



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Efecto del D-lactato en la actividad fisiológica de la  
cinasa sensora ArcB en *Escherichia coli*”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRA EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

***PRESENTA***

**Biól. Claudia Rodríguez Rangel**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. Dimitris Georgellis**

**MÉXICO, D.F.**

**Noviembre 2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



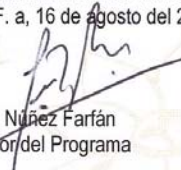
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 4 de diciembre del 2006, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) de la alumna **Claudia Rodríguez Rangel** con número de cuenta **82377261** con la tesis titulada: **"Efecto del D-lactato en la actividad fisiológica de la cinasa sensora ArcB en *Escherichia coli*"** bajo la dirección del Dr. **Dimitris Georgellis**.

Presidente:	Dra. Gloria Soberón Chávez
Vocal:	Dr. Jesús Aguirre Linares
Secretario:	Dr. Dimitris Georgellis
Suplente:	Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo
Suplente:	Dr. Angel Manjarrez Hernández

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a, 16 de agosto del 2007

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa



El estudio que se describe a continuación se llevó a cabo en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México en el Departamento de Genética Molecular bajo la dirección del Dr. Dimitris Georgellis y contó con apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT proyectos 3747N y 47799 ), de la Dirección General de Apoyo de Personal Académico (PAPIIT proyectos IN-218902, IN221106 e IX233404) así como del "National Institute of Health Research" (proyecto R03 TW06003).



## ***AGRADECIMIENTOS:***

A la División de Estudios de Posgrado.

A la Facultad de Ciencias de la UNAM

Al Instituto de Fisiología Celular

Al Dr. Dimitris Georgellis por su paciente enseñanza.

Al comité tutorial por su tiempo y sus comentarios para la realización de este trabajo:

Dra. Gloria Soberón

Dr. Jesús Aguirre

Dr. Dimitris Georgellis

Dra. Bertha Josefina González Pedrajo

Dr. Angel Manjarrez



## ***AGRADECIMIENTOS:***

Esta parte de la tesis es una de las que más trabajo me ha costado escribir, la razón es que quisiera expresar muchas cosas pero temo caer en el ridículo, pero una buena amiga escribió en la suya que es la única parte que todo el mundo lee y me convenció de escribir algo más:

Al Dr. Dimitris Georgellis por permitirme la posibilidad de formar un equipo de trabajo y enseñarme el compromiso con la Ciencia y con uno mismo.

A mi amado esposo CD Adrián Andrade por ser la mitad de mi vida.

A mi madre por su amor.

A los Flores, Moru, Raúl, Raulin y Andy.

A mi abue, por estar conmigo siempre.

A mis amigos y compañeros quienes me soportan mas tiempo que mi propia familia: Luis, Clau, Carlos, Ricardo, Itzel, Bernardo, Gaby, Adrián y Pedro

A mi muy querida Rox por su incondicional apoyo

Gracias Clau por ayudarme a poner coqueta esta versión “última de verdad” de esta tesis.

Gracias!!



## ***Índice***

***“Efecto del D-lactato en la actividad fisiológica de la cinasa sensora ArcB en Escherichia coli”***

**Resumen**

**Abstract**

**Introducción**

**Discusión y conclusiones**

**Perspectivas**

**Bibliografía**

**Sobretiros**

## ***Resumen:***

El sistema de dos componentes Arc (anoxic redox control) regula respuestas adaptativas a cambios ambientales de acuerdo a condiciones redox de crecimiento en las bacterias.

Este complejo sistema de transducción de señales consiste de la proteína ArcB como la cinasa asociada a la membrana y la proteína ArcA como la reguladora de la respuesta. La proteína ArcA es un regulador de la respuesta típico que posee un dominio receptor en el extremo N-terminal con un residuo de aspartato altamente conservado (Asp 54) y un dominio hélice-vuelta-hélice para la unión a DNA. En contraste, ArcB es altamente complicada. Primero, no tiene un dominio periplásmico evidente. En segundo, la porción citoplásmica de la proteína contiene un zipper de leucinas y un dominio PAS. Y tercero, ArcB posee tres dominios catalíticos en la porción citoplásmica: Un dominio transmisor en el extremo N-terminal (H1) con un residuo de histidina altamente conservado en la posición 292, un dominio receptor central (D1) con un residuo de aspartato conservado en la posición 576, y un dominio fosfotransmisor (H2) en el extremo carboxilo terminal con un residuo de histidina conservado en la posición 717. En condiciones reductoras ArcB se autofosforila a expensas de ATP.

Subsecuentemente, ArcB transfosforila a ArcA vía el fosforelevo His292→Asp576→His717→Asp54. ArcA fosforilada (ArcA-P) reprime la expresión de genes que codifican para enzimas que están involucradas en el metabolismo respiratorio, tales como las enzimas transportadoras de electrones, las del ciclo del ácido tricarbónico y las del ciclo del glioxalato. Al mismo tiempo, activa la expresión de genes involucrados en la fermentación.

En condiciones de crecimiento aeróbico, la autofosforilación de ArcB se inhibe por la forma oxidada de las quinonas transportadoras de electrones, y ArcA-P se desfosforila vía un fosforelevo reverso. Estudios previos *in vitro* han demostrado que metabolitos productos de la fermentación, tales como el D-lactato, el acetato y el piruvato incrementan el nivel neto de la fosforilación de

ArcB. En este trabajo exploramos: a) el efecto del D-Lactato *in vivo* sobre la modulación de la actividad de ArcB, y b) la posible participación del D-lactato como señal activadora del sistema Arc en ambientes anaeróbicos. Evaluamos el efecto del D-lactato como señal directa y como efector alostérico. Para tal efecto se construyó una cepa incapaz de sintetizar y de metabolizar el D-lactato y analizamos el efecto de éste en cultivos aeróbicos y anaeróbicos. Encontramos que añadir D-lactato a cultivos crecidos en presencia de oxígeno no altera la expresión de los genes reporteros *cyd-lacZ* y *lldP-lacZ*. Por otro lado, en células crecidas en condiciones anaeróbicas, el nivel de *cyd-lacZ* fue significativamente mayor en la presencia de D-lactato que en la ausencia de éste. Probamos en experimentos *in vivo* el efecto del D-lactato en la versión trunca de ArcB, lo que nos llevó a confirmar que la versión trunca de la proteína funciona como cinasa parcialmente constitutiva. Nuestros resultados sugieren que el D-Lactato no activa la función cinasa de ArcB, mas sin embargo indican que éste actúa como efector alostérico al incrementar la actividad de ArcB, y sugerimos que el D-lactato juega un papel fisiológico en la modulación de dicha actividad.

## ***Abstract:***

The Arc (anoxic redox control) two-component system, mediates adaptive responses to environmental changes in accordance with redox conditions of growth in bacteria.

This complex signal transduction system consists of the ArcB protein as the membrane associated sensor kinase and the ArcA protein as the cognate response regulator. The ArcA protein is a typical response regulator comprising an N-terminal receptor domain with a conserved Asp residue (Asp54) and a C-terminal helix-turn-helix domain for DNA binding. By contrast, ArcB is unusually complicated. Firstly, there is not any evident periplasmic domain. Secondly, the cytosolic portion of the protein contains a putative leucine zipper and a PAS domain. Thirdly, ArcB possesses three cytosolic catalytic domains: an N-terminal transmitter domain (H1) with a conserved His residue at position 292, a central receiver domain (D1) with a conserved Asp residue at position 576, and a C-terminal phosphotransfer domain (H2) with a conserved His residue at position 717.

Under reducing conditions, ArcB autophosphorylates at the expense of ATP.

Subsequently, ArcB transphosphorylates ArcA via a His 292→ Asp 576→His 717→Asp54 phosphorelay.

Phosphorylated ArcA (ArcA-P) acts as a transcriptional regulator that represses the expression of genes that encode enzymes involved in respiratory metabolism (electron transport enzymes, the tricarboxylic acid cycle, and the glyoxylate shunt), and activates other genes involved in fermentation.

Under oxidizing conditions ArcB autophosphorylation is inhibited by the oxidized quinone electron carriers, and ArcA-P dephosphorylates via reverse Asp 54→His 717→Asp576 phosphorelay.

In a previous study it was demonstrated that the presence of certain fermentation intermediates, namely D-lactate, acetate and pyruvate, heightened the level of net ArcB phosphorylation, and it was suggested that this effect was exerted through inhibition of the intrinsic

phosphatase activity of ArcB. Since the above cellular metabolites increasingly accumulate during anaerobiosis, an inhibition of phosphatase activity and concomitant increase in kinase activity should have the effect of increasing the concentration of ArcA-P in the cell leading to an alteration in gene expression.

Therefore, it was proposed that these metabolites may be the signal through which ArcB senses anaerobic environments *in vivo*. In a subsequent *in vitro* study, however, it was demonstrated that the effect of D-lactate, acetate and pyruvate on the activity of ArcB is exerted through enhancement of the ArcB autophosphorylation rate rather than silencing of its phosphatase activity. Nevertheless, no *in vivo* evidence has thus far been provided to support the physiological significance of such an effect, and the possibility of the metabolites acting as direct signals remains unclarified.

Here we designed experiments to probe the *in vivo* effect of D-lactate on Arc signaling and to test whether this metabolite acts as a primary signal or an allosteric effector.

## ***Introducción:***

*Escherichia coli*, como otras enterobacterias, ha desarrollado la capacidad de crecer en una gran variedad de fuentes de carbono y la extracción de energía de estas fuentes puede ocurrir a través de varias reacciones de transporte de electrones en presencia o en ausencia de oxígeno (O<sub>2</sub>) y, posteriormente, esta energía puede canalizarse a distintos aceptores de electrones exógenos. Por otro lado, en caso de no existir aceptores de electrones en el ambiente, pueden simplemente fermentar los azúcares para obtener energía. Por lo anterior, tanto la sobrevivencia como el crecimiento bacteriano es posible que ocurran en un intervalo muy amplio de condiciones. Para “elegir” alguna de estas vías de extracción de energía, las bacterias primero deben detectar la presencia de los sustratos posibles para “encender” o “apagar” la vía adecuada. Este control puede llevarse a cabo por la regulación transcripcional de los genes que codifican enzimas ya sea de las vías aeróbicas o anaeróbicas, asegurando que no se sinteticen enzimas innecesarias y que las que son requeridas se encuentren en las cantidades adecuadas (Gonsalus R.P y Park S.J ).

En la respiración, se oxidan sustratos orgánicos o hidrogenados, y un aceptor de electrones se reduce. Este aceptor puede ser el O<sub>2</sub> en el caso de la respiración aeróbica o nitrato, nitrito fumarato, azufre, iones de hierro, dimetil sulfóxido, trimetilamina N-óxido, dióxido de carbono, sulfato u otros compuestos orgánicos clorados cuando hablamos de respiración anaeróbica. En ambos casos la energía se conserva vía un gradiente electroquímico generado ya sea por protones o por iones de sodio.

La fermentación es un proceso anaeróbico redox en el cual el ATP se genera a través de la fosforilación a nivel de sustrato acoplado con la oxidación del sustrato, donde el transporte de electrones hacia una molécula aceptora normalmente no se encuentra acoplada con la conservación de la energía. Tanto los donadores de electrones como los aceptores son derivados de moléculas orgánicas de estados redox medianos tales como azúcares, ácidos



orgánicos, aminoácidos y compuestos heterocíclicos, los cuales son convertidos a compuestos orgánicos reducidos como el D-lactato, acetato, formato, succinato, etanol así como CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> (Clark, 1989).

La desventaja de la fermentación es la necesidad de sacrificar una gran porción de átomos de carbono e hidrógeno como productos finales, muchos de los cuales poseen el potencial para ser utilizados en presencia del oxígeno u otro aceptor de electrones.

La elección de la vía redox se establece a favor de aquella que provee la mayor diferencia de potencial entre el donador de electrones inicial y el aceptor de electrones terminal, esta diferencia limita la cantidad de energía que puede ser aprovechada. Por lo que la respiración aeróbica interfiere con la inducción del sistema de respiración anaeróbica. Dado que la biosíntesis de muchas enzimas aparentemente depende exclusivamente de la tensión de oxígeno, Iuchi y Lin (1988) supusieron que existía un mecanismo de control global cuya regulación pudiera ser transcripcional. Dado que las bacterias tienen que operar entre los cambios de respiración aeróbica a anaeróbica y de respiración anaeróbica a fermentación causando un decremento gradual en la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana citoplásmica (menos negativo en el interior) o en el gradiente de pH a lo largo de la membrana (menos alcalino en el interior), identificaron la existencia de una proteína en la membrana citoplásmica capaz de detectar estos cambios. Entonces, a través de un elaborado ensayo de genética bacteriana caracterizando un gran número de mutantes, identifican dos genes reguladores: *arcA*, (el cual previamente se denominaba gen *dye* dado que supresiones de este gen causaban sensibilidad a algunos colorantes como el azul de toluidina) (Buxton R.S y Drury L.S.,1984) localizado al minuto 0, y *arcB* localizado en el minuto 69.5 (Iuchi S., et al 1989).

El sistema Arc (acrónimo de Anoxio redox control) pertenece a la familia de sistemas reguladores denominados de dos componentes los cuales se encuentran constituidos por un par de proteínas, una que funciona como sensora y otra que interacciona con los genes blanco de regulación. Una descripción más extensa de cómo son y como funcionan estos sistemas se

detalla a continuación.

### **Sistemas de dos componentes**

Los sistemas de dos componentes (SDC) son los sistemas de transducción de señales que utilizan predominantemente las bacterias para responder a variaciones ambientales. La transmisión de una señal involucra la interacción de un ligando extracelular con una proteína transmembranal que tiene un dominio a ambos lados de la membrana. La unión del ligando genera cambios en el receptor, el cual pasa de un estado inactivo a uno activo.

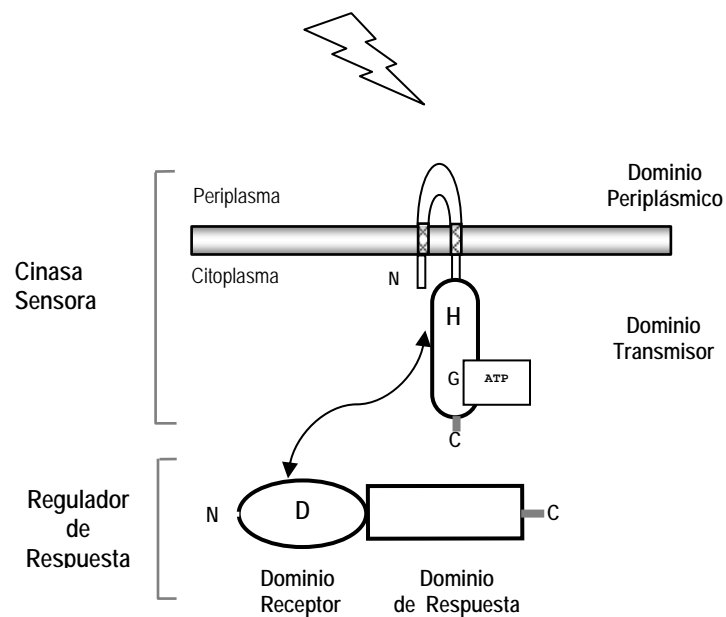
Este proceso se ha denominado transducción de señales porque un estímulo externo tiene un efecto a través de la membrana y provee los medios para llevar a cabo la amplificación de la señal (Nixon *et al.* 1986). Como se mencionó anteriormente, los SDC se caracterizan por tener dos elementos: una proteína sensora y una proteína reguladora de la respuesta, las cuales a través de un mecanismo básico de estímulo-respuesta permiten a los organismos detectar y responder a cambios en la temperatura, la osmolaridad, el pH o los nutrientes en diferentes condiciones ambientales (Stock *et al.* 2000).

Estos sistemas regulan una gran variedad de procesos entre los que se incluyen aquellos relacionados con la adaptación a condiciones ambientales como los ya mencionados cambios en la osmolaridad y el pH, así como en procesos relativos a la generación y a la utilización de energía. Se sabe que cada sistema responde a un estímulo específico, como el sistema CheA/CheY que regula funciones relacionadas con la quimiotaxis, el sistema NtrB/NtrC asociado al metabolismo del nitrógeno o el sistema PhoR/PhoB involucrado en la utilización del fosfato.

Inicialmente, este concepto se aplicó para describir conjuntos de proteínas regulatorias bacterianas aunque hoy se sabe que estos sistemas se encuentran reportados en organismos de varios reinos. En procariontes, como en las arqueobacterias *Halobacterium salinarum* (Rudolph y Oesterthelt 1985) y *Archaeoglobus fulgidus* (Klenck et al., 1997). Homólogos de SDC se han reportado en organismos eucariontes, como los hongos *Saccharomyces cereviceae* (Ota y

Varshavsky, 1993) y *Neurospora crassa* (Alex et al., 1996) en plantas como *Arabidopsis thaliana* (Chang et al. 1993), pero no se han encontrado en genomas de eucariontes superiores. Como cualquier vía de señalización, los SDC son esquemas modulares que involucran dominios conservados. Se han podido reconocer distintas clases de SDC: El sistema clásico u ortodoxo y el no ortodoxo. Los sistemas clásicos son los predominantes.

### Estructura de los Sistemas de Dos Componentes ortodoxos:



**Figura 1. Estructura de los Sistemas de Dos Componentes ortodoxos**

La figura 1 muestra un esquema básico de los SDC. En la cinasa sensora (CS) se encuentra presente el dominio responsable de la unión del ligando, mientras que generalmente el dominio de unión a DNA responsable del control de la transcripción está presente en el componente conocido como regulador de respuesta (RR) ( Stock A.M *et al.*, 2000)

Una CS típica posee un segmento N-terminal corto en la región citoplásmica, dos segmentos transmembranales que anclan a la proteína a la membrana, los cuales flanquean al

dominio sensor periplásmico. Este último, consta aproximadamente de 100 aminoácidos y es en éste donde generalmente se detectan los cambios en las condiciones ambientales específicas. El dominio transmisor se localiza en el citoplasma y se caracteriza por que en él se identifican residuos altamente conservados relacionados con su función catalítica, se encuentra un invariable residuo de histidina y es en éste donde se lleva a cabo la autofosforilación de la proteína. Se han identificado también, secuencias ricas en glicina en lo que se ha denominado caja G cuya función se sabe está relacionada a la unión del ATP a la cinasa. También se han identificado la caja N y la caja F aunque no se ha descrito su función (Parkinson *et al.* 1992).

Los RR son fosfotransferasas que como podemos observar en la figura 1 consisten de dos dominios: un dominio receptor conservado en el extremo amino terminal, el cual posee un residuo de aspartato altamente conservado, y un dominio efector en el extremo carboxilo terminal que frecuentemente está asociado a la unión al DNA para el control transcripcional de los genes que regula. Aunque algunos RR controlan diversas funciones como la regulación de la motilidad (Falke *et al.* 1997), la activación de cascadas de MAP cinasas (mitogen-activated proteins) (Maeda T. *et al.* 1994) y la modulación de niveles de nucleótidos ciclicos. (Thomanson P.A *et al.* 1998).

En las eubacterias son predominantes los sistemas de dos componentes cuya transferencia del grupo fosfato ocurre en los residuos His-Asp, mientras que en la mayoría de los eucariontes, donde se han descrito las cascadas de fosforilación, la señalización involucra residuos de los aminoácidos serina, treonina y tirosina (Ser/Thr/Tyr) (Stock *et al.* 2000).

#### **Sistemas de dos componentes ortodoxos:**

En un SDC típico, se supone que el dominio periplásmico de la CS es el sitio de recepción de la señal. La detección del estímulo externo conduce a cambios conformacionales en la CS que favorecen la autofosforilación de un residuo de histidina altamente conservado en el dominio transmisor citosólico, proceso que es dependiente de ATP. La CS fosforilada, cataliza la transfosforilación de un residuo de aspartato altamente conservado que se localiza

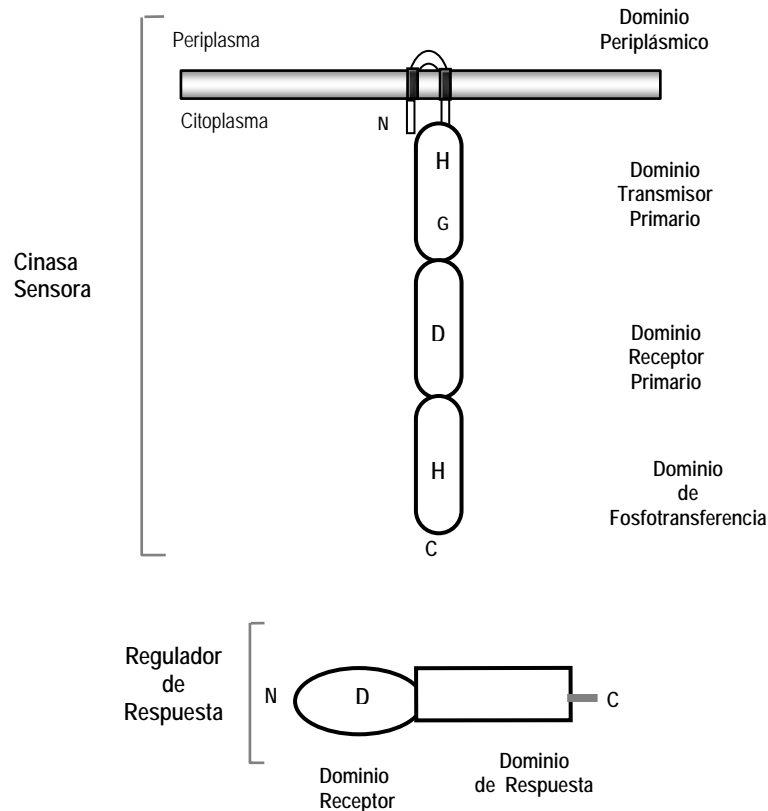
en el regulador de respuesta, el cual se vuelve funcional. Generalmente estos RR son factores transcripcionales con dominios efectores que se unen al DNA (Stock *et al.* 2000).

El decaimiento de la señal puede ocurrir, ya sea mediante la liberación hidrolítica espontánea del Pi del regulador de respuesta fosforilado o a través de la actividad fosfatasa de la CS por un proceso de fosforelevo reverso.

#### **Sistemas de dos componentes no ortodoxos:**

Como observamos en el esquema de la figura 2, muchos SDC son mucho más elaborados que el esquema descrito anteriormente. En estos sistemas la transmisión de la señal puede involucrar una CS híbrida, es decir, tanto el dominio transmisor como el dominio receptor se encuentran en una misma proteína. Como ejemplos de SDC que poseen cinasas atípicas encontramos a la cinasa BvgS de *Bordetella pertussis* que juega un papel importante en la colonización de este organismo en el aparato respiratorio de su hospedero (Uhl y Millar 1996), TorS que responde al trimetilamina N-óxido y relaciona los donadores de electrones exógenos para la respiración en condiciones de anaerobiosis (Jourlin et al., 1997).

El sistema Arc de *Escherichia coli* es un SDC no ortodoxo ya que ArcB, la cinasa sensora, es atípica por dos razones: por poseer un dominio periplásmico corto que no está involucrado en la recepción de la señal, y por contener tres dominios citosólicos catalíticos (dominio transmisor, dominio receptor y dominio de fosfotransferencia).



**Figura 2. Arquitectura del SDC ArcA/B**

**Descripción estructural del Sistema ArcA/B.**

El SDC Arc es un regulador global que permite a las bacterias anaerobias facultativas detectar las condiciones redox de crecimiento para adaptar su expresión genética y de acuerdo a esto ajustar su metabolismo.

El RR de este sistema de transducción de señales es la proteína ArcA (Fig 3). Es un regulador de respuesta típico que posee un dominio denominado D2 en el extremo N-terminal y un dominio hélice-vuelta-hélice (H-V-H) para la unión a DNA (Iuchi S. y Lin E.C., 1988). En el dominio receptor, los aminoácidos Glu 10, Asp 11, Asp 54 (D2) corresponden a aminoácidos altamente conservados que forman una estructura denominada “envoltura ácida” descrita en la estructura cristalográfica de la proteína CheY, y donde se reportó la presencia de un residuo de lisina (Lys 103) el cual se encuentra invariablemente en el extremo carboxilo terminal de todos los dominios receptores de las proteínas reguladoras de respuesta (Volz K. 1993).

El sistema Arc se conforma por la histidin-cinasa ArcB, que es una proteína tripartita híbrida de 77-kDa, la cual contiene en su extremo amino terminal dos dominios transmembranales denominados TM1 y TM2 que se encuentran unidos por una pequeña porción periplasmica de solo 16 aminoácidos (Iuchi S. *et al.* 1990) (Figura 4). Posteriormente encontramos la región "linker" la cual une la porción membranal de la proteína con la región catalítica. En esta porción de la cinasa, se encuentran dos estructuras cuya función no ha sido demostrada pero sin embargo se ha establecido identidad con dominios de otros organismos: se trata de un zipper de leucinas putativo y un dominio PAS también putativo. (Georgellis D. *et al.* 1998) (Taylor B.L. y Zulin I.B., 1999).

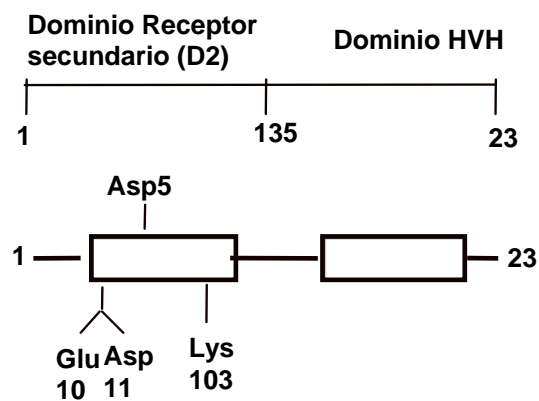


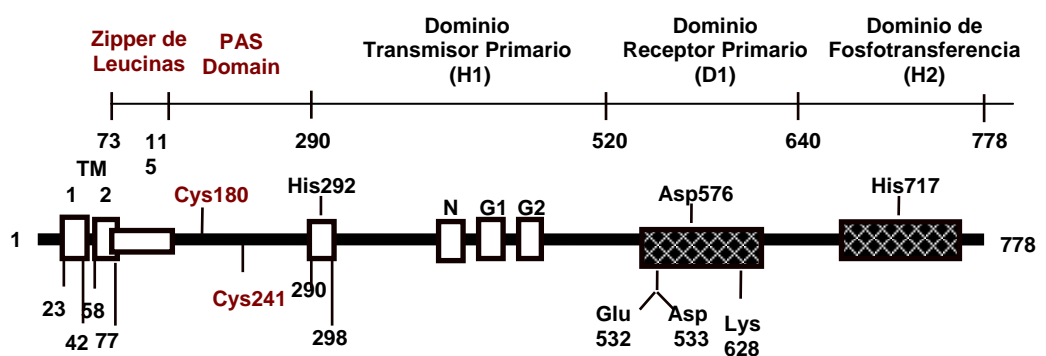
Figura 3. Estructura del regulador de respuesta ArcA

El motivo "ziper" de leucinas se caracteriza por ser una hélice anfipática que posee residuos de aminoácidos hidrofílicos en una cara mientras que en la cara opuesta se observan aminoácidos hidrofóbicos, cabe resaltar que esta estructura tiene 4 secuencias repetitivas de 7 aminoácidos donde cada primer aminoácido es una leucina. Esta estructura se ha asociado

con dimerización así como con unión a DNA. Sin embargo, la funcionalidad de este motivo se descartó por el grupo de Mizuno un estudio *in vitro*. (Matsushika A y Mizuno T., 2000).

Otro dominio que se ha postulado se encuentra presente en la estructura de ArcB pero no se ha caracterizado su funcionalidad es PAS. Éste es el acrónimo de los nombres de las proteínas que se identificaron con este motivo: PER (“period clock protein” de *Drosophila*), ARNT (“aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator” de vertebrados) y SIM (“single-minded protein” de *Drosophila*). Actualmente se sabe que los dos residuos de cisteínas involucrados en la recepción de la señal no forman parte de la secuencia consenso propuesta para este dominio, por lo que podemos decir que el dominio PAS putativo de ArcB no está involucrado en el proceso de señalización del sistema ArcA/B.

ArcB posee tres dominios citosólicos catalíticos: un dominio transmisor primario (H1) con un residuo de histidina conservado en la posición 292, donde también se distinguen una caja N, y 2 cajas G que se han determinado sirven para la unión al ATP; Un dominio central (D1) con un residuo de aspartato (Asp-576) altamente conservado y un dominio fosfotransmisor en el extremo carboxilo terminal con un residuo de histidina conservado en la posición 717 (Luchi et al., 1990,1992. Ishige et al., 1994) ArcB pertenece a la subclase de histidin-cinasas híbridas entre las que también se encuentran BarA, BvgS, EvgS, GacS, RteA y TorS (Arico B. et al. 1989).





#### Figura 4. Estructura de la cinasa sensora ArcB

##### Descripción funcional del sistema Arc

Como ya se mencionó anteriormente, la histidin-cinasa del sistema ArcB consta de un dominio periplásmico corto de 16 residuos a diferencia de los 150 aminoácidos que en promedio constituyen la región periplásmica de las cinasas sensoras comunes. Esta característica puso en duda el hecho de que en este dominio se llevara a cabo la recepción de la señal, hecho que Kwon y sus colaboradores clarificaron al concluir que la región transmembranal no participa en la señalización pero mantiene anclada a la proteína a la membrana citoplásmica para posiblemente, favorecer la interacción de ArcB con algún elemento de la cadena transportadora de electrones (Kwon O. *et al.*, 2000)

Se sabe que ArcB es activa como cinasa en la transición de condiciones de crecimiento aeróbicas a condiciones anaeróbicas (Kwon O. *et al.*, 2000a). Así también, ha sido demostrado que el oxígeno molecular no es la señal que promueve la actividad cinasa de ArcB, y durante mucho tiempo se sugirió que el sistema detectaba indirectamente la tensión de oxígeno (Iuchi S. y Lin E.C, 1988), pero Georgellis y sus colaboradores demostraron que ArcB posee 3 dominios catalíticos que han evolucionado como identidades autónomas para plegarse como unidades activas con o sin la unión de los dominios contiguos, esta característica de la proteína ha sido una importante herramienta que ha permitido el efectuar estudios *in vitro* que han contribuido a entender varios de los mecanismos de la transducción de señales (Georgellis D. *et al.* 1997) como veremos a continuación:

El sistema Arc opera a través reacciones en cadena His → Asp → His → Asp cuyo conjunto se ha denominado fosforrelevo (Kwon O. *et al.*, .2000b) (Georgellis D. *et al.* 1997).

Se cree que la condición de microaerobiosis o de total ausencia de oxígeno causa un cambio conformacional en ArcB que favorece la activación del funcionamiento de la proteína como cinasa. Una vez que ArcB es activa como cinasa se autofosforila en el residuo de histidina 292 aceptando el fosfato gamma del ATP ( Iuchi, S. y Lin E. C., 1992).

Actualmente en el laboratorio se están llevando a cabo experimentos cuyo resultado indica que esta autofosforilación es un evento que involucra una reacción intramolecular. El grupo fosforilo es transferido al residuo de aspartato 576 del dominio D1, entonces el grupo fosforilo puede pasar directamente hacia el residuo de histidina 717 del dominio H2 de modo reversible o puede transferirse irreversiblemente hacia H<sub>2</sub>O. Posteriormente el grupo fosfato se transfiere desde el residuo de histidina 717 hacia el residuo de aspartato 54 de ArcA (Georgellis et al 1997).

Como consecuencia, el incremento de ArcA-P reprime la síntesis de enzimas relacionadas con el metabolismo aerobio, como es el caso de varias enzimas del TCA como lo son: la succinato deshidrogenasa, la fumarasa, la piruvato deshidrogenasa, la malato deshidrogenasa. Además de estas deshidrogenasas se incluyen también la L-lactato deshidrogenasa, D-lactato deshidrogenasa, D-aminoácido deshidrogenasa las cuales están involucradas en reacciones que están relacionadas en el aporte de fuentes de carbono al TCA ( Iuchi y Lin 1988).

Resulta interesante destacar el hecho de que ArcA-P, reprime la expresión de la oxidasa terminal aeróbica citocromo *bo* oxidasa, mientras que activa la expresión de oxidasa terminal citocromo *bd* oxidasa codificada por el operón *cydAB*, la cual tiene una mayor afinidad por el oxígeno.

El sistema Arc también activa genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo fermentativo, tal es el caso del gen *pf*, que codifica para la enzima piruvato-formato liasa. Esta enzima está involucrada en la degradación del piruvato durante la fermentación (Iuchi y Lin 1991).

La observación de que la represión de ArcA-P en anaerobiosis por varios aceptores de electrones alternativos llevó a luchi y Lin que el oxígeno no era la señal directa sugiriendo que el estado redox de la poza de quinonas podría representar la señal redox. Posteriormente, Georgellis y colaboradores (Georgellis *et al.* 2001) demostraron que análogos solubles de la quinona como la ubiquinona-0 (Q<sub>0</sub>) o la menadiona (MK<sub>3</sub>) inhibían la autofosforilación de ArcB, mientras que las formas reducidas no lograban el mismo efecto. Lo que llevó a la conclusión de que el cambio de condiciones aeróbicas a microaeróbicas podría favorecer la acumulación de la forma reducida de las quinonas (quinoles) estimulando la autofosforilación de ArcB y por lo tanto la acumulación de ArcA-P.

Estudios recientes demostraron que la inhibición de la actividad cinasa de ArcB dependiente de quinona se debe principalmente a la formación de uno o dos enlaces disulfuro entre los monómeros de ArcB, donde las quinonas parecen actuar oxidando a los residuos de cisteína 180 y 241 (Cys-180 y Cys-241) (Malpica *et al.*, 2004). En la figura 5 observamos el modelo molecular actual que explica la inhibición de la actividad cinasa de ArcB. La forma oxidada de las quinonas oxida los tioles de los residuos Cys-180 y Cys-241 lo que involucra la dimerización de ArcB por la formación de dos enlaces disulfuro intermoleculares: el establecido entre los residuos Cys-180 de un par de monómeros, lo que resulta en la reducción de actividad cinasa de ArcB hasta en un 85%, y aunque en menor medida, se requiere de la formación de los puentes disulfuro establecidos entre los residuos Cys-241 para la total inhibición del sistema (Malpica *et al.*, 2004).

Una vez que cesa la señalización se produce el evento de desfosforilación, el cual da como resultado el silenciamiento del sistema.

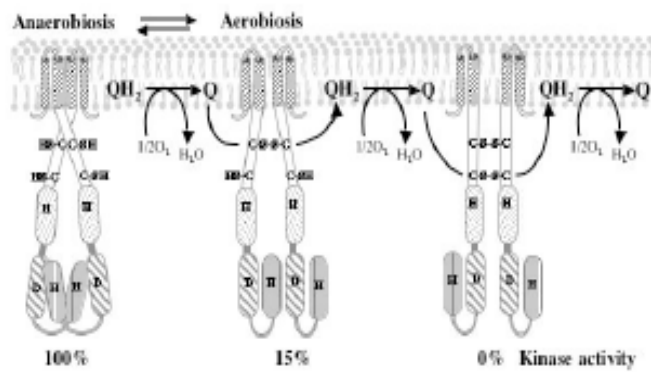


Figura 5. Esquema del mecanismo de inhibición molecular de la cinasa sensora ArcB

Como se mencionó anteriormente, la desfosforilación puede darse ya sea por la hidrólisis espontánea del regulador de respuesta fosforilado o puede ser un proceso catalizado por la cinasa sensora (Igo M.M *et al.* 1989). Sin embargo, en sistemas más complejos, fosfatasas específicas independientes están involucradas en el decaimiento de la señal (Perego M., 1997). En el caso del sistema Arc, la hidrólisis espontánea de ArcA-P puede considerarse casi nula en el evento de decaimiento de la señal. Mientras que en estudios *in vitro* (Georgellis D. *et al.* 1998) y recientemente en estudios *in vivo* por Peña y colaboradores (Peña-Sandoval *et al.*, 2005) demostraron que el decaimiento de la señal se efectúa a través de un proceso de fosforrelevo reverso.

En general, el sistema Arc media la regulación de operones relacionados con el metabolismo respiratorio, muchos de estos genes están corregulados por el factor de transcripción FNR (Fumarate and Nitrate Reduction). Se ha demostrado que FNR es un regulador global del metabolismo anaeróbico en *E. coli*, controlando la síntesis de más de 125 genes (Sawers, R.G., *et al.* 1988). Los genes del regulón ArcA/ArcB y el regulón FNR están sobrelapados, indicando que ambos regulones coordinan la expresión génica en la transición entre el crecimiento aeróbico y anaeróbico (Chao Shen *et al.* 1987). FNR activa la expresión de genes que en anaerobiosis utilizan un aceptor de electrones terminal alternativo como el

TAMAO, y reprime la expresión de genes con funciones aeróbicas. FNR es una proteína citosólica que consiste de un dominio de unión a DNA en el extremo carboxilo y un dominio sensor en el extremo amino terminal que contiene cuatro residuos de cisteína que pueden unir un cluster de  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  el cual funciona como un sensor directo de oxígeno (Unden G. y Bongaerts J., 1997) Estudios recientes demostraron que dos tercios de los genes que se ven afectados por FNR también se afectan por ArcA.

Estudios genéticos han permitido la identificación de cerca de 30 operones controlados por ArcA que están relacionados con el metabolismo redox ( Lynch, A. S., and E. C. Lin. 1996b).

Sin embargo, ahora se sabe que también controla otras funciones no relacionadas con el metabolismo aeróbico como la transferencia del plasmido F (luchi S.*et al.*, 1989), la recombinación sitio-específica de Xer en *psi* (Colloms S.D.*et al.* 1998) y la inhibición de la replicación cromosomal en *oriC* (Lee Y.S. *et al.* 2001). Estudios basados en técnicas de microarreglos han hecho predicciones de genes regulados por Arc con funciones muy diversas. Encontramos: genes asociados con la síntesis de flagelo (*fliMN* y *fliE*), con la división celular (*ftsZ*) y con la sobrevivencia inducida por el stress ( Liu X. y De Wulf P.,2004).

Resulta de interés que el sistema Arc se ha reportado está vinculado a funciones de virulencia en especies patógenas para el humano. Tal es el caso de *S. enterica* serovar Enteriditis (Lu *et al.*, 2002). De *H. influenzae* (De Souza- Hart *et al.*, 2003). Y *Vibrio cholerae* (Sengupta *et al.*, 2003).

La ventaja de las cinasas sensoras tripartitas como ArcB, de poseer una estructura tan elaborada, así como de un complejo mecanismo de fosfotransferencia, probablemente radica en la posibilidad de tener varios puntos de chequeo que permiten integrar mecanismos de multicontrol o de afinamiento en la señalización como lo es en el caso de ArcB.

En estudios previos Georgellis (Georgellis *et al.* 1999), evaluó los efectos de ciertos intermediarios metabólicos de la fermentación en la tasa de fosforilación de ArcB. Estas investigaciones se llevaron a cabo con la fracción citosólica (H1-D1-H2) de la proteína. Y se

observó que la presencia de D-lactato 1mM en la mezcla de reacción aumentó hasta tres veces la tasa neta de fosforilación del péptido a diferencia de lo que resultó al agregar acetato o piruvato, los cuales también afectan la fosforilación pero en un menor grado, demostrando que el D-lactato actúa directamente en la actividad de autofosforilación de ArcB. Por lo que decidimos corroborar con experimentación *in vivo* lo anterior, ya que de confirmarse estaríamos describiendo el primer ejemplo de modulación fisiológica en la actividad de autofosforilación de una cinasa sensora tripartita.

## ***Discusión y conclusiones:***

En condiciones de crecimiento anaeróbicas o microaeróbicas, *Escherichia coli* convierte la glucosa en una mezcla de productos metabólicos consistentes principalmente en acetato y formato así como pequeñas cantidades de lactato, succinato y etanol (Chatterjee et al., 2001; Clark, 1989). Estos productos tienen diferentes estados de oxidación y a través del ajuste de las proporciones de cada uno de los compuestos producidos, *E. coli* puede modular su metabolismo para crecer en distintas fuentes de carbono (Sawers and Böck, 1988).

A excepción del succinato, todos los productos de la fermentación se forman a partir del piruvato, y el piruvato tiene un papel central en la regulación del metabolismo (Yang et al., 2001).

La distribución de la poza de piruvato para la producción de ácidos orgánicos está altamente controlada. En *E. coli*, la expresión de los genes que codifican para las enzimas que catalizan tanto los procesos de fermentación como los de respiración se encuentran bajo el control de los reguladores globales FNR y el SDC ArcA/B. Estos reguladores transcripcionales detectan el estado redox de algunos intermediarios de los procesos de respiración y activan o reprimen genes relacionados con enzimas de procesos fermentativos o respiratorios. Se sabe que FNR responde a la relación intracelular de  $[Fe^{2+}/Fe^{3+}]$  estrictamente en condiciones anaeróbicas, mientras que el sistema ArcA/B es activo incluso en condiciones microaerofílicas.

Como ya mencionamos, ArcB pertenece a la subfamilia de CS tripartitas que poseen tres dominios catalíticos que participan en reacciones de fosforrelevo tanto para la transmisión de la señal como para el decaimiento de la misma. Esta elaborada arquitectura y el complejo mecanismo de transferencia del grupo fosforilo, sugieren que estas CS poseen diversos niveles de control que podrían modular su actividad.

Previamente se reportó que *in vitro*, la tasa de autofosforilación del dominio transmisor primario de ArcB aumentaba hasta tres veces en presencia de D-lactato, en comparación con el nivel basal de autofosforilación. Con el fin de conocer si el incremento en la actividad de ArcB en presencia del D-lactato ocurre en condiciones fisiológicas construimos una cepa mutante en la cual la concentración intracelular de D-lactato dependiera únicamente de una fuente exógena, para lo que fue necesario el considerar los siguientes aspectos del metabolismo del D-lactato en el diseño de la cepa mutante:

Durante la fermentación de la glucosa el D-lactato se forma por una oxidoreductasa ligada a NAD codificada por el operón monocistrónico *ldhA* en el minuto 30.5. En condiciones anaeróbicas el D-lactato puede extraerse del medio por los transportadores de membrana LldP (L-lactato permeasa) y GlcA (glicolato permeasa) (Núñez M. *et al.* 2002). El D-lactato capturado puede reconvertirse a piruvato por una deshidrogenasa dependiente de FAD (flavin adenin dinucleotido) codificada por el operón monocistrónico *dld* en el minuto 47.9.

Con estas consideraciones se creó una cepa cuyo genotipo es  $\Delta dld \Delta ldhA$  y también posee una fusión  $\lambda \phi(cydA'-lacZ)$ , además del alelo  $\Delta fnr::Tn9$  (Cm<sup>r</sup>) para evitar la represión del reportero por Fnr (Cotter P.A., *et al* 1997).

Para comprobar la capacidad de la cepa mutante  $\Delta dld \Delta ldhA$  de acumular pero de no metabolizar D-lactato se hicieron ensayos de captura de D-lactato marcado radiactivamente con carbono 14. Se determinó la cantidad de D-lactato intracelular. Donde se encontró que la cepa mutante era capaz de acumular D-lactato marcado en un gradiente de concentración (concentración intracelular / concentración extracelular) mayor de 16. Se observó que la captura de D-lactato en células crecidas en condiciones anaeróbicas era cerca de tres veces menor que la captura en células crecidas en condiciones aeróbicas. (Tabla1) Esto quizá se explica por el hecho de la expresión del gen *lldP* (L-lactato permeasa) se inhibe por el sistema ArcA/B en condiciones



de crecimiento anaeróbicas (Iuchi *et al.*, 1994), y por lo tanto la captura del D-lactato únicamente se efectúa a través de la enzima glicolato permeasa (GlcA).

La incapacidad de metabolizar D-lactato por la cepa mutante construida se verificó comparando la actividad de D-lactato deshidrogenada tanto en la cepa mutante como en la cepa isogénica silvestre.

Tabla1. Captura de D-lactato

Condiciones de crecimiento <sup>a</sup>	+O <sub>2</sub>		-O <sub>2</sub>	
	30 sec	5 min	30 sec	5 min
Concentración <sup>b</sup> (μM)	23.3	67.5	8.7	23.7

Nuestros resultados descartan la posibilidad que el D-lactato pudiera ser una señal a través de la cual ArcB detecta ambientes anaeróbicos *in vivo*. Esta afirmación se basa en las siguientes observaciones:

Primero, en condiciones de crecimiento aeróbicas la presencia del D-lactato no tiene influencia en la expresión del reportero activado por ArcA-P  $\phi$ (*cydA*'-lacZ) lo que sugiere que ArcB permanece inactivo.

Segundo, aunque el D-lactato no tiene influencia en la actividad de ArcB en condiciones no estimulantes, la presencia de este metabolito incrementa la actividad de ArcB dependiente de DTT en aerobiosis. El agente reductor ditioneitol (DTT) es capaz de activar ArcB en condiciones de crecimiento aeróbicas, este hecho, nos proporcionó una pista sobre el mecanismo de activación de ArcB. Cabe mencionar que en un ensayo similar se probó el efecto del glutati6n, el cual es también un potente agente reductor pero cuyo tama1o es mayor que el del DTT por lo que no puede

penetrar la membrana citoplásmica y por lo tanto, es incapaz de activar al sistema Arc en condiciones de crecimiento aeróbicas.

Este resultado nos llevó a pensar que la porción citoplásmica de ArcB controla mediante reacciones reversibles de oxido-reducción la activación del sistema. Los únicos aminoácidos en la secuencia de la porción citoplásmica de la proteína susceptibles a ser reversiblemente oxidados o reducidos, resultaron ser un par de residuos de cisteína (180 y 241). Ensayos de fosforilación *in vitro* efectuados en la fracción citoplásmica de ArcB extraída en condiciones nativas y en ausencia de cualquier agente oxidante, mostraron que como esperábamos, ArcB era activa como cinasa y al agregar DTT a la mezcla de reacción se observó un incremento en la tasa de fosforilación, indicando que la proteína podía reducirse de manera reversible. Por otro lado, el hecho de que la fosforilación de ArcB se inhibe al agregar agentes oxidantes a la mezcla de reacción, como la cloramina T, demostraron que la actividad cinasa de ArcB es sensible a la oxidación (Malpica *et al* 2004).

Y tercero, estudios previos demostraron que la extracción de la fracción citoplásmica de ArcB resulta una cinasa parcialmente activa. Tomando esto en consideración, decidimos evaluar el efecto del D-lactato en la actividad cinasa de la versión trunca de la proteína en condiciones de crecimiento aeróbicas. Para fines prácticos a esta fracción se le denominó ArcB<sup>cyt</sup>, ya que carece de los segmentos transmembranales que le anclan a la membrana citoplásmica.

Esta valoración se llevó a cabo comparando la cepa isogénica que conservaba la versión completa de ArcB (*arcB+*) y observamos que la expresión del gen reportero es considerablemente mayor en la cepa mutante que en la cepa silvestre para ArcB, confirmando que en aerobiosis ArcB<sup>cyt</sup> es parcialmente activa como cinasa. Cuando se adicionó al medio de cultivo D-lactato, vimos dos tipos de respuesta. Por un lado, la cepa que contenía la versión completa de ArcB no observó cambio alguno, mientras que la cepa cuyo alelo contenía la versión trunca de la proteína, la presencia de D-lactato resultó en un incremento inmediato en la expresión del reportero. Estas

observaciones apoyaron nuestra conclusión de que el D-lactato acelera la actividad cinasa de ArcB *in vivo*, sí y solo sí ésta se encuentra en estado activo.



## ***Perspectivas:***

Podemos señalar básicamente dos puntos, el primero es la identificación tanto de los requerimientos estructurales de la proteína como de los mecanismos de reacción de los efectores. Aunque no se ha esclarecido el mecanismo mediante el cual el D-lactato modula la actividad de ArcB, cabe mencionar que la presencia del dominio receptor (D1), aún siendo catalíticamente inactivo, es indispensable para que el D-lactato ejerza su efecto *in vitro* (Georgellis *et al* 1999). Este hecho sugiere que el sitio de unión del efector se encuentra en D1 o que la presencia estructural de D1 permite al efector unirse al dominio transmisor primario de ArcB (H1). El residuo de aspartato 576 es el que recibe el grupo fosforilo del residuo de histidina His 292 ( Georgellis *et al* 1997).

Si la autofosforilación del dominio H1 es el paso limitante en la cascada de transducción de ArcB, el fosforrelevo es el único medio por el que ArcA es fosforilado por ArcB, entonces, aumentando la  $V_{max}$  de la reacción de autofosforilación con D-lactato debería de ser suficiente para tener el nivel de ArcA-P. Tal proceso debe ser ventajoso para la célula ya que el D-lactato se acumula en condiciones de crecimiento anaeróbicas, asegurando la máxima actividad cinasa de ArcB. La aceleración de la actividad cinasa de ArcB por efectores alostéricos como el D-lactato deban responder de forma rápida a los cambios en las condiciones redox y por tanto una adaptación más rápida al nuevo ambiente.

También una respuesta más rápida garantiza un modo de crecimiento más económico, como que las enzimas no necesarias se repriman inmediatamente.

Por otro lado resulta interesante investigar si existen otros elementos que influyeran la transmisión de la señal o el decaimiento de la misma.



## ***Bibliografía:***

Alam, K. Y., and D. P. Clark. *J. Bacteriol.* **171**:6213-6217. "Anaerobic fermentation balance of *Escherichia coli* as observed by in vivo nuclear magnetic resonance spectroscopy". (1989).

Alex L.A., Borkovich K.A., Simon M.I., *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8, 3416-3421 "Hyphal development in *Neurospora crassa*: Involvement of a two-component histidine kinase". (1996).

Arico B., Miller J.F., Roy C., Stibitz s., Monack D., Falkow S., Gross R. and Rappapoli R. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:6671-5. "Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins". (1989).

Bauer, C. E., S. Elsen, and T. H. Bird. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**:495-523. "Mechanisms for redox control of gene expression". (1999).

Bunch P.K., Fairouz M.J., Norizan L., Clark P.D. *Microbiology* **143**:187-195. "The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*". (1997).

Burbulys, D., K. A. Trach, and J. A. Hoch. *Cell* **64**:545-552. "The initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay". (1991).

Buxton RS and Drury LS. *Mol Gen Genet* **194**: 241-7. "Identification of the *dye* gene product, mutational loss of which alters envelope protein composition and also affects sex factor F expression in *Escherichia coli* K-12". (1984).

Clark, D.P. *FEMS Microbiol Rev* **63**, 223-234 "The fermentation pathways of *Escherichia coli*". (1989).

Colloms S.D., Alen C. and Sherratt D.J. *Mol Microbiol* **28**:521-30 "The ArcA/ArcB two component regulatory system of *Escherichia coli* is essential for Xer site specific recombination at *psi*". (1998).

Cotter, P. A., S. B. Melville, J. A. Albrecht, and R. P. Gunsalus. *Mol. Microbiol.* **25**:605-615. "Aerobic regulation of cytochrome *d* oxidase (*cydAB*) operon expression in *Escherichia coli*: roles of Fnr and ArcA in repression and activation". (1997).

Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM. *Science*. **22;262** (5133):532. Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. (1993).

[Chao G, Shen J, Tseng CP, Park SJ, Gunsalus RP. \*J Bacteriol.\* \*\*179\*\*\(13\):4299-304. "Aerobic regulation of isocitrate dehydrogenase gene \(\*icd\*\) expression in \*Escherichia coli\* by the \*arcA\* and \*fnr\* gene products". \(1997\).](#)

Chatterjee R., C.S. Millard, K. Champion, D.P. Clark and M.I. Donnelly *Appl. Environ. Microbiol.* **67** 148–154. "Mutation of the *ptsG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli*". (2001).

De Souza-Hart JA, Blackstock W, Di Modugno V, Holland IB, and Kok M. *Infect Immun* **71**: 163-72. "Two component systems in *Haemophilus influenzae*: a regulatory role for ArcA in serum resistance". (2003).

Falke, J.J, Bass, R.B., Butler, S.L., Chervitz, S and Danielson, M.A. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13** 457-512 "The two component signalling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes". (1997).

Georgellis, D., A. S. Lynch, and E. C. Lin. *J. Bacteriol.* **179**:5429-5435. " In vitro phosphorylation study of the Arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*". (1997).

Georgellis, D., O. Kwon, P. De Wulf, and E. C. Lin. *J. Biol. Chem.* **273**:32864-32869. "Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system". (1998).

Georgellis, D., O. Kwon, and E. C. Lin. *J. Biol. Chem.* **274**:35950-35954 "Amplification of signaling activity of the Arc two-component system of *Escherichia coli* by anaerobic metabolites. An in vitro study with different protein modules". (1999).

Georgellis, D., O. Kwon, and E. C. Lin. *Science* **292**:2314-2316. "Quinones as the redox signal for the Arc two-component system of bacteria". ( 2001).

Gunsalus R. P., Park S.J. In: Bacterial sensor kinase/Response regulator systems. IV Electron transport regulation. 12<sup>th</sup> Forum in Microbiology.

Igo M.M., Ninfa A.J., Stock J.B and Silhavy T.J. *Genes Dev* **3**:1725-34 "Phosphorylation and dephosphorylation of a bacterial transcriptional activator by a transmembrane receptor". (1989).

Iuchi, S., and E. C. C. Lin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:1888-1892. "*arcA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways". (1988).



Iuchi S., Furlong D. yLin E.C. *J Bacteriol* **171**:2889-93, "Differentiation of *arcA*, *arcB* y *cpxA* mutant phenotypes of *Escherichia coli* by sex pilus formation and enzyme regulation". (1989).

Iuchi, S., Z. Matzuda, T. Fujiwara, and E. C. Lin. *Mol. Microbiol.* **4**:715-727 "The *arcB* gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the *arc* modulon". (1990).

Iuchi, S., and E. C. C. Lin. *Cell* **66**: 5-7 "Adaptation of *Escherichia coli* to respiratory conditions: regulation of gene expression". (1991).

Iuchi, S., and E. C. C. Lin. *J. Bacteriol.* **174**:3972-3980. "Mutational analysis of signal transduction by ArcB, a membrane sensor protein responsible for anaerobic repression of operons involved in the central aerobic pathways in *Escherichia coli*". (1992).

Iuchi, S. *J. Biol. Chem.* **268**:23972-23980. "Phosphorylation/dephosphorylation of the receiver module at the conserved aspartate residue controls transphosphorylation activity of histidine kinase in sensor protein ArcB of *Escherichia coli*". (1993).

Iuchi, S., A. Aristarkhov, J. M. Dong, J. S. Taylor, and E. C. C. Lin. *J. Bacteriol.* **176**:1695-1701 "Effects of nitrate respiration on expression of the Arc-controlled operons encoding succinate dehydrogenase and flavin-linked L-lactate dehydrogenase". (1994).

Ishige, K., S. Nagasawa, S. Tokishita, and T. Mizuno. *EMBO J.* **13**:5195-5202 "A novel device of bacterial signal transducers". (1994).

Jourlin, C. Ansaldi, M. and Méjean, V. *J. Mol. Biol.* **267**: 770-777. "Transphosphorylation of TorR response regulator requires the three phosphorylation sites of the TorS sensor in *Escherichia coli*". (1997).

Kang, S. Y. *J Bacteriol.* **136**:867-873. "Mechanism of autoenergized transport and nature of energy coupling for d-lactate in *Escherichia coli*". (1978).

Koshland DE Jr. *Science.* **22**:262(5133):532. "The two-component pathway comes to eukaryotes". (1993).

Kuritzkes, D. R., X. Y. Zhang. And E. C. C. Lin. *J. Bacteriol.* **157**: 591-598 "Use of  $\Phi(glp-lac)$  in studies of respiratory regulation of the *Escherichia coli* anaerobic *sn*-glycerol-3-phosphate dehydrogenase genes (*glpAB*)". (1984).

Kwon, O., D. Georgellis, A. S. Lynch, D. Boyd, and E. C. Lin. *J. Bacteriol.* **182**:2960-2966 "The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli* genetic exploration of the transmembrane region". (2000a).

Kwon, O., D. Georgellis, and E. C. Lin. *J. Bacteriol.* **182**:3858-3862. "Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the Arc two-component system of *Escherichia coli*". (2000b).

Lee Y.S., Han J.S and Hwang D. S. *J Biol Chem* **276**:9917-23 "The arc two-component signal transduction system inhibits *in vivo* *Escherichia coli* chromosomal initiation". (2001).

Liu X. and De Wulf P. *J. Biol Chem* **279**:12588-97 "Probing the Arc-P modulon of *Escherichia coli* by whole genome transcriptional analysis and sequence recognition profiling". (2004).

Link, A. J., D. Phillips, and G. M. Church. *J. Bacteriol.* **179**:6228-6237. "Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization". (1997).

Lu S, Killoran PB, Fang FC, and Riley LW. *Infect Immun* **70**: 451-61. "The global regulator ArcA controls resistance to reactive nitrogen and oxygen intermediates in *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*". (2002).

Lynch, A. S., and E. C. Lin. "Responses to molecular oxygen" p. 1526-1538. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella : cellular and molecular biology*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1996).

Lynch, A. S., and E. C. Lin. *J. Bacteriol.* **178**:6238-6249. "Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*. characterization of DNA binding at target promoters". (1996).

Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M and Saito, H. *Nature* **369**, 242-245 "A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast". (1994).

Maloney, P. C., E. R. Kashket, and T. H. Wilson. "Methods for studying transport in bacteria, p. 1-49. In E. D. Korn (ed.), *Methods in membrane biology*, vol. 5. Plenum, New York, N.Y." (1996).

Malpica R, Franco B, Rodriguez C, Kwon O, and Georgellis D. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 13318-23. "Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase". (2004).

Matsushika, A., and T. Mizuno. *J. Biochem (Tokyo)* **127**:855-860. "Characterization of three putative sub-domains in the signal-input domain of the ArcB hybrid sensor in *Escherichia coli*". (2000).

Miller, J. H. Experiments in molecular genetics, p. 352-355. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1972).

Nixon B.T., Ronson C. W and Ausubel F.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 7850-4. "Two component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC* ". (1986).

Núñez, M. F., O. Kwon, T. H. Wilson, J. Aguilar, L. Baldoma, and E. C. Lin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**:824-829. "Transport of l-lactate, d-lactate, and glycolate by the LldP and GlcA membrane carriers of *Escherichia coli*". (2002).

[Ota IM, Varshavsky A. \*Science\*. \*\*22\*\*;262\(5133\):566-9. "A yeast protein similar to bacterial two-component regulators". \(1993\).](#)

Parkinson J.S. and Kofoid E.C *Annu Rev Genet* **26**: 71-112,"Comunication modules in bacterial signaling proteins". (1992).

Perego M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 8612-7. "A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay". (1997).

Peña-Sandoval GR, Kwon O. and Georgellis D. *J. Bacteriol* **187**: 3267-72. " Requeriment of the receiver and phosphotransfer domains of ArcB for efficient dephosphorylation of phosphorylated ArcA *in vivo*". (2005).

Posas, F., S. M. Wurgler-Murphy, T. Maeda, E. A. Witten, T. C. Thai, and H. Saito. *Cell* **86**:865-875. "Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor". (1996).

Rudolph,J. and Oesterhelt, D. *EMBO J* **14**: 667-673."Chemotaxis and phototaxis require a CheA histidine kinase in archaon *Halobacterium salinarum*". (1995).

Salmon K., Hung S.P., Mekjian K., Hatfield G. W. and Gonsalus R.P. *J Biol Chem* **278**:29837-55. "Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: The effects of oxygen aviability and FNR". (2003).

Salmon K., Hung S.P., Steffen N.R., Krupp R., Baldi P., Hatfield G. W. and Gonsalus R.P. *J Biol Chem* **280**:15084-96 "Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: The effects of oxygen availability and ArcA." (2005).

Sengupta N, Paul K, and Chowdhury R. *Infect Immun* **71**: 5583-9. "The global regulator ArcA modulates expression of virulence factors in *Vibrio cholerae*". (2003).

Sawers G., Zehelein, E. and Böck, A. *Arch. Microbiol.* **149**, 240–244. "Two-dimensional gel electrophoretic analysis of *Escherichia coli* proteins: influence of various anaerobic growth conditions and the *fnr* gene product on cellular protein composition". (1988).

Sawers G. and Böck A., *J. Bacteriol.* **170** 5330–5336. "Anaerobic regulation of pyruvate formate-lyase from *Escherichia coli* K-12". (1988).

Stock A.M., Robinson V., Goudreau P. *Annu.Rev. Biochem.* 69:183-215."Two Component Signal Transduction". (2000).

Stock JB., Stock A.M and Mottonen, J.M. *Nature* **344**, 395-400. "Signal transduction in bacteria" (1990).

Taylor B.L. and Zhulin I.B. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 479-506."PAS domains: internal sensors of oxygen redox potential and light". (1999).

Thomason, P. A. *et al. EMBO J.* **17**, 2838-2845 "An intersection of the cAMP/PKA and two-component signal transduction systems in *Dictyostelium*". (1998).

Uhl, M. A., and J. F. Miller. *EMBO J.* **15**:1028-1036 "Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay". (1996).

Uden G. and Bongaerts J. *BiochimBiophys Acta* **1320**: 217-34. "Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors". (1997).

Volz K. *Biochemistry* **32**: 11741-53 "Structural conservation in the CheY superfamily", (1993).

White D. Fermentations. *The physiology and Biochemistry of Prokaryotes*, pp 272-293. New York. Oxford University Press (1995).

Wilson TH and Lin EC. *J Supramol Struct* **13**: 421-46. "Evolution of membrane bioenergetics". (1980).

Yang YT and G.N. Bennett and K.Y. San. *Metab. Eng.* **3** 115–123 “The effects of feed and intracellular pyruvate levels on the redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli*”. (2001).

Zhang , C,-C. *Mol. Microbiol.* **20**, 9-15.”Bacterial signalling involving eukaryotic-type protein kinases”. (1996).