



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO MOLECULAR DE LAS VÍAS DE FOSFOTRANSFERENCIA EN EL SISTEMA DE DOS COMPONENTES ArcB/A EN *Escherichia coli*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

JUAN LUIS TERÁN MELO

TUTOR PRINCIPAL

DR. DIMITRIS GEORGELLIS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. ALFREDO TORRES LARIOS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DR. SEBASTIÁN POGGIO GHILARDUCCI

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Ciudad Universitaria, CD. MX. Abril de 2019



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.

AGRADECIMIENTOS

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

Agradezco la asesoría del Dr. Adrián F. Álvarez.

Agradezco el apoyo técnico en el desarrollo de este trabajo de Tesis a la M en C. Claudia Rodríguez Rangel.

Agradezco el apoyo económico brindado a los proyectos:

“Control de la expresión génica microbiana por estímulos extracelulares”. De la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), # IN209918.

“Organización y función de microdominios membranales bacterianos”. De la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), # IN208718.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de Beca de Doctorado Número de becario 220613

Al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP) por el apoyo otorgado para la asistencia al *III Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias Sociedad Mexicana de Bioquímica, AC* y al *XXI Congreso Nacional de Bioquímica*.

Agradezco especialmente a mis compañeros de laboratorio (Fer, Esme, Hoty, Quique, Óscar, Katy, Mariana y todos los que se me pasen) y en especial a la familia Terán Melo por todo su apoyo en este camino.

Índice

Resumen.....	5
Abstract.....	6
Introducción.....	7
Sistemas de transducción de señales de dos componentes bacterianos.....	7
Estructura de los sistemas de dos componentes.....	7
Cinasa sensora.....	8
Regulador de respuesta.....	9
Funcionamiento de los SDC.....	10
Sistema de dos componentes Arc en <i>E. coli</i>	11
Justificación.....	15
Hipótesis.....	15
Objetivos.....	15
Materiales y métodos.....	16
Cepas y plásmidos utilizados.....	16
Proteínas recombinantes utilizadas.....	18
Medios y condiciones de crecimiento.....	19
Preparación de células competentes.....	19
Transformación.....	20
Mantenimiento de las cepas.....	20
Sobreexpresión y purificación de proteínas recombinantes.....	20
Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> de ArcB.....	23
Transferencia del grupo fosforilo de H1 a D1 <i>in vitro</i>	23
Transferencia del grupo fosforilo de D1 a H2 <i>in vitro</i>	24
Ensayos de defosforilación de ArcA-P <i>in vitro</i>	24
Transferencia del grupo fosforilo de H1 a D1 <i>in vivo</i>	25
Efecto del incremento de <i>arcB</i> ^{H292Q, D576A} y <i>arcB</i> ^{D576A, H717Q} en la expresión de la fusión reportera $\lambda\Phi$ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>) para el estudio de la transferencia del grupo fosforilo de D1 a H2 <i>in vivo</i>	26

Transferencia del grupo fosforilo de H2 a D1 <i>in vivo</i>	26
Ensayos de la actividad β -galactosidasa.....	26
Ensayos de inmunorréplica tipo Western blot.....	27
Resultados	28
La transferencia del grupo fosforilo del dominio H1 al dominio D1 de ArcB es intramolecular	28
<i>In vivo</i> , el grupo fosforilo es transferido del dominio H1 al dominio D1 en una reacción intramolecular	33
La transferencia del grupo fosforilo <i>in vitro</i> del dominio D1 al dominio H2 de ArcB, ocurre preferencialmente en una reacción intermolecular	36
En condiciones fisiológicas, la transferencia del grupo fosforilo del dominio D1 al dominio H2 ocurre preferencialmente en una reacción intermolecular...	38
Durante la actividad fosfatasa de ArcB, la fosfotransferencia del dominio H2 al dominio D1 ocurre preferencialmente de manera intramolecular.....	40
<i>In vivo</i> , la transferencia del grupo fosforilo del dominio H2 al dominio D1 de ArcB opera intramolecularmente.....	43
Discusión	45
Conclusiones	49
Perspectivas	49
Literatura citada	50
Publicación	56

Abreviaturas:

SDC: sistema de dos componentes	H2: dominio de fosfotransferencia	IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
CS: cinasa sensora	TM1: cruce transmembranal 1	Ni-NTA: agarosa nitrilo-ácido triacético
RR: regulador de respuesta	TM2: cruce transmembranal 2	MBP: proteína de unión a maltosa
~P: grupo fosforilo	ArcA-P: ArcA fosforilado	SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida
RR-P: regulador de respuesta fosforilado	UQ: ubiquinonas	Pi: fosfato inorgánico
H1: dominio transmisor	UQH ₂ : ubiquinonas reducidas	DO ₆₀₀ : densidad óptica a 600 nm
D1: dominio receptor	MQ: menaquinonas	ONPG: o-nitrofenil- β -D-galactósido

Resumen

El sistema Arc de dos componentes de *Escherichia coli*, que comprende a ArcB como la cinasa sensora y ArcA como el regulador de respuesta, juega un papel importante en la regulación del metabolismo energético a nivel transcripcional en bacterias. En condiciones anaeróbicas de crecimiento, ArcB es activada como cinasa y se autofosforila a expensas del ATP, mientras que en condiciones aeróbicas su actividad cinasa es silenciada por dos residuos de cisteína que participan en la formación de un enlace disulfuro intermolecular.

ArcB pertenece a la familia de cinasas sensoras híbridas que contienen tres dominios catalíticos: un dominio transmisor (H1), un dominio receptor (D1) y un dominio de fosfotransferencia (H2). La cinasa sensora ArcB es una enzima bifuncional que fosforila a ArcA en condiciones estimulantes, y además defosforila a ArcA-P en condiciones no estimulantes. El hecho de que los dominios catalíticos D1 y H2 sean necesarios para las actividades opuestas de ArcB, plantea la pregunta de qué controla la dirección de la transferencia del grupo fosforilo y/o influencia los índices de transferencia individual respecto a la transmisión de la señal y el decaimiento de esta.

En el presente trabajo, resultados de experimentos *in vivo* e *in vitro* indican que, después de la autofosforilación, la transferencia del grupo fosforilo de H1 a D1 ocurre intramolecularmente y de D1 a H2 ocurre preferencialmente de manera intermolecular. Los experimentos de la actividad fosfatasa indican que la transferencia del grupo fosforilo en el fosforelevo (H2 a D1) sucede intramolecularmente. En conclusión, proponemos un mecanismo que dicta la dirección de la transferencia del grupo fosfato entre los dímeros de ArcB y que permite la discriminación de las actividades cinasa y fosfatasa de ArcB.

Abstract

The Arc two-component system of *Escherichia coli* comprising ArcB as the sensor kinase and ArcA as the response regulator plays an important role in regulating energy metabolism at the level of transcription in bacteria. Under anaerobic growth conditions ArcB is activated as a kinase and autophosphorylates at the expense of ATP, whereas under aerobic growth conditions its kinase activity is silenced by the two cysteine residues that participate in intermolecular disulfide bond formation.

ArcB belongs to the family of hybrid sensor kinases that contain three catalytic domains: a transmitter domain (H1), a receptor domain (D1) and a histidine phosphotransfer domain (H2). The sensor kinase ArcB is a bi-functional enzyme that phosphorylates ArcA under stimulatory conditions, and it also dephosphorylates ArcA-P under nonstimulatory conditions. The fact that the catalytic domains D1 and H2 are required for both opposing activities of ArcB raises the question of what controls the direction of the phosphoryl-group transfers and/or influence the individual phosphoryl-group transfer rates in regard to signal transmission and signal decay.

In this work, the results from *in vivo* and *in vitro* experiments indicate that, after autophosphorylation, the H1 to D1 phosphoryl-group transfer occurs intramolecularly and the D1 to H2 phosphoryl-group transfer occurs preferentially intermolecularly. The phosphatase experiments indicate that the phosphoryl-group transfer in the reverse phosphorelay (H2 to D1) occurs intramolecularly. In conclusion, we present a mechanism that dictates the direction of the phosphoryl group transfer within ArcB dimers and that enables the discrimination of the kinase and phosphatase activities of ArcB.

Introducción

Sistemas de transducción de señales de dos componentes bacterianos.

Los organismos procariotas habitan ambientes en los cuales las condiciones del entorno, como la osmolaridad, la temperatura, el pH, el balance redox, la disponibilidad de nutrientes, etc, pueden variar rápida y repentinamente (2, 19, 20, 34, 57). Con el fin de sobrevivir y adaptarse a estos cambios, las bacterias monitorean las condiciones externas para ajustar su estructura y fisiología a través de circuitos de señalización llamados sistemas de dos componentes (SDC). Este término fue acuñado para describir un grupo de proteínas reguladoras encontradas en bacterias (55, 56, 66). Tales sistemas se han encontrado también en arqueas y algunos eucariotes como plantas y hongos (69).

Mediante estos SDC, las bacterias modulan la expresión génica en respuesta a las fluctuaciones en su ambiente. Esto lo realizan regulando procesos como la adquisición de nutrientes (nitrógeno, fosforo, carbono), metabolismo energético, adaptación a variables físicas (pH, osmolaridad, cantidad de luz) y químicas del ambiente, comunicación celular, interacciones simbióticas y patogénicas, división celular y patrones de desarrollo, entre otros. (6, 29, 60, 70, 77). En *E. coli* se han reportado 29 cinasas sensoras (24 ortodoxas y 5 híbridas) y 32 reguladores de respuesta (54).

Estructura de los sistemas de dos componentes.

Un SDC típico está formado por una cinasa sensora (CS) y una proteína reguladora de respuesta (RR). Generalmente, la CS se encuentra anclada a la membrana citoplásmica de la célula por su extremo amino terminal; su extremo carboxilo terminal se encuentra proyectado hacia el citosol. La proteína RR se encuentra como elemento soluble en el citosol (Fig. 1). Ambas proteínas presentan en su estructura dominios catalíticos funcionales. La CS posee un dominio transmisor caracterizado por un núcleo de cinasa que posee un residuo de histidina conservado. Con relación al RR típico, este contiene un dominio receptor con un residuo de aspartato conservado, así como un dominio de respuesta (42, 59, 60, 66).

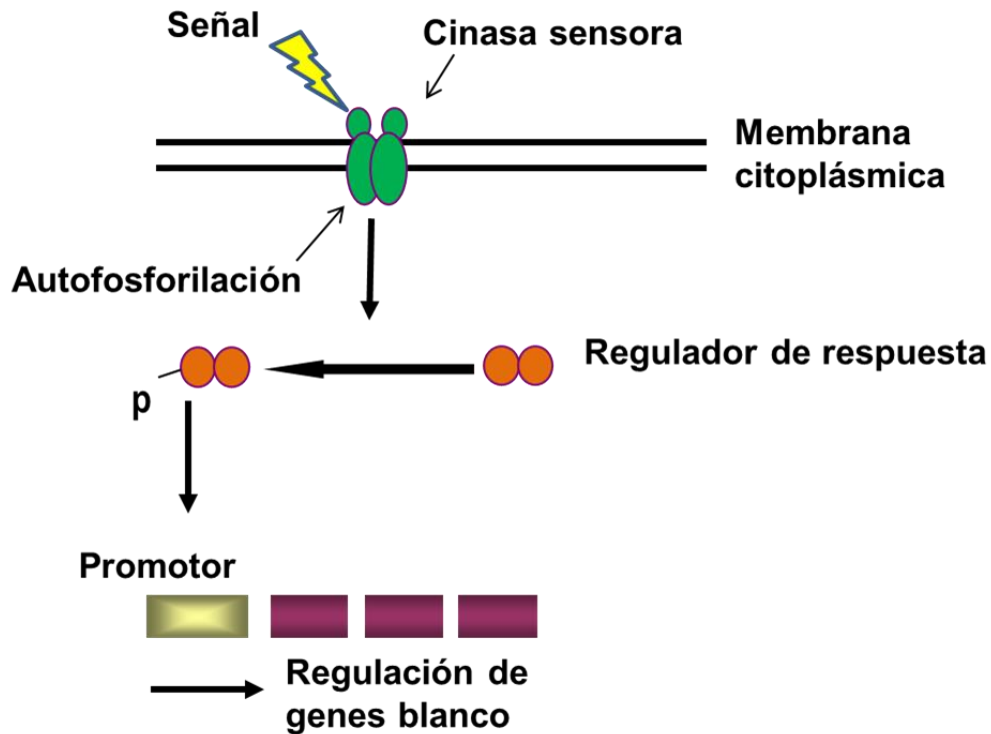


Figura 1. Representación esquemática de un sistema de transducción de señales de dos componentes. En general, la cinasa sensora se encuentra anclada a la membrana citoplásmica, en presencia de la señal específica del sistema, ésta se autofosforila y fosforila al segundo componente que es una proteína citosólica que actúa como regulador transcripcional.

Cinasa sensora.

Las CSs contienen dos segmentos transmembranales hidrófobos que les permiten anclarse a la membrana citoplásmica, entre los cuales se incluye un dominio periplásmico de tamaño variable. El segmento transmembranal se une a la porción citoplásmica por medio de una porción *linker* que conecta la región transmembranal con el dominio transmisor. En esta porción se pueden encontrar otros elementos; por ejemplo, una hélice compuesta por residuos hidrofóbicos en una cara de la hélice e hidrofílicos en la otra cara, la cual se caracteriza por poseer cuatro residuos de leucina repetidos en cada séptima posición (LX₆ LX₆ LX₆ LX₆). Son motivos involucrados en la formación de homo y heterodímeros, a través de la interacción intermolecular de las hélices. Se han encontrado principalmente en proteínas reguladoras de unión a DNA; además, en proteínas transmembranales como las CSs (1, 11, 46, 76).

Otro elemento que puede estar presente en esta porción *linker* es el dominio PAS (acrónimo formado por los nombres de proteínas en las cuales fueron identificadas secuencias repetidas imperfectas: PER de *Drosophila* – *period clock protein*-; ARNT de un vertebrado – *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* y SIM de *Drosophila* – *single minded protein*-) (78). Este dominio monitorea cambios en el potencial redox, luz, oxígeno y pequeños ligandos, dependiendo del cofactor asociado (64, 78). Los dominios PAS típicamente se encuentran adyacentes al segundo segmento transmembranal.

Las CSs tripartitas son poco usuales en procariontes, su arquitectura es compleja, ya que además de contener las estructuras de una cinasa típica u ortodoxa, tienen un dominio receptor con un residuo de aspartato (Asp) y un dominio de fosfotransferencia con una histidina conservada (His) (Fig. 2). Ambos residuos pueden encontrarse en módulos independientes, como es el caso de la cinasa KinA de *Bacillus subtilis* (12), o pueden estar fusionadas entre sí, como por ejemplo BvgS de *Bordetella pertussis* (74) o ArcB de *E. coli*.

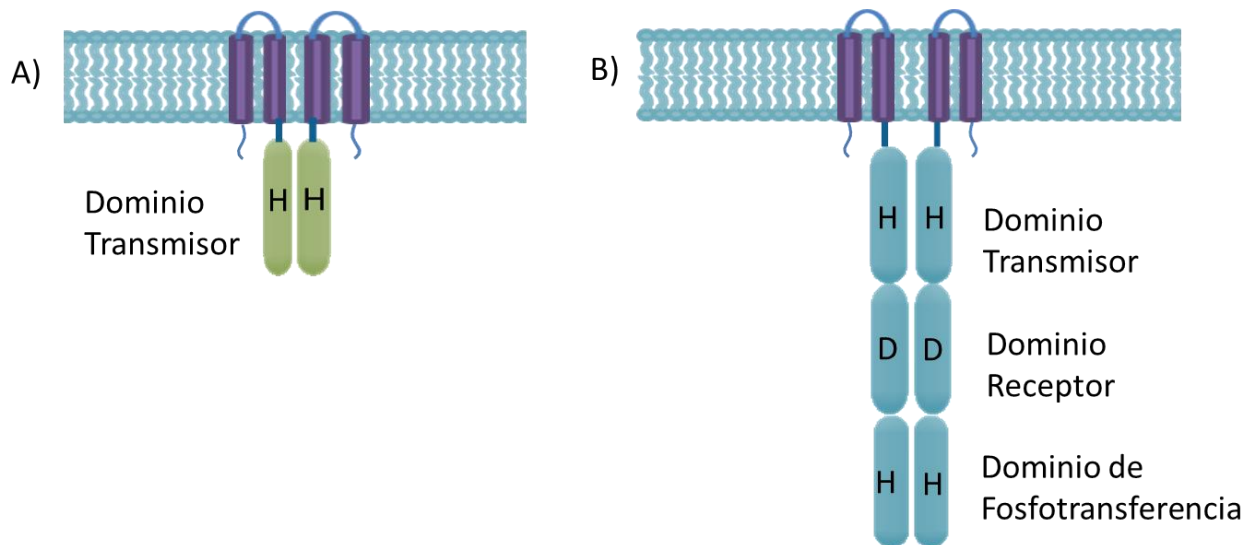


Figura 2. A) Las CS ortodoxas contienen un dominio transmisor donde ocurre la autofosforilación. B) Las CS tripartitas son más elaboradas, puesto que contienen módulos adicionales con residuos de aminoácidos conservados indicados como H=Histidina y D=aspartato.

Regulador de respuesta.

El RR contiene un dominio receptor donde se localiza un residuo de aspartato conservado, así como un dominio efector que generalmente es de unión a DNA, mediante el cual

activa o reprime la expresión de genes específicos (Fig. 3). Existen sistemas en los que el dominio efector funciona como enzima, como CheB de *E. coli* que es una metil esterasa (68), o RegA de *Dictyostelium discoideum* que es una fosfodiesterasa de AMPc (67).

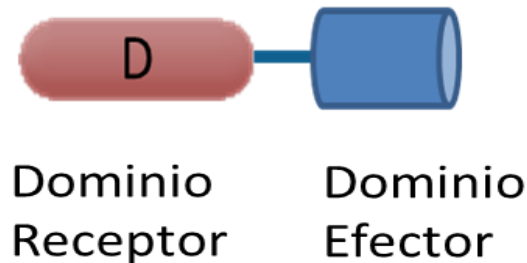


Figura 3. Modelo típico de un regulador de respuesta (RR). Proteína localizada en el citoplasma, comprende un dominio receptor con un residuo de aspartato (D) conservado y un dominio efector que en la mayoría de los casos es de unión a DNA.

Funcionamiento de los SDC.

En un SDC típico bacteriano, la percepción de una señal específica por la CS permite su autofosforilación dependiente de ATP en el residuo de His del dominio transmisor. Inmediatamente, el grupo fosforilo ($\sim P$) es transferido al Asp en el dominio receptor del RR. Este RR fosforilado (RR-P) media la respuesta celular mediante la regulación de la expresión de genes a nivel transcripcional. Por otra parte, cuando la señal específica está ausente, el RR-P pierde el $\sim P$, inactivándose como regulador transcripcional. Por lo general, la defosforilación del RR es acelerada por la misma CS que, en ausencia de la señal, adquiere una actividad fosfatasa específica para su RR-P. Sin embargo, en algunos SDC bacterianos la CS cuenta con dominios proteicos adicionales que participan en la transducción de la señal. En estas CSs, denominadas híbridas o tripartitas, además del dominio transmisor existe un dominio receptor adicional con un Asp conservado y un dominio de fosfotransferencia (Hpt) con una His conservada (Fig. 2B). Cuando estos SDC son activados por una señal específica, la CS híbrida se autofosforila en el dominio transmisor y posteriormente transfiere el $\sim P$ secuencialmente al Asp del receptor y a la His del Hpt dentro de la CS, para finalmente fosforilar al Asp del RR. A este proceso se le conoce como fosforelevo. Cuando la señal está ausente, el RR-P se defosforila (reacción catalizada por la misma CS), mediante un fosforelevo reverso, que involucra la transferencia de $\sim P$ desde el RR a la His del Hpt, luego al residuo de Asp del dominio receptor de la CS y finalmente la liberación de fosfato inorgánico (40) (Fig. 4).

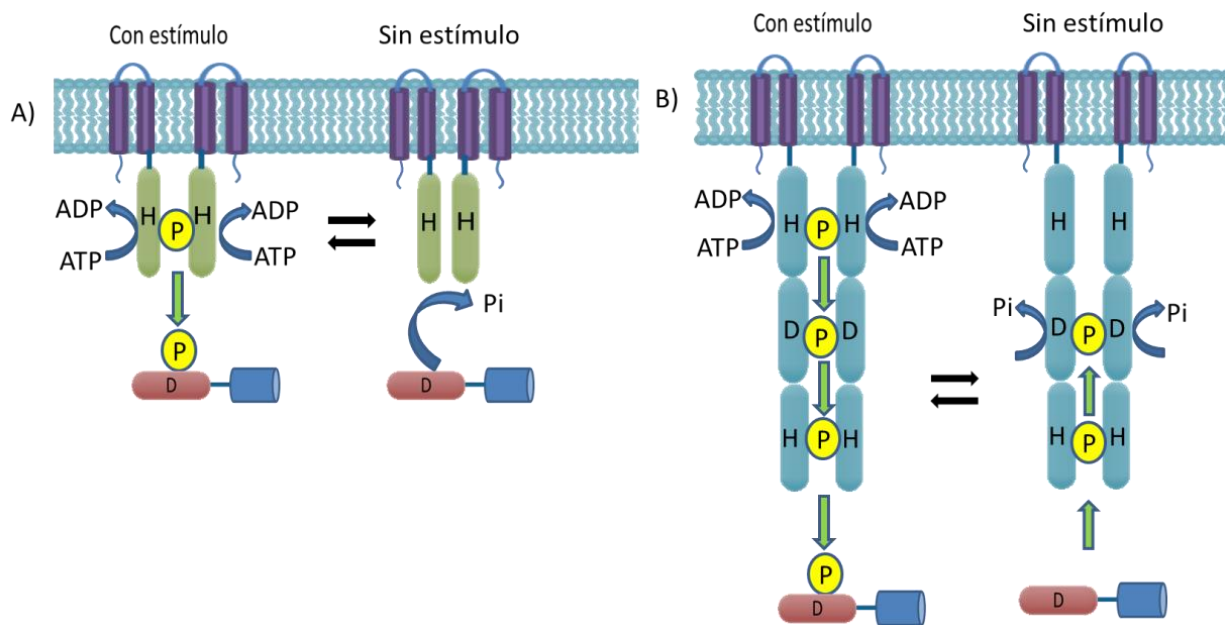


Figura 4. Funcionamiento de los SDC. En A) y B) la CS se autofosforila en presencia de una señal específica y transfiere el grupo fosforilo al RR. En las CSs híbridas, esta transferencia ocurre por medio del fosforelevo que involucra la fosfotransferencia dentro de los dominios catalíticos (B). En ausencia de la señal, estas proteínas catalizan la defosforilación del RR.

Sistema de dos componentes Arc en *E. coli*.

Los elementos de este SDC fueron descritos en la década de los 80's por luchi y Lin. El gen *arcA*, localizado en el minuto cero del genoma de *E. coli*, codifica para la proteína citosólica de 29 kDa nombrada ArcA. Contiene un residuo de Asp en la posición 54 de la región N-terminal (denominado D2), el cual tiene como función recibir el grupo fosfato proveniente de la CS, así como un dominio hélice-vuelta-hélice de unión a DNA en la región C-terminal (33) (Fig. 5B).

Se le han dado otros nombres dependiendo del enfoque de cada estudio; por ejemplo, **dye**, porque su delección causa sensibilidad a ciertos colorantes que generan especies reactivas de oxígeno, como el azul de toluidina y azul de metileno (16), **seg**, porque al ser eliminado se observaron problemas en la replicación (47) y segregación del plásmido F (28, 37), o **sfrA**, por la regulación del factor sexual (o pili) (9, 10, 21). Sin embargo, luchi y Lin le llamaron *arcA*, porque relacionaron su rol central con la represión anaeróbica de genes asociados a la condición aeróbica de crecimiento (33).

La CS sensora de este sistema es la proteína transmembranal ArcB, de 778 aminoácidos. Esta proteína se encuentra anclada a la membrana por dos cruces transmembranales (TM1 y TM2), entre los cuales se encuentra un dominio periplásmico de tan solo 16 aminoácidos (35, 45), mientras que en la mayoría de las CSs este dominio consta de alrededor de 150 aminoácidos. Se ha descrito que el dominio transmembranal de ArcB no participa directamente en la recepción de la señal, pero sirve para mantener a la proteína cerca de la señal de activación (45). A partir de TM2 se extiende una porción *linker*, la cual contiene un *zipper* de leucinas funcional (58) y un dominio PAS (78). Después de esta región se encuentra la porción citosólica de ArcB, la cual consiste de tres dominios catalíticos: un dominio transmisor (H1) con un residuo de His²⁹² conservado, un dominio receptor central (D1) con un residuo Asp⁵⁷⁶ conservado y un dominio de fosfotransferencia (H2) con un residuo His⁷¹⁷ (36, 31) (Fig. 5A).

Bajo condiciones reductoras de crecimiento, ArcB se autofosforila a expensas del ATP, un proceso que es aumentado por metabolitos anaeróbicos, como el D-lactato, acetato y piruvato (22, 65); a su vez, la CS transfosforila a ArcA mediante el fosforelevo His²⁹² → Asp⁵⁷⁶ → His⁷¹⁷ → Asp⁵⁴ (25, 43). ArcA fosforilado (ArcA-P) reprime la expresión de muchos operones involucrados en el metabolismo respiratorio y activa otros que codifican proteínas involucradas en el metabolismo fermentativo (4, 27, 48, 49). En condiciones aeróbicas de crecimiento, ArcB actúa como fosfatasa específica de ArcA-P, catalizando la defosforilación mediante el fosforelevo reverso Asp⁵⁴ → His⁷¹⁷ → Asp⁵⁷⁶ → Pi (24, 62) (Fig. 5B).

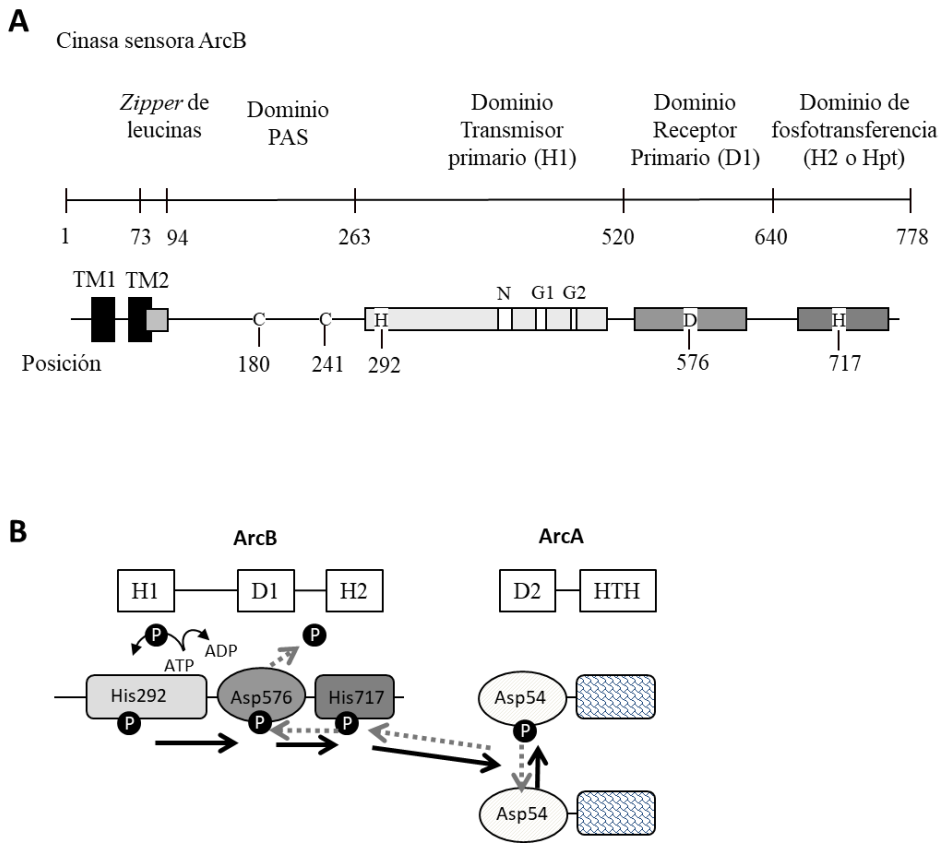


Figura 5. A) Representación esquemática de la cinasa sensora ArcB de *E. coli* que pertenece a la familia de las CSs híbridas que contienen tres dominios catalíticos. Estos dominios participan en la transferencia del grupo fosforilo a ArcA mediante el fosforelevo (B) en condiciones estimulantes (flechas sólidas). En ausencia de la señal, ArcB es una fosfatasa específica, defosforilando a ArcA fosforilado mediante el fosforelevo reverso (flechas discontinuas).

Por otro lado, ha sido demostrado que la actividad catalítica de ArcB se lleva a cabo por movimientos rotacionales que alteran la orientación de la porción citosólica de la CS (44). Además, el evento molecular para la regulación de ArcB involucra la oxidación-reducción de dos residuos de cisteína que participan en la formación de un enlace disulfuro intermolecular, una reacción en la cual los transportadores de electrones quinol/quinonas actúan como los oxidantes o reductores directos (5, 8, 23, 52,) (Fig. 6).

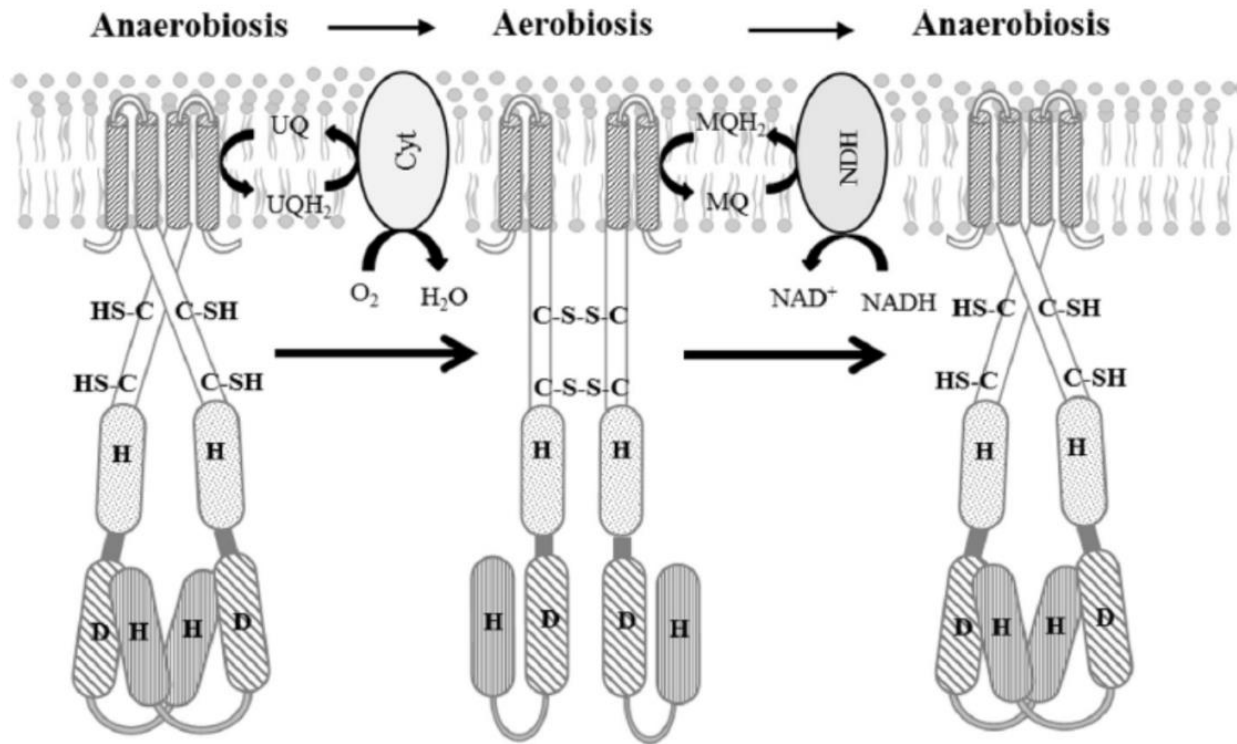


Figura 6. Modelo de la regulación de ArcB. En un cambio de condiciones anaeróbicas a aeróbicas de crecimiento, las ubiquinonas (UQ/UQH₂) constituyen las principales quinonas en la cadena respiratoria en *E. coli*. Conforme los electrones fluyen hacia el oxígeno vía los citocromos, las UQ mantienen su estado oxidado permitiendo la transferencia de electrones desde los residuos de cisteína de ArcB hacia las quinonas. Esto resulta en la formación de enlaces disulfuro y el inmediato silenciamiento de la actividad cinasa de ArcB. Durante el crecimiento anaeróbico, las UQ son gradualmente reemplazadas por la menaquinonas (MQ) que permiten la transferencia de electrones a los residuos de cisteína resultando en el rompimiento de los puentes disulfuro y la activación del modo cinasa de ArcB.

Justificación:

La cinasa sensora ArcB ha sido ampliamente estudiada. Se conoce que se encuentra anclada a la membrana, su función y las señales que regulan su actividad así como el fosforelevo por el cual transfosforila y defosforila a ArcA. Sin embargo, no es claro cómo se lleva a cabo la transferencia del grupo fosforilo cuando se encuentra activa como cinasa o fosfatasa. El modelo generalmente aceptado es que las CSs se encuentran unidas a la membrana en forma de homodímeros (17, 71, 72, 75); por otro lado, ArcB es una proteína bifuncional, es decir, que actúa como cinasa en condiciones anaeróbicas y como fosfatasa en condiciones aeróbicas. Para realizar ambas funciones, ArcB utiliza los residuos de Asp⁵⁷⁶ e His⁷¹⁷, lo anterior hace interesante conocer qué es lo que permite diferenciar la direccionalidad que toma el grupo fosforilo en ambas condiciones de crecimiento.

Hipótesis:

- Durante la actividad cinasa de ArcB, el grupo fosforilo es transferido entre los dominios catalíticos mediante una vía determinada (inter o intramolecular), esta vía es diferente cuando ArcB actúa como fosfatasa.

Objetivos:

1. Determinar si la reacción de fosfotransferencia del dominio H1 al dominio D1 de ArcB ocurre de manera intramolecular o intermolecular cuando se encuentra activa como cinasa.
2. Determinar si la reacción de fosfotransferencia del dominio D1 al dominio H2 de ArcB ocurre de manera intramolecular o intermolecular cuando se encuentra activa como cinasa.
3. Determinar si la reacción de fosfotransferencia del dominio H2 al dominio D1 ocurre de manera intramolecular o intermolecular cuando ArcB funciona como fosfatasa.

Materiales y métodos.

Para poder estudiar las vías de fosfotransferencia en la CS ArcB, se realizaron una serie de ensayos *in vitro*, combinando proteínas recombinantes consistentes en variantes de ArcB. Para confirmar y obtener evidencia fisiológica se realizaron ensayos *in vivo* evaluando la expresión de las fusiones reporteras $\lambda\Phi$ (*IldP'*-*lacZ*) y $\lambda\Phi$ (*cydA'*-*lacZ*), las cuáles en condiciones anaeróbicas son reprimida y activada respectivamente por ArcA-P. Además, se siguieron una serie de protocolos para el mantenimiento de las cepas y vectores utilizados, la obtención de proteínas recombinantes así como los ensayos *in vitro* e *in vivo* necesarios para realizar este trabajo, los cuales serán descritos a continuación.

Cepas y plásmidos utilizados.

Cepa	Características relevantes	Fuente
<i>E. coli</i> Top10	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21DE3	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHlo ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	New England Biolabs
<i>E. coli</i> M15	<i>F-, lacZ M15, thi-1, lac-, mtl-, recA+, KmR</i>	Qiagen
<i>E. coli</i> MC4100	<i>F' araD139 (argF-lac) U169 rpsL150 relA1 flb5301 deoC ptsF25 rbsR</i>	(13)
<i>E. coli</i> ECL 5002	MC4100 $\lambda\Phi$ (<i>IldP'</i> - <i>lacZ</i>), <i>arcB^{Wt}</i>	(13)
<i>E. coli</i> ECL5003	MC4100 Δ <i>fnr::Tn9(Cm^r)</i> $\lambda\Phi$ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>), <i>arcB^{Wt}</i>	(45)
<i>E. coli</i> ECL5004	MC4100 Δ <i>arcB::Tet^r Δfnr::Tn9(Cm^r)</i> $\lambda\Phi$ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	(45)
<i>E. coli</i> ECL5012	MC4100 Δ <i>arcB::Tet^r λΦ (IldP'-lacZ)</i>	(45)
<i>E. coli</i> ECL5023	MC4100 <i>arcB^{D576A} Kan^r λΦ (cydA'-lacZ) Δfnr::Tn9(Cm^r)</i>	(43)
<i>E. coli</i> ECL5024	MC4100 <i>arcB^{H717Q} Kan^r λΦ (cydA'-lacZ) Δfnr::Tn9(Cm^r)</i>	(43)
<i>E. coli</i> ECL5032	MC4100 <i>arcB^{H717Q} Kan^r λΦ (IldP'-lacZ)</i>	(43)
<i>E. coli</i> IFC2001	MC4100 <i>arcB^{D576A} Kan^r λΦ (cydA'-lacZ) Δfnr::Tn9(Tet^r)</i>	Este trabajo, (73)
<i>E. coli</i> IFC2002	MC4100 <i>arcB^{H717Q} Kan^r λΦ (cydA'-lacZ) Δfnr::Tn9(Tet^r)</i>	Este trabajo, (73)
Plásmido	Características relevantes	Fuente
pEXT22	Vector de bajo número de copias, Kan ^r	(18)
pEXT22Cm	Vector de bajo número de copias, Kan ^r , Cm ^r	Este trabajo, (73)
pACT3	Vector de bajo número de copias, Cm ^r	(18)
pMX712	Gen <i>arcB^{Wt}</i> bajo el control del promotor nativo en pBluescript KS II (+) Amp ^r	(58)

pMX517	Gen <i>arcB</i> ^{Wt} bajo el control del promotor inducible con L-arabinosa en pBad30, Amp ^r	(58)
pQE30ArcB ⁷⁸⁻⁷⁷⁸	His ₆ -ArcB ⁷⁸⁻⁷⁷⁸ bajo el control del promotor inducible con IPTG en pQE30, Amp ^r	(25)
pMX028	His ₆ -ArcB ^{78-778, H292Q} bajo el control del promotor inducible con IPTG en pQE30, Amp ^r	(61)
pQE30ArcB ^{78-778, D576A, H717Q}	His ₆ -ArcB ^{78-778, D576A, H717Q} bajo el control del promotor inducible con IPTG en pQE30, Amp ^r	(22)
pQE30ArcB ^{78-661, D576A}	His ₆ -ArcB ^{78-661, D576A} bajo el control del promotor inducible con IPTG en pQE30, Amp ^r	(22)
pQE30ArcB ^{521-778, H717Q}	His ₆ -ArcB ^{521-778, H717Q} bajo el control del promotor inducible con IPTG en pQE30, Amp ^r	(24)
pQE30ArcA	His ₆ -ArcA bajo el control del promotor inducible con IPTG en pQE30, Amp ^r	(49)
pQE30ArcA ¹⁻¹³⁶	His ₆ -ArcA ¹⁻¹³⁶ (ArcA') bajo el control del promotor inducible con IPTG en pQE30, Amp ^r	(24)
pQE30ArcB ^{78-778, D576A}	His ₆ -ArcB ^{78-778, D576A} bajo el control del promotor inducible con IPTG en pQE30, Amp ^r	Este trabajo, (73)
pQE30ArcB ^{78-778, H717Q}	His ₆ -ArcB ^{78-778, H717Q} bajo el control del promotor inducible con IPTG en pQE30, Amp ^r	Este trabajo, (73)
pQE30ArcB ^{78-778, H292Q, H717Q}	His ₆ -ArcB ^{78-778, H292Q, H717Q} bajo el control del promotor inducible con IPTG en pQE30, Amp ^r	Este trabajo, (73)
pQE30ArcB ^{78-778, H292Q, D576A}	His ₆ -ArcB ^{78-778, H292Q, D576A} bajo el control del promotor inducible con IPTG en pQE30, Amp ^r	Este trabajo, (73)
pQE30ArcB ^{78-778, H292Q, D576A, H717Q}	His ₆ -ArcB ^{78-778, H292Q, D576A, H717Q} bajo el control del promotor inducible con IPTG en pQE30, Amp ^r	Este trabajo, (73)
pBADHis-ArcB ^{78-778, H292Q}	His ₆ -ArcB ^{78-778, H292Q} bajo el control del promotor inducible con L-arabinosa en pBAD30, Amp ^r	Este trabajo, (73)
pBADHis-ArcB ^{78-778, H292Q, D576A}	His ₆ -ArcB ^{78-778, H292Q, D576A} bajo el control del promotor inducible con L-arabinosa en pBAD30, Amp ^r	Este trabajo, (73)
pBADHis-ArcB ^{78-778, H292Q, D576A, H717Q}	His ₆ -ArcB ^{78-778, H292Q, D576A, H717Q} bajo el control del promotor inducible con L-arabinosa en pBAD30, Amp ^r	Este trabajo, (73)
pBADHis-ArcB ^{78-778, H717Q}	His ₆ -ArcB ^{78-778, H717Q} bajo el control del promotor inducible con L-arabinosa en pBAD30, Amp ^r	Este trabajo, (73)
pBADHis-ArcB ^{78-778, H292Q, H717Q}	His ₆ -ArcB ^{78-778, H292Q, H717Q} bajo el control del promotor inducible con L-arabinosa en pBAD30, Amp ^r	Este trabajo, (73)
pMAL-ArcB	MBP-ArcB ⁷⁸⁻⁷⁷⁸ bajo el control del promotor inducible con IPTG en pMALc2x, Amp ^r	Este trabajo, (73)
pACT3MBP-ArcB ⁷⁸⁻⁷⁷⁸	MBP-ArcB ⁷⁸⁻⁷⁷⁸ bajo el control del promotor inducible con IPTG, Cm ^r	Este trabajo, (73)
pACT3MBP-ArcB ^{78-778, H292Q}	MBP-ArcB ^{78-778, H292Q} bajo el control del promotor inducible con IPTG, Cm ^r	Este trabajo, (73)
pACT3MBP-ArcB ^{78-778, D576A}	MBP-ArcB ^{78-778, D576A} bajo el control del promotor inducible con IPTG, Cm ^r	Este trabajo, (73)
pACT3MBP-ArcB ^{78-778, H292Q, D576A}	MBP-ArcB ^{78-778, H292Q, D576A} bajo el control del promotor inducible con IPTG, Cm ^r	Este trabajo, (73)

pMX546	<i>arcB</i> ^{H292Q} bajo el control del promotor nativo en pBluescript KS II (+),Amp ^r	Este trabajo, (73)
pMX547	<i>arcB</i> ^{H292Q, D576A} bajo el control del promotor nativo en pBluescript KS II (+),Amp ^r	Este trabajo, (73)
pMX548	<i>arcB</i> ^{D576A, H717Q} bajo el control del promotor nativo en pBluescript KS II (+),Amp ^r	Este trabajo, (73)
pEXT22CmArcB ^{wt}	<i>arcB</i> bajo el control del promotor nativo en pEXT22Cm, Cm ^r , Kan ^r	Este trabajo, (73)
pEXT22CmArcB ^{H292Q}	<i>arcB</i> ^{H292Q} bajo el control del promotor nativo en pEXT22Cm, Cm ^r , Kan ^r	Este trabajo, (73)
pEXT22CmArcB ^{H292Q, D576A}	<i>arcB</i> ^{H292Q, D576A} bajo el control del promotor nativo en pEXT22Cm, Cm ^r , Kan ^r	Este trabajo, (73)
pBAD-ArcB ^{H292Q, D576A}	<i>arcB</i> ^{H292Q, D576A} bajo el control del promotor inducible con L-arabinosa en pBAD30, Amp ^r	Este trabajo, (73)
pBAD-ArcB ^{D576A, H717Q}	<i>arcB</i> ^{D576A, H717Q} bajo el control del promotor inducible con L-arabinosa en pBAD30, Amp ^r	Este trabajo, (73)

Proteínas recombinantes utilizadas.

Para realizar los ensayos *in vitro* necesarios en el presente trabajo, se utilizaron las variantes de ArcB enlistadas en la Tabla 1. Estas variantes contienen mutaciones puntuales en los sitios conservados de fosforilación. Para simplificar la purificación de estas proteínas, se eliminó la región correspondiente a los fragmentos transmembranales, que comprende los residuos 1-77. Es conocido que estas variantes citosólicas son funcionales porque en estudios previos se ha demostrado que la eliminación de estos segmentos no afecta la autofosforilación y la posterior transfosforilación al regulador de respuesta (25, 30, 32, 38, 51, 63).

Tabla 1.

Péptido	Característica principal	Fuente
His-H1-D1-H2	ArcB Wt con la etiqueta de 6x-His transfosforila y defosforila a ArcA.	Este trabajo, (73)
His-H1*-D1-H2	ArcB ^{H292Q} , incapaz de autofosforilarse.	Este trabajo, (73)
His-H1-D1*-H2	ArcB ^{D576A} , se autofosforila pero no transfosforila a ArcA	Este trabajo, (73)
His-H1*-D1*-H2	ArcB ^{H292Q, D576A} , no se autofosforila, es capaz de recibir el grupo fosforilo de ArcA-P	Este trabajo, (73)
His-H1-D1-H2*	ArcB ^{H717Q} , se autofosforila pero no transfosforila a ArcA.	Este trabajo, (73)
His-H1*-D1*-H2*	ArcB ^{H292Q, D576A, H717Q} . Proteína incapaz de autofosforilarse o recibir grupos fosforilo.	Este trabajo, (73)

MBP-H1-D1-H2	ArcB Wt fusionada a MBP, transfosforila y defosforila a ArcA.	Este trabajo, (73)
MBP-H1-D1*-H2	ArcB ^{D576A} fusionada a MBP, se autofosforila pero no transfosforila a ArcA	Este trabajo, (73)
MBP-H1*-D1*-H2*	ArcB ^{H292Q, D576A, H717Q} fusionada a MBP. Proteína incapaz de autofosforilarse o recibir grupos fosforilo.	Este trabajo, (73)

Medios y condiciones de crecimiento.

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se cultivaron en agar o LB líquido (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, Cloruro de Sodio 10 g/L). Cuando fue necesario se adicionó ampicilina, kanamicina, tetraciclina o cloranfenicol a las concentraciones de 100, 50, 12 o 10 µg/ml, respectivamente. En el crecimiento de pre-cultivos y colonias bacterianas transformantes se utilizó LB líquido adicionado con el antibiótico adecuado. Para la selección de células transformantes se utilizaron placas de LB-agar 1.5% y el antibiótico correspondiente.

Para los ensayos de β-galactosidasa, las cepas portadoras de la fusión reportera λΦ (*cydA*'-*lacZ*) se cultivaron en LB líquido adicionado con 0.1 M de MOPS (ácido morfolin-propano-sulfónico; pH 7.4), D-xilosa 20 mM y el antibiótico de selección adecuado. En el caso de la fusión reportera λΦ (*IldP*'-*lacZ*), el medio fue suplementado con 20 mM de L-lactato como inductor (15). Cuando las células crecieron aeróbicamente, se agitaron a 300 rpm a 37 °C. En condiciones anaeróbicas las bacterias se cultivaron con agitación mediante un magneto en tubos llenos con medio y tapa de rosca.

Preparación de células competentes.

Las células competentes fueron preparadas adicionando 200 µl de un pre-cultivo a 50 ml de LB líquido. Se incubó a 37 °C hasta una DO₆₀₀ de 0.3 y posteriormente se colocó 10 minutos en hielo. Se centrifugó a 1800 g durante 15 min a 4 °C. La pastilla bacteriana fue resuspendida en 20 ml de solución RF1 (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, CH₃CO₂K 30 mM) esterilizada por filtración, incubando 30 min en hielo y centrifugando a 1800 g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 2 ml de RF2 (RbCl 10

mM, MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM, 15% de glicerol anhidro) esterilizada por filtración, haciendo alícuotas de la suspensión celular de 200 µl en microtubos. Inmediatamente se procedió a la congelación con N₂ líquido y las alícuotas se almacenaron a -70 °C hasta su utilización para ser transformadas con DNA plasmídico.

Transformación.

Las células competentes se incubaron en hielo durante 10 min en hielo hasta su descongelación. Se agregó 1 µl del plásmido y la mezcla fue incubada 30 min en hielo. Después, se sometieron a un choque térmico a 42 °C durante 30 segundos. A cada tubo se le agregó 1 ml de medio LB líquido y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Las células recuperadas fueron centrifugadas a 2000 x g y posteriormente fueron sembradas en placas de LB-agar suplementadas con el antibiótico correspondiente según la resistencia del plásmido. Las placas de cultivo sembradas fueron incubadas durante toda la noche a 37 °C. Una vez obtenidas colonias aisladas, se inoculó una en 5 ml de LB líquido con el antibiótico de selección hasta obtener un cultivo denso.

Mantenimiento de las cepas.

Para el mantenimiento de las cepas utilizadas en este estudio, se inoculó una colonia transformante en 5ml de LB líquido con el antibiótico de selección necesario. Cada cultivo se mantuvo en agitación constante durante 16 horas. Posteriormente se tomaron 750 µl de cada cultivo, se agregaron 300 µl de glicerol al 80% y se congelaron a -70 °C.

Sobreexpresión y purificación de proteínas recombinantes.

En este estudio fueron generados una serie de proteínas recombinantes derivadas de ArcB con mutaciones puntuales o múltiples en los sitios conservados de fosforilación, de tal manera que el fosforelevo se encuentra bloqueado en las proteínas codificadas. Estas proteínas se obtuvieron mediante sobreexpresión, utilizando los vectores pQE30, pACT3 y pMALc2x, los cuáles contienen un promotor inducible con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG). El plásmido pQE30 que codifica las distintas variantes de ArcB, fue utilizado para la transformación de la cepa M15 (pREP4) siguiendo el protocolo

anteriormente descrito. De las transformantes obtenidas se tomó una colonia para realizar la sobreexpresión de la proteína. En primer lugar, se realizó un pre-cultivo en 5 ml de medio LB líquido adicionado con kanamicina y ampicilina e incubándolo durante toda la noche a 37 °C con agitación.

Al siguiente día, fueron inoculados matraces con 250 ml de medio LB con 1 ml de pre-cultivo. Los cultivos fueron incubados a 37 °C hasta obtener una DO_{600} de 0.6. En este punto se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM y se continuó con la incubación durante 4 horas. Después de este tiempo, el cultivo fue centrifugado a 6000 x g durante 20 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y la pastilla celular se congeló a -20 °C hasta su posterior utilización.

Cada pastilla de células obtenida, fue descongelada y resuspendida en 5 ml de solución de lisis (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8) fría. La resuspensión fue sometida a un tratamiento para lisar células con la prensa de French a 1500 psi. El lisado fue recuperado en un tubo de base redonda y centrifugado a 10000 x g durante 20 min.

El sobrenadante fue transferido a otro tubo con 1 ml de resina de agarosa nitrilo-ácido triacético (Ni-NTA) previamente equilibrada con la solución de lisis. Esta resina se utilizó para unir la proteína mediante 6x-His localizadas en el extremo N-terminal de las proteínas de acuerdo al protocolo de Qiagen (The Qiaexpressionist). Tanto la resina como el sobrenadante, fueron mezclados mediante agitación e incubados a 4 °C durante 1 hora. La mezcla fue transferida en su totalidad en una columna de polipropileno de 15 ml, dejando el tiempo necesario para que la resina se asentara. Se realizaron tres lavados con la solución de lisis, después tres veces con solución de lavado (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol 10%, pH 8). Finalmente, la proteína fue eluida con 10 ml de solución de elución (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 300 mM, glicerol 10 %, pH 8), colectando fracciones de 1 ml. A cada fracción se le adicionó glicerol hasta obtener una concentración final de 30 %, se realizó la cuantificación y almacenamiento a -20 °C hasta su utilización. Este mismo protocolo fue utilizado para las variantes de ArcB comprendidas

en el vector pACT3, con la diferencia de que fue transformado en la cepa de *E. coli* BL21 DE3 para realizar la sobreexpresión.

En el caso de las variantes clonadas en pMalc2x, este vector permite fusionar la proteína de interés a la proteína de unión a maltosa (MBP), lo cual le proporciona un tamaño mayor que el de His-ArcB. En este caso, el fragmento que codifica MBP-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ fue subclonado en el vector pACT3, de tal manera que ahora MBP-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ y sus variantes fueron expresadas en este vector inducible. Para realizar la sobreexpresión, un pre-cultivo de 5 ml de la cepa BL21DE3 previamente transformada con cada plásmido, fue inoculado en 250 ml de LB líquido suplementado con cloranfenicol y glucosa al 0.2%. El cultivo se incubó a 37 °C con agitación a 250 rpm hasta obtener una DO₆₀₀ de 0.6, en este punto se le agregó IPTG a una concentración final de 1 mM y se continuó con la incubación durante 4 horas. El cultivo fue centrifugado a 6000 x g durante 20 min para obtener una pastilla de células que fue congelada hasta su uso.

La pastilla obtenida fue resuspendida en solución A (TrisHCl 20 mM pH 7.0, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM) fría y se sometió a 1500 psi en la prensa de French para lisar las células. A la vez, se tomó 1 ml de resina de amilosa y se colocó en una columna de polipropileno de 15 ml, se equilibró pasando 5 volúmenes (10 ml cada uno) de solución A. El lisado celular fue transferido en su totalidad a la columna, dejando el tiempo necesario hasta que la resina se asentara. Se realizaron 5 lavados con solución A. Finalmente la elución de la proteína se realizó agregando 10 ml de solución A + 10 mM de maltosa colectando fracciones de 1 ml. A las fracciones obtenidas se les agregó glicerol hasta obtener una concentración final del 30%, se cuantificó y almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Para la obtención de heterodímeros de ArcB, las cepas de *E. coli* ECL 5012 ($\Delta arcB$) conteniendo los plásmidos pBAD-His-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ + pACT3-MBP-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ en las combinaciones pertinentes, fueron sometidas al mismo protocolo descrito anteriormente para sobreexpresar y purificar proteínas marcadas con 6x-His. Aquí la sobreexpresión de las proteínas fue inducida con 1 mM de L-arabinosa y 0.1 mM de IPTG.

Ensayos de fosforilación *in vitro* de ArcB.

Las variantes y/o heterodímeros de ArcB fueron incubadas a 25 °C en presencia de [γ -³²P] ATP 40 μ M (actividad específica, 2 Ci/mmol, 1 Ci=37 Gbq), HEPES 33 mM (pH 7.5), KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0.1 mM, 1 mM de DTT, glicerol al 10% para evaluar su capacidad de transferir el grupo fosforilo. Por ejemplo, se incubó His-H1-D1-H2 + ArcA para verificar la capacidad de ArcB de transfosforilar a ArcA. Las reacciones fueron iniciadas agregando [γ -³²P] ATP. Muestras de 5 μ l fueron tomadas y mezcladas con un volumen de amortiguador de carga a los 15, 30, 60, 120 y 180 segundos de reacción. Dichas muestras se analizaron por SDS-PAGE. Los geles fueron secados a 80 °C durante una hora y expuestos en la *Storage Phosphor Screen* y analizados con el equipo Typhoon FLA7000 (GE Healthcare). La intensidad de cada banda fue estimada utilizando el programa *Image Quant* (Molecular Dynamics).

Transferencia del grupo fosforilo de H1 a D1 *in vitro*.

Para probar si la transferencia del grupo fosforilo del dominio H1 al dominio D1 es intramolecular o intermolecular, se realizaron cinéticas de fosforilación con las proteínas coexpresadas MBP-H1-D1*-H2/His-H1*-D1-H2 (vía intermolecular) y MBP-H1-D1-H2/His-H1*-D1*-H2 (vía intramolecular). 10 pmol de cada heterodímero fueron incubados con 50 pmol de ArcA. Las reacciones fueron iniciadas agregando [γ -³²P] ATP. Muestras de 5 μ l fueron tomadas a los 15, 30, 60, 120 y 180 segundos de reacción; mezcladas con un volumen de amortiguador de carga. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE en geles al 12%. Estos fueron secados a 80 °C durante una hora y expuestos en la *Storage Phosphor Screen* y analizados con el equipo Typhoon FLA7000 (GE Healthcare). La intensidad de cada banda fue estimada utilizando el programa *Image Quant* (Molecular Dynamics).

Si la transferencia del grupo fosforilo de H1 a D1 es intermolecular ArcA-P sería detectado en la reacción con el heterodímero MBP-H1-D1*-H2/His-H1*-D1-H2, si la transferencia es intramolecular se detectaría ArcA fosforilado en la mezcla con MBP-H1-D1-H2/His-H1*-D1*-H2. Cualquiera que sea el caso, se espera un nivel Wt de ArcA-P.

Transferencia del grupo fosforilo de D1 a H2 *in vitro*.

Para probar si la transferencia del grupo fosforilo del dominio D1 al dominio H2 es intramolecular o intermolecular, se realizaron cinéticas de fosforilación con las proteínas coexpresadas MBP-H1*-D1*-H2/His-H1-D1-H2* (vía intermolecular) y MBP-H1-D1-H2/His-H1*-D1*-H2* (vía intramolecular). 10 pmol de cada heterodímero fueron incubados con 50 pmol de ArcA. Las reacciones fueron iniciadas agregando [γ - 32 P] ATP. Muestras de 5 μ l fueron tomadas a los 15, 30, 60, 120 y 180 segundos; mezcladas con un volumen de amortiguador de carga. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE en geles al 12%. Estos fueron secados a 80 °C durante una hora y expuestos en la *Storage Phosphor Screen* y analizados con el equipo Typhoon FLA7000 (GE Healthcare). La intensidad de cada banda fue estimada utilizando el programa *Image Quant* (Molecular Dynamics).

Si la transferencia del grupo fosforilo de D1 a H2 es intermolecular ArcA-P sería detectado en la reacción con el heterodímero MBP-H1*-D1*-H2/His-H1-D1-H2*, si la transferencia es intramolecular se detectaría ArcA fosforilado en la mezcla con MBP-H1-D1-H2/His-H1*-D1*-H2*. Cualquiera que sea el caso, se espera un nivel Wt de ArcA-P.

Ensayos de defosforilación de ArcA-P *in vitro*.

Con el fin de estudiar el fosforelevo reverso, se realizó una reacción de fosforilación con 2 mM de MBP-H1-D1-H2 y 20 mM de ArcA¹⁻¹³⁶ en la presencia de solución de fosforilación (33 mM HEPES pH 7.5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, glicerol al 10%) y [γ - 32 P] ATP 40 μ M (actividad específica, 2 Ci/mmol) e incubada a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, la reacción fue detenida agregando 100 μ l de amortiguador A (TRIS-HCl 50 mM pH 7.0, KCl 150 mM, EDTA 5 mM, Tritón X-100 3%). ArcA-P fue separado de MBP-H1-D1-H2 por ultrafiltración utilizando un filtro Nanosep 30 K el cual no retiene a ArcA-P, ATP, ni fosfato inorgánico (Pi). El eluido fue pasado en un Nanosep 10 K, lavado 4 veces con 500 μ l de amortiguador A y una vez con 500 μ l de solución de defosforilación (33 mM HEPES pH 7.5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, glicerol al 10%). El material retenido conteniendo ArcA-P esencialmente libre de MBP-H1-D1-H2, ATP y Pi fue

recuperado en 200 µl de solución de defosforilación, alicuotada y usada en los ensayos de actividad fosfatasa.

Para estudiar la transferencia del grupo fosforilo del dominio H2 al dominio D1 en ArcB, 10 pmol de los heterodímeros MBP-H1*-D1-H2/His-H1*-D1*-H2* (vía intramolecular) y MBP-H1*-D1*-H2/His-H1*-D1-H2* (vía intermolecular) o 5 pmol de MBP-H1-D1-H2 fueron incubados con 50 pmol de ArcA-P en solución de defosforilación. Se tomaron muestras de 5 µl a los 0, 2.5, 5 y 10 minutos; las muestras fueron mezcladas con un volumen de amortiguador de carga y analizadas por SDS-PAGE en geles al 15 %. Estos fueron secados a 80 °C durante una hora y expuestos en la *Storage Phosphor Screen* y analizados con el equipo Typhoon FLA7000 (GE Healthcare). La intensidad de cada banda fue estimada utilizando el programa *Image Quant* (Molecular Dynamics).

Transferencia del grupo fosforilo de H1 a D1 *in vivo*.

Para realizar este ensayo, utilizamos las cepas ECL 5003 (*arcB^{wt}*), IFC2001 (*arcB^{D576A}*) complementada con el plásmido pEXT22Cm-*arcB^{H292Q}*, IFC2002 (*arcB^{H717Q}*) complementada con el plásmido pEXT22Cm-*arcB^{H292Q, D576A}*, estas cepas tienen la fusión reportera λΦ (*cydA'-lacZ*) activable por ArcA-P. A partir de pre-cultivos, cada cepa fue inoculada en 10-50 ml de LB líquido suplementado con MOPS 0.1 M pH 7.4, D-xilosa 20 mM y antibiótico de selección, los matraces fueron incubados a 37 °C en agitación a 300 rpm. A una DO₆₀₀ de 0.2, una muestra fue tomada para medir la actividad β-galactosidasa (0 min) en este punto el resto del cultivo fue dividido en dos, una parte se mantuvo bajo condiciones aeróbicas mientras que la otra fue cambiada a anaerobiosis llenando tubos con tapa de rosca y agitados con un magneto; la expresión de la fusión reportera fue medida tomando muestras a los 15, 30, 45, 60 y 75 min para ambas condiciones de crecimiento.

Efecto del incremento de *arcB*^{H292Q, D576A} y *arcB*^{D576A, H717Q} en la expresión de la fusión reportera $\lambda\Phi$ (*cydA'-lacZ*) para el estudio de la transferencia del grupo fosforilo de D1 a H2 *in vivo*.

En este ensayo se utilizaron las cepas ECL 5003 (*arcB*^{wt}) complementada con el plásmido pBAD-*arcB*^{H292Q, D576A} y con el plásmido pBAD-*arcB*^{D576A, H717Q}. A manera de comparación, se usaron las cepas ECL 5003 (*arcB*^{wt}) y ECL 5004 (Δ *arcB*). A partir de pre-cultivos, estas cepas fueron inoculadas en LB líquido suplementado con MOPS 0.1 M pH 7.4, D-xilosa 20 mM y antibiótico de selección, el cultivo fue incubado en condiciones aeróbicas hasta una DO₆₀₀ de 0.1. En este punto el cultivo fue dividido en 5 tubos con tapa de rosca para el crecimiento anaeróbico. Con el fin de inducir la expresión de las variantes de ArcB, se agregó L-arabinosa en las siguientes concentraciones: 0, 10, 15, 20 y 30 μ M. Los cultivos fueron crecidos hasta una DO₆₀₀ de 0.5 para tomar muestras y medir la actividad β -galactosidasa.

Transferencia del grupo fosforilo de H2 a D1 *in vivo*.

La cepa ECL 5002 (*arcB*^{wt}) y la cepa ECL 5032 (*arcB*^{H717Q}) complementada con el vector pEXT22Cm-*arcB*^{H292Q, D576A} fueron utilizadas para realizar este estudio, dichas cepas tienen la fusión reportera $\lambda\Phi$ (*IldP'-lacZ*) reprimible por ArcA-P. A partir de pre-cultivos, estas cepas fueron crecidas anaeróticamente en LB líquido suplementado con MOPS 0.1 M pH 7.4, D-xilosa 20 mM, L-lactato 20 mM y antibiótico de selección. A una DO₆₀₀ de 0.2, una muestra fue tomada para medir la actividad β -galactosidasa (punto 0 min), el resto del cultivo fue dividido en dos: una parte se mantuvo en anaerobiosis como control y la otra se cultivó en aerobiosis; la expresión del reportero fue medida tomando muestras a los 15, 30, 45, 60, 75 y 90 min para ambas condiciones de crecimiento.

Ensayos de la actividad β -galactosidasa.

Para la detección de la expresión de $\lambda\Phi$ (*cydA'-lacZ*) o $\lambda\Phi$ (*IldP'-lacZ*) se siguió el método de Miller (53), 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 agregarse a tubos de ensayo que contenían 0.9 ml de amortiguador Z ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6 M, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0.04 M, β -mercaptoetanol 0.05 M), 10 μ l de SDS al 10% y 20 μ l 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 10 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 y 550 nm para cada tubo. La actividad β -galactosidasa se expresó en unidades Miller, de acuerdo con la siguiente fórmula: unidades Miller = $1000 [DO_{420} - (1.75)(DO_{550})] / [(10)(0.1)(DO_{600})]$.

Ensayos de inmunorréplica tipo Western blot.

Para verificar la presencia y correcto tamaño de las variantes de ArcB codificadas por las cepas y los vectores utilizados en los experimentos *in vivo* se realizaron ensayos de inmunorréplica tipo Western blot. Cuando los cultivos llegaron a una DO_{600} de 0.5-0.6, se tomó 1 ml de muestra y se centrifugó a 12000 x g. Cada pastilla de células fue resuspendida en amortiguador de carga para proteínas y se hirvieron durante 10 min a 95 °C. De esta suspensión se tomaron 10 μ l y se sometieron a SDS-PAGE en geles al 10%. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL) durante 1 hora en una cámara sumergida en solución de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 250 mM, EDTA 1 mM, 20% de metanol). La membrana fue equilibrada en amortiguador TTBS (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, con 0.05% de Tween 20) durante 10 min, después fue incubada en solución de bloqueo (1% de leche en TTBS) por 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos dirigidos contra ArcB fueron agregados en una dilución 1:10000 e incubados 1 hora a temperatura ambiente, el anticuerpo unido fue detectado siguiendo el protocolo de *Amersham ECL Western Blotting Detection Kit*.

Cada uno de los ensayos de fosforilación *in vitro* y de β -galactosidasa, fueron realizados por triplicado.

Resultados.

Las proteínas necesarias para ensayar los pasos del fosforelevo y el fosforelevo reverso en ArcB (enlistadas en la Tabla 1) en sus versiones tipo silvestre y mutantes, fueron obtenidas para realizar experimentos de fosforilación *in vitro* tal como se describió en la sección materiales y métodos, las cuales contienen la etiqueta de 6x-His o MBP (aquí referidas como His-H1-D1-H2 o MBP-H1-D1-H2). Tales proteínas contienen mutaciones puntuales en los residuos de aminoácidos conservados de fosforilación. Es decir, la His conservada en la posición 292 del dominio H1 fue reemplazada por glutamina (referida aquí como H1*), el Asp conservado en la posición 576 de D1 fue reemplazado por alanina (referido como D1*) y la His en la posición 717 de H2 por glutamina (referida aquí como H2*). Además, estas proteínas carecen del fragmento transmembranal que comprende los residuos 1-77 de ArcB. Se sabe que estas proteínas recombinantes citosólicas son funcionales, puesto que en estudios previos se ha demostrado que la eliminación de estos segmentos no afecta la autofosforilación y la posterior transfosforilación al regulador de respuesta (25, 30, 38, 51, 63). Todas las proteínas recombinantes utilizadas contienen los residuos de cisteínas en las posiciones 180 y 247, que se ha demostrado que participan en las reacciones oxido-reducción en la regulación de ArcB (52).

La transferencia del grupo fosforilo del dominio H1 al dominio D1 de ArcB es intramolecular.

Peña Sandoval y cols. (2010) determinaron que la reacción de autofosforilación en ArcB ocurre mediante una reacción intramolecular, es decir que el sitio de autofosforilación y de unión a ATP deben estar en la misma molécula (61). Con el fin de saber cómo sucede el siguiente paso en el fosforelevo, es decir la transferencia del grupo fosforilo del dominio H1 al dominio D1, se purificaron las siguientes variantes de ArcB: His-H1-D1-H2, His-H1*-D1-H2, His-H1-D1*-H2, His-H1*-D1*-H2 e His-H1-D1-H2*. Como un experimento control, las proteínas individuales fueron evaluadas por su capacidad para fosforilarse y transfosforilar al regulador de respuesta ArcA (Fig. 7).

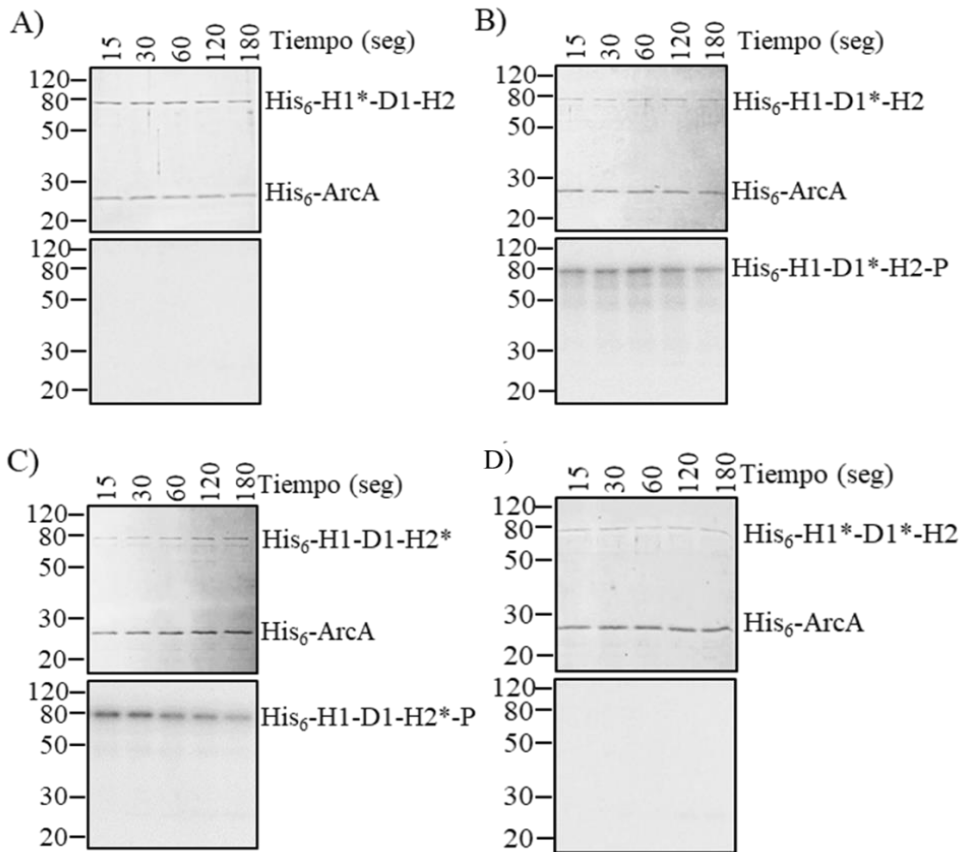


Figura 7. Los aminoácidos conservados en los dominios catalíticos H1, D1 y H2, son necesarios para la actividad cinasa de ArcB. La proteína ArcA purificada fue incubada en mezclas de reacción de 30 μ l con las versiones de ArcB indicadas en cada panel y con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP. En los tiempos indicados, una muestra de 5 μ l fue tomada y sometida a SDS-PAGE. En la parte superior de cada panel se muestra el gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie para revelar las proteínas utilizadas. En la parte de abajo se muestran los autorradiogramas, del lado izquierdo de cada panel se muestra la masa molecular en kDa y del lado derecho la posición de cada proteína.

Observamos que ninguna de las proteínas mutantes fueron capaces de transfosforilar a ArcA, además la mutación del Asp en D1 y la His en H2 no afectaron la capacidad de autofosforilación de las versiones de ArcB H1-D1*-H2 y H1-D1-H2* (Fig. 7). Estos resultados indicaron que el fosforelevio se encuentra interrumpido debido a estas mutaciones y que los residuos de aminoácidos conservados en cada dominio son necesarios para la actividad cinasa de ArcB.

Con estas proteínas realizamos dos mezclas de reacción para poder estudiar la transferencia del grupo fosforilo del dominio H1 al dominio D1. La primer mezcla comprendió a His-H1*-D1-H2 + His-H1-D1*-H2 + ArcA (vía intermolecular), la segunda fue con His-H1*-D1*-H2 + His-H1-D1-H2* + ArcA (vía intramolecular). La primer mezcla no

generó ArcA-P; sin embargo, en la segunda mezcla de reacción se generó cierto nivel de ArcA-P, en un 30% en comparación con la reacción tipo silvestre, en esta mezcla la vía intramolecular de H1 a D1 está permitida (Fig. 8C y D). Estos resultados indicaron que la transferencia del grupo fosforilo de H1 a D1 es intramolecular. No obstante, esta afirmación no es concluyente debido a que ninguna de las combinaciones fue capaz de restaurar los niveles silvestres de ArcA-P, posiblemente esto se deba a la insuficiente formación de heterodímeros en las mezclas de reacción.

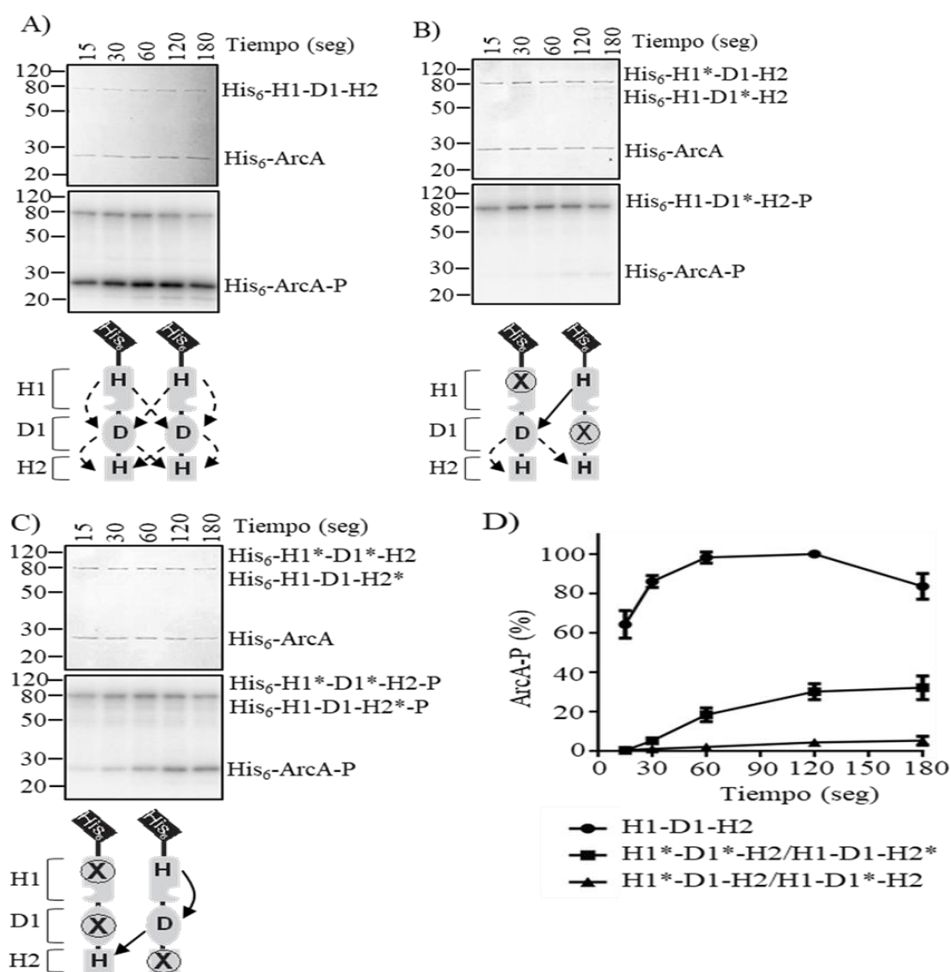


Figura 8. La transferencia del grupo fosforilo del dominio H1 al dominio D1 es intramolecular. La proteína ArcA purificada fue incubada en mezclas de reacción de 30 μ l con las versiones de ArcB indicadas en cada panel y con [γ -³²P] ATP (A-C). (D) análisis densitométrico de ArcA-P obtenido en cada reacción. En los tiempos indicados una muestra de 5 μ l fue tomada y sometida a SDS-PAGE. En la parte superior de cada panel se muestra el gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie para revelar las proteínas utilizadas. En medio se muestran los autorradiogramas, en la parte de abajo se muestra un esquema de las fosfotransferencias permitidas en cada reacción, del lado izquierdo de cada panel se muestra la masa molecular en kDa y del lado derecho las proteínas.

Tomando en consideración esta última posibilidad y con el fin de poder asegurar la formación de heterodímeros, se construyeron plásmidos inducibles con arabinosa que comprenden las variantes de ArcB fusionadas a MBP (*Maltose Binding Protein*). Estos plásmidos fueron transformados en la cepa ECL5012 ($\Delta arcB$), expresando His-ArcB mutada en alguno de los residuos de fosforilación para obtener las combinaciones pertinentes. Observamos que la incubación de MBP-ArcB con la resina de Ni-NTA no retiene a la proteína; sin embargo, cuando MBP-ArcB es coexpresada con His-ArcB e incubada con la resina Ni-NTA, ambas proteínas son recuperadas después de realizar el paso de elución. Lo anterior indica que existe interacción física entre ambas versiones de ArcB, lo cual asegura la formación de heterodímeros (Fig. 9A).

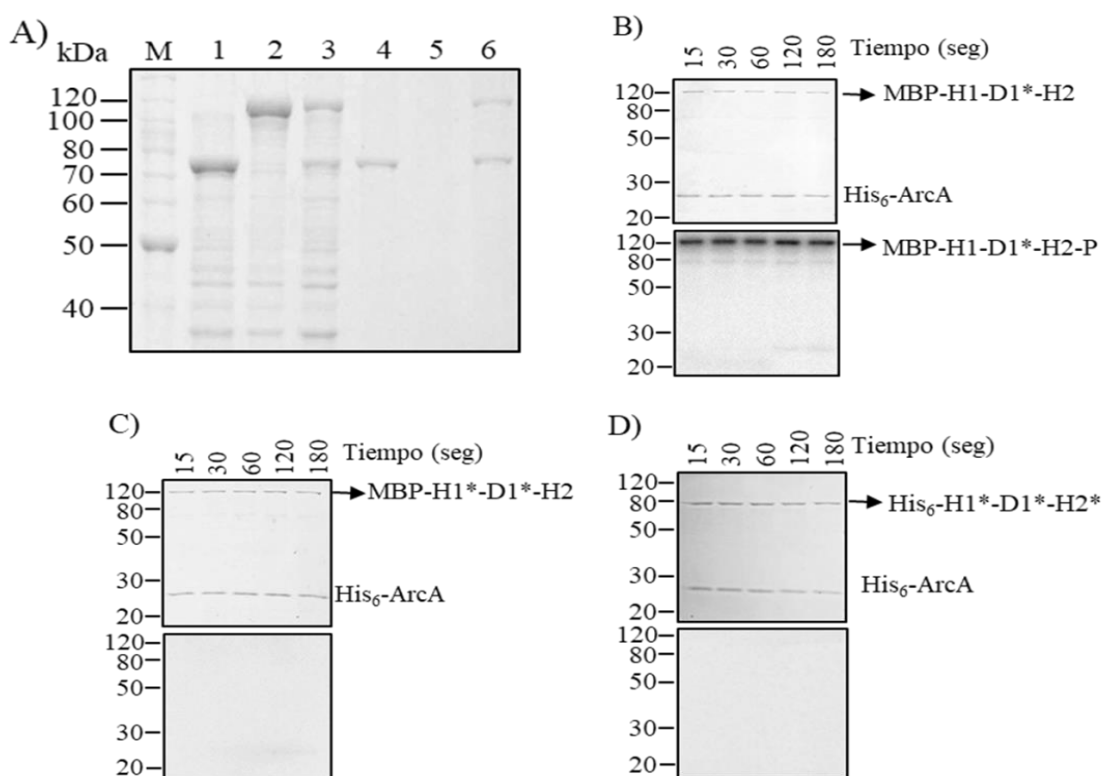


Figura 9. MBP-ArcB copurifica con His-ArcB cuando es incubada con resina Ni-NTA. (A) Las proteínas sobreexpresadas (carril 1=His-ArcB, 2=MBP-ArcB, 3=MBP-ArcB/His-ArcB) fueron analizadas por SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie. Las proteínas fueron purificadas por cromatografía de afinidad con resina Ni-NTA y analizadas por SDS-PAGE. Carril 4=His-ArcB purificada, 5=MBP-ArcB no es recuperada con Ni-NTA, 6=MBP-ArcB/His-ArcB copurificadas. En B-D, las versiones mutantes de ArcB indicadas son incapaces de fosforilar a ArcA. En los tiempos indicados una muestra de 5 μ l fue tomada y sometida a SDS-PAGE. En la parte superior de cada panel se muestra el gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie revelando las proteínas utilizadas, en la parte inferior el autorradiograma correspondiente. De lado izquierdo la masa molecular en kDa y del lado derecho la posición de cada proteína.

Así, para estudiar el paso del grupo fosforilo de H1 a D1, se sobreexpresaron y purificaron los heterodímeros MBP-H1-D1*-H2/His-H1*-D1-H2 (vía intermolecular) y MBP-H1-D1-H2/His-H1*-D1*-H2 (vía intramolecular). Estos heterodímeros fueron sometidos a fosforilación *in vitro* en presencia de ArcA así como de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, para probar su capacidad de complementarse y restaurar los niveles silvestres de ArcA-P.

Aun cuando MBP-H1-D1*-H2 fue capaz de autofosforilarse, His-H1*-D1-H2-P no fue detectada y prácticamente ArcA-P no fue generada, sugiriendo que la transferencia del grupo fosforilo de H1 a D1 no es intermolecular. Por otro lado, el heterodímero MBP-H1-D1-H2/His-H1*-D1*-H2 rápidamente transfosforiló a ArcA, indicando que *in vitro* la fosfotransferencia de H1 a D1 ocurre mediante una reacción intramolecular (Fig. 10).

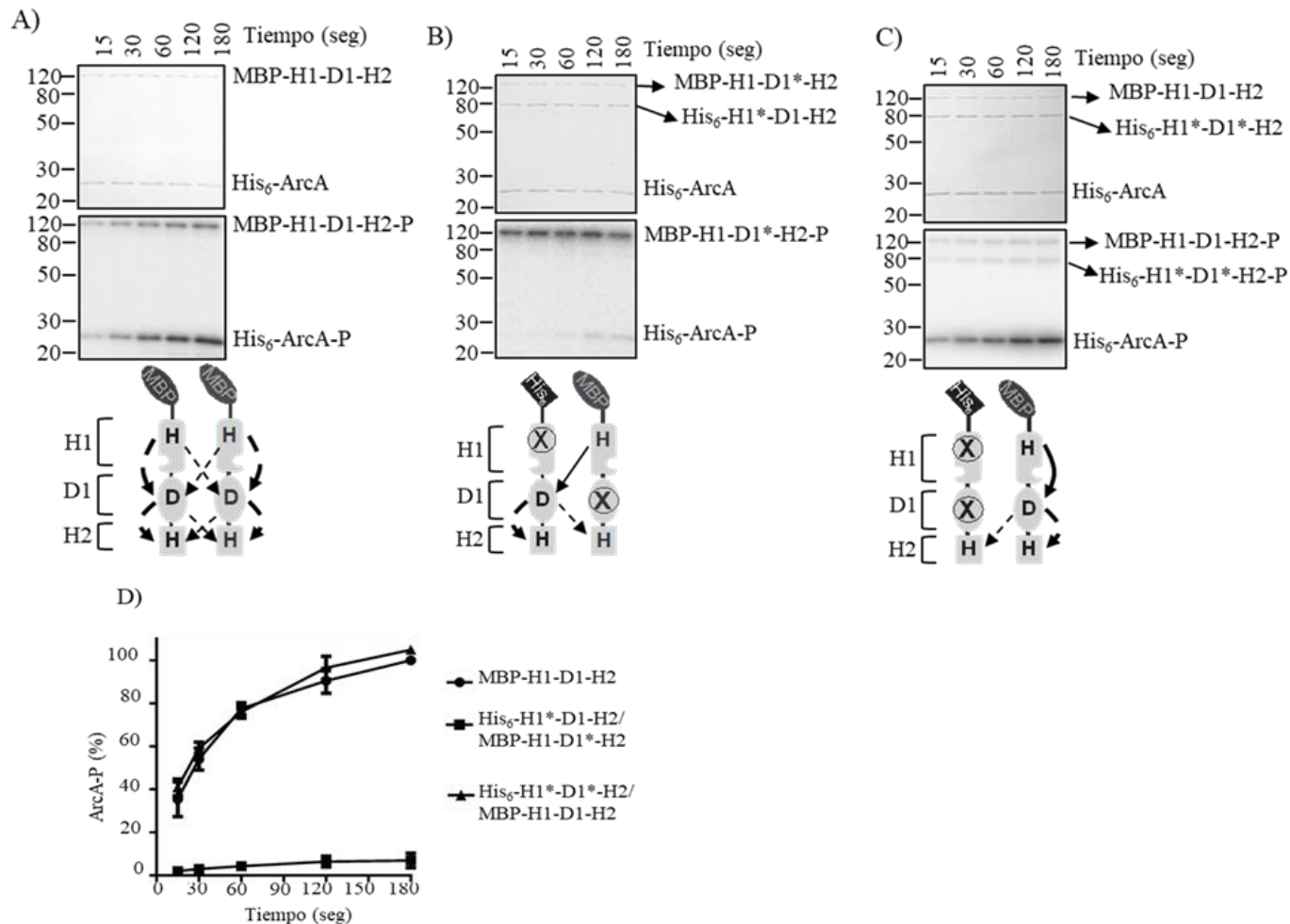


Figura 10. La transferencia del grupo fosforilo de H1 a D1 es una reacción intramolecular *in vitro*. ArcA fue incubada en mezclas de reacción de 30 μ l con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP y (A) ArcB tipo silvestre pero fusionada a MBP, (B) MBP-H1-D1*-H2/His-H1*-D1-H2 o (C) MBP-H1-D1-H2/His-H1*-D1*-H2. En los tiempos indicados, una

muestra de 5 μ l fue tomada y analizada por SDS-PAGE. En D, se muestra el análisis densitométrico de ArcA-P obtenida en cada reacción. En la parte superior de los paneles se muestran los geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie para revelar las proteínas utilizadas, en medio se muestran los autorradiogramas, abajo se muestran esquemas de las fosfotransferencias permitidas en cada heterodímero. Del lado izquierdo de cada panel se muestra la masa molecular en kDa y del lado derecho la posición de las proteínas.

***In vivo*, el grupo fosforilo es transferido del dominio H1 al dominio D1 en una reacción intramolecular.**

Con el fin de obtener evidencia fisiológica de la fosfotransferencia intramolecular de H1 a D1, se generaron los plásmidos de bajo número de copias pEXT22Cm-*arcB*^{H292Q, D576A} y pEXT22Cm-*arcB*^{H292Q}, los cuales contienen la región codificante de la variante de ArcB indicada bajo el control de su promotor nativo. Estos plásmidos fueron transformados en las cepas IFC2002 (*arcB*^{H717Q}) e IFC2001 (*arcB*^{D576A}) de *E. coli*, respectivamente. Entre paréntesis se indica la forma variante de ArcB codificada a nivel cromosomal en las cepas mencionadas.

Las cepas complementadas obtenidas portan la fusión reportera $\lambda\Phi$ (*cydA'*-*lacZ*) activable por ArcA-P; por tanto, son adecuadas para estudiar la capacidad de complementación molecular de las variantes de ArcB y de restauración de los niveles silvestres de ArcA-P *in vivo*. Como un experimento control, las cepas IFC2001 e IFC2002, así como los plásmidos anteriormente mencionados pero ahora transformados en la cepa 5004 (Δ *arcB*), fueron probados mediante ensayos de β -galactosidasa, en los cuales ninguna de las mutantes de ArcB fueron capaces de activar la expresión de la fusión reportera (Fig.11), indicando que el fosforelevo se encuentra interrumpido tal como fue mostrado en los experimentos *in vitro* de este trabajo.

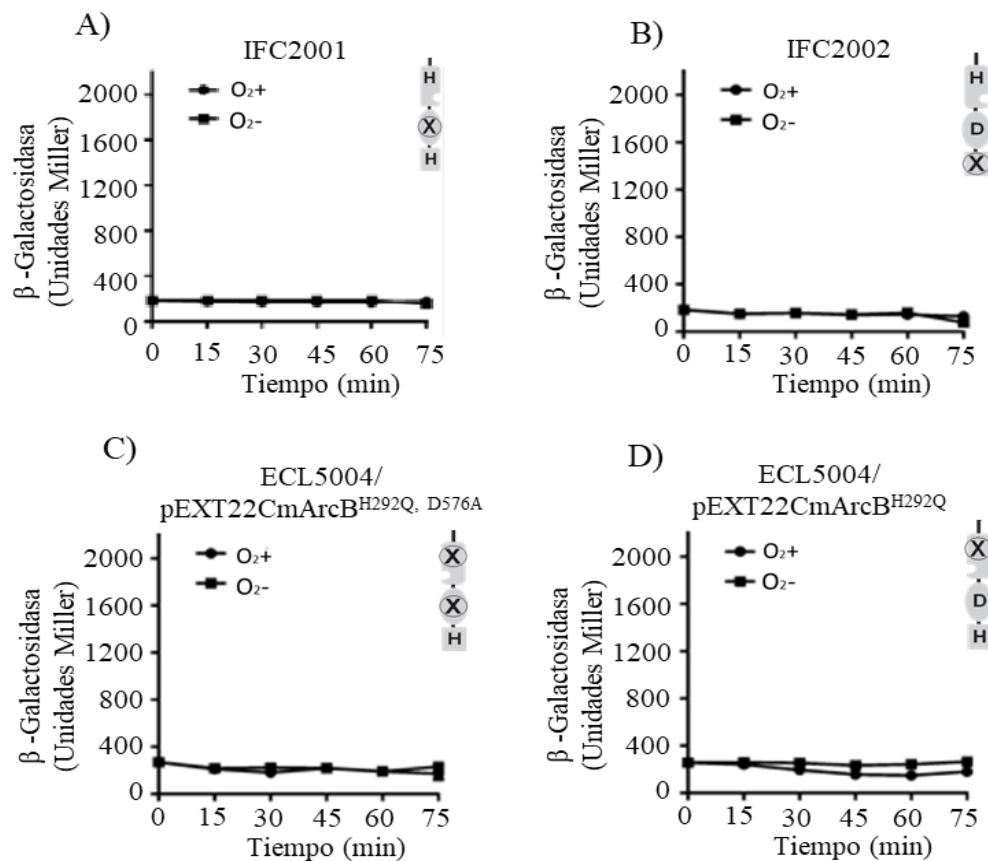


Figura 11. Las versiones mutantes de ArcB no activan la expresión de la fusión reportera $\lambda\Phi$ (*cydA'-lacZ*). Las cepas (A) IFC2001, (B) IFC2002, (C) ECL5004 portando el plásmido pEXT22Cm-*arcB*^{H292Q, D576A} y (D) ECL5004 con pEXT22Cm-*arcB*^{H292Q}, todas con la fusión reportera $\lambda\Phi$ (*cydA'-lacZ*), fueron crecidas aeróbicamente en LB líquido amortiguado con 0.1 M de MOPS (pH 7.4) y suplementado con 20 mM de D-xilosa. A una DO₆₀₀ de 0.2, una muestra fue tomada para medir la actividad β -galactosidasa (mostrada como tiempo 0 min) y el resto del cultivo fue dividido en dos. Una parte se mantuvo en condiciones aeróbicas (círculos) como control, mientras que la otra fue cambiada a anaerobiosis (cuadrados) y la actividad β -galactosidasa fue seguida en el tiempo tanto en condiciones aeróbicas (O_2+) como anaeróbicas (O_2-). En el lado derecho de cada gráfica se muestra un esquema de la versión mutante de ArcB expresada en las cepas indicadas.

En el caso de la cepa complementada IFC2001 (*arcB*^{D576A}) + *arcB*^{H292Q}, en la cual el paso H1 a D1 intermolecular está permitido, fue incapaz de activar la expresión del reportero, mostrando un fenotipo *arcB*⁻. En contraste, la cepa IFC2002 (*arcB*^{H717Q}) + *arcB*^{H292Q, D576A}, en la cual la fosfotransferencia de H1 a D1 intramolecular es admitida, la expresión del reportero fue restaurada a niveles silvestres (Fig. 12), esto es consistente con los resultados obtenidos *in vitro*. Las cepas utilizadas expresan las versiones de ArcB a niveles silvestres, lo cual fue corroborado mediante inmunorreplaca tipo Western blot (Fig. 12E). En su conjunto, estos experimentos indican que el grupo fosforilo es transferido en una reacción intramolecular del dominio H1 al dominio D1 en ArcB durante la actividad cinasa.

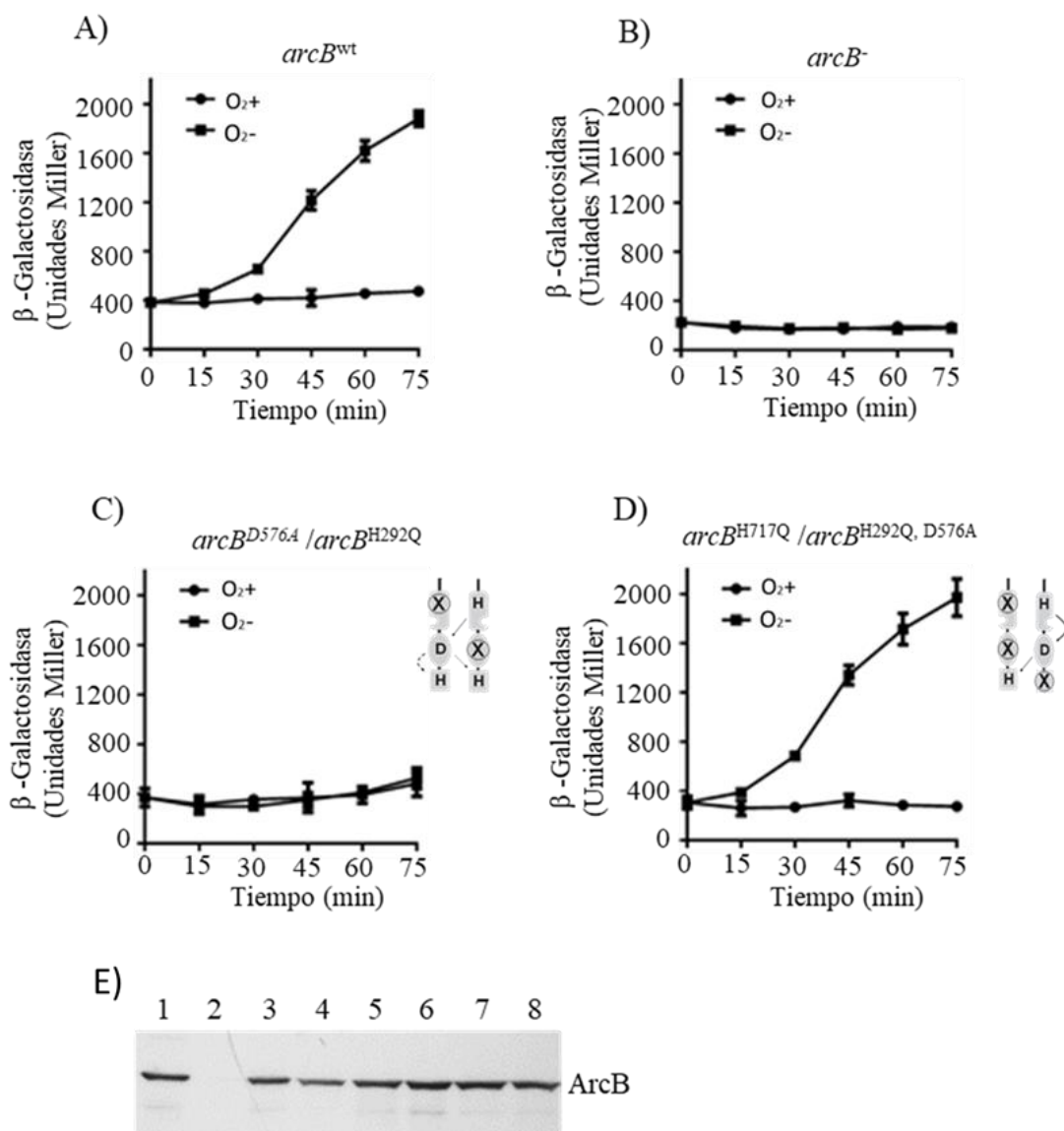


Figura 12. La co-expresión de *arcB^{H717Q}* y *arcB^{H292Q, D576A}* restaura la actividad cinasa de ArcB y la regulación de la expresión de la fusión reportera $\lambda\Phi$ (*cydA'-lacZ*). Las cepas (A) ECL 5003 (*arcB^{wt}*), (B) ECL 5004 (*arcB⁻*), (C) IFC2001 (*arcB^{D576A}*) complementada con el plásmido pEXT22Cm-*arcB^{H292Q}*, (D) IFC2002 (*arcB^{H717Q}*) complementada con el plásmido pEXT22Cm-*arcB^{H292Q, D576A}* fueron crecidas aeróbicamente en LB líquido amortiguado con 0.1 M de MOPS (pH 7.4) y suplementado con 20 mM de D-xilosa. Las cepas portan la fusión reportera $\lambda\Phi$ (*cydA'-lacZ*) activable por Arca-P. A una DO₆₀₀ de 0.2, una muestra fue tomada para medir la actividad β -galactosidasa (mostrada como tiempo 0 min) y el resto de cada cultivo fue dividido en dos. Una parte se mantuvo en condiciones aeróbicas (círculos) como control, mientras que la otra fue cambiada a anaerobiosis (cuadrados) y la actividad β -galactosidasa fue seguida en el tiempo tanto en condiciones aeróbicas (O₂⁺) como anaeróbicas (O₂⁻). En el lado derecho de las gráficas C y D se muestra un esquema de las versiones mutantes de ArcB co-expresadas así como las fosfotransferencias permitidas en cada caso. En E), ensayo de inmunorreplaca tipo Western blot mostrando que la expresión de ArcB en las cepas utilizadas es a niveles silvestres. Carriles: 1=ArcB silvestre, 2= Δ arcB, 3=IFC 2001 (*arcB^{D576A}*), 4=IFC 2002 (*arcB^{H717Q}*), 5=IFC2001 + *arcB^{H292Q}*, 6=IFC2002 + *arcB^{H292Q, D576A}*, 7=ECL 5004 (Δ arcB) + *arcB^{H292Q}*, 8=ECL 5004 (Δ arcB) + *arcB^{H292Q, D576A}*.

La transferencia del grupo fosforilo *in vitro* del dominio D1 al dominio H2 de ArcB, ocurre preferencialmente en una reacción intermolecular.

Para estudiar si la transferencia del grupo fosforilo de D1 a H2 sucede en una reacción intramolecular o intermolecular en el dímero ArcB, los heterodímeros MBP-H1*-D1*-H2/His-H1-D1-H2* (D1 a H2 vía intermolecular) y MBP-H1-D1-H2/His-H1*-D1*-H2* (D1 a H2 vía intramolecular) fueron purificados y sometidos a reacciones de fosforilación *in vitro* para evaluar si son capaces de complementarse y completar los pasos del fosforelevo mediante la generación así como la detección de ArcA-P. Como control, verificamos que las versiones mutantes de ArcB presentan la característica de tener interrumpido el fosforelevo y por tanto son incapaces de fosforilar a ArcA por sí solas (Fig. 7C, 9C y D).

Por otro lado, observamos que el heterodímero MBP-H1*-D1*-H2/His-H1-D1-H2* fosforila a ArcA a niveles silvestres; sin embargo, en el heterodímero MBP-H1-D1-H2/His-H1*-D1*-H2*, ArcA-P es generado a un índice reducido (Fig. 13). Estos resultados indican que el grupo fosforilo es transferido de D1 a H2 preferencialmente de manera intermolecular, al menos *in vitro*.

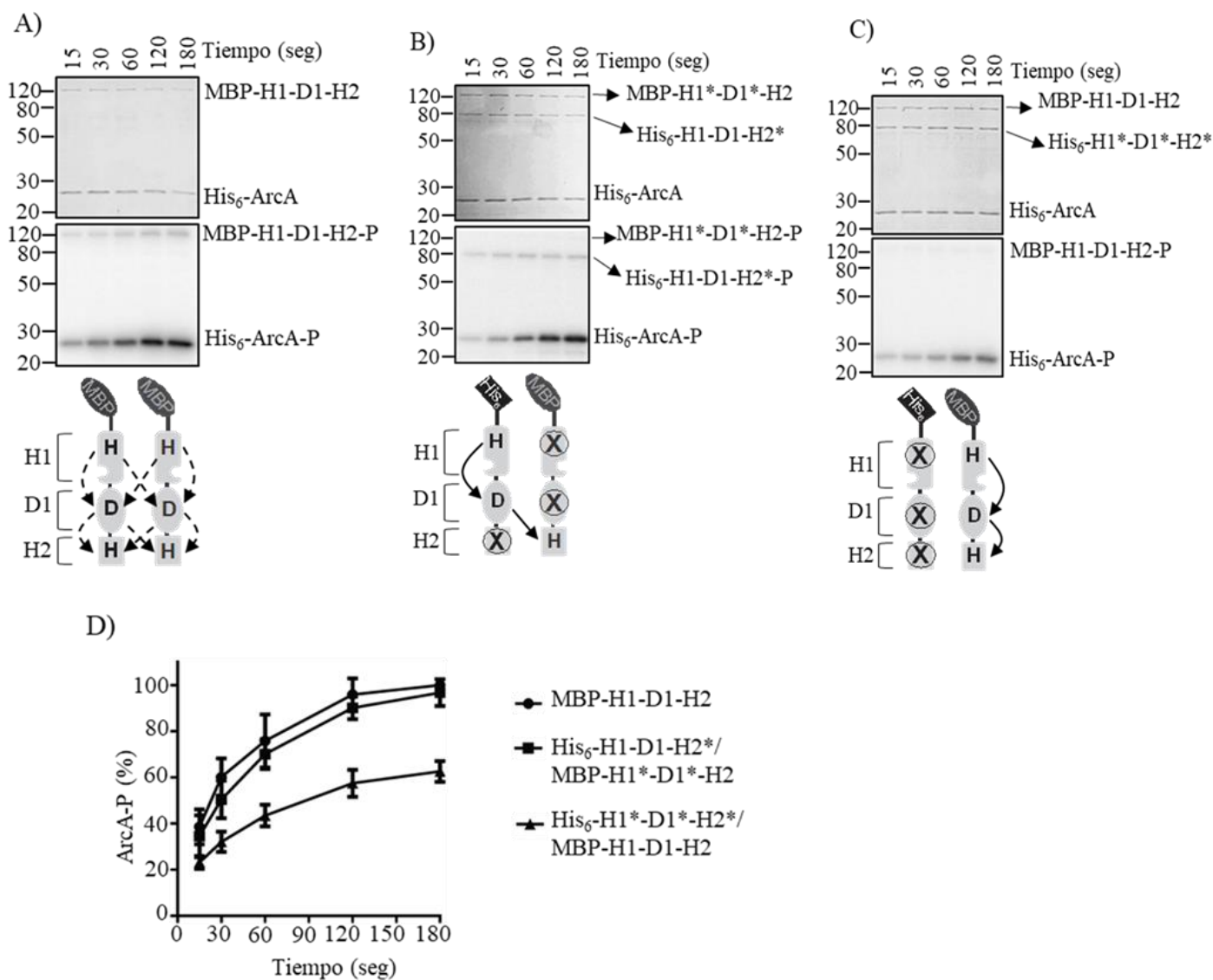


Figura 13. La fosfotransferencia del dominio D1 al dominio H2, preferencialmente es intermolecular. ArcA purificada fue incubada en mezclas de reacción de 30 μ l con [γ -³²P] ATP y (A) ArcB tipo silvestre fusionada a MBP, (B) MBP-H1*-D1*-H2/His₆-H1-D1-H2* o (C) MBP-H1-D1-H2/His₆-H1*-D1*-H2*. En los tiempos indicados, una muestra de 5 μ l fue tomada y analizada por SDS-PAGE. En D, se muestra el análisis densitométrico de ArcA-P obtenida en cada reacción. En la parte superior de los paneles se muestran los geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie para revelar las proteínas utilizadas, en medio se muestran los autorradiogramas, abajo se muestran esquemas de las fosfotransferencias permitidas en cada reacción. Del lado izquierdo de cada panel se muestra la masa molecular en kDa y del lado derecho la posición de las proteínas.

En condiciones fisiológicas, la transferencia del grupo fosforilo del dominio D1 al dominio H2 ocurre preferencialmente en una reacción intermolecular.

Mientras estudiamos *in vivo* el paso intramolecular de H1 a D1, cuando utilizamos la cepa IFC2002 ($arcB^{H717Q}$) + $arcB^{H292Q, D576A}$ (Fig. 12D), observamos que el fosforelevo fue completado, tal resultado sugirió además la posibilidad de que *in vivo* el paso D1 a H2 es intermolecular; sin embargo, la fosfotransferencia intramolecular no puede ser descartada.

Los resultados *in vitro* mostraron una preferencia por la vía intermolecular. Con el fin de discriminar *in vivo* entre las dos vías de transferencia del grupo fosfato del dominio D1 al dominio H2, consideramos que el incremento de la versión $arcB^{D576A, H717Q}$ en una cepa con el fondo $arcB^{Wt}$ deberá favorecer la formación del heterodímero $arcB^{D576A, H717Q} / arcB^{Wt}$. Tal combinación solo permite la fosfotransferencia intramolecular de D1 a H2, por lo tanto, una reducción en los niveles de ArcA-P serán obtenidos si la vía es intermolecular. A manera de control, la concentración de $arcB^{H292Q, D576A}$ fue incrementada en el fondo genético $arcB^{Wt}$ para favorecer la formación del heterodímero $arcB^{H292Q, D576A} / arcB^{Wt}$, de tal forma que en este caso ambas posibilidades (intra- e intermolecular) son admitidas.

Los plásmidos $pBAD-arcB^{D576A, H717Q}$ y $pBAD-arcB^{H292Q, D576A}$, inducibles con L-arabinosa, fueron transformados en la cepa ECL5003 ($arcB^{Wt}$), la cual contiene la fusión reportera $\lambda\Phi$ ($cydA'-lacZ$). Estas cepas fueron crecidas en condiciones anaeróbicas en presencia de distintas concentraciones de L-arabinosa (0-30 μ M), a una DO_{600} de 0.5 fue evaluada la actividad β -galactosidasa. El incremento del inductor en la cepa que porta el plásmido que expresa a $arcB^{H292Q, D576A}$ resultó en una disminución de los niveles de la expresión de la fusión reportera. Debido a que la fosfotrasferencia intramolecular de H1 a D1 y ambas vías de D1 a H2 están permitidas en el heterodímero $arcB^{H292Q, D576A} / arcB^{Wt}$, una posible explicación es que la cantidad incrementada de los homodímeros de $ArcB^{H292Q, D576A}$ puede conducir a la transferencia del grupo fosforilo desde ArcA-P al dominio H2 disminuyendo su actividad reguladora. En un estudio previo (62) fue mostrado que la sobreexpresión de un péptido que comprende el dominio H2, bajo condiciones

estimulantes, genera una disminución en los niveles de ArcA-P debido a la transferencia del ~P a H2.

Por otro lado, el incremento de $arcB^{D576A, H717Q}$ resultó en un efecto más notorio en la reducción de la expresión del reportero $\lambda\Phi$ ($cydA'-lacZ$); esta disminución fue del 40% en comparación con la cepa control (Fig. 14). Al parecer, de acuerdo con los resultados *in vitro*, la transferencia del grupo fosforilo del dominio D1 al dominio H2 preferencialmente ocurre a través de una reacción intermolecular bajo condiciones fisiológicas.

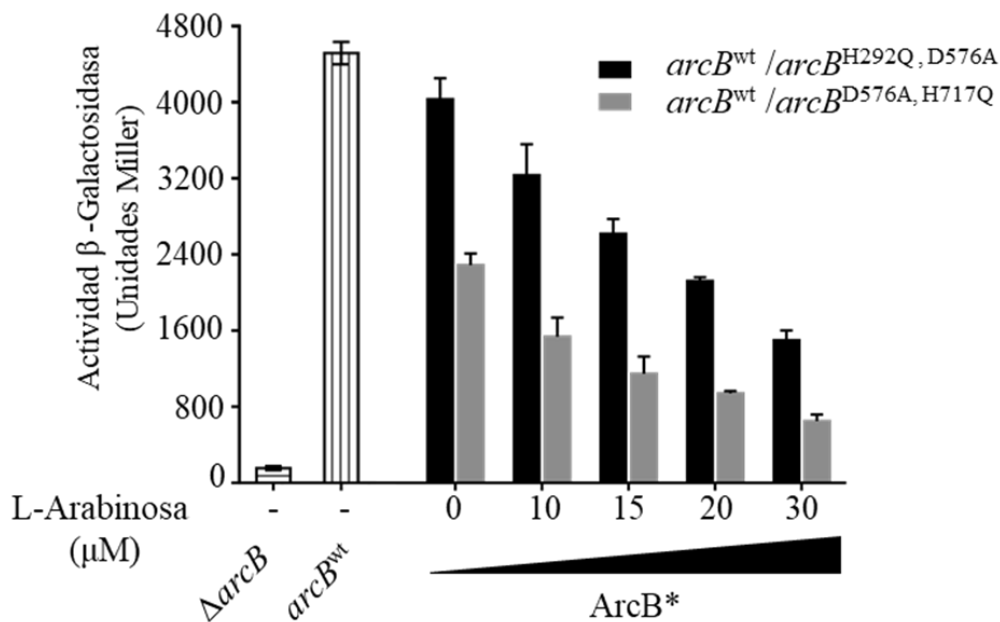


Figura 14. La transferencia del grupo fosforilo de D1 a H2 tiene una preferencia por la reacción intermolecular. La cepa ECL 5003 ($arcB^{wt}$) complementada con el plásmido pBAD- $arcB^{H292Q, D576A}$ (barras negras) o con el plásmido pBAD- $arcB^{D576A, H717Q}$ (barras grises) fue crecida en condiciones aeróbicas en LB líquido amortiguado con 0.1 M de MOPS (pH 7.4) y suplementado con 20 mM de D-xilosa. A una DO_{600} de 0.1, el cultivo fue dividido en 5 tubos con tapa de rosca llenos hasta el tope para el crecimiento anaeróbico, la L-arabinosa fue agregada a las concentraciones indicadas. A una DO_{600} de 0.5, la actividad β -galactosidasa fue evaluada. A manera de comparación, la actividad β -galactosidasa en condiciones anaeróbicas de ECL 5003 (barras con líneas verticales) y de ECL 5004 ($arcB^-$) (barras con líneas horizontales) son indicadas.

Durante la actividad fosfatasa de ArcB, la fosfotransferencia del dominio H2 al dominio D1 ocurre preferencialmente de manera intramolecular.

La cinasa sensora ArcB es una proteína bifuncional, es decir que bajo condiciones estimulantes fosforila al regulador de respuesta ArcA, mientras que en condiciones no estimulantes ésta defosforila a ArcA-P. Para ambas funciones excluyentes, los residuos Asp⁵⁷⁶ e His⁷¹⁷ son utilizados, por lo que surge la interesante pregunta de si en el fosforelevo reverso la transferencia del grupo fosforilo sucede en una vía diferente a la utilizada en la actividad cinasa de ArcB.

Para estudiar esta posibilidad *in vitro*, generamos ArcA-P en una reacción de fosforilación en presencia de MBP-H1-D1-H2, ArcA fosforilada fue purificada de la reacción y utilizada como sustrato para los ensayos de fosfatasa. En primer lugar, realizamos reacciones de fosfatasa control, en las cuales las variantes individuales de ArcB se incubaron con ArcA-P, estos experimentos mostraron que MBP-H1*-D1-H2 defosforila rápidamente al sustrato. Por otro lado, His-H1*-D1-H2* e His-H1*-D1*-H2* fueron incapaces de recibir el grupo fosforilo de ArcA-P; a su vez, MBP-H1*-D1*-H2 recibió el ~P de ArcA pero es incapaz de liberarlo, debido a la ausencia del dominio D1 funcional. De esta manera, verificamos también la participación de los dominios H2 y D1 en la actividad fosfatasa de ArcB como previamente se ha documentado (24) (Fig. 15).

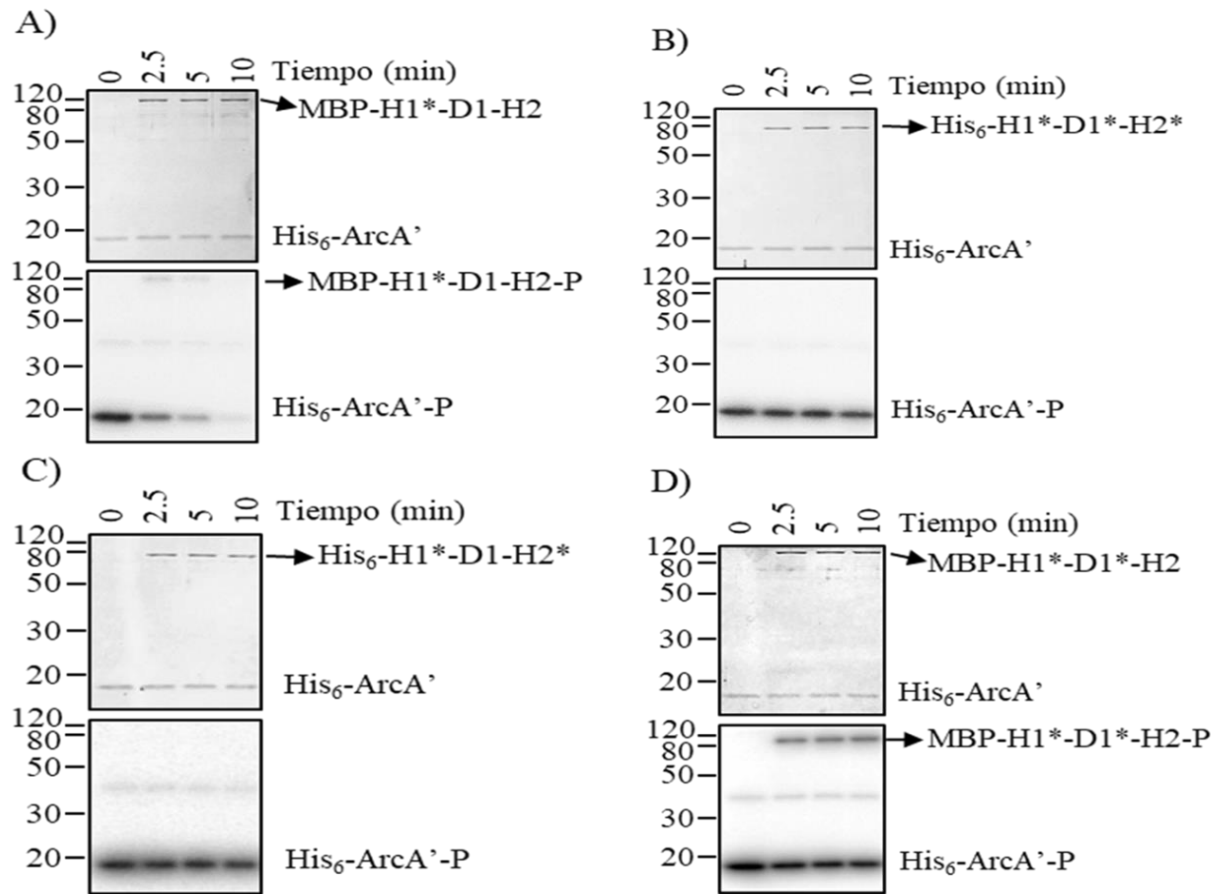


Figura 15. Los dominios H2 y D1 de ArcB participan en la defosforilación de ArcA fosforilado (ArcA-P). La proteína ArcA-P purificada fue incubada con (A) MBP-H1*-D1-H2, (B) His-H1*-D1*-H2*, (C) His-H1*-D1-H2* o (D) MBP-H1*-D1*-H2 en mezclas de reacción de 25 μ l. En los tiempos indicados una muestra de 5 μ l fue tomada y sometida a SDS-PAGE. En la parte superior de los paneles se muestran los geles de poliácridamida teñidos con azul de Coomassie para revelar las proteínas utilizadas, en la parte inferior se muestran los autorradiogramas. Del lado izquierdo de cada panel se muestra la masa molecular en kDa y del lado derecho la posición de las proteínas.

ArcA-P purificada es estable y se mantiene en su estado fosforilado a lo largo del experimento (Fig. 16A), por tanto es adecuada para el estudio de la actividad fosfatasa de ArcB *in vitro*. Por consiguiente, para estudiar la transferencia del grupo fosforilo del dominio H2 al dominio D1, el heterodímero MBP-H1*-D1-H2/His-H1*-D1*-H2*, que solo permite la transferencia intramolecular del \sim P de H2 a D1, defosforiló a ArcA-P a niveles semejantes a la reacción silvestre (Fig. 16C). Para evaluar la vía intermolecular, el heterodímero MBP-H1*-D1*-H2/His-H1*-D1-H2* fue incubado con ArcA-P y mostró una actividad fosfatasa menor respecto a la reacción silvestre (Fig. 16D, E)

Derivado de los resultados con los heterodímeros, pareciera que *in vitro* existe una preferencia intramolecular de la fosfotransferencia de H2 a D1 cuando ArcB funciona como fosfatasa.

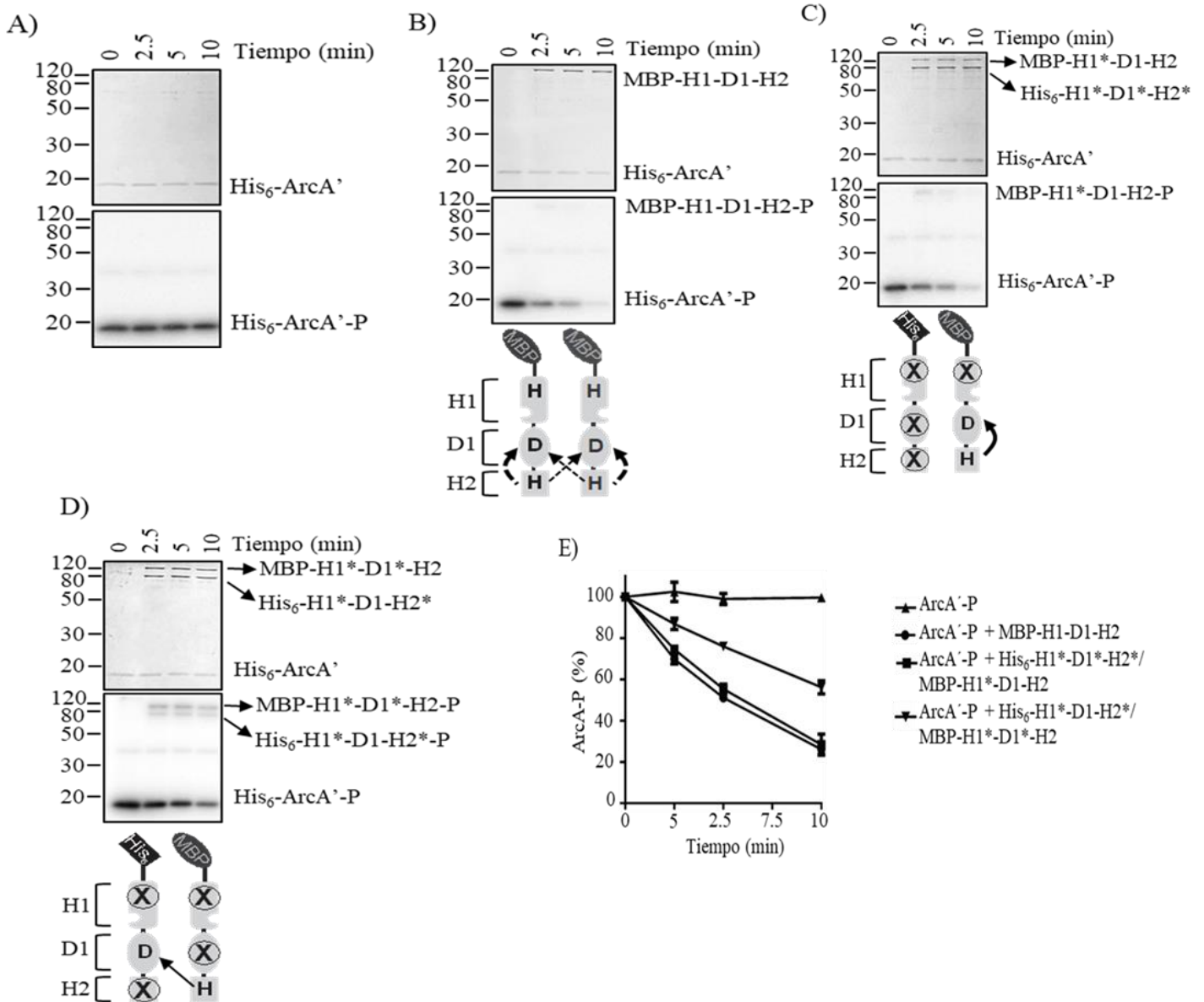


Figura 16. El grupo fosforilo es transferido del dominio H2 al dominio D1 de ArcB preferentemente de manera intramolecular. ArcA-P purificada fue incubada (A) sin ArcB o con (B) MBP-H1-D1-H2, (C) MBP-H1*-D1-H2/His-H1*-D1*-H2* o con (D) MBP-H1*-D1*-H2/His-H1*-D1*-H2* en mezclas de reacción de 25 μ l. En los tiempos indicados una muestra de 5 μ l fue tomada y sometida a SDS-PAGE. En la parte superior de los paneles se muestran los geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie para revelar las proteínas utilizadas, en la parte de en medio se muestran los autorradiogramas, abajo se muestran esquemas de las fosfotransferencias permitidas en las reacciones B-D. Del lado izquierdo de cada panel se muestra la masa molecular en kDa y del lado derecho la posición de las proteínas.

***In vivo*, la transferencia del grupo fosforilo del dominio H2 al dominio D1 de ArcB opera intramolecularmente.**

Para estudiar la transferencia del grupo fosforilo de H2 a D1 *in vivo* en un cambio de condiciones de crecimiento de anaerobiosis a aerobiosis, las cepas ECL5032 ($arcB^{H717Q}$) transformada con el plásmido pEXT22 Cm- $arcB^{H292Q, D576A}$ y ECL5002 ($arcB^{Wt}$), las cuales contienen la fusión reportera $\lambda\Phi$ ($IldP'$ - $lacZ$) reprimible por ArcA-P, fueron crecidas en condiciones anaeróbicas. A una DO_{600} de 0.2, una muestra fue tomada para evaluar la actividad β -galactosidasa. Tal como se esperaba, la expresión de la fusión reportera en ambas cepas fue muy baja, indicando la represión dependiente de ArcA-P. Este resultado demuestra que la coexpresión de $arcB^{H717Q}$ y $arcB^{H292Q, D576A}$ restaura la actividad cinasa de ArcB y la apropiada formación de heterodímeros. Posteriormente, una parte del cultivo de cada cepa fue cambiado a condiciones aeróbicas. En el caso de la cepa ECL5032 ($arcB^{Wt}$), un inmediato incremento en la expresión de la fusión reportera fue observada, indicando la defosforilación de ArcA-P y por tanto la liberación de la represión de la expresión de $\lambda\Phi$ ($IldP'$ - $lacZ$). En contraste, un incremento escaso y retardado fue observado para la cepa ECL5032 ($arcB^{H717Q}$) + $arcB^{H292Q, D576A}$; en dicha cepa la transferencia del grupo fosforilo de H2 a D1 mediante la vía intermolecular está permitida (Fig. 17).

Estos resultados indican fuertemente que bajo condiciones en las cuáles ArcB actúa como fosfatasa, la reacción de fosfotransferencia de H2 a D1 ocurre mediante una transferencia intramolecular.

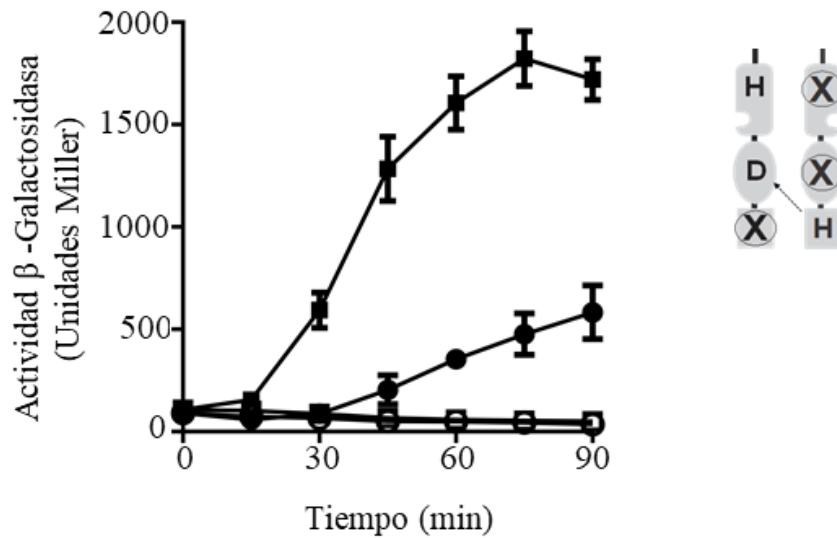


Figura 17. La fosfotransferencia del dominio H2 al dominio D1 de ArcB, ocurre en una reacción intramolecular en condiciones no estimulantes. Las cepas ECL5002 ($arcB^{Wt}$) (cuadrados) y ECL5032 ($arcB^{H717Q}$) + pEXT22Cm- $arcB^{H292Q, D576A}$ (círculos), ambas con la fusión reportera $\lambda\Phi$ (IldP'-lacZ), fueron crecidas anaeróbicamente en LB líquido amortiguado con 0.1 M de MOPS (pH7.4), suplementado con 20 mM de D-xilosa y 20 mM de L-lactato. A una DO_{600} de 0.2, una alícuota fue tomada para medir la actividad β -galactosidasa (mostrada como 0 min), el resto de los cultivos fue dividido en dos: un parte fue mantenida en anaerobiosis (símbolos abiertos) como control, mientras que la otra fue cambiada a aerobiosis (símbolos rellenos) y la actividad β -galactosidasa fue seguida en el tiempo. En el lado derecho de la gráfica, se muestra un esquema de las versiones mutantes de ArcB co-expresadas, para el caso de ECL5032 ($arcB^{H717Q}$) + pEXT22Cm- $arcB^{H292Q, D576A}$, así como la fosfotransferencia permitida en condiciones no estimulantes.

Discusión:

El sistema ArcB/A de *E. coli* regula la expresión de una gran cantidad de genes en respuesta al estado redox del medio. Este SDC se encuentra activo en condiciones anaerobias y microaerobias de crecimiento, mientras que se inactiva cuando las células crecen en condiciones aerobias (3, 23, 49). ArcB es una cinasa híbrida y ha sido un modelo de estudio para este tipo de sensores, debido a que fue uno de los pocos en los que se demostró que existe un fosforelevo y un fosforelevo reverso tanto *in vivo* como *in vitro* (24, 25, 62). El ambiente reductor genera cambios conformacionales en la proteína, favoreciendo la reacción de autofosforilación a expensas del ATP. Ha sido demostrado que ArcB, en contraste con muchas CSs homodiméricas, se autofosforila a través de una reacción intramolecular, siendo requisito que el sitio de unión a ATP y de autofosforilación (His²⁹²) se encuentren en la misma molécula de ArcB (61). Sin embargo, en dicho estudio no se aclararon los pasos subsecuentes, respecto a la transferencia inter o intramolecular del grupo fosfato entre los monómeros.

Además de la reacción de autofosforilación, los transportadores de electrones quinonas y menaquinonas actúan como oxidantes y reductores de ArcB, participando en su regulación mediante la formación de enlaces disulfuro entre monómeros (5, 52). Por otro lado, ha sido demostrado que la regulación catalítica es realizada a través de movimientos rotacionales que alteran la porción citosólica de esta proteína (44).

Recientemente, ha sido de gran interés elucidar el modo de transferencia del grupo fosforilo en las cinasas híbridas, en particular ArcB. Jovanovic y cols (2015), analizaron el fosforelevo mediante predicciones matemáticas y estadísticas, así como experimentación *in vivo*. Las variantes de ArcB, con mutaciones puntuales en los sitios de fosforilación (His²⁹², Asp⁵⁷⁶ e His⁷¹⁷), fueron expresadas a partir de plásmidos de alto número de copias, bajo el control de promotores inducibles con IPTG. Los autores observaron que la co-expresión de una copia mutante en His²⁹², Asp⁵⁷⁶ o His⁷¹⁷ con ArcB silvestre resultaba en un fenotipo comparable con una cepa mutante en *arcB*. Con estos resultados, los autores sugirieron que la fosfotransferencia en ArcB ocurre por un mecanismo cooperativo y

alostérico, en el que todos los dominios y sitios de fosforilación deben ser funcionales para permitir que ocurra la fosfotransferencia entre dominios (39).

En un segundo reporte, a través de la estrategia *Phos-tag* usando geles de poliacrilamida, se analizó la capacidad de mutantes de ArcB de complementarse para restaurar el fosforelevo *in vitro*. Esta metodología consiste en observar un retardo en la migración de las formas fosforiladas de las proteínas en geles de poliacrilamida. Los resultados sugirieron que las dos transferencias del grupo fosforilo involucradas suceden en reacciones intermoleculares (41). Sin embargo, ambos reportes no permiten establecer una conclusión clara. El hecho de alterar la relación *in vivo* de la CS respecto a su RR, resulta en una reducción de la actividad del regulador de respuesta como ha sido previamente descrito (7, 26), lo que puede explicar el fenotipo semejante a una cepa $\Delta arcB$ a pesar de que la CS está siendo expresada. Por otro lado, la metodología *Phos-tag* tiene una sensibilidad y reproducibilidad limitada y requiere el uso de grandes cantidades de proteína, lo cual puede incrementar la presencia de fosforilaciones no específicas.

En el presente trabajo estudiamos las vías de fosfotransferencia en el dímero ArcB, por medio de ensayos de complementación *in vivo* e *in vitro* de variantes de ArcB con mutaciones en los residuos de fosforilación. La metodología *in vitro* que utilizamos permite el estudio tanto cualitativo como cuantitativo de la transferencia del grupo P, en este caso de ^{32}P , sin el uso de cantidades excesivas de proteína. Esto nos permitió detectar y analizar las proteínas fosforiladas. Con el fin de estudiar la complementación *in vivo*, utilizamos plásmidos de bajo número de copias cuyo nivel de expresión es a niveles silvestres, lo cual verificamos mediante inmunorreplaca tipo Western blot. (Fig. 12E). Las estrategias utilizadas aquí podrían resolver los problemas metodológicos mencionados, los cuáles dificultan el establecimiento de una conclusión.

Nuestros resultados mostraron que durante el fosforelevo en la actividad cinasa de ArcB, la transferencia del grupo fosforilo de H1 a D1 ocurre exclusivamente en una reacción intramolecular, mientras que de D1 a H2 sucede preferencialmente de manera intermolecular, estos resultados también fueron verificados bajo condiciones fisiológicas.

En un estudio similar, Uhl y colaboradores (1996) estudiaron la complementación molecular *in vivo* de la cinasa sensora BvgS de *B. pertussis* para analizar la participación del dominio de fosfotransferencia en esta proteína, el cual al parecer recibe el grupo fosforilo por una vía intermolecular desde D1. Es probable que la vía de fosfotransferencia para este paso esté conservada en algunas CSs híbridas. Por otro lado, la actividad fosfatasa no fue estudiada en dicho reporte (74).

El alcance de nuestro estudio incluyó estudiar la transferencia del grupo fosforilo en el fosforelevo reverso del dominio H2 al dominio D1 durante la defosforilación de ArcA-P. Los resultados obtenidos sugieren que la fosfotransferencia desde el dominio H2 al dominio D1 sucede de manera intramolecular. Al parecer, en la actividad cinasa de ArcB, la fosfotransferencia ocurre mediante una vía determinada, la cual es diferente a la vía utilizada en la actividad fosfatasa.

Este hecho es interesante, puesto que en ArcB los residuos conservados Asp⁵⁷⁶ (en el dominio receptor) e His⁷¹⁷ (en el dominio de fosfotransferencia) participan en ambas actividades excluyentes: cinasa y fosfatasa. Por lo tanto, nos interesamos en estudiar cómo es que pueden discriminarse dichas actividades. Nuestros resultados sugieren que las diferencias entre las vías de fosfotransferencia de ArcB, en el modo cinasa y fosfatasa, podrían estar asociadas a movimientos y ajustes conformacionales que permiten que los dominios D1 y H2 de monómeros adyacentes se aproximen para transferir el grupo fosforilo en *trans*. Por otro lado, en estado fosfatasa, estos dominios estarán próximos en un mismo monómero favoreciendo la transferencia en *cis*. Probablemente, estos ajustes conformacionales están favorecidos por la presencia o ausencia de la señal, determinando así la dirección del grupo fosforilo hacia ArcA o a la liberación como fosfato inorgánico (Fig. 18). Sin embargo, la obtención del análisis cristalográfico de ArcB será necesaria para elucidar los ajustes conformacionales que suceden en cambios en las condiciones redox y así comprender por completo las vías de transferencia del grupo fosforilo en ArcB.

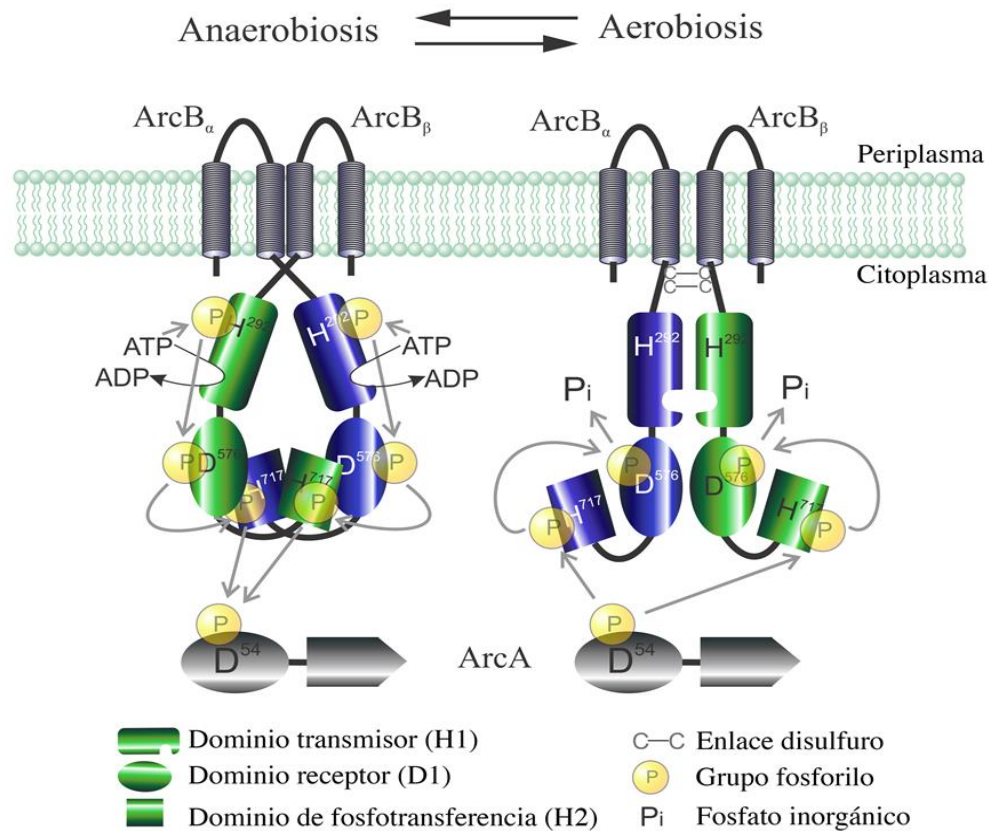


Figura 18. Representación gráfica de las vías de fosfotransferencia propuestas en ArcB. En condiciones anaeróbicas de crecimiento, la autofosforilación a expensas del ATP ocurre en una reacción intramolecular resultando en la fosforilación del dominio H1, entonces el grupo fosforilo es transferido al dominio D1 por la vía intramolecular, después en una reacción intermolecular el grupo fosforilo es transferido al dominio H2. En condiciones aeróbicas de crecimiento, ajustes conformacionales de los módulos catalíticos de ArcB, que además permiten la formación de enlaces disulfuro en los residuos de cisteína, conducen a la transferencia del grupo fosforilo de H2 a D1 mediante la vía intramolecular.

Si tomamos a ArcB como modelo, las CSs híbridas podrían operar de manera similar, determinando el destino del grupo fosforilo a través de ajustes conformacionales que favorecen determinadas vías de fosfotransferencia dentro del dímero. El conocer estas vías de transferencia en una CS híbrida permite sugerir características estructurales en estas proteínas, las cuáles determinan la dirección del grupo fosfato en los eventos de transducción de señales que resultan en respuestas adaptativas en bacterias (Fig. 18).

Conclusiones:

- La vía de fosfotransferencia del dominio H1 al dominio D1 es intramolecular en ArcB cuando es activa como cinasa.
- La vía de fosfotransferencia del dominio D1 al dominio H2 ocurre preferentemente de forma intermolecular cuando ArcB es activa como cinasa.
- La vía de transferencia de grupo fosfato del dominio H2 al dominio D1 ocurre de forma intramolecular cuando ArcB actúa como fosfatasa.

Perspectivas:

Obtener la estructura cristalográfica y tridimensional de ArcB para elucidar los ajustes conformacionales que ocurren en el cambio de condiciones redox y así comprender por completo la transferencia del grupo fosfato entre los dominios catalíticos de esta cinasa sensora.

LITERATURA CITADA:

1. **Abel, T, and Maniatis, T.** 1989. Gene regulation. Action of leucine zippers. *Nature*. 341(6237): 24-25
2. **Aguilar, P.S., Hernández-Arriaga A.M., Cybulski, L. E., Erazo, A. C., and de Mendoza, D.** 2001. Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* 20(7): 1681-1691.
3. **Álvarez, A. F., and Georgellis, D.** 2010. *In vitro* and *in vivo* analysis of the ArcB/A redox signaling pathways. *Methods Enzymol.* 471(10): 205-228
4. **Álvarez, A. F., Malpica, R., Contreras, M., Escamilla, E., and Georgellis, D.** 2010. Cytochrome d but not cytochrome o rescues the toluidine blue growth sensitivity of arc mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 192(2): 391-399
5. **Álvarez, A. F., Rodriguez, C., and Georgellis, D.** 2013. Ubiquinone and menaquinone electron carriers represent the yin and yang in the redox regulation of the ArcB sensor kinase. *J Bacteriol.* 195(13): 3054-3061
6. **Barret, J. F., and Hoch, J. A.** 1998. Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 42(7): 1529-1536
7. **Batchelor, E., and Goulian, M.** 2003. Robustness and the cycle of phosphorylation and dephosphorylation in a two-component regulatory system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(2): 691-696
8. **Bekker, M., Alexeva, S., Laan, W., Sawers, G., Teixeira de Mattos, J., and Hellingwerf, K.** 2010. The ArcBA two-component system of *Escherichia coli* is regulated by the redox state of both the ubiquinone and the menaquinone pool. *J Bacteriol.* 192(3): 746-754
9. **Beutin, L., and Achtman, M.** 1979. Two *Escherichia coli* chromosomal cistrons, *sfrA* and *sfrB*, which are needed for expression of F factor *tra* functions. *J Bacteriol.* 139(3): 730-737
10. **Beutin, L., Manning, P. A., Achtman, A. M., and Willetts, N.** 1981. *sfrA* and *sfrB* products of *Escherichia coli* K-12 are transcriptional control factors. *J Bacteriol.* 145(2):840-844
11. **Buckland, R., and Wild, F.** 1989. Leucine zipper motif extends. *Nature.* 338: 547
12. **Burbulys, D., Trach, K. A., and Hoch, J. A.** 1991. Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell.* 64(3): 545-552
13. **Casadaban, M. J.** 1976. Transposition and fusions of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage Lambda and Mu. *J Mol Biol.* 104: 541-555

14. **Casino, P., Rubio, V., and Marina, A.** 2009. Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell*. 139(2): 325-336
15. **Don, J. M., Taylor, J. S., Latour, D. J., Iuchi, S., and Lin E. C.** 1993. Three overlapping *lct* genes involved in L-lactate utilization by *Escherichia coli*. 175(20): 6671-6678
16. **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(7): 4236-4242
17. **Dutta, R., Qin, L, and Inouye, M.** 1999. Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol Microbiol*. 34(4): 633-640
18. **Dykxhoorn, D. M., St Pierre, R., and Linn, T.** 1996. A set of compatible *tac* promoter expression vectors. *Gene*. 177(1-2): 133-136
19. **Eguchi, Y., and Utsumi, R.** 2014. Alkali metals in addition to acidic pH activate the EvgS histidine kinase sensor in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 196(17): 3140-3149
20. **Forst, S. A., and Roberts, D. L.** 1994. Signal transduction by the EnvZ-OmpR phosphotransfer system in bacteria. *Res Microbiol*. 145(5-6): 363-373.
21. **Gaffney, D., Skurray, R., and Willetts, N.** 1983. Regulation of the F conjugation genes studied by hybridization and *tra-lacZ* fusion. *J Mol Biol*. 168(1): 103-122
22. **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(50): 35950-35954
23. **Georgellis, D., Kwon, O., and Lin, E. C.** 2001. Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science*. 292(5525): 2314-2316
24. **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(49): 32864-32869
25. **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(17): 5429-5435
26. **Goulian, M.** 2010. Two-component signaling circuit structure and properties. *Curr Opin Microbiol*. 13(2): 184-189
27. **Gunsalus, R. P., and Park, S. J.** 1994. Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: control by the ArcAB and Fnr regulons. *Res Microbiol*. 145(5-6): 437-450
28. **Hathaway, B. G., and Bergquist, P.** 1973. Temperature-sensitive mutations affecting the replication of F-prime factors in *Escherichia coli* K 12. *Mol Gen Genet*. 127: 297-306

29. **Hoch, J. A., and Silhavy, T. J.** 1995. Two-component signal transduction. Washington, DC. American Society for Microbiology
30. **Igo, M. M., Ninfa, A. J., Stock, J. B., and Silhavy, T. J.** 1989. Phosphorylation and dephosphorylation of a bacterial transcriptional activator by a transmembrane receptor. *Genes Dev.* 3(11): 1725-1734
31. **Ishige, K., Nagasawa, S., Tokishita, S., and Mizuno, T.** 1994. A novel device of bacterial signal transducers. *EMBO J.* 13(21): 5195-5202
32. **Iuchi, S., and Lin E. C.** 1992. Purification and phosphorylation of the Arc regulatory components of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 174(17): 5617-5623
33. **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(6): 1888-1892
34. **Iuchi, S., and Lin, E. C. C.** 1993. Adaptation of *Escherichia coli* to redox environments by gene expression. *Mol Microbiol.* 9(1): 9-15.
35. **Iuchi, S., Chepuri, V., Fu, H. A., Gennis, R. B., and Lin E.** 1990. Requirement for terminal cytochromes in generation of the aerobic signal for the Arc regulatory system in *Escherichia coli*: study utilizing deletions and *lac* fusions of *cyo* and *cyd*. *J Bacteriol.* 172(10): 6020-6025
36. **Iuchi, S., Matzusa, S., Fujiwara, T., and Lin, E. C.** 1990. The *ArcB* gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the *arc* modulon. *Mol Microbiol.* 4(5): 715-727
37. **Jamieson, A. F., and Bergquist, P.** 1976. Genetic mapping of chromosomal mutations affecting the replication of the F-factor of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 148(2): 221-223
38. **Jin, S. G., Prusti, P. K., Roitsch, T., Ankerbauer, R. G., and Nester, E. W.** 1990. Phosphorylation of the VirG proteina of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG. *J Bacteriol.* 172: 4945-4950
39. **Jovanovic, G., Sheng, X., Ale, A., Feliu, E., Harrington, H. A., Kirk, P., Wiuf, C., Buck, M., and Stumpf MP.** 2015. Phosphorelay of non-orthodox two component systems functions through a bi-molecular mechanism in vivo: the case of ArcB. *Mol Biosyst.* 11(5): 1348-1359
40. **Kenney, L. J.** 2010. How important is the phosphatase activity of sensor kinases?. *Curr Opin Microbiol.* 13(2): 168-172
41. **Kinoshita-Kikuta, E., Kinoshita, E., Eguchi, Y., and Koike, T.** 2016. Validation of Cis and Trans Modes in Multistep Phosphotransfer Signaling of Bacterial Tripartite Sensor Kinases by Using Phos-Tag SDS-PAGE. *PLoS One.* 11(2): e0148294


42. **Kofoid, E. C., and Parkinson, J.** 1998. Transmitter and receiver modules in bacterial signaling proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85(14): 4981-4985
43. **Kwon, O., Georgellis, D., and Lin, E. C.** 2000. Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the Arc two-component system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 186(13): 3858-3862
44. **Kwon, O., Georgellis, D., and Lin, E. C.** 2003. Rotational on-off switching of a hybrid membrane sensor kinase Tar-ArcB in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 278(15): 13192-13195
45. **Kwon, O., Georgellis, D., Lynch, A. S., Boyd, D., and Lin E.** 2000. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region. *J Bacteriol*. 182(10): 2960-2966
46. **Lau, P. C., Wang, Y., Patel, A., Labbe, D., Bergeron, H., Brousseau, R., Konishi, Y., and Raylings, M.** 1997. A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94(4): 1453-1458
47. **Lee, Y. S., Han, J. S., Jeon, Y., and Hwang, D.** 2001. The arc two-component signal transduction system inhibits *in vitro* *Escherichia coli* chromosomal initiation. *J Biol Chem*. 276(13): 9917-9923
48. **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(13): 12588-12597
49. **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(21): 6238-6249
50. **Lynch, A. S., and Lin, E. C.** 1996. Regulation of gene expression in *Escherichia coli*. In Neidhardt, F. C., Curtis, R., Ingraham, A. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, H., Umberger, E. (Eds), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* (pp. 1526-1538). Washington, DC: Am. Soc. Microbiol.
51. **Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kawamoto, T., Yamada, M., and Nakata, A.** Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J Mol Microbiol*. 210(3): 551-559
52. **Malpica, R., Franco, B., Rodriguez, C., Kwon, O., and Georgellis, D.** 2004. Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(36): 13318-13323
53. **Miller, J. H.** Experiments in molecular genetics. 1972. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY 352-355.

54. **Mizuno, M. T.** 1997. Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res.* 4(2): 161-168
55. **Ninfa, A. J., and Magasanik B.** 1986. Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, regulates the transcription of the glnALG operon in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83(16): 5909-5913.
56. **Nixon, B. T., Ronson, C. W., and Ausubel, F. M.** 1986. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83(20): 7850-7854.
57. **Nohno, T., Noji, S., Taniguchi, S., and Saito, T.** 1989. The narX and narL genes encoding the nitrate sensing regulators of *Escherichia coli* are homologous to a family of prokaryotic two-component regulatory genes. *Nucleic Acid Res.* 17(8): 2947-2957
58. **Nuñez-Oreza, L. A., Alvarez, A. F., Arías-Olguín, I. I., Torres-Larios A., and Georgellis D.** 2012. The ArcB leucine zipper domain is required for proper ArcB signaling. *Plos One.* 7(5): e38187
59. **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, DC.: ASM press), pp. 9-24
60. **Parkinson, J. S., and Kofoid, E. C.** 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet.* 26: 71-112
61. **Peña-Sandoval, G. R., and Georgellis, D.** 2010. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli* autophosphorylates by an intramolecular reaction. *J Bacteriol.* 192(6): 1735-1739
62. **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(9): 3267-3272
63. **Pernestig, A. K., Melefors, O., and Georgellis, D.** 2001. Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 276(1): 225-231.
64. **Ponting, C. P., and Aravind, L.** 1997. PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr Biol.* 7(11): R674-677
65. **Rodríguez, C., Kwon, O., and Georgellis, D.** 2004. Effect of D-lactate on the physiological activity of the ArcB sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 186(7): 2085-2090

66. **Ronson, C. W., Nixon, B. T., and Ausubel, F. M.** 1987. Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. *Cell*. 49: 579-581.
67. **Shaulsky, G., Escalante, R., and Loomins, W. F.** 1996. Developmental signal transduction pathways uncovered by genetic suppressors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(26): 15260-15265
68. **Simms, S. A., Keane, M. G., and Stock, J.** 1985. Multiple forms of the CheB methylesterase in bacterial chemosensing. *J Biol Chem*. 260(18):10161-10168
69. **Stock, A. M., Robinson, V. L., and Goudreau, P. N.** 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 69: 183-215
70. **Stock, J. B., Ninfa, A. J., Stock, A. M.** Protein phosphorylation and regulation of adaptative responses in bacteria. *Microbiol Rev*. 53(4): 450-490
71. **Surette, M. G., Levit, M., Liu, Y., Lukat, G., Ninfa, E. G., Ninfa, A., and Stock, J. B.** 1996. Dimerization is required for the activity of the protein histidine kinase CheA that mediates signal transduction in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem*. 271(2): 939-945
72. **Tanaka, T., Saha, S. K., Tomomori, C., Ishima, R., Liu, D., Tong, K. I., Park, H., Dutta, R., Qin, L., Swindells, M. B., Yamazaki, T., Ono, A. M., Kainosho, M., Inouye, M., Ikura, M.** 1998. NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. *Nature*. 396(6706): 88-92
73. **Terán-Melo, J. L., Peña-Sandoval, G. R., Silva-Jiménez, H., Rodríguez, C., Alvarez, A. F., and Georgellis, D.** 2018. Routes of phosphoryl group transfer during signal transmission and signal decay in the dimeric sensor histidine kinase ArcB. *J Biol Chem*. 293(34): 13214-13223
74. **Uhl, M. A., and Miller, J. F.** 1996. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J*. 15(5): 1028-1036
75. **West, A. H., and Stock, A. M.** 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci*. 26(6): 369-376
76. **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(3): 409-413
77. **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(4 Pt 2): S150-154
78. **Zhulin, I. B., Taylor, B. L., and Drapal, R.** 1997. PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem Sci*. 22(9): 331-333

Routes of phosphoryl group transfer during signal transmission and signal decay in the dimeric sensor histidine kinase ArcB

Received for publication, May 9, 2018, and in revised form, June 14, 2018. Published, Papers in Press, June 26, 2018. DOI: 10.1074/jbc.RA118.003910

Juan L. Teran-Melo¹, Gabriela R. Peña-Sandoval⁵, Hortencia Silva-Jimenez¹, Claudia Rodriguez¹, Adrián F. Alvarez¹, and  Dimitris Georgellis¹

From the ¹Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico, the ⁵Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit, 63190 Tepic, Nayarit, Mexico, and the ²Area de Oceanografía Química, Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, 22860 Ensenada, Baja California, Mexico

Edited by Chris Whitfield

The Arc (anoxic redox control) two-component system of *Escherichia coli*, comprising ArcA as the response regulator and ArcB as the sensor histidine kinase, modulates the expression of numerous genes in response to respiratory growth conditions. Under reducing growth conditions, ArcB autophosphorylates at the expense of ATP, and transphosphorylates ArcA via a His²⁹² → Asp⁵⁷⁶ → His⁷¹⁷ → Asp⁵⁴ phosphorelay, whereas under oxidizing growth conditions, ArcB catalyzes the dephosphorylation of ArcA-P by a reverse Asp⁵⁴ → His⁷¹⁷ → Asp⁵⁷⁶ → P_i phosphorelay. However, the exact phosphoryl group transfer routes and the molecular mechanisms determining their directions are unclear. Here, we show that, during signal propagation, the His²⁹² → Asp⁵⁷⁶ and Asp⁵⁷⁶ → His⁷¹⁷ phosphoryl group transfers within ArcB dimers occur intra- and intermolecularly, respectively. Moreover, we report that, during signal decay, the phosphoryl group transfer from His⁷¹⁷ to Asp⁵⁷⁶ takes place intramolecularly. In conclusion, we present a mechanism that dictates the direction of the phosphoryl group transfer within ArcB dimers and that enables the discrimination of the kinase and phosphatase activities of ArcB.

The Arc two-component signal transduction system plays an important role in the transcriptional regulatory network that allows facultative anaerobic bacteria, such as *Escherichia coli*, to sense and signal changes in respiratory growth conditions and to adapt their gene expression accordingly (1–4). This system consists of the cytoplasmic response regulator ArcA, and the membrane-anchored sensor kinase ArcB (5, 6). ArcA is a typical response regulator, possessing an N-terminal receiver domain with a phosphoryl group-accepting Asp residue at position 54 and a C-terminal helix-turn-helix DNA-binding

This work was supported by a doctoral fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (to J. L. T. M.) as well as DGAPA-PAPIIT, UNAM, Grants IN208718 and IN209918 (to A. F. A. and D. G.). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

This article contains Table S1 and Figs. S1–S3.

¹To whom correspondence should be addressed: Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico. Tel.: 52-55-5622-5738; Fax: 52-55-5622-5611; E-mail: dimitris@fci.unam.mx.

domain. In contrast, ArcB is an unorthodox sensor kinase that contains three catalytic cytosolic domains: a transmitter domain (H1) with a conserved His²⁹² residue, a central receiver domain (D1) with a conserved Asp⁵⁷⁶ residue, and a C-terminal histidine phosphotransfer domain (H2) with a conserved His⁷¹⁷ residue (6, 7). In addition, the ArcB protein contains a functional leucine zipper (8) and a PAS domain (9), both located in the linker region, which is the segment connecting the transmembrane domain with the transmitter domain.

Under reducing growth conditions, ArcB autophosphorylates in an ATP-dependent manner, a process that is enhanced by certain anaerobic metabolites, such as D-lactate, acetate, and pyruvate (10, 11), and transphosphorylates ArcA via a His²⁹² → Asp⁵⁷⁶ → His⁷¹⁷ → Asp⁵⁴ phosphorelay (12, 13). Phosphorylated ArcA (ArcA-P),² in turn, represses the expression of many operons involved in respiratory metabolism and activates some others encoding proteins involved in fermentative metabolism (14–17). Under oxic growth conditions, ArcB acts as a specific ArcA-P phosphatase, catalyzing the dephosphorylation of ArcA-P by a reverse Asp⁵⁴ → His⁷¹⁷ → Asp⁵⁷⁶ → P_i phosphorelay (18, 19). The catalytic activity of ArcB has been shown to be set by rotational movements that alter the orientation of the cytosolic portion of ArcB (20). Moreover, the molecular event for ArcB regulation involves the oxidation or reduction of two cytosol-located redox-active cysteine residues that participate in intermolecular disulfide bond formation, a reaction in which the quinol/quinone electron carriers act as the direct oxidants or reductants (21–24).

In general, histidine sensor kinases act as homodimers (25–28) and autophosphorylate by either an inter- or intramolecular reaction (29–35). Also, studies on the subsequent phosphoryl group (~P) transfer steps (*i.e.* from H1 to D1 and from D1 to H2) in various hybrid histidine kinases indicate that they can occur either intra- or intermolecularly, depending on the particular sensor kinase protein and on the specific ~P transfer step (36–38). In contrast, the ~P transfer step from H2 to D1 in

²The abbreviations used are: ArcA-P, phosphorylated ArcA; ~P, phosphoryl group; MBP, maltose-binding protein; β-gal, β-galactosidase; IPTG, isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside; LB, lysogeny broth; BTA, nitrotriacetic acid.

the reverse phosphorelay, responsible for the phosphatase activity of these hybrid sensor kinases, has yet to be addressed.

In the case of ArcB, the autophosphorylation reaction appears to occur intramolecularly, as the γ -phosphoryl group of ATP bound to one monomer in the homodimer was shown to be transferred to the histidine of the same monomer (35, 38). In contrast, the mode of \sim P transfer in the two subsequent steps in ArcB signaling remains ambiguous, because two independent studies reached dissimilar conclusions (38, 39). On one hand, in a report based on *in vivo* experiments analyzed with mathematical and statistical models, it was suggested that a bimolecular or allosteric mechanism, in which the integrity of all phospho-accepting/donating sites is required and in which no exclusive intra- or intermolecular \sim P transfer mechanisms are identifiable, may be operating during ArcB signaling (39). On the other hand, in a later study based on *in vitro* complementation analyses, it was proposed that the \sim P transfers from H1 to D1 and from D1 to H2 occur intermolecularly (38).

Here, we present results from *in vitro* and *in vivo* experiments addressing the above mentioned discrepancy and extend these studies to include the characterization of the H2 to D1 \sim P transfer step, involved in ArcA-P dephosphorylation during signal decay. Our results demonstrate that the \sim P transfer from H1 to D1 occurs exclusively intramolecularly, whereas the following step (*i.e.* from D1 to H2) occurs preferentially intermolecularly. Finally, the H2 to D1 \sim P transfer, responsible for the intramolecular reaction. The consequences of the proposed \sim P transfers between the various ArcB modules for the regulation of signal transmission and signal decay of the Arc two-component system are discussed.

Results

Probing the mode of phosphoryl group transfer from the transmitter domain to the receiver domain of ArcB

Autophosphorylation of the tripartite sensor kinase ArcB was shown to be an intramolecular reaction (35, 38), whereas contradictory results were reported for the mode of \sim P transfer in the two subsequent steps (38, 39). Therefore, we attempted to probe the mode of these \sim P transfer steps by an approach different from the ones used previously.

To this end, we generated N-terminal His₆-tagged cytosolic WT and mutant ArcB variants (hereafter referred to as His₆-H1-D1-H2), carrying single or multiple punctual mutations of the conserved phosphorylation sites. In other words, the conserved histidine 292 in H1 was replaced by glutamine (hereafter referred to as H1*), the conserved aspartate 576 in D1 was replaced by alanine (hereafter referred to as D1*), and the conserved histidine 717 in H2 was replaced by glutamine (hereafter referred to as H2*). WT and single- and multiple-mutant His₆-H1-D1-H2 proteins were purified, and their ability to autophosphorylate and transphosphorylate His₆-ArcA (hereafter referred to as ArcA) was tested. ArcA was rapidly phosphorylated by His₆-H1-D1-H2 (Fig. 1A), but not by His₆-H1*-D1-H2, His₆-H1-D1*-H2, His₆-H1-D1-H2*, or His₆-H1*-D1*-H2 mutant proteins (Fig. S1, A–D), in agreement with previous reports (12, 13). The ability of combinations of mutant His₆-

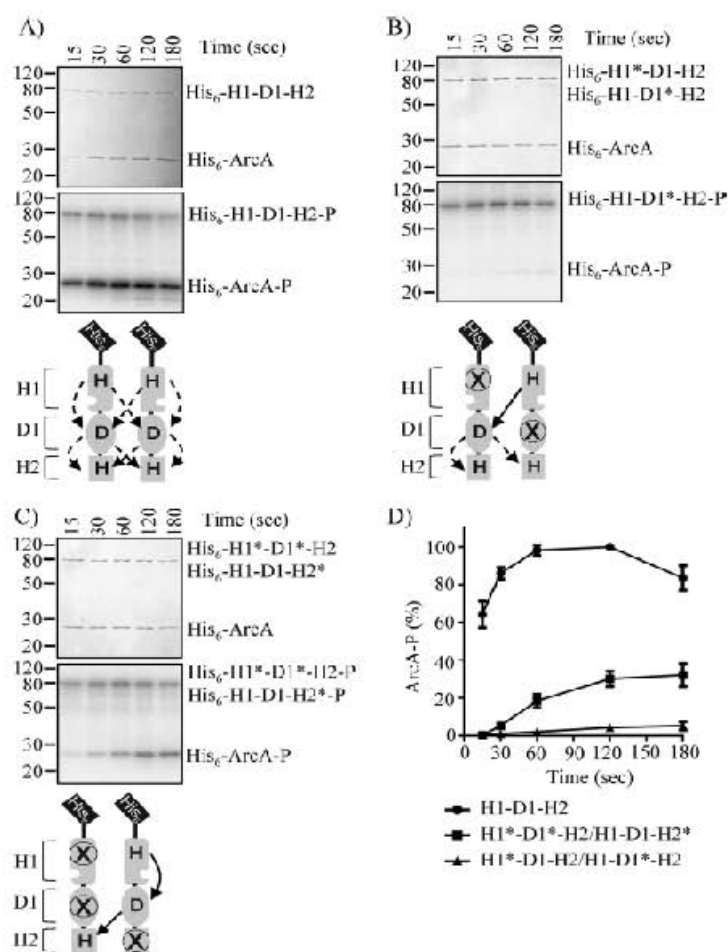


Figure 1. ArcA phosphorylation by His₆-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ and by combinations of His₆-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ phosphorelay mutants. Purified ArcA was incubated in a 30- μ l reaction mixture with [γ -³²P]ATP and His₆-H1-D1-H2 (A), His₆-H1*-D1-H2 and His₆-H1-D1*-H2 (B), or His₆-H1*-D1*-H2 and His₆-H1-D1-H2* (C). At the indicated time intervals, 5- μ l samples were withdrawn and subjected to SDS-PAGE analysis. Coomassie Blue-stained gels revealing protein bands (top panels), corresponding autoradiograms (middle panels), and schemes showing the permitted \sim P transfers into ArcB dimers (bottom panels) are presented. The molecular mass standard values (kDa) are shown on the left, and the position of each polypeptide in the gel is indicated on the right of each panel. D, relative amount of ArcA-P formed, as quantified by densitometric analysis of the autoradiograms. Data represent the averages from at least three independent experiments, and S.D. values (error bars) are indicated.

H1-D1-H2 variants to transphosphorylate ArcA was then evaluated. No ArcA phosphorylation was observed in the reaction mixture containing His₆-H1*-D1-H2 and His₆-H1-D1*-H2, in which only intermolecular H1 to D1 phosphotransfer is allowed (Fig. 1, B and D). On the other hand, a weak ArcA phosphorylation, \sim 30% of that observed by the WT His₆-H1-D1-H2, was obtained in the reaction mixture containing His₆-H1*-D1*-H2 and His₆-H1-D1-H2*, in which only the intramolecular H1 to D1 \sim P transfer is permitted (Fig. 1, C and D), indicating that the \sim P transfer from H1 to D1 occurs intramolecularly. However, this conclusion is hampered by the fact that none of the combinations was able to restore the phosphorelay at WT ArcB levels, most likely due to the insufficient heterodimer formation in the reaction mixture.

To ensure heterodimer formation, a set of plasmids carrying arabinose-inducible MBP-tagged H1-D1-H2 variants were constructed and transformed in strains harboring plasmids that

Phosphoryl group transfer modes in ArcB

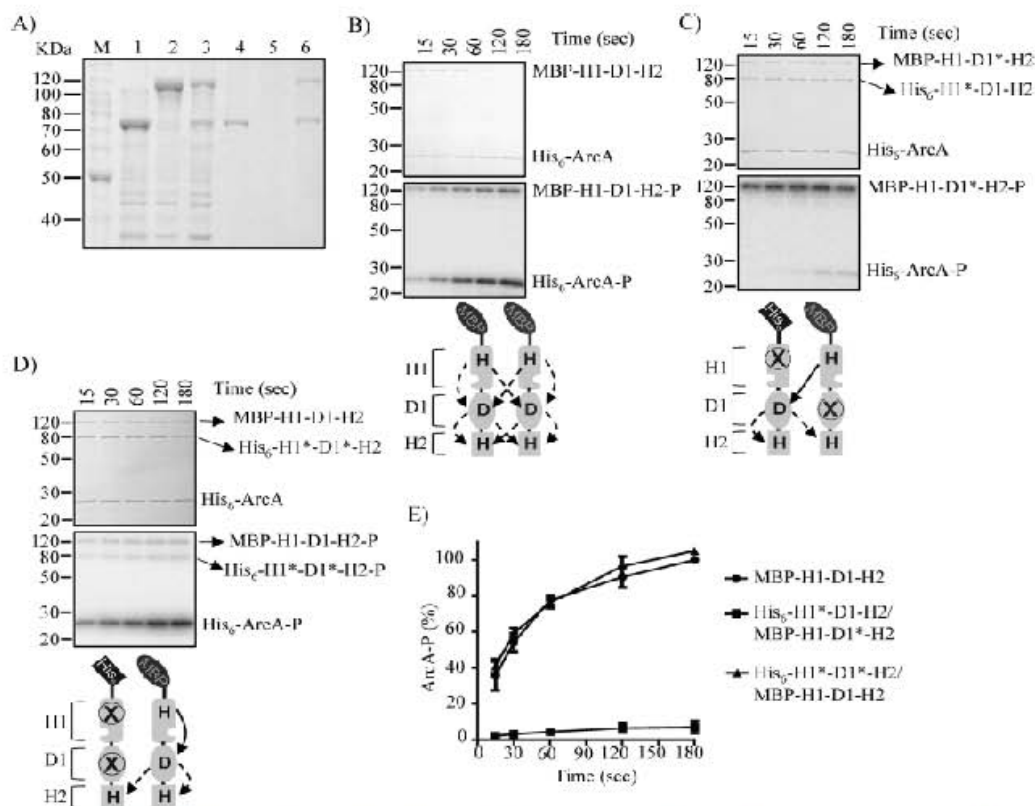


Figure 2. Probing the mode of H1 to D1 ~P group transfer by *in vitro* phosphorelay complementation assays using His₆-ArcB^{7A-77A*}/MBP-ArcB^{7A-77A*} dimers. A, overexpression of His₆-H1*-D1-H2 (lane 1), MBP-H1-D1*-H2 (lane 2), and His₆-H1*-D1-H2/MBP-H1-D1*-H2 (lane 3) was analyzed by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining. Overexpressed proteins were purified by Ni-NTA affinity chromatography, and the elution fractions of His₆-H1*-D1-H2 (lane 4), MBP-H1-D1*-H2 (lane 5), and His₆-H1*-D1-H2/MBP-H1-D1*-H2 (lane 6) were analyzed by SDS-PAGE and visualized by Coomassie Blue staining. Purified ArcA was incubated in a 30- μ l reaction mixture with [γ -³²P]ATP and purified/co-eluted MBP-H1-D1-H2 (B), His₆-H1*-D1-H2/MBP-H1-D1*-H2 (C), or His₆-H1*-D1*-H2/MBP-H1-D1-H2 (D). At the indicated time intervals, 5- μ l samples were withdrawn and subjected to SDS-PAGE analysis. Coomassie Blue-stained gels revealing protein bands (top panels), the corresponding autoradiograms (middle panels), and schemes showing the permitted ~P transfers (bottom panels) are presented. The molecular mass standard values (kDa) are shown on the left, and the position of each polypeptide in the gel is indicated on the right of each panel. E, relative amount of ArcA-P formed, as quantified by densitometric analysis of the autoradiograms. Data represent the averages from at least three independent experiments, and the S.D. values (error bars) are indicated.

express complementary His₆-tagged H1-D1-H2 mutant proteins. The desired combinations of MBP-tagged and His₆-tagged protein versions were simultaneously overexpressed and purified under native conditions, using Ni-NTA affinity chromatography. According to this approach, only His₆-tagged/MBP-tagged protein heterodimers and His₆-tagged protein homodimers should be purified, and MBP-tagged protein homodimers should not be. An example of this approach is presented in Fig. 2A. The obtained results demonstrate that His₆-H1*-D1-H2 and MBP-H1-D1*-H2 were readily overexpressed (Fig. 2A, lanes 2 and 3) and that only His₆-H1*-D1-H2, and not MBP-H1-D1*-H2, was retained by and eluted from the nickel-nitrilotriacetic acid resin (Fig. 2A, lanes 5 and 6). However, when both proteins were co-expressed (Fig. 2A, lane 4), the MBP-H1-D1*-H2 protein co-eluted with His₆-H1*-D1-H2 to almost stoichiometric amounts (Fig. 2A, lane 7), ensuring heterodimer formation.

Single MBP-tagged proteins, used for heterodimer formation, were purified and subjected to *in vitro* phosphorylation assays with [γ -³²P]ATP and His₆-ArcA. Only the MBP-tagged proteins having a WT H1 were able to autophosphorylate (Fig. S1E), and only the MBP-H1-D1-H2 was able to transphosphorylate ArcA (Fig. 2B), indicating that the purified proteins have the expected activities and that the N-terminal MBP tag does

not interfere with the activity of ArcB. Subsequently, the ability of the His₆-H1*-D1-H2/MBP-H1-D1*-H2 heterodimer, in which only intermolecular phosphoryl group transfer from H1 to D1 is permitted, to functionally complement and restore the phosphorelay to ArcA was tested (Fig. 2C). Although the MBP-H1-D1*-H2 protein was rapidly autophosphorylated, no His₆-H1*-D1-H2-P was observed, and almost no ArcA-P was formed (Fig. 2, C and E), suggesting that the H1 to D1 phosphotransfer does not occur intermolecularly. In contrast, the His₆-H1*-D1*-H2/MBP-H1-D1-H2 heterodimer was found to readily transphosphorylate ArcA (Fig. 2, D and E), indicating that the phosphoryl group transfer from H1 to D1 occurs intramolecularly, at least *in vitro*. It has to be noted that phosphorylation of His₆-H1*-D1*-H2 was also observed, most likely due to intermolecular phosphoryl group transfer from D1 to H2 or from ArcA to H2.

To verify the *in vitro* results by *in vivo* experiments, low-copy number plasmids carrying the *arcB*^{H292Q,D576A} (pEXT22CmArcB^{1292Q,D576A}) and *arcB*^{I292Q} (pEXT22CmArcB^{1292Q}) mutant alleles were generated and transformed, respectively, into the *arcB*^{H717Q} (IFC2002) and *arcB*^{D576A} (IFC2001) mutant strains, both carrying a $\lambda\Phi$ (*cydA'*-*lacZ*) reporter (40). Plasmid pEXT22, which was reported to have 1–2 copies/cell (41), and *arcB* mutant alleles under the control of the native *arcB* pro-

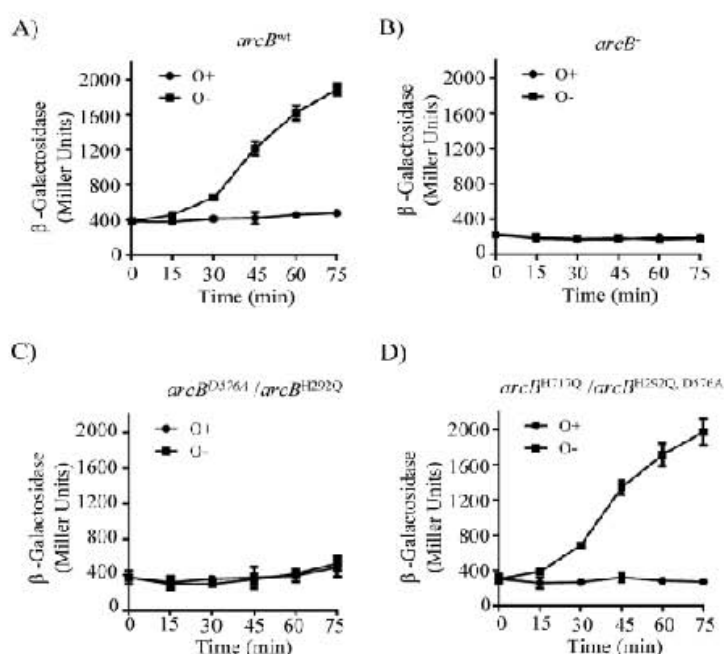


Figure 3. Co-expression of *arcBH717Q* and *arcBH292Q,D576A* restores ArcB activity and regulation of reporter expression. Cultures of strain ECL5003 (*arcB*^{wt}) (A) and its isogenic strains ECL5004 (*arcB*⁻) (B) and IFC2001 (*arcB*^{D576A}) (C) harboring plasmid pEXT22CmArcB^{H292Q} and IFC2002 (*arcB*^{H717Q}) (D) harboring plasmid pEXT22CmArcB^{H292Q,D576A}, all carrying the ArcA-P-activatable $\lambda\Phi$ (*cydA'*-*lacZ*) reporter, were grown aerobically in LB buffered with 0.1 M MOPS (pH 7.4) and supplemented with 20 mM D-xylose. At an A_{600} of 0.2, one aliquot was withdrawn, to measure the β -gal activity (depicted as 0 min), and the rest of the culture was divided in two. One part was kept under aerobic conditions (circles) as a control, whereas the other was shifted to anaerobiosis (squares), and the time course of the β -gal activity was followed. The data represent the averages from three independent experiments, and the S.D. values (error bars) are indicated.

motor were chosen to avoid the overexpression of the sensor kinase. This is because distortion of the ArcB/ArcA concentration balance has been reported to produce unpredictable effects on reporter expression (42). Indeed, Western blot analysis using ArcB polyclonal antibodies, raised against purified His₆-ArcB^{78–520} (10), revealed that all plasmid-borne *arcB* alleles produce similar to WT levels of ArcB protein (Fig. S2E). Subsequently, the phenotypic consequences of the above described strains were analyzed by changes in the *in vivo* levels of phosphorylated ArcA, as indicated by the expression of the ArcA-P-activatable $\lambda\Phi$ (*cydA'*-*lacZ*) reporter (Fig. 3). As expected, *arcB*-null phenotypes were found for strains IFC2002 (*arcB*^{H717Q}) and IFC2001 (*arcB*^{D576A}) and when the plasmid-borne *arcB*^{H717Q,D576A} and *arcB*^{H292A} were expressed in the Δ *arcB* mutant strain ECL5004 (Fig. S2, A–D), in agreement with the *in vitro* results and previous reports (12). Moreover, expression of the plasmid-borne *arcB*^{H292Q} in IFC2001 (*arcB*^{D576A}), where only intermolecular \sim P transfer from III to D1 is permitted, resulted in an *arcB*-null phenotype (Fig. 3, B and C). In contrast, expression of the plasmid-borne *arcB*^{H292Q,D576A} in IFC2002 (*arcB*^{H717Q}), where only intramolecular phosphoryl group transfer from III to D1 is permitted, resulted in WT levels of reporter expression (Fig. 3, A and D), in accordance with the above presented *in vitro* results. Therefore, it appears reasonable to conclude that an intramolecular mode of \sim P transfer operates from H1 to D1. This result also suggests that the *in vivo* \sim P transfer from D1 to H2 occurs intermolecu-

larly, although the intramolecular mode cannot be excluded. Taken together, the above results from the *in vitro* and *in vivo* experiments provide strong evidence that the phosphorelay along ArcB comprises an intramolecular H1 to D1 \sim P transfer.

Probing the mode of \sim P transfer from D1 to H2 within the ArcB dimer

We then asked whether the D1 to H2 \sim P transfer step within ArcB dimers occurs intra- or intermolecularly. To this end, the His₆-H1-D1-H2*/MBP-H1*-D1*-H2 heterodimer, permitting intermolecular \sim P transfer, and His₆-H1*-D1*-H2*/MBP-H11-D1-H2 heterodimer, permitting intramolecular \sim P transfer, were obtained, and their ability to complete the phosphorelay and transphosphorylate ArcA was evaluated. His₆-H1-D1-H2*/MBP-H1*-D1*-H2 was found to phosphorylate ArcA at WT ArcB levels, whereas the His₆-H1*-D1*-H2*/MBP-H11-D1-H2 heterodimer phosphorylated ArcA at a significantly lower rate (Fig. 4). In contrast, homodimers composed by any of the ArcB mutant variants were unable to phosphorylate ArcA (Fig. S1). These results indicate that the D1 to H2 \sim P transfer step occurs preferentially intermolecularly *in vitro*, in agreement with a previous study (38). Indeed, in the above presented *in vivo* complementation assay, co-expression of the *arcB*^{H717Q} and *arcB*^{H292Q,D576A} mutant alleles resulted in WT levels of reporter expression (Fig. 3D), indicating that an intermolecular D1 to H2 phosphotransfer does occur during *in vivo* ArcB signaling. The direct evaluation of an intramolecular \sim P transfer from D1 to H2 *in vivo*, requiring the expression of ArcB^{D576A,H717Q} and ArcB^{H292A}, however, is unattainable because the \sim P transfer step from H1 to D1 is exclusively intramolecular, rendering the use of a WT ArcB mandatory, which, in turn, impedes the discrimination between the two modes of \sim P transfer. To circumvent this problem, we reasoned that expression of increasing amounts of *arcB*^{D576A,H717Q} in an *arcB*^{wt} background strain should favor ArcB^{D576A,H717Q}/ArcB^{wt} heterodimer formation. Because such heterodimers allow only intramolecular D1 to H2 phosphotransfer, a reduction of the ArcA-P levels should be obtained if an intermolecular D1 to H2 \sim P transfer were to be favored. Because overexpression of a sensor kinase may have unexpected effects on its signaling, increased concentrations of *arcB*^{H292Q,D576A} in the *arcB*^{wt} background, favoring the formation of ArcB^{H292Q,D576A}/ArcB^{wt} heterodimers that permit both inter- and intramolecular D1 to H2 phosphotransfer, was used as a control.

To this end, plasmids pBADArcB^{H292Q,D576A} and pBAD ArcB^{D576A,H717Q}, carrying, respectively, the *arcB*^{H292Q,D576A} and *arcB*^{D576A,H717Q} mutant alleles under the control of the inducible arabinose promoter were constructed and transformed into the ECL5003 strain, which carries the ArcA-P-activatable $\lambda\Phi$ (*cydA'*-*lacZ*) reporter (12). The transformants were grown anaerobically in the presence of various concentrations of arabinose (0–30 μ M), and at midexponential phase of growth, A_{600} of \sim 0.5, the β -gal activities were determined (Fig. 5). Increasing amounts of inductor in the growth medium of the strain carrying the ArcB^{H292Q,D576A}-expressing plasmid resulted in decreasing levels of reporter expression (Fig. 5). Because the intramolecular H1 to D1 phosphotransfer and both modes of phosphotransfer from D1 to H2 are permitted within the

Phosphoryl group transfer modes in ArcB

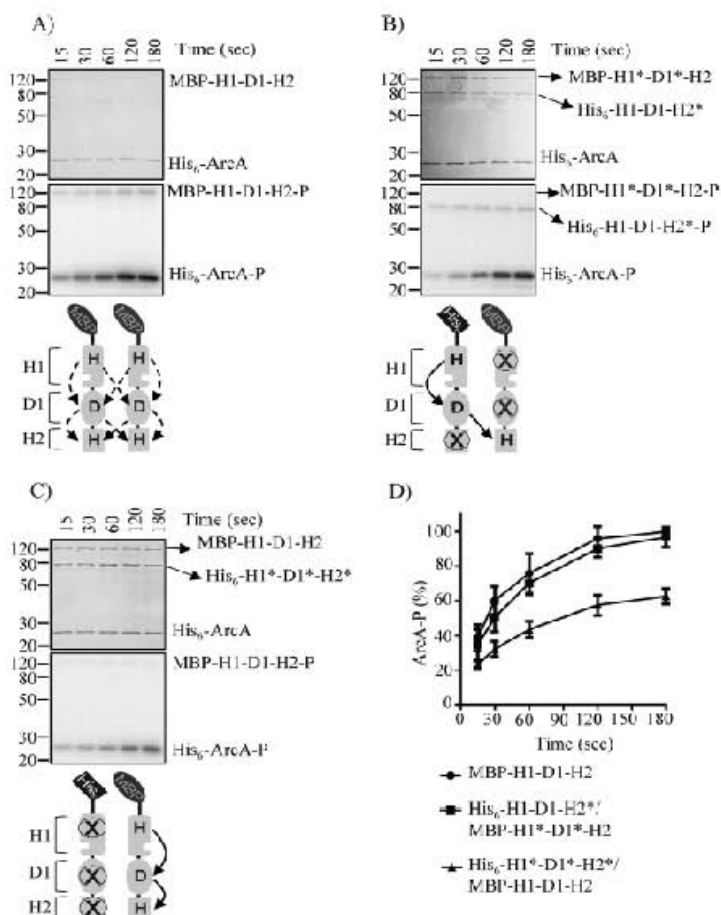


Figure 4. Probing the mode of $\sim P$ group transfer from D1 to H2 *in vitro*. Purified ArcA was incubated in a 30- μ l reaction mixture, in the presence of [γ - 32 P]ATP, with purified MBP-H1-D1-H2 (A), co-purified His₆-H1-D1-H2*/MBP-H1*-D1*-H2 (B), or co-purified His₆-H1*-D1*-H2*/MBP-H1-D1-H2 (C). At the indicated time intervals, 5- μ l samples were withdrawn and subjected to SDS-PAGE analysis. Coomassie Blue-stained gels revealing protein bands (top panels), the corresponding autoradiograms (middle panels), and schemes showing the permitted $\sim P$ transfers into ArcB dimers (bottom panels) are presented. The molecular mass standard values (kDa) are shown on the left, and the position of each polypeptide in the gel is indicated on the right of each panel. D, relative amount of ArcA-P formed, as quantified by densitometric analysis of the autoradiograms. Data represent the averages from at least three independent experiments, and the S.D. values (error bars) are indicated.

ArcB^{H292Q,D576A}/ArcB^{WT} heterodimer, a possible explanation could be that the increasing amount of ArcB^{H292Q,D576A} homodimers may lead to $\sim P$ transfer from ArcA-P to H2, as has been shown earlier (19), thereby lowering its regulatory activity. Nevertheless, the strain carrying the ArcB^{D576A,I1717Q}-expressing plasmid exhibited a more notorious effect. A 40% reduction of reporter expression as compared with that of the ArcB^{H292Q,D576A}-carrying strain was observed under all tested conditions (Fig. 5). It thus appears that, in agreement with the *in vitro* results, the $\sim P$ transfer from D1 to H2 has a clear preference for the intermolecular reaction *in vivo*.

Probing the mode of the H2 to D1 $\sim P$ transfer for ArcA-P dephosphorylation

The amplitude and duration of an adaptive response depend on the balance between the rates of phosphorylation and dephosphorylation of the response regulator. The sensor kinase ArcB is a bifunctional enzyme that phosphorylates ArcA under stim-

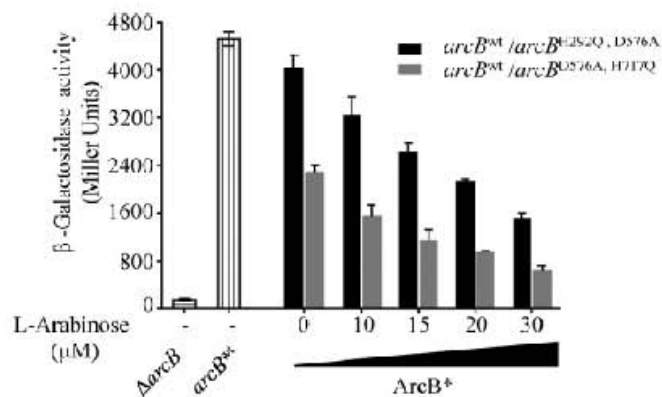


Figure 5. Effect of increasing concentrations of ArcB^{H292Q,D576A} or ArcB^{H576A,H717Q} in an arcB^{WT} WT strain on the anaerobic ArcA phosphorylation *in vivo*. Strain ECL5003 (arcB^{WT}), carrying plasmid pBAD ArcB^{H292Q,D576A} (black bars) or pBAD ArcB^{D576A,I1717Q} (gray bars) was grown aerobically in LB buffered with 0.1 M MOPS (pH 7.4) and supplemented with 20 mM D-xylose to an A₆₀₀ of 0.1. The culture was split to five screw-cap tubes (filled to the rim) for anaerobic growth, and L-arabinose was added at the indicated concentrations. At the mid-exponential phase of growth (A₆₀₀ of 0.5) β -gal activity was assayed. For comparison purposes, β -gal activities of ECL5003 (bars with vertical lines) and ECL5004 (arcB⁻) (bars with horizontal lines) anaerobic cultures are indicated. The data are averages from three independent experiments, and the S.D. values (error bars) are indicated.

ulatory conditions, and it also dephosphorylates ArcA-P under nonstimulatory conditions (12, 13, 18, 19). The fact that the conserved His⁷¹⁷ and Asp⁵⁷⁶ are required for both opposing activities of ArcB (18, 19) raises the intriguing possibility that the forward and the reverse phosphorelay do not have the same pattern with respect to inter- and intramolecular phosphoryl group transfers.

To test this, His₆-ArcA¹⁻¹³⁶ (hereafter referred to as ArcA'), containing the receiver domain but lacking the DNA-binding domain, was purified. ArcA' was used instead of the full-length His₆-ArcA due to the tendency of His₆-ArcA-P to aggregate during its purification process (18). The purified protein was incubated with MBP-H1-D1-H2 in the presence of [γ - 32 P]ATP to generate ArcA'-P. The product, ArcA'-P, was separated from MBP-H1-D1-H2 and [γ - 32 P]ATP and was used as substrate in phosphatase assays. As observed previously, ArcA'-P was stable, and it maintained in its phosphorylated state during the experiment (Fig. 6A) (18). By contrast, both MBP-H1-D1-H2 and MBP-H1*-D1-H2 were shown to rapidly dephosphorylate ArcA'-P (Fig. 6B and Fig. S3A), whereas the His₆-H1*-D1-H2* and His₆-H1*-D1*-H2* were without effect (Fig. S3, B and C), in agreement with previous reports (18). On the other hand, MBP-H1*-D1*-H2 was able to receive the $\sim P$ from ArcA'-P, but it was unable to release it and, as a consequence, failed to properly dephosphorylate ArcA'-P (Fig. S3D), as observed previously (18). In contrast, the His₆-H1*-D1*-H2*/MBP-H1*-D1-H2 heterodimer, which only permits the intramolecular H2 to D1 $\sim P$ transfer, dephosphorylated ArcA'-P at levels similar to those exerted by the WT ArcB, whereas the His₆-H1*-D1-H2*/MBP-H1*-D1*-H2 heterodimer, which allows only intermolecular $\sim P$ transfer from H2 to D1, dephosphorylated ArcA'-P with a significantly lower rate (Fig. 6, C-E). It thus appears that the reverse H2 to D1 $\sim P$ transfer occurs preferably intramolecularly.

The mode of $\sim P$ transfer from H2 to D1 was then probed *in vivo*, by examining the time lag of ArcA-P dephospho-

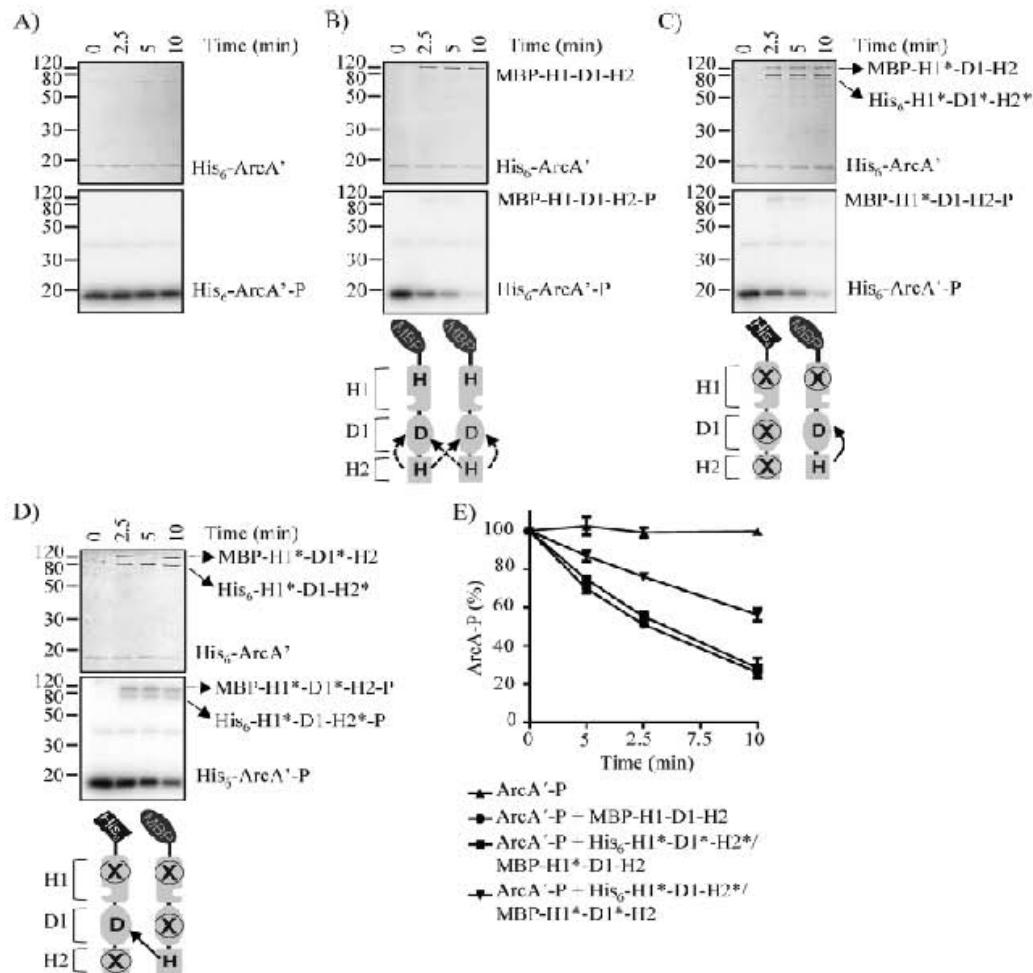


Figure 6. Testing the ArcA'-P dephosphorylation by MBP-H1-D1-H2 and His₆-ArcB⁷⁰⁻⁷⁷⁰⁺/MBP-ArcB⁷⁰⁻⁷⁷⁰⁺ dimers. Purified ArcA'-P was incubated alone (A) or with MBP-H1-D1-H2 (B), His₆-H1*-D1*-H2*/MBP-H1*-D1*-H2 (C), or His₆-H1*-D1*-H2*/MBP-H1*-D1*-H2 (D) in 25- μ l reaction mixtures. At the indicated time points, 5- μ l samples were withdrawn for SDS-PAGE analysis. Coomassie Blue-stained gels revealing protein bands (top panels), the corresponding autoradiograms (middle panels), and schemes showing the permitted ~P transfers into ArcB dimers (bottom panels) are presented. The molecular mass standard values (kDa) are shown on the left, and the position of each polypeptide in the gel is indicated on the right of each panel. E, relative amount of ArcA'-P formed, as quantified by densitometric analysis of the autoradiograms. Data represent the averages from at least three independent experiments, and the S.D. values (error bars) are indicated.

phorylation after a shift from anaerobic to aerobic growth-conditions. To this end, strain ECL5032 (*arcB*^{H171Q}) harboring the ArcB^{H171Q,D576A}-expressing plasmid (pEXT22Cm ArcB^{H292Q,D576A}) and the isogenic WT strain ECL5002, both carrying the ArcA-P-repressible $\lambda\Phi$ (*lldP'*-*lacZ*) reporter (12, 40), were grown anaerobically in lysogeny broth (LB) supplemented with 20 mM L-lactate to induce expression of the reporter (43). At an A_{600} of ~0.2, a sample was withdrawn, and the expression of the reporter was determined (depicted as 0 min in Fig. 7). As expected, in both strains, the expression of the reporter was very low (Fig. 7), indicative of ArcA-P-dependent reporter repression. This result demonstrates that co-expression of the *arcB*^{H171Q} and *arcB*^{H292Q,D576A} mutant alleles fully restores ArcB kinase activity and thus proper ArcB^{H171Q}/ArcB^{H292Q,D576A} heterodimer formation. Subsequently, the cultures were shifted to aerobiosis, and the time course of the β -gal activity was followed. An almost immediate increase of reporter expression (Fig. 7) was observed for the strain carrying the WT *arcB* allele, indicating ArcA-P dephosphorylation and release of reporter repression. On the other hand, a retarded and scarce increase of reporter expression was noticed for the

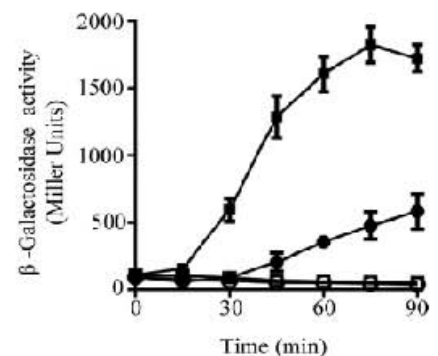


Figure 7. Testing the time lag for ArcA'-P dephosphorylation (signal decay) after a shift to nonstimulating conditions. Strain ECL5002 (squares) and its isogenic ECL5032 (*arcB*^{H171Q}) strain harboring a plasmid born *arcB*^{H292Q,D576A} allele (circles), both carrying the $\lambda\Phi$ (*lldP'*-*lacZ*) reporter, were grown anaerobically in LB buffered with 0.1 M MOPS (pH 7.4) and supplemented with 20 mM D-xylose and 20 mM L-lactate. At an A_{600} of 0.2, one aliquot was withdrawn, to measure the β -gal activity (depicted as 0 min), and the rest of the cultures were divided into two: one of the subcultures was kept under anaerobiosis (open symbols), serving as control, whereas the other one was shifted to aerobiosis (filled symbols), and the time course of the β -gal activity was followed. Data represent the averages from three independent experiments, and the S.D. values (error bars) are indicated.

Phosphoryl group transfer modes in ArcB

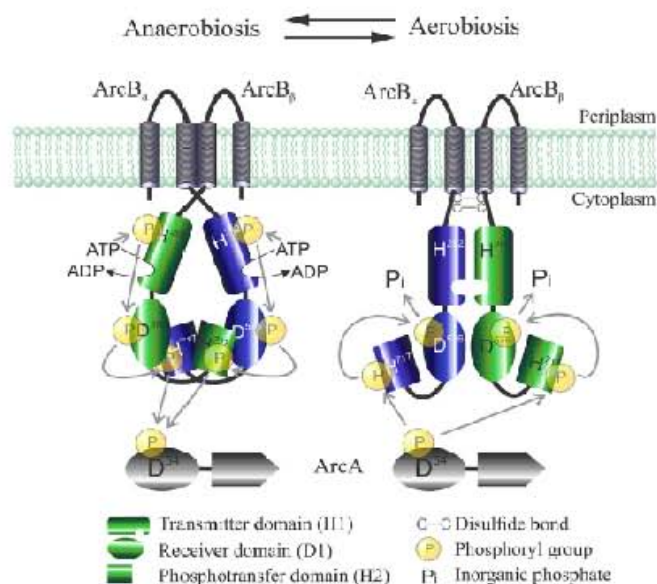


Figure 8. Graphic representation of the ArcB/A two-component system showing the proposed modes of \sim P group transfer during signal propagation (anaerobiosis) and signal decay (aerobiosis). Under anoxic growth conditions, the ATP-dependent intramolecular autophosphorylation in H1 is followed by a phosphorelay that involves an intramolecular H1 to D1 phosphotransfer and an intermolecular D1 to H2 phosphotransfer. Under oxic growth conditions, disulfide bond dependent conformational adjustments of the ArcB modules enforce an intramolecular phosphotransfer from H2 to D1 followed by release of \sim P as P_i, resulting in ArcA-P dephosphorylation and signal decay.

strain carrying the *arcB*^{H717Q} and *arcB*^{H292Q,DS76A} mutant alleles (Fig. 7). Taken together, these results strongly suggest that the reverse \sim P transfer during signal decay (*i.e.* from H2 to D1) operates intramolecularly.

Thus, it seems reasonable to conclude that conformational changes of ArcB may affect the mode of \sim P transfer between the D1 and H2 domains, thereby discriminating between the two opposing activities (*i.e.* between signal transmission and signal decay).

Discussion

In this study, results from *in vitro* and *in vivo* experiments demonstrate that the His²⁹² to Asp⁵⁷⁶ \sim P transfer within the ArcB dimer occurs exclusively intramolecularly, whereas the \sim P transfer from Asp⁵⁷⁶ to His⁷¹⁷ occurs preferentially intermolecularly. Finally, the reverse \sim P transfer responsible for signal decay, namely from His⁷¹⁷ to Asp⁵⁷⁶, appears to have a clear preference for the intramolecular reaction. It is therefore tempting to propose a model in which, during signal propagation, the physiological mode of \sim P transfers between the individual ArcB modules occurs intramolecularly from H1 to D1 and intermolecularly from D1 to H2, whereas the reverse \sim P transfer during signal decay (*i.e.* from H2 to D1) occurs intramolecularly (Fig. 8).

This model differs from that of a previous study, based on *in vivo* experiments analyzed with mathematical and statistical models, where it was suggested that the mechanism operating in ArcB \sim P transfers is dictated by a cooperative or bimolecular mechanism in which all phosphorylation sites of both monomers appear to be required for proper functioning of the ArcB phosphorelay (39). It is worth noting that in these *in vivo* exper-

iments, the ArcB variants were expressed from medium to high copy number plasmids under the control of IPTG-inducible promoters and with the addition of 0.1 mM IPTG. Surprisingly, all combinations, including those in which a WT ArcB was co-expressed with mutant ArcB variants, failed to fully restore a functional phosphorelay. Therefore, it was suggested that all domains and phosphorylation sites in both monomers have to be present if a functional phosphorelay is to be allowed. However, in our hands, co-expression of a chromosomal *arcB*^{H717Q} mutant and a low-copy number plasmid-borne *arcB*^{H292Q,DS76A} mutant fully restored the kinase activity of ArcB (Fig. 3D), indicating that the mutant proteins do complement not only the WT ArcB activity but also its regulation. Therefore, we could only speculate that, in the earlier study, a possible overproduction of the ArcB mutant variants might have been the cause of the lower ArcA activation. Indeed, it has been demonstrated previously that significant overexpression of proteins can be achieved with plasmid pCA24N, which was used in the above study, with as little as 50 μ M IPTG (44). In fact, we have observed that overexpression of a mutant version of ArcB in a WT strain results in a drastic reduction of ArcA-P formation and, thereby, reporter expression (Fig. 5). This, most probably, could be caused by the alteration of the sensor/response regulator concentration balance, in accordance with previous observations for other two-component signal transduction systems (42, 45). Moreover, an intermolecular \sim P transfer from H1 to D1 of ArcB, in contrast to our result, was reported in an earlier study. In that study, the mode of \sim P transfers involved in the phosphorelay of ArcB was analyzed by complementation of single-phosphorelay mutant proteins in *in vitro* phosphorylation assays, followed by separation of phosphorylated proteins by Phos-Tag SDS-PAGE and detection by Coomassie Blue staining (38). However, the high protein concentrations needed for detection of phosphorylated forms of proteins by Coomassie Blue after Phos-Tag SDS-PAGE separation could increase the incidence of nonspecific phosphorylation and, therefore, weaken the resulting conclusions. In contrast, our *in vitro* assays, using ArcB mutant heterodimers, in addition to the *in vivo* complementation experiments, clearly discard intermolecular H1 to D1 phosphotransfer and demonstrate that only the intramolecular transfer is allowed.

At any rate, the model proposed herein for ArcB (Fig. 8) appears appealing if we consider that the spatio-steric constraints of a given assembly of an ArcB_α/ArcB_β homodimer should allow only Asp⁵⁷⁶_α or Asp⁵⁷⁶_β to be in the vicinity of His²⁹²_α, permitting either an inter- or intramolecular \sim P transfer. Likewise, only one His⁷¹⁷, the one of either ArcB_α or ArcB_β, could be in the vicinity of Asp⁵⁷⁶_α, permitting only one mode of \sim P transfer. Thus, under anoxic growth conditions, the assembly of the ArcB_α/ArcB_β dimer would permit the intramolecular \sim P transfer from H1 to D1 (His²⁹²_α → Asp⁵⁷⁶_α and His²⁹²_β → Asp⁵⁷⁶_β) and the intermolecular \sim P transfer from D1 to H2 (Asp⁵⁷⁶_α → His⁷¹⁷_β and Asp⁵⁷⁶_β → His⁷¹⁷_α), favoring the kinase activity of ArcB. On the other hand, under oxic growth conditions, redox-dependent conformational adjustments of the individual modules within the ArcB dimer would permit the intramolecular \sim P transfer from H2 to D1 (His⁷¹⁷_α → Asp⁵⁷⁶_α and His⁷¹⁷_β → Asp⁵⁷⁶_β), favoring the phosphatase activity of

ArcB. Such a model provides some insights within the biochemical mechanism that dictates the direction of \sim P transfer, thereby differentiating the kinase and phosphatase activities of ArcB. A similar *modus operandi* may also apply to other two-component systems comprising a tripartite sensor kinase. Nevertheless, the attainment and analysis of the ArcB crystallographic structure should be needed to elucidate the conformational adjustments that occur upon changes in the redox conditions and to completely understand the bases of the ArcB \sim P transfer pattern.

Experimental procedures

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions

The strains and plasmids used in this work are listed in Table S1. Strains IFC2001 and IFC2002 were constructed by P1vir transduction of the *fur::Tn10* allele from strain ECL556 (46) into strains ECL5023 and ECL5024 (12), respectively. Plasmids pQE30ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸, pQE30ArcB^{78-778,H292Q} (pMX028), pQE30ArcB^{78-778,D576A,H717Q}, pQE30ArcB^{78-778,H292Q,D576A}, pQE30ArcB^{521-778,H717Q}, pQE30ArcA, and pQE30ArcA¹⁻¹³⁶, used for cloning and/or for expression of His₆-ArcB and His₆-ArcA derivatives, have been described previously (10, 13, 16, 18, 35). Plasmid pQE30ArcB^{78-778,D576A} was constructed by replacing the BamHI-EcoRV fragment of plasmid pQE30ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ with the corresponding restriction fragment of pQE30ArcB^{78-778,H292Q,D576A}. Plasmids pQE30ArcB^{78-778,H717Q} and pQE30ArcB^{78-778,H292Q,H717Q} were constructed by replacing the EcoRV-HindIII fragment of pQE30ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ and pQE30ArcB^{78-778,H292Q}, respectively, with the corresponding fragment of pQE30ArcB^{521-778,H717Q}. Plasmid pQE30ArcB^{78-778,H292Q,D576A} was constructed by replacing the MluI-EcoRV fragment of plasmid pQE30ArcB^{78-778,H292Q} with the corresponding MluI-EcoRV fragment of pQE30ArcB^{78-778,H292Q,D576A}. Plasmid pQE30ArcB^{78-778,H292Q,D576A,H717Q} was created by replacing the MluI-HindIII fragment of plasmid pQE30ArcB^{78-778,H292Q} with the corresponding restriction fragment of plasmid pQE30ArcB^{78-778,H292Q,D576A,H717Q}. Plasmids pBADHis-ArcB^{78-778*} (where the asterisk refers to specific amino acid replacements; see Table S1), used for L-arabinose-induced expression of His₆-ArcB^{78-778*}, were constructed by cloning the NdeI-HindIII fragment from the respective pQE30ArcB^{78-778*} between the same restriction sites of plasmid pMX517 (8). Plasmid pMAL-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸, used for expression of ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ fused to the maltose-binding protein (MBP-I-II-D1-II2), was created by cloning the BamHI-HindIII fragment from pQE30ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ between the same restriction sites of pMAL-c2x (New England Biolabs). Then the HpaI-HindIII restriction fragment from plasmid pMAL-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸, containing the MBP-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸-expressing gene and the *tac* promoter, was cloned between the SmaI and HindIII sites of plasmid pACT3 (41), resulting in pACT3MBP-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸. Afterward, pACT3MBP-ArcB^{78-778*} plasmids were constructed by replacing the BamHI-HindIII fragment of pACT3MBP-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ with the BamHI-HindIII fragment from the corresponding pQE30ArcB^{78-778*} (where the asterisk refers to specific amino acid replacements; see Table S1). High-copy number plasmids carrying full-length *arcB* variants

pMX546 (*arcB*^{H292Q}), pMX547 (*arcB*^{H292Q,D576A}), and pMX548 (*arcB*^{D576A,H717Q}) were created by cloning the NruI-HindIII fragment from the corresponding pQE30ArcB^{78-778*} between the NruI and HindIII sites of pMX712 (*arcB*^{wt}) (8). The low-copy number plasmid pEXT22Cm, used for *in vivo* complementation assays, was obtained by cloning the blunt-ended XmnI-ScaI fragment from pACT3 (41), containing the chloramphenicol resistance cassette, into the SspI-restricted pEXT22 (41). Then the BamHI-HindIII fragments from pMX712, pMX546, and pMX547 were cloned between the BamHI and HindIII sites of pEXT22Cm to generate pEXT22CmArcB^{wt}, pEXT22CmArcB^{H292Q}, and pEXT22CmArcB^{H292Q,D576A}, respectively. Plasmids pBADArcB^{H292Q,D576A} and pBADArcB^{D576A,H717Q}, used to express full-length ArcB under the control of the L-arabinose-inducible promoter, were constructed by cloning the NdeI-HindIII restriction fragment from pMX547 and pMX548, respectively, between the NdeI and HindIII sites of pMX517 (8).

Bacteria were routinely cultured at 37 °C in LB. When necessary, media were supplemented with antibiotics, at the following concentrations: chloramphenicol, 20 μg/ml; kanamycin, 50 μg/ml; ampicillin, 100 μg/ml; and tetracycline, 10 μg/ml. For β-galactosidase activity assays, the λΦ(*cydA'*-*lacZ*)-bearing strains were grown in LB containing 0.1 M MOPS (pH 7.4) and 20 mM D-xylose, whereas the λΦ(*lidP'*-*lacZ*)-bearing strains were grown in the above medium supplemented with 20 mM L-lactate as inducer.

Purification of His₆- and MBP-tagged proteins and phosphorylation assays

Native His₆-tagged ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ variants and His₆-ArcA, used in phosphorylation assays, were prepared as described previously (13, 47). MBP-tagged ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ variants were purified by using amylose resin (New England Biolabs) as affinity matrix according to the instructions provided by the manufacturer. For the co-purification of the His₆-/MBP-tagged ArcB versions, strain ECL5012 (*arcB*⁻) (40) carrying both pBADHis-ArcB^{78-778*} and pACT3MBP-ArcB^{78-778*} (where the asterisk refers to specific amino acid replacements) was grown in 1 liter of LB, supplemented with chloramphenicol and ampicillin, in a rotary shaker at 37 °C until an A₆₀₀ of 0.6. Then the expression of the His₆- and MBP-tagged ArcB^{78-778*} was induced by the addition of 1 mM L-arabinose and 0.1 mM IPTG, respectively. Cells were harvested 5 h after induction, and the cell pellet was resuspended in 10 ml of lysis buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole). Finally, the proteins were purified under native conditions by Ni-NTA-agarose affinity chromatography, as described previously (13, 47). Phosphorylation assays were carried out at room temperature in the presence of 40 μM [γ -³²P]ATP (specific activity, 2 Ci mmol⁻¹; New England Nuclear), 33 mM HEPES (pH 7.5), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, and 10% glycerol. 5 pmol of purified ArcB^{78-778*} (His₆- or MBP-tagged) or 10 pmol of co-purified His₆- and MBP-tagged ArcB^{78-778*} and 50 pmol of His₆-ArcA were used in each phosphorylation assay. The phosphorylation reactions were initiated by the addition of [γ -³²P]ATP, and samples were withdrawn and mixed with SDS sample buffer after 15, 30, 60, 120, and 180 s and subject to

Phosphoryl group transfer modes in ArcB

analysis by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels. The radioactivity of proteins resolved in the gels was analyzed by exposing to a Storage Phosphor Screen and scanning by a Typhoon FLA7000 biomolecular imager (GE Healthcare). The intensity of individual band signals was estimated using the ImageQuant version 5.2 software (Molecular Dynamics).

Isolation of His-ArcA¹⁻¹³⁶-P and dephosphorylation assays

Phosphorylation of ArcA¹⁻¹³⁶ and dephosphorylation assays were carried out as described previously (10, 47). Briefly, a 20- μ l reaction mixture containing phosphorylation buffer (33 mM HEPES at pH 7.5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, and 10% glycerol), ArcA¹⁻¹³⁶ (20 mM, purified as a His₆-tagged peptide as above), MBP-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ (2 mM), and 40 μ M [γ -³²P]ATP (specific activity 2 Ci/mmol) was incubated at room temperature. After 10 min, the reaction was stopped by the addition of 100 μ l of buffer A, containing 50 mM Tris-HCl at pH 7.0, 150 mM KCl, 5 mM EDTA, and 3% Triton X-100. Separation of ArcA¹⁻¹³⁶-P from MBP-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸-P was achieved by ultrafiltration using a Nanosep 30 K device (Pallfiltron), which retains MBP-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ but not ArcA¹⁻¹³⁶-P, ATP, and P_i. The eluate was then passed through a Nanosep 10K device (Pallfiltron), washed four times with 500 ml of buffer A to remove ATP and P_i, and once with 500 ml of dephosphorylation buffer (33 mM HEPES at pH 7.5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, and 10% glycerol). The retained material containing ArcA¹⁻¹³⁶-³²P (essentially free of MBP-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸, ATP, and P_i) was recovered in 200 ml of dephosphorylation buffer, aliquoted, and used in dephosphorylation assays. Dephosphorylation reactions were carried out at room temperature in mixtures of 25 μ l containing 50 pmol of His₆-ArcA¹⁻¹³⁶-³²P and 5 pmol of MBP-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ or 10 pmol of co-purified ArcB heterodimers in dephosphorylation buffer. At various time points, a 5- μ l sample was withdrawn, mixed with 5 μ l of SDS sample buffer, and analyzed by SDS-PAGE on 15% polyacrylamide gels. The radioactivity of proteins resolved in the gels was analyzed by using a PhosphorImager (Molecular Dynamics).

β -Galactosidase activity assay

In general, for aerobic growth, cells were cultured in 10–50 ml of medium in 250-ml baffled flasks at 37 °C with shaking (300 rpm), whereas 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. For the aerobiosis to anaerobiosis shift, cells were aerobically grown and, at an A₆₀₀ of 0.2, part of the culture was transferred to five prewarmed screw-capped tubes, filled up to the rim, and stirred by a magnet. The rest of the aerobic culture was further incubated with shaking at the same temperature. The time course of the experiment was followed by taking a sample from a filled screw-capped tube (anaerobiosis) and from the baffled flasks (aerobiosis) at each chosen time. For the anaerobiosis-to-aerobiosis shift, cells were cultured in seven screw-capped tubes filled with medium up to the rim at 37 °C and stirred by a magnet. At an A₆₀₀ of 0.2, the content of a tube was passed to a 250-ml prewarmed baffled flask and incubated with shaking at the same temperature. Samples from aerobic and anaerobic cultures (the rest of the screw-capped tubes) were withdrawn at each chosen time after the shift. β -gal

activity was assayed and expressed in Miller units as described previously (48).

Western blotting

Cells were harvested from cultures by centrifugation during mid-exponential growth. The cell pellet was resuspended in 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 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).

Author contributions—J. L. T.-M., A. F. A., and D. G. conceptualization; J. L. T.-M., G. R. P.-S., H. S.-J., and C. R. investigation; J. L. T.-M., G. R. P.-S., H. S.-J., and C. R. methodology; A. F. A. and D. G. supervision; A. F. A. and D. G. funding acquisition; A. F. A. writing—original draft; D. G. writing—review and editing.

Acknowledgments—We thank Diego González-Italphen and Bertha Michel for critically reading the manuscript.

References

- Georgellis, D., Kwon, O., Lin, E. C., Wong, S. M., and Akerley, B. J. (2001) Redox signal transduction by the ArcB sensor kinase of *Haemophilus influenzae* lacking the PAS domain. *J. Bacteriol.* 183, 7206–7212 CrossRef Medline
- Jung, W. S., Jung, Y. R., Oh, D. B., Kang, H. A., Lee, S. Y., Chavez-Canales, M., Georgellis, D., and Kwon, O. (2008) Characterization of the Arc two-component signal transduction system of the capnophilic rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens*. *TTMS Microbiol. Lett.* 284, 109–119 CrossRef Medline
- Malpica, R., Sandoval, G. R., Rodriguez, C., Franco, B., and 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 CrossRef Medline
- Lynch, A. S., and Lin, E. C. (1996) Regulation of gene expression in *Escherichia coli*. In *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology* (Neidhardt, F. C., Curtis, R., Ingraham, A. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., and Umberger, H. E., eds) pp. 1526–1538. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Iuchi, S., and Lin, E. C. (1988) *arcA* (*dyo*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 1888–1892 CrossRef Medline
- 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 CrossRef Medline
- Ishige, K., Nagasawa, S., Tokishita, S., and Mizuno, T. (1994) A novel device of bacterial signal transducers. *EMBO J.* 13, 5195–5202 Medline
- Núñez-Oreza, L. A., Alvarez, A. F., Arias-Olguín, I. I., Torres Larios, A., and Georgellis, D. (2012) The ArcB leucine zipper domain is required for proper ArcB signaling. *PLoS One* 7, e38187 CrossRef Medline
- Zhulin, I. B., Taylor, R. L., and Dixon, R. (1997) PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem. Sci.* 22, 331–333 CrossRef Medline
- 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 CrossRef Medline
11. Rodriguez, C., Kwon, O., and Georgellis, D. (2004) Effect of D-lactate on the physiological activity of the ArcB sensor kinase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 2085–2090 CrossRef Medline
 12. Kwon, O., Georgellis, D., and Lin, E. C. (2000) Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the Arc two-component system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**, 3858–3862 CrossRef Medline
 13. 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 CrossRef Medline
 14. Gunsalus, R. P., and Park, S. J. (1991) Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: control by the ArcAB and Fnr regulons. *Res. Microbiol.* **145**, 437–450 CrossRef Medline
 15. 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 CrossRef Medline
 16. 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**, 6234–6249 CrossRef Medline
 17. Alvarez, A. F., Malpica, R., Contreras, M., Escamilla, E., and Georgellis, D. (2010) Cytochrome *d* but not cytochrome *o* rescues the toluidine blue growth sensitivity of arc mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **192**, 391–399 CrossRef Medline
 18. 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 CrossRef Medline
 19. 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 CrossRef Medline
 20. Kwon, O., Georgellis, D., and Lin, E. C. (2003) Rotational on-off switching of a hybrid membrane sensor kinase Tar-ArcB in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278**, 13192–13195 CrossRef Medline
 21. Georgellis, D., Kwon, O., and Lin, E. C. (2001) Quinones as the redox signal for the Arc two-component system of bacteria. *Science* **292**, 2314–2316 CrossRef Medline
 22. Alvarez, A. F., Rodriguez, C., and Georgellis, D. (2013) Ubiquinone and menaquinone electron carriers represent the yin and yang in the redox regulation of the ArcB sensor kinase. *J. Bacteriol.* **195**, 3054–3061 CrossRef Medline
 23. Malpica, R., Franco, B., Rodriguez, C., Kwon, O., and Georgellis, D. (2001) Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 13318–13323 CrossRef Medline
 24. Bekker, M., Alexceva, S., Laan, W., Sewers, G., Teixeira de Mattos, J., and Hellingwerf, K. (2010) The ArcBA two-component system of *Escherichia coli* is regulated by the redox state of both the ubiquinone and the menaquinone pool. *J. Bacteriol.* **192**, 746–754 CrossRef Medline
 25. Tomomori, C., Tanaka, T., Dutta, R., Park, H., Saha, S. K., Zhu, Y., Ishima, R., Liu, D., Tong, K. I., Kurokawa, H., Qian, H., Inouye, M., and Ikura, M. (1999) Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 729–734 CrossRef Medline
 26. Tanaka, T., Saha, S. K., Tomomori, C., Ishima, R., Liu, D., Tong, K. I., Park, H., Dutta, R., Qin, L., Swindells, M. B., Yamazaki, T., Ono, A. M., Kainosho, M., Inouye, M., and Ikura, M. (1998) NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. *Nature* **396**, 88–92 CrossRef Medline
 27. West, A. H., and Stock, A. M. (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 369–376 CrossRef Medline
 28. Alvarez, A. F., Barba-Ostria, C., Silva-Jiménez, H., and Georgellis, D. (2016) Organization and mode of action of two component systems signaling circuits from the various kingdoms of life. *Environ. Microbiol.* **18**, 3210–3226 CrossRef Medline
 29. Stock, A. M., Robinson, V. L., and Goudreau, P. N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 183–215 CrossRef Medline
 30. Yang, Y., and Inouye, M. (1991) Intermolecular complementation between two defective mutant signal-transducing receptors of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 11067–11061 CrossRef Medline
 31. Ninfa, E. G., Atkinson, M. R., Kamberov, E. S., and Ninfa, A. J. (1993) Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. *J. Bacteriol.* **175**, 7024–7032 CrossRef Medline
 32. Casino, P., Rubio, V., and Marina, A. (2009) Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell* **139**, 325–336 CrossRef Medline
 33. Swanson, R. V., Bourret, R. B., and Simon, M. I. (1993) Intermolecular complementation of the kinase activity of ChcA. *Mol. Microbiol.* **8**, 435–441 CrossRef Medline
 34. Cotter, P. A., and Jones, A. M. (2003) Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol.* **11**, 367–373 CrossRef Medline
 35. 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 CrossRef Medline
 36. Jourlin, C., Ansaldi, M., and Méjean, V. (1997) Transphosphorylation of the TorR response regulator requires the three phosphorylation sites of the TorS unorthodox sensor in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **267**, 170–177 CrossRef Medline
 37. Uhl, M. A., and Miller, J. F. (1996) Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J.* **15**, 1028–1036 Medline
 38. Kinoshita-Kikuta, E., Kinoshita, E., Eguchi, Y., and Koike, T. (2016) Validation of *cis* and *trans* modes in multistep phosphotransfer signaling of bacterial tripartite sensor kinases by using Phos-Tag SDS-PAGE. *PLoS One* **11**, e0148294 CrossRef Medline
 39. Jovanovic, G., Sheng, X., Ale, A., Feliu, E., Harrington, H. A., Kirk, P., Wu, C., Buck, M., and Stumpf, M. P. H. (2015) Phosphorelay of non-orthodox two component systems functions through a bi-molecular mechanism *in vivo*: the case of ArcB. *Mol. Biosyst.* **11**, 1348–1359 CrossRef Medline
 40. Kwon, O., Georgellis, D., Lynch, A. S., Boyd, D., and Lin, E. C. (2000) The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region. *J. Bacteriol.* **182**, 2950–2956 CrossRef Medline
 41. Dykxhoorn, D. M., St Pierre, R., and Linn, T. (1996) A set of compatible tac promoter expression vectors. *Gene* **177**, 133–136 CrossRef Medline
 42. Goulian, M. (2010) Two-component signaling circuit structure and properties. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 184–189 CrossRef Medline
 43. Dong, J. M., Taylor, J. S., Latour, D. J., Iuchi, S., and Lin, E. C. (1993) Three overlapping *lct* genes involved in L-lactate utilization by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 6671–6678 CrossRef Medline
 44. Soo, V. W. C., Hanson-Manful, P., and Patrick, W. M. (2011) Artificial gene amplification reveals an abundance of promiscuous resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 1484–1489 CrossRef Medline
 45. Batchelor, E., and Goulian, M. (2003) Robustness and the cycle of phosphorylation and dephosphorylation in a two-component regulatory system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 691–696 CrossRef Medline
 46. Fu, H.-A., Iuchi, S., and Lin, E. C. C. (1991) The requirement of ArcA and Fnr for peak expression of the *cyd* operon in *Escherichia coli* under microaerobic conditions. *Mol. Gen. Genet.* **226**, 209–213 Medline
 47. Alvarez, A. F., and Georgellis, D. (2010) *In vitro* and *in vivo* analysis of the ArcB/A redox signaling pathway. *Methods Enzymol.* **471**, 205–228 CrossRef Medline
 48. Miller, J. H. (1972) β -Galactosidase assay. in *Experiments in Molecular Genetics*. pp. 352–355, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

Supporting information

Routes of phosphoryl-group transfer during signal transmission and signal decay in the dimeric sensor
histidine kinase ArcB

Juan Luis Teran-Melo, Gabriela R. Peña-Sandoval, Hortencia Silva-Jimenez, Claudia Rordiguez, Adrián
F. Alvarez and Dimitris Georgellis

Figures S1, S2 and S3, Table S1 and references

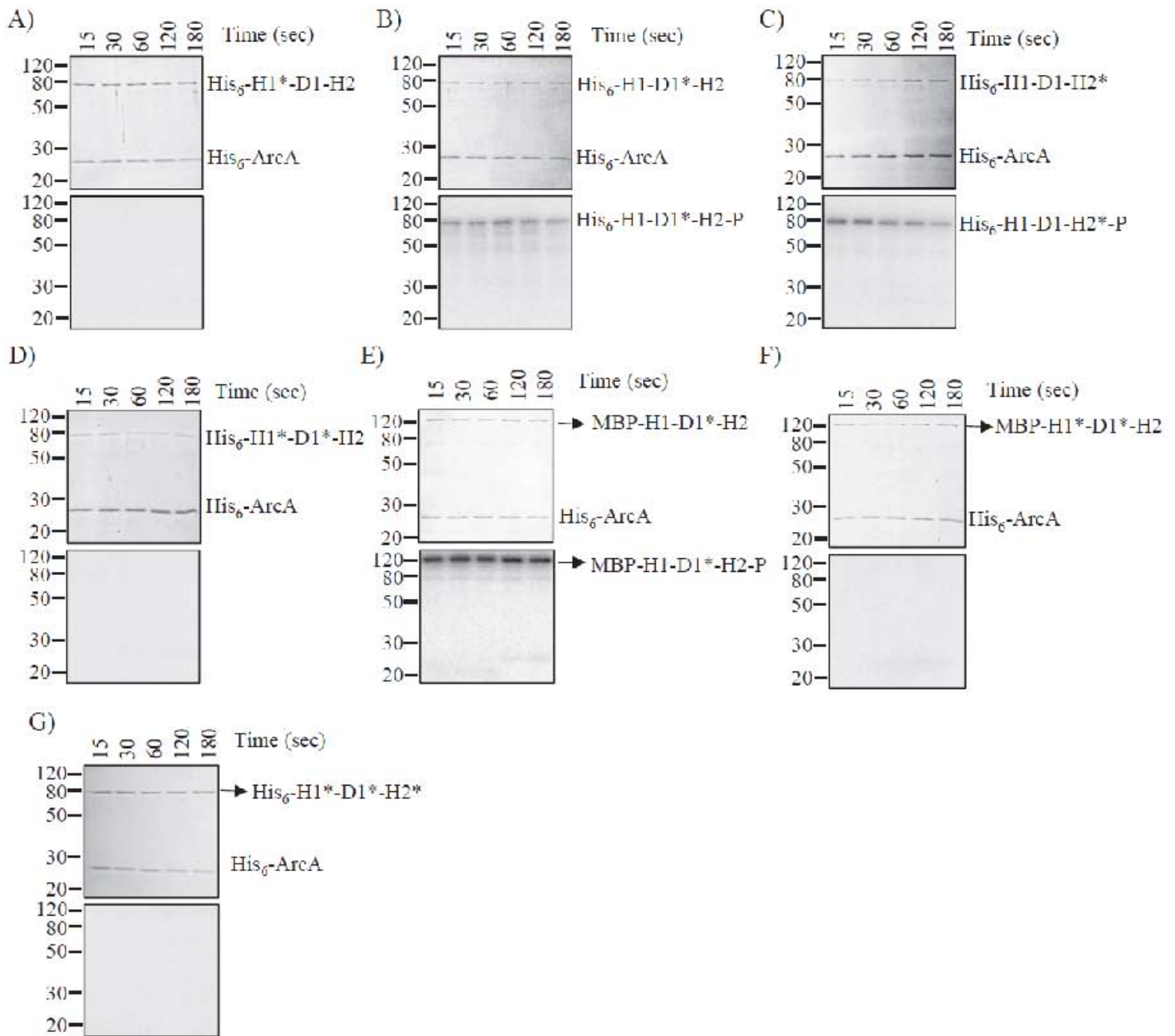


Figure S1. None of the His₆-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ and MBP-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ mutants are able to transphosphorylate ArcA. Purified ArcA was incubated in a 30 μ l-reaction mixture, in the presence of [γ -³²P]ATP, with (A) His₆-H1*-D1-H2, (B) His₆-H1-D1*-H2, (C) His₆-H1-D1-H2*, (D) His₆-H1-D1*-H2*, (E) MBP-H1-D1*-H2, (F) MBP-H1*-D1*-H2, or (G) His₆-II1*-D1*-II2*, and 5- μ l samples were withdrawn at the indicated time intervals for SDS-PAGE analysis. The Coomassie blue-stained gels revealing protein bands (upper panels), and the corresponding autoradiograms (bottom panels) are presented. The molecular mass standard values (kDa) are shown on the left, and the position of each polypeptide in the gel is indicated on the right side of each panel.

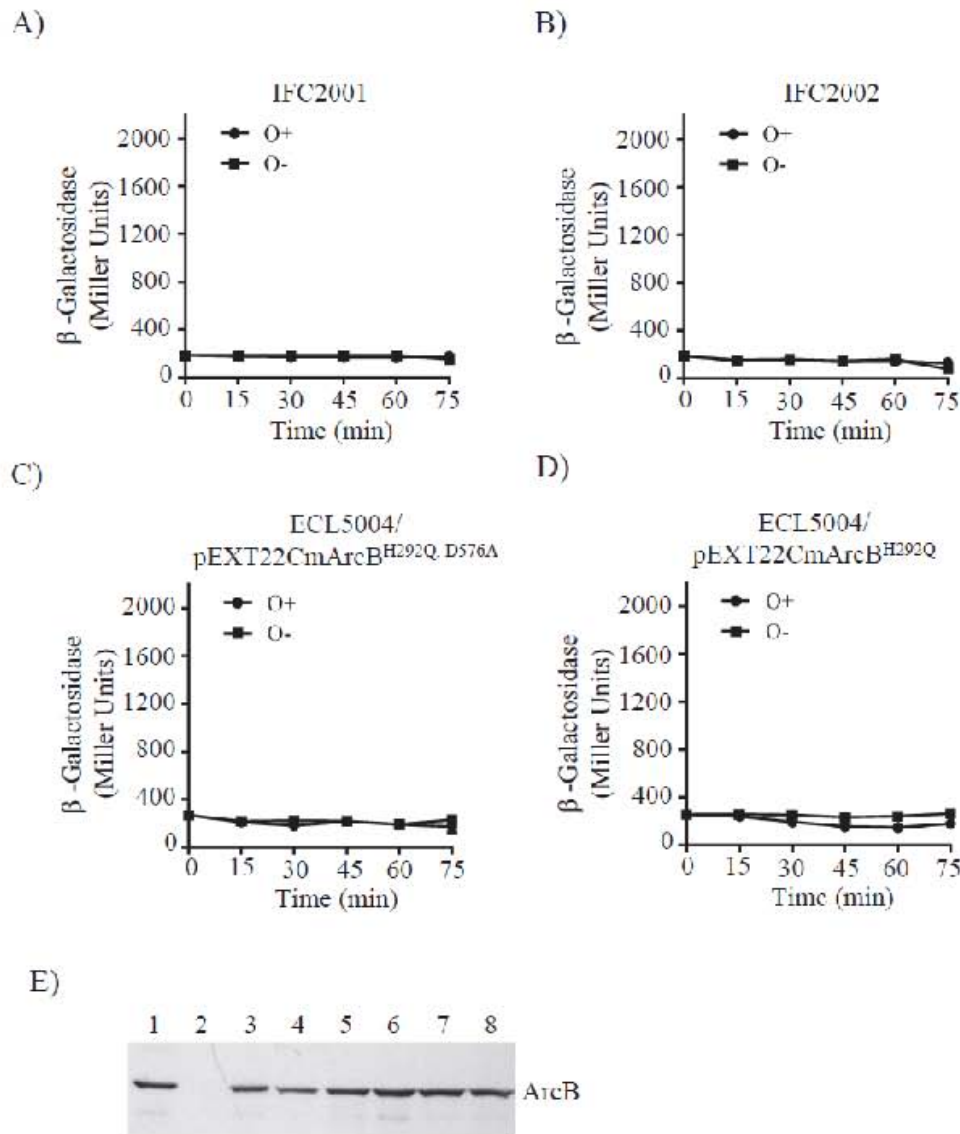


Figure S2. Mutant variants of ArcB do not activate the anaerobic expression of the *cydA'*-*lacZ* reporter. Cultures of strain (A) IFC2001 (*arcB*^{D576A}), (B) IFC5002 (*arcB*^{H717Q}), (C) ECL5004 (*arcB*⁻) harboring plasmid pEXT122CmArcB^{H292Q, D576A}, and (D) ECL5004 (*arcB*⁻) harboring plasmid pEXT22CmArcB^{H292Q}, all carrying the ArcA-P activatable $\lambda\Phi$ (*cydA'*-*lacZ*) reporter, were grown aerobically in LB buffered with 0.1M MOPS (pH 7.4) and supplemented with 20 mM D-xylose. At an OD₆₀₀ of 0.2, one aliquot was withdrawn, to measure the β -galactosidase activity (depicted as 0 min), and the rest of the culture was divided to two parts. One part was kept under aerobic conditions (circles), as a control, whereas the other was shifted to anaerobiosis (squares), and the time course of the β -galactosidase activity was followed. Data represent the averages from three independent experiments and the standard deviation values are indicated. (E) Equal number of bacteria of the above aerobic cultures and those used for Figure 3 were analyzed by Western blot analysis, using ArcB polyclonal antibodies. Lanes correspond to (1) ECL5003, (2) ECL5004, (3) IFC2001, (4) IFC2002, (5) IFC2001 carrying pEXT22CmArcB^{H292Q}, (6) IFC2002 carrying pEXT22CmArcB^{H292Q, D576A}, (7) ECL5004 carrying pEXT22CmArcB^{H292Q}, and (8) ECL5004 carrying pEXT22CmArcB^{H292Q, D576A}.

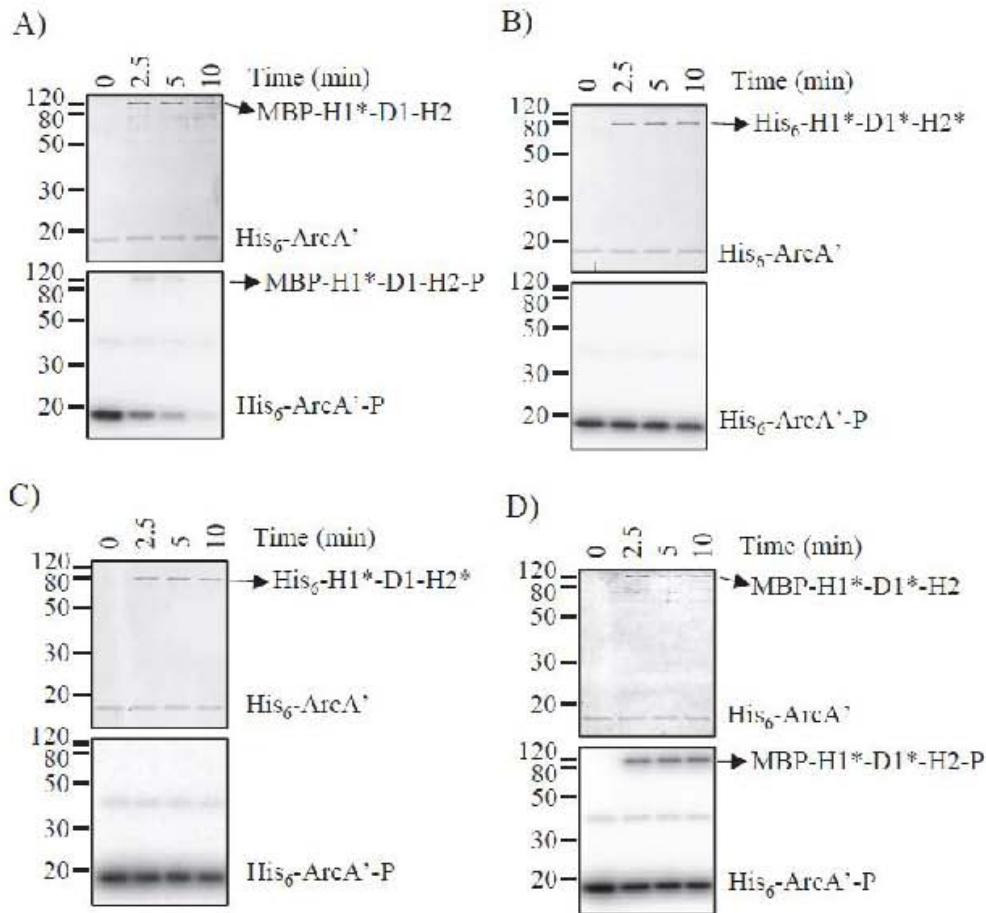


Figure S3. ArcA^{-P} dephosphorylation by His₆-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ and MBP-ArcB⁷⁸⁻⁷⁷⁸ mutant variants. Purified ArcA^{-P} was incubated with (A) MBP-H1^{*}-D1-H2, (B) His₆-H1^{*}-D1^{*}-H2^{*}, (C) His₆-H1^{*}-D1-H2^{*}, or (D) MBP-H1^{*}-D1^{*}-H2, in 25 μ l-reaction mixtures. At the indicated time points, 5- μ l samples were withdrawn for SDS-PAGE analysis. The Coomassie blue-stained gels revealing protein bands (upper panels), and the corresponding autoradiograms (bottom panels) are presented. The molecular mass standard values (kDa) are shown on the left, and the position of each polypeptide in the gel is indicated on the right side of each panel.

Table S1. *E. coli* strain and plasmids used in this work

Strain	Relevant characteristics	Source
MC4100	<i>F araD139 (argF-lac) U169 rpsL150 relA1 flbB5301 deoC ptsF25 rbsR</i>	(1)
ECL5002	MC4100 $\lambda\Phi$ (<i>lldP'</i> - <i>lacZ</i>)	(2)
ECL5003	MC4100 $\Delta fur::Tn9$ (Cm ^r) $\lambda\Phi$ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	(2)
ECL5004	MC4100 $\Delta arcB::Tet^r \Delta fur::Tn9$ (Cm ^r) $\lambda\Phi$ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>)	(2)
ECL5012	MC4100 $\Delta arcB::Tet^r \lambda\Phi$ (<i>lldP'</i> - <i>lacZ</i>)	(2)
ECL5023	MC4100 <i>arcB</i> ^{D576A} Kan ^r $\lambda\Phi$ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>) $\Delta fur::Tn9$ (Cm ^r)	(3)
ECL5024	MC4100 <i>arcB</i> ^{H717Q} Kan ^r $\lambda\Phi$ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>) $\Delta fur::Tn9$ (Cm ^r)	(3)
ECL5032	MC4100 <i>arcB</i> ^{H717Q} Kan ^r $\lambda\Phi$ (<i>lldP'</i> - <i>lacZ</i>)	(3)
IFC2001	MC4100 <i>arcB</i> ^{D576A} Kan ^r $\lambda\Phi$ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>) $\Delta fur::Tet^r$	This study
IFC2002	MC4100 <i>arcB</i> ^{H717Q} Kan ^r $\lambda\Phi$ (<i>cydA'</i> - <i>lacZ</i>) $\Delta fur::Tet^r$	This study
Plasmid		
pEX122	Low copy number vector, Kan ^r	(4)
pEXT22Cm	Low copy number vector, Kan ^r , Cm ^r	This study
pACT3	Low copy number vector, Cm ^r	(4)
pMX712	<i>arcB</i> under native promoter in pBluescript KS II (+), Amp ^r	(5)
pMX517	<i>arcB</i> in pBAD30 under control of l-arabinose inducible promoter, Amp ^r	(5)
pQE30ArcB ⁷⁸⁻⁷⁷⁸	His ₆ -ArcB ⁷⁸⁻⁷⁷⁸ in pQE30 under IPTG inducible promoter, Amp ^r	(6)
pMX028	His ₆ -ArcB ^{78-778, H717Q} in pQE30 under IPTG inducible promoter, Amp ^r	(7)
pQE30ArcB ^{78-778, D576A, H717Q}	His ₆ -ArcB ^{78-778, D576A, H717Q} in pQE30 under IPTG inducible promoter, Amp ^r	(8)
pQE30ArcB ^{78-661, D576A}	His ₆ -ArcB ^{78-661, D576A} in pQE30 under IPTG inducible promoter, Amp ^r	(8)
pQE30ArcB ^{521-778, H717Q}	His ₆ -ArcB ^{521-778, H717Q} in pQE30 under IPTG inducible promoter, Amp ^r	(9)
pQE30ArcA	His ₆ -ArcA in pQE30 under IPTG inducible promoter, Amp ^r	(10)
pQE30ArcA ¹⁻¹⁴⁶	His ₆ -ArcA ¹⁻¹⁴⁶ (His ₆ -ArcA [']) in pQE30 under IPTG inducible promoter, Amp ^r	(9)
pQE30ArcB ^{78-778, D576A}	His ₆ -ArcB ^{78-778, D576A} in pQE30 under IPTG inducible promoter, Amp ^r	This study
pQE30ArcB ^{78-778, H717Q}	His ₆ -ArcB ^{78-778, H717Q} in pQE30 under IPTG inducible promoter, Amp ^r	This study
pQE30ArcB ^{78-778, H292Q, H717Q}	His ₆ -ArcB ^{78-778, H292Q, H717Q} in pQE30 under IPTG inducible promoter, Amp ^r	This study

pQE30ArcB ^{78-778, H292Q, D576A}	His ₆ -ArcB ^{78-778, H292Q, D576A} in pQE30 under IPTG inducible promoter, Amp ^r	This study
pQE30ArcB ^{78-778, H292Q, D576A, H717Q}	His ₆ -ArcB ^{78-778, H292Q, D576A, H717Q} in pQE30 under IPTG inducible promoter, Amp ^r	This study
pBADHis-ArcB ^{78-778, H292Q}	His ₆ -ArcB ^{78-778, H292Q} in pBAD30 under l-arabinose inducible promoter, Amp ^r	This study
pBADHis-ArcB ^{78-778, H292Q, D576A}	His ₆ -ArcB ^{78-778, H292Q, D576A} in pBAD30 under l-arabinose inducible promoter, Amp ^r	This study
pBADHis-ArcB ^{78-778, H292Q, D576A, H717Q}	His ₆ -ArcB ^{78-778, H292Q, D576A, H717Q} in pBAD30 under l-arabinose inducible promoter, Amp ^r	This study
pBADHis-ArcB ^{78-778, H717Q}	His ₆ -ArcB ^{78-778, H717Q} in pBAD30 under l-arabinose inducible promoter, Amp ^r	This study
pBADHis-ArcB ^{78-778, H292Q, H717Q}	His ₆ -ArcB ^{78-778, H292Q, H717Q} in pBAD30 under l-arabinose inducible promoter, Amp ^r	This study
pMAL-ArcB ⁷⁸⁻⁷⁷⁸	MBP-ArcB ⁷⁸⁻⁷⁷⁸ in pMALc2x under IPTG inducible promoter, Amp ^r	This study
pACT3MBP-ArcB ⁷⁸⁻⁷⁷⁸	MBP-ArcB ⁷⁸⁻⁷⁷⁸ in pACT3 under IPTG inducible promoter, Cm ^r	This study
pACT3MBP-ArcB ^{78-778, H292Q}	MBP-ArcB ^{78-778, H292Q} in pACT3 under IPTG inducible promoter, Cm ^r	This study
pACT3MBP-ArcB ^{78-778, D576A}	MBP-ArcB ^{78-778, D576A} in pACT3 under IPTG inducible promoter, Cm ^r	This study
pACT3MBP-ArcB ^{78-778, H292Q, D576A}	MBP-ArcB ^{78-778, H292Q, D576A} in pACT3 under IPTG inducible promoter, Cm ^r	This study
pMX546	<i>arcB</i> ^{H292Q} under native promoter in pBluescript KS II (+), Amp ^r	This study
pMX547	<i>arcB</i> ^{H292Q, D576A} under native promoter in pBluescript KS II (+), Amp ^r	This study
pMX548	<i>arcB</i> ^{D576A, H717Q} under native promoter in pBluescript KS II (+), Amp ^r	This study
pEXT22CmArcB ^{WT}	<i>arcB</i> under native promoter in pEXT22Cm, Kan ^r , Cm ^r	This study
pEXT22CmArcB ^{H292Q}	<i>arcB</i> ^{H292Q} under native promoter in pEXT22Cm, Kan ^r , Cm ^r	This study
pEXT22CmArcB ^{H292Q, D576A}	<i>arcB</i> ^{H292Q, D576A} under native promoter in pEXT22Cm, Kan ^r , Cm ^r	This study
pBADArcB ^{H292Q, D576A}	<i>arcB</i> ^{H292Q, D576A} in pBAD30 under l-arabinose inducible promoter, Amp ^r	This study
pBADArcB ^{D576A, H717A}	<i>arcB</i> ^{D576A, H717Q} in pBAD30 under l-arabinose inducible promoter, Amp ^r	This study

References

1. Casadaban, M. J. (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage Lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* **104**, 541–555
2. Kwon, O., Georgellis, D., Lynch, A. S., Boyd, D., and Lin, E. C. (2000) The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region. *J. Bacteriol.* **182**, 2960–2966
3. Kwon, O., Georgellis, D., and Lin, E. C. (2000) Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the Arc two-component system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**, 3858–3862
4. Dykxhoorn, D. M., St Pierre, R., and Linn, T. (1996) A set of compatible tac promoter expression vectors. *Gene*. **177**, 133–136
5. Nuñez Oreza, L. A., Alvarez, A. F., Arias-Olguín, I. I., Torres Larios, A., and Georgellis, D. (2012) The ArcB leucine zipper domain is required for proper ArcB signaling. *PLoS One*. **7**, e38187
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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