atypical conformational exchange dynamics. *J Biol Chem* 286: 27537–27547.
45. Swain KE, Gonzalez MA, Falke JJ (2009) Engineered socket study of signaling through a four-helix bundle: evidence for a yin-yang mechanism in the kinase control module of the aspartate receptor. *Biochemistry* 48: 9266–9277.
46. Gargovet LM, Sauer RT (1998) Tolerance of a protein helix to multiple alanine and valine substitutions. *Folding & design* 3: 119–126.
47. Dykxhoorn DM, St Pierre R, Linn T (1996) A set of compatible *lac* promoter expression vectors. *Gene* 177: 133–136.
48. Alvarez AF, Georgellis D (2010) *In vitro* and *in vivo* analysis of the ArcB/A redox signaling pathway. *Method Enzymol* 471: 205–228.
49. Miller JH (1972) β -Galactosidase Assay. In: *Experiments in molecular genetics*. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. pp 352–355.
50. Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5: 725–738.

Referencias Bibliográficas

1. Abel, T., and Maniatis, T. 1989. Gene regulation. Action of leucine zippers. *Nature*. 341: 24-25.
2. 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 USA*. 93:3416-21.
3. Alvarez, A.F., Rodriguez, C. & Georgellis, D. 2013. Ubiquinone and menaquinone electron-carriers represent the Ying and Yang in the redox regulation of the ArcB sensor kinase. *J Bacteriol*. 13: 3054-3061.
4. Anantharaman, V., Balaji, S., Aravind, L. 2006. The signaling helix: a common functional theme in diverse signaling proteins. *Biol Direct*. 1: 25.
5. Arico, B., Miller, J.F., Roy, C. Stibitz, S. Monack, D., Falkow, S., Gross, R. and Rappuoli, R. 1989. Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:6671-6675.
6. Aslund, F. and J. Beckwith. 1999. The thioredoxin superfamily: Redundancy, specificity, and gray-area genomics. *J. Bacteriol*. 181:1375-1379
7. Aslund, F., Berndt, K.D. and A. Holgrem. 1997. Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxins superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *J. Biol. Chem*. 272:15661-15667
8. Aslund, F., Ehn, B., Miranda-Vizueté, A, Pueyo, C. and A. Holgrem. 1994. Two additional glutaredoxins exist in *Escherichia coli*: Glutaredoxin 3 is an hydrogen donor for ribonucleotide reductase in a thioredoxin/glutaredoxin 1 double mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 91:9813-9817
9. 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.
10. Böck, A., Sawers, G. 1996. Fermentation. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, Neidhardt FC, Ingraham JL, Lin EC, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, and Umberger HE (eds.) Washington, DC: ASM Press. pp. 262-282.
11. Bornberg-Bauer, E., Rivals, E. and Vingron, M. 1988. Computational approaches to identify leucine zippers. *Nucleic acids res*. 26: 2740-2746.

12. Brondsted, L., and Atlung, T. 1994. Anaerobic regulation of the hydrogenase 1 (*hya*) operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 176: 5423-5428.
13. Buckland, R., and Wild, F. 1989. Leucine zipper motif extends. *Nature.* 338: 547.
14. 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.
15. 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.
16. Compan, I. and Touati, D. 1994. Anaerobic activation of *arcA* transcription in *Escherichia coli*: roles of Fnr and ArcA. *Mol Microbiol.* 11: 955-964.
17. Crick, F.H.C. 1953. The packing of a-helices: simple coiled-coils. *Acta Crystallogr.* 6: 689-697.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Dykxhoorn, D.M., St Pierre, R., Linn, T. 1996. A set of compatible tac promoter expression vectors. *Gene.* 177: 133-136.
22. Feng, J., Atkinson, M.R., McCleary, W., Stock, J.B., Wanner, B.L., et al. 1992. Role of phosphorylated metabolic intermediates in the regulation of glutamine synthetase synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 174: 6061-6070.
23. Gennis, R.B. and Stewart, V. *Cellular and Molecular Biology.* (ed. Neidhardt, F.) 217-261 (ASM press, Washington, D.C., 1996).
24. 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.
25. 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.

26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Gregoret, L.M., Sauer, R.T. 1998. Tolerance of a protein helix to multiple alanine and valine substitutions. *Folding & design.* 3: 119-126.
30. Gruber, M., Soeding, J. and Lupas, A.N. 2005. REPPER-repeats and their periodicities in fibrous proteins. *Nucleic acids res.* 33: 239-243.
31. Guest, J.R. and Shaw, D.J. 1981. Molecular cloning of menaquinone biosynthetic genes of *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet.* 181: 379-383.
32. Hoch, J. A., and Silhavy, T.J.1995. Two-Component Signal Transduction. (Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
33. Hoch, J.A. 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol.* 3:165-170.
34. Holgrem, A. 1989. Thioredoxins and glutaredoxins systems. *J. Biol Chem.* 264:13963-13966
35. Hrabak, E.M., and Willis, D.K. 1992. The *lemA* gene required for pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean is a member of a family of two-component regulators. *J Bacteriol.* 174: 3011-3020.
36. Ishige, K., Nagasawa, S., Tokishita, S., and Mizuno, T. 1994. A novel device of bacterial signal transducers. *Embo J.* 13: 5195-5202.
37. 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.
38. 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 USA.* 85: 1888-1892.
39. Iuchi, S., and Lin, E. C. 1992a. Mutational analysis of signal transduction by ArcB, a membrane sensor protein responsible for anaerobic repression of operons involved in the central aerobic pathways in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 174: 3972-3980.

40. Iuchi, S., and Lin, E. C. 1992b. Purification and phosphorylation of the Arc regulatory components of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 174: 5617-5623.
41. Iuchi, S., Furlong, D., and Lin, E. C. 1989. Differentiation of *arcA*, *arcB*, and *cpxA* mutant phenotypes of *Escherichia coli* by sex pilus formation and enzyme regulation. *J Bacteriol.* 171: 2889-2893.
42. 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 regulon. *Mol Microbiol* 4: 715-727.
43. 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.
44. Kato, M., Mizuno, T., Shimizu, T., and Hakoshima, T. 1997. Insights into multistep phosphorelay from crystal structure of the C-terminal HPT domain of ArcB. *Cell.* 88: 717-723.
45. 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.
46. 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:* 277: 13192-13195.
47. 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.
48. 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.
49. 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 USA.* 94: 1453-1458.
50. 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.
51. Lee, T.Y., Makino, K., Shinagawa, H. and Nakata, A. 1990. Overproduction of acetate kinase activates the phosphate regulon in the absence of the *phoR* and *phoM* functions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 172: 2245-2249.

52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. Malpica, R. Franco, B. Rodríguez, C. Kwon, O, and Georgellis, D. 2004. Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Prot Natl Acad Sci USA.* 101:13318-13323.
56. 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.
57. Mason, J.M. and Arndt, K.M. 2004. Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem.* 5: 170–176.
58. Matsushika, A. and Mizuno, T. 2000. Characterization of three putative sub-domains in the signal-input domain of the ArcB hybrid sensor in *Escherichia coli* (1). *J Biochem (Tokyo).* 127: 855-860.
59. McCleary, W.R. and Stock, J.B. 1994. Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J Biol Chem.* 269: 31567–31572.
60. 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.
61. McLachlan, A.D. and Stewart, M. 1975 Tropomyosin coiled-coil interactions: evidence for an unstaggered structure. *J Mol Biol.* 98: 293–304.
62. Meganathan, R. *Cellular and Molecular Biology.* (ed. Neidhardt, F.) 642-656 (ASM press, Washington, D.C., 1996).
63. Miller, J.H. *Experiments in Molecular Genetics.* 1972. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y. 352-355
64. Miranda-Vizueté, A. Damdimopoulos, A.E. Gustafsson, J.A. and G. Spyrou. 1997. Cloning, expresión and characterization of a novel *Escherichia coli* thioredoxin. *J. Biol Chem* 272:30841-30847

65. Mizuno, M.T. 1997. Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducer in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res* 4:161-168.
66. Mossner, E., Huber-Wunderlich, M., Rietsch, A., Beckwith, J., Glockshuber, R and F. Aslund. 1999. Importance of redox potential for the *in vivo* function of the cytoplasmic disulfide reductant thioredoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274:25254-2725259.
67. Nagasawa, S., Tokishita, S., Aiba, H. and Mizuno T. 1992. A novel sensor-regulator protein that belongs to the homologous family of signal-transduction proteins involved in adaptive responses in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 6: 799-807.
68. Nuñez-Oreza, L. Alvarez, A.F., Arias-Olguin, I., Torres-Larios, A. and Georgellis, D. 2012. The ArcB Leucine zipper domain is required for proper ArcB signaling. *Plos One* 7:(5) e38187.
69. Ota, I. M., and Varshavsky, A. 1993. A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science.* 262:566-569.
70. Ottemann, K. M., Xiao, W., Shin, Y.-K., and Koshland, D. E., Jr. 1999. A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor. *Science.* 285: 1751–1754
71. 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.
72. Parkinson, J.S., and Kofoed, E. C. 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet.* 26: 71-112.
73. Parkinson, J.S. 1993. Signal Transduction schemes of bacteria. *Cell.* 73: 857-871.
74. Peña-Sandoval, G.R. and Georgellis, D. 2010. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli* autophosphorylates by an intramolecular reaction. *J Bacteriol.* 192: 1735-1739.
75. 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
76. Prinz, W., Aslund, F., Holmgren, A. and Beckwith, J. 1997. The role of the thioredoxins and glutaredoxins pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 272:15661-15667
77. 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 USA.* 89: 8701-8705.
78. Ritz, D. and J. Beckwith. 2001. Roles of thiols-redox pathways in bacteria. 2001. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:21-48
79. Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc.* 5: 725–738.

80. Russo, A.F., and Koshland, D.E., Jr. 1983. Separation of signal transduction and adaptation functions of the aspartate receptor in bacterial sensing. *Science*. 220: 1016-1020.
81. 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.
82. 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.
83. 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.
84. 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.
85. 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.
86. Simon, G., Mejean, V., Jourlin, C., Chippaux, M., and Pascal, M.C. 1994. The *torR* gene of *Escherichia coli* encodes a response regulator protein involved in the expression of the trimethylamine N-oxide reductase genes. *J. Bacteriol*. 176: 5601-5606.
87. Stevens, A.M., Sanders, J.M., Shoemaker, N.B., and Salyers, A.A. 1992. Genes involved in production of plasmid-like forms by a Bacteroides conjugal chromosomal element share amino acid homology with two-component regulatory systems. *J Bacteriol*. 174: 2935-2942.
88. Stewart, J.E, Aslund, F. and J. Beckwith. 1998. Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: as *in vivo* role reversal for the thioredoxins. *EMBO J*. 17:5543-5550
89. 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.
90. Stewart, V. 2003. Biochemical Society Special Lecture. Nitrate- and nitrite-responsive sensor NarX and NarQ of proteobacteria. *Biochem Soc Trans*. 31:1-10.
91. Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 69:183-215.
92. Stock, J.B., Surette, M.G., Levit, M. and Park, P. 1995. Two-component signal transduction systems: Structure-Function Relationships and Mechanism of Catalysis. In: *Two-component signal transduction*, edited by Hoch J.A. and Silhavy T.J. Washington D.C.: ASM. pp. 25-51.
93. Swain, K.E., Gonzalez, M.A., Falke, J.J. 2009. Engineered socket study of signaling through a four-helix bundle: evidence for a yin-yang mechanism in the kinase control module of the aspartate receptor. *Biochemistry*. 48: 9266-9277.

94. Swanson, R.V., Alex, L.A., and Simon, M.I. 1994. Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. *Trends Biochem Sci.* 19: 485-490.
95. 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.
96. Tomomori, C., Tanaka, T., Dutta, R., Park, H., Saha, S.K., et al. 1999. Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ. *Nature structural biology.* 6: 729-734.
97. Toro-Roman, A., Mack, T.R., and Stock, A.M. 2005. Structural analysis and solution studies of the activated regulatory domain of the response regulator ArcA: a symmetric dimer mediated by the alpha4-beta5 face. *J Mol Biol.* 349: 11-26.
98. Tseng, C.P., Albrecht, J. and Gunsalus, R.P. 1996. Effect of microaerophilic cell growth conditions on expression of the aerobic(*cyoABCDE* and *cydAB*) and anaerobic (*narGHJ*, *frdABCD*, and *dmsABC*) respiratory pathway genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1996. 178: 1094-1098.
99. Uden, G., Achebach, S., Holighaus, G., Tran, H.G., Wackwitz, B., and Zeuner, Y. 2002, Control of FNR function of *Escherichia coli* by O₂ and reducing conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 4: 263-268.
100. Uden, 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.
101. Uden, 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.
102. Uden, G. 1988. Differential roles for menaquinone and demethylmenaquinone in anaerobic electron transport of *E. coli* and their *fnr*-independent expression . *Arch Microbiol.* 150: 499-503.
103. Utsumi, R., Brissette, R. E., Rampersaud, A., Forst, S. A., Oosawa, K., and Inouye, M. 1989. Activation of bacterial porin gene expression by a chimeric signal transducer in response to aspartate. *Science.* 245: 1246-1249
104. 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.
105. Vinson, C., Acharya, A. and Taparowsky, E.J. 2006. Deciphering B-ZIP transcription factor interactions in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta.* 1759: 4-12.

106. Volz, K. 1993. Structural conservation in the CheY superfamily. *Biochemistry*. 32: 11741-11753.
107. 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.
108. Wanner, B.L., Wilmes-Riesenberg, M.R. 1992. Involvement of phosphotransacetylase, acetate kinase, and acetyl phosphate synthesis in control of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 174: 2124-2130.
109. Williams, S. B., and Stewart, V. 1999. Functional similarities among two-component sensors and methyl-accepting chemotaxis proteins suggest a role for linker region amphipathic helices in transmembrane signal transduction. *Mol. Microbiol*. 33: 1093-1102
110. 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.
111. 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.
112. Zheng, M., Aslund, F., and Storz, G. 1998. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science*. 279: 1718-1721.
113. 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.