

ARC B: EL SENSOR DEL ESTADO REDOX EN BACTERIAS

Luis Alberto Núñez-Oreza^{1,2*}, Dimitris Georgellis¹
y Adrián F. Álvarez¹

¹Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Deleg. Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F.

²Laboratorio de Microbiología, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Autónoma de Campeche. Av. Patricio Trueba Regil, San Francisco de Campeche, C.P. 24090, Campeche, México, E-mail: *lanoreza@hotmail.com.mx

RESUMEN

El sistema de dos componentes Arc está compuesto por la cinasa sensora ArcB y por el regulador de respuesta ArcA. En *Escherichia coli*, este sistema regula la red transcripcional implicada en el metabolismo energético, acorde a las condiciones de óxido-reducción del medio. En condiciones anóxicas de crecimiento, ArcB se autofosforila y transfosforila a ArcA, el cual reprime o activa la expresión de sus operones blanco. En condiciones aeróbicas, ArcB actúa como una fosfatasa, catalizando la defosforilación de ArcA-P e inactivándolo como regulador transcripcional. Esta revisión describe las principales propiedades estructurales de ArcB y los eventos trascendentales que ocurren en la señalización por Arc, incluyendo la percepción de la señal y la regulación de la actividad cinasa. Además, compara la secuencia de ArcB de *E. coli* con la de homólogos en otras bacterias, revelando similitudes y diferencias que pueden ser de gran importancia en la regulación de esta proteína sensora.

Palabras Clave: ArcB, cinasa sensora, fosforilación, quinonas, regulación redox.

ABSTRACT

The Arc two-component system comprises the sensor kinase ArcB and the response regulator ArcA. In *Escherichia coli*, this system regulates the transcriptional network involved in energy metabolism according to the redox conditions of their environment. Under anoxic growth conditions, ArcB autophosphorylates and transphosphorylates ArcA, which in turn represses or activates the expression of its target operons. Under aerobic conditions, ArcB acts as a phosphatase that catalyzes the dephosphorylation of ArcA-P and thereby releasing its transcriptional regulation. This review describes the key structural features of ArcB, and the main events for Arc signaling, including signal reception and kinase regulation. It also compares the ArcB sequence of *E. coli* with the one of other bacteria and reveals similarities and differences that may be of foremost importance for the regulation of this sensor kinase protein.

Key Words: ArcB, sensor kinase, phosphorylation, quinones, redox regulation.

INTRODUCCIÓN

La capacidad de responder a variaciones en las condiciones del medio ambiente es vital para el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. La detección de estos cambios y el procesamiento de la respuesta están a cargo de circuitos moleculares en la célula que detectan, amplifican e integran señales externas en una respuesta específica. En organismos procariontes como las bacterias, estos

circuitos moleculares están generalmente organizados en pares de proteínas: una cinasa sensora (CS) y una reguladora de la respuesta (RR), que conforman la gran familia de sistemas de dos componentes (SDC). Estos sistemas, además de estar presentes en bacterias, se encuentran ampliamente distribuidos en organismos eucariotas como hongos y plantas, aunque su organización y arquitectura difiere en muchos aspectos de los sistemas bacterianos. El número de SDC por célula varía desde unos pocos hasta varios cientos en los diferentes organismos, y regulan diversos procesos celulares como metabolismo

Nota: Artículo recibido el 31 de marzo de 2014 y aceptado el 15 de septiembre de 2014.

energético, motilidad, formación de biopelículas, *quorum sensing*, reconocimiento de hospederos, respuesta a estrés o virulencia^{1,2}.

En un SDC bacteriano típico, la CS se encuentra anclada a la membrana interna mediante dos dominios transmembranales en su extremo amino-terminal, mientras que el extremo carboxilo-terminal, que se proyecta hacia el citosol, contiene un dominio transmisor que se caracteriza por tener un sitio de unión a ATP y un residuo de histidina (His) conservado³. Por su parte, el RR es una proteína citosólica que tiene en su extremo amino-terminal un dominio receptor, con un residuo de aspartato (Asp) conservado, y en el extremo carboxilo-terminal, un dominio hélice-vuelta-hélice (HVH) de unión al ADN, mediante el cual se une a secuencias específicas en sus promotores blanco, regulando así su expresión.

La señalización en un SDC prototipo, inicia por la captación de una señal específica por la CS, que se activa como cinasa, propiciando su autofosforilación en el residuo de His del dominio transmisor. Posteriormente, el grupo fosforilo es rápidamente transferido al Asp del dominio receptor de su correspondiente proteína reguladora de respuesta. De esta forma, la propagación de la señal de la cinasa al RR mediante su fosforilación, genera su activación como regulador transcripcional³⁻⁵. Sin embargo, existen numerosas variaciones en cuanto a arquitectura y funcionamiento en los SDC bacterianos con respecto a un sistema típico. En muchos casos, la señalización mediante fosforilación es más compleja, involucrando transferencias secuenciales del grupo fosforilo entre diferentes dominios de la CS (CS híbridas) antes de ser transferido al RR. *Escherichia coli* tiene cuatro CS híbridas, BarA, EvgS, TorS y ArcB, con una estructura un poco más compleja que las CS típicas, conteniendo tres dominios catalíticos. La CS ArcB forma parte del sistema Arc, que regula el metabolismo energético de acuerdo a las condiciones redox del medio⁶⁻¹⁰.

Esta revisión tiene como propósito describir las principales propiedades estructurales y funcionales de la proteína ArcB de *E. coli* y los eventos involucrados en la percepción de la señal y regulación de su actividad de cinasa. Se abordan eventos históricos que llevaron a la generación de un modelo de regulación de ArcB simplificado que se adapta a los datos experimentales. Asimismo, se infieren similitudes y diferencias en el mecanismo de regulación de ortólogos de ArcB en otras γ -Proteobacterias de acuerdo a la conservación de determinados motivos.

EL SISTEMA DE DOS COMPONENTES ARC B/A

El SDC ArcB/A de *E. coli* regula la expresión de más de 300 operones¹¹⁻¹³, controlando principalmente genes involucrados en el metabolismo energético, acorde a las condiciones redox de crecimiento. El sistema Arc está formado por la proteína RR "ArcA" y por la CS "ArcB". Su nombre proviene del

acrónimo "Anoxic Redox Control", porque regula la expresión de numerosas enzimas involucradas en el crecimiento aeróbico/anaeróbico de las células procariotas. La proteína ArcA, es un típico regulador de respuesta de 238 aminoácidos (29kDa), que contiene un dominio receptor en el extremo amino terminal y un dominio Hélice-Vuelta-Hélice (H-V-H) en el extremo carboxilo-terminal¹¹. En contraste, ArcB es una proteína de 778 aminoácidos (88 kDa), unida a la membrana interna de la célula a través de dos segmentos transmembranales, que están separados por un puente periplásmico muy pequeño de tan sólo 16 aminoácidos^{7,14}. Después del segundo segmento transmembranal, en la porción citosólica de la proteína, se localiza una región *linker* que contiene un *zipper* de leucinas necesario para la apropiada funcionalidad de la cinasa¹⁵ y un dominio PAS¹⁶, que se continúa por tres dominios catalíticos citosólicos, típicos de las cinasas híbridas o tripartitas, denominados transmisor primario (H1), receptor (D1) y transmisor secundario (H2) o de fosfo-transferencia (HPt)² (Fig. 1A). El dominio H1 contiene la caja H donde se localiza un residuo de histidina conservado en la posición 292 y las cajas G1 y G2 que conforman el sitio de unión de ATP^{3,17}; en el dominio D1 se encuentra el residuo Asp576, aceptor del grupo fosforilo; y por último el dominio H2 o HPt presenta una histidina conservada en la posición 717 que participa en la transferencia del grupo fosforilo a la proteína ArcA (Fig. 1A)^{14,18}.

Cuando las células de *E. coli* se encuentran en condiciones microaeróbicas o anaeróbicas, ArcB se activa como cinasa y se autofosforila en el residuo His292 del dominio H1, a expensas de ATP (Fig. 1B). Es importante mencionar que, aunque como todas las CS, ArcB se encuentra y funciona como homodímero, la reacción de autofosforilación ocurre en *cis*, es decir la misma molécula de ArcB que une el ATP es la que se fosforila (fosforilación intramolecular)¹⁹. Posteriormente, el grupo fosforilo es transferido al Asp576 del dominio D1, luego a la His717 del dominio HPt y finalmente al residuo Asp54 del dominio receptor de ArcA, en un proceso denominado fosforelevo (His-292→Asp-576→His-717→Asp-54)^{8,20,21} (Fig. 1B). La proteína reguladora ArcA fosforilada (ArcA-P) es capaz de unirse a secuencias específicas en el ADN, reprimiendo la expresión de muchos operones y genes involucrados en la respiración aeróbica y activando genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo fermentativo^{11,14,22,23}. En condiciones aeróbicas ArcB se inactiva como cinasa pero adquiere actividad fosfatasa, catalizando la defosforilación de ArcA-P vía un fosforelevo reverso Asp-54→His-717→Asp-576→Pi, donde el grupo fosforilo es liberado como fosfato inorgánico (Fig. 1B), inactivando a ArcA como regulador transcripcional y silenciando, por ende, el sistema^{24,25}.

En diferentes trabajos se propuso la participación de componentes adicionales en la señalización del sistema ArcB/A. En un principio, se sugirió que otra cinasa sensora de identidad desconocida era capaz de fosforilar la His717 de ArcB,

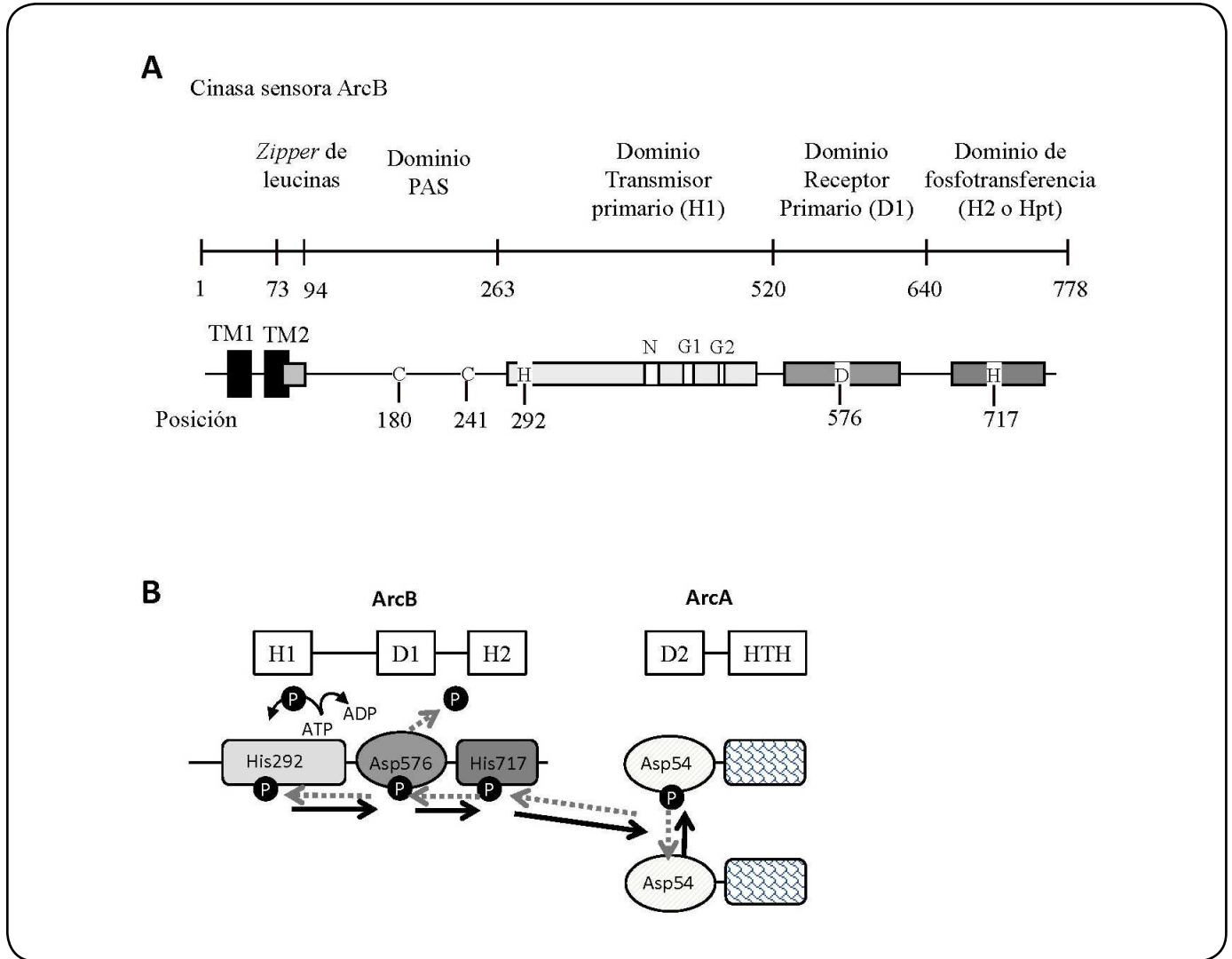


Figura 1. A. Representación esquemática de la cinasa sensora ArcB. B. Representación esquemática de las reacciones de fosforilación de ArcB. Flechas sólidas indican la vía de transferencia del grupo fosforilo que resulta en ArcA-P; flechas punteadas representan el fosforelevo reverso que resulta en la defosforilación de ArcA-P.

representando una vía alternativa de activación del sistema¹⁸. En el mismo reporte y en trabajos posteriores del mismo grupo, se demostró mediante ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, la transferencia del grupo fosforilo directamente del residuo His292 de ArcB al Asp54 de ArcA, como ocurre en una CS típica que contiene sólo un dominio catalítico^{26,27} y se propuso que ambas vías de transferencia del grupo fosforilo respondían a diferentes estímulos, convirtiendo a ArcB en un sensor “dual”²⁷. Sin embargo, si bien la fosforilación directa de ArcA mediante ArcB fosforilado en la His292 ocurre *in vitro*, su importancia fisiológica fue desestimada posteriormente mediante estudios *in vivo* en los que el gen *arcB* fue reemplazado en el cromosoma de *E. coli* por *arcB* 1–520 (conteniendo sólo H1), *arcB* 1–661 (conteniendo H1 y D1), *arcB* 1–661D576A (conteniendo H1 y

D1, con el Asp576 sustituido por Ala), o *arcBD576A H717Q* (ArcB completo pero con Asp576 y His717 sustituido por otro residuo). Todas estas formas modificadas de ArcB resultaron ser inactivas, con fenotipos idénticos a los de una cepa $\Delta arcB$ ²¹. En el mismo trabajo se descartó la participación de una cinasa alternativa para la fosforilación del dominio H2 de ArcB, ya que al reemplazar *arcB* por *arcBH292Q D576A* (ArcB completo pero con His292 y Asp576 sustituido por otro aminoácido), nuevamente el fenotipo mostró ser indistinguible al de una cepa $\Delta arcB$ ²¹. Así, sólo el fosforelevo expuesto anteriormente parece ser la única vía fisiológica de activación del sistema.

La vía de decaimiento de la señal o defosforilación de ArcA-P fue también ampliamente discutida mediante diferentes trabajos en

los últimos 20 años. Primero, un estudio con ensayos *in vitro* de fosforilación de proteínas purificadas, demostró y propuso la vía de fosforelevo reverso expuesta anteriormente (Asp-54→His-717→Asp-576→Pi)²⁴. Posteriormente, se sugirió que una proteína con actividad de fosfohistidín-fosfatasa, denominada SixA, estaba implicada en la modulación de la actividad del sistema ArcB/A en condiciones anaeróbicas mediante la defosforilación de la His717 de ArcB^{28,29}. Si bien el papel de SixA como modulador en determinadas condiciones parece ser fisiológicamente relevante²⁹, la rápida inactivación del sistema en condiciones aeróbicas ocurre exclusivamente mediante el fosforelevo reverso, sin participación de componentes adicionales, como fue demostrado mediante ensayos *in vivo* posteriormente²⁵.

Por otra parte, otros trabajos sugirieron que ArcB es capaz de fosforilar, además de a ArcA, a otro RR denominado RssB, que en su estado fosforilado promueve la proteólisis del factor sigma RpoS^{30,31}. Este hallazgo y la demostración de la importancia fisiológica de esta fosforilación, permitió a los autores hablar de un sistema de tres componentes, que involucra a ArcB y a los dos RRs, ArcA y RssB³¹.

DOMINIOS TRANSMEMBRANALES Y PERIPLÁSMICO DE ArcB

La mayoría de las CS bacterianas son proteínas membranales, ancladas a la membrana interna y con una región periplásmica/extracelular que les permite detectar señales externas. De la misma manera, ArcB de *E. coli* presenta dos dominios transmembranales formados por los residuos 23 a 41 (TM1) y 58 a 77 (TM2), pero, en contraste con otras CS, tiene una región periplásmica muy pequeña de sólo 16 aminoácidos. Cuando se comenzó a estudiar este sistema, el segmento periplásmico parecía ser muy pequeño para constituir un dominio receptor de una señal extracelular, aunque su eliminación producía una cinasa citosólica constitutivamente activa⁷. Además, el reemplazo del TM1 y de la porción periplásmica, o del TM2 de ArcB por las correspondientes secciones de la proteína MalF, que es una subunidad de la maltosa permeasa, no relacionada con ArcB, produjo proteínas quiméricas con capacidad de regular la expresión de genes reporteros, utilizados para evaluar la actividad del sistema Arc, de una forma muy similar a como lo hace la proteína ArcB silvestre⁷. Por lo tanto, se descartó la importancia de los cruces transmembranales y la porción periplásmica de ArcB en la percepción de una señal que active o inactive el sistema.

Después de numerosos estudios enfocados a elucidar el proceso de percepción y propagación de la señal mediante la CS ArcB, hoy sabemos que la funcionalidad de los cruces transmembranales y del dominio periplásmico, radica en mantener a la proteína anclada a la membrana interna, en donde se encuentran las señales activadoras e inactivadoras del sistema, que son la quinonas. Esta cercanía promueve la interacción entre la porción citosólica de la cinasa y los acarreadores de

electrones ubiquinonas y menaquinonas que regulan la actividad del sistema^{9,10}.

EL ZIPPER DE LEUCINAS, EL DOMINIO PAS Y LA ADECUADA REGULACIÓN DE ArcB

La región *linker* de ArcB, que es la porción que une el segundo cruce transmembranal con el primer dominio catalítico de la proteína (H1) y está comprendido por los aminoácidos 78-290, contiene dos regiones con homología a dominios conservados en otras proteínas que tienen importancia en la funcionalidad de las mismas. En particular, la porción comprendida por los residuos 177-267, guarda similitud con dominios PAS, que son porciones de proteína que están frecuentemente presentes en sensores de oxígeno, luz o potencial redox^{16,32,33}. Sin embargo, la importancia fisiológica de este dominio de ArcB fue descartada, ya que formas mutadas de la proteína ArcB en donde se reemplazaron aminoácidos conservados en los dominios PAS, conservaron la capacidad de regular la expresión de genes reporteros de acuerdo a las condiciones redox del medio³⁴.

Por otra parte, entre los residuos 70 y 97 de ArcB, es posible identificar una estructura con similitud a un *zipper* de leucinas³⁵. En estos motivos las leucinas se encuentran en la primera posición de cada una de sus cuatro repeticiones de siete aminoácidos que lo conforman (L-X₆-L-X₆-L-X₆-L-X₆)³⁶. Asimismo, cada tercer aminoácido que antecede a la leucina, corresponde a un residuo no polar, mientras que los aminoácidos situados una y tres posiciones posteriores a la leucina son residuos polares (a-b-c-d-e-f-g; d: Leu; a: no polar; e, g: polares)³⁷. Es ampliamente conocido que los *zipper* de leucinas conforman motivos súper-enrollados, donde las hélices de dos monómeros (homo o hetero) forman dímeros estables, a través de los aminoácidos hidrofóbicos que se agrupan en una cara y los hidrofílicos en la cara opuesta del motivo³⁶. Así, como se comentó anteriormente, el segmento de aminoácidos VEQLSVVVEQL_{EESRQRL}SRLVQKLEEM localizado desde la posición 70 hasta la 97 de ArcB concuerda con un motivo *zipper* de leucinas. De igual forma, el método de predicción COILS/PCOILS³⁸ determina que en la estructura súper-enrollada del *zipper* se encuentran los residuos de leucinas mencionados, y además se continúa hasta el aminoácido 157 (Fig. 2A)¹⁵. Además, un modelo realizado con la secuencia de los residuos 73 a 121, basado en la estructura cristalina de un modelo dimérico súper-enrollado (código PDB 3he5), coincide con las características de este motivo, encontrando que las leucinas 73, 80, 87, 94, 108 y 115 se encuentran orientados en la cara hidrofóbica de la hélice entre dos monómeros (Fig. 2B), a diferencia de la leucina 102¹⁵.

Sin embargo, el mismo estudio que desestimó la funcionalidad del posible dominio PAS de ArcB, también concluyó que el *zipper* de leucinas no es esencial para la señalización por ArcB³⁴. En este trabajo, se construyeron formas mutantes de ArcB con las Leu 80, 87 y 94 reemplazadas por Ala, y aunque la mutante

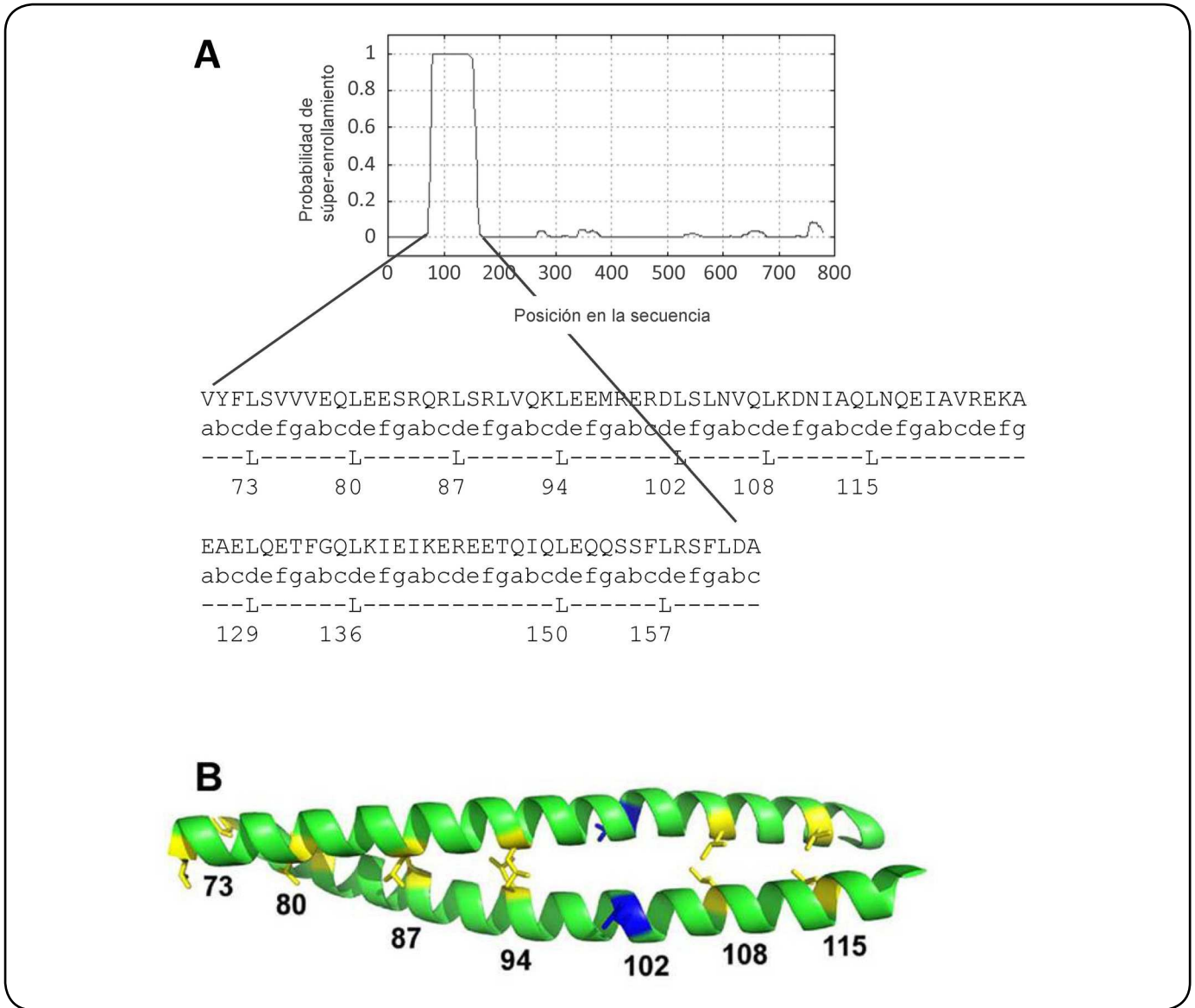


Figura 2. A. Predicción de los motivos súper-enrollados encontrados en la secuencia de ArcB obtenida por la herramienta COILS/PCOILS³⁸. Abajo se presenta la secuencia del motivo de ArcB, con repeticiones hepta-peptídicas de leucinas. B. Modelo de ArcB de la secuencia 73 a 121, generado sobre la estructura cristalina de un modelo dimérico súper-enrollado (Código PDB 3he5). Los residuos de leucina en las posiciones 73, 80, 87, 94, 108 y 115 están indicados en color amarillo y la posición de la leucina 102 en color azul (Reproducido de Núñez *et al.*, 2012)¹⁵.

L80A presentó un fenotipo semiconstitutivo (parcialmente activo aún en condiciones aerobias) y la forma L87A mostró ser inactiva como cinasa, los autores concluyeron que el motivo no es funcional³⁴.

Recientemente, nuestro grupo realizó un estudio sistemático analizando la actividad de la CS ArcB con diferentes mutaciones puntuales tanto *in vivo* como *in vitro*, en un intento por determinar la importancia de esta estructura súper-enrollada, incluyendo el zipper de leucinas, en la funcionalidad de ArcB. Así, se

construyeron una serie de plásmidos de bajo número de copias expresando formas mutantes de ArcB, en donde cada uno de los residuos de leucina o la combinación de ellos, fue sustituida por valina (que produce un cambio mínimo en la estructura de la hélice), y se determinó su capacidad de complementar una cepa mutante en *arcB*. Los resultados indicaron que las sustituciones L73V o L80V resultaron en una proteína con activación semiconstitutiva, siendo la mutación L80V donde el efecto fue más notable. Con relación a la doble mutante L73V-L80V, ésta mostró en presencia de oxígeno una activación constitutiva

```

EC (73-150)  LSVVVEQLEESRQRLSRLVQKLEEMRERDLSLNVQLKDNLIAQLNQEIA
SB (73-150)  LSVVVEQLEESRQRLSRLVQKLEEMRERDLSLNVQLKDNLIAQLNQEIA
SE (73-150)  LSVVVEQLEESRQRLSRLVQKLEEMRERDLKLNVLKDNLIAQLNQEIV
PL (73-150)  LSVVVEQLEESRQRLSRLVEKLEVMRQRDRELNQQKLDNLIKLNQEIS
YP (73-150)  LSVVVEQLEESRQRLSRLVDKLEVMRHRDLELNKQLTENITQLNQEIV
ER (73-150)  LSVVVEQLEESRQRLSKLVAKLEEMRHRDLELNVLQENIAQLNQEIA
VC (73-150)  LSVVVDQLEESRQRLSKLVSKLKDMRSRDQELNQLQONIVKLNQEIE
PP (73-130)  LSVVVDQLEDSRQRLSKLVSKLEEMRSRDMQLNTQLQMNITQLNQEIE
MS (73-143)  FALLVERLELSRQNLTLNVGELQQEIRERTTAEQRLAQAI-----R
AS (73-122)  FTVLVERLELSRQDLARLI-----R
HI (73-150)  FTVLVERLEHSRLDLSSSVNRLNEVAERIAAQQKLSQALEKLEKNSR
PM (73-150)  FTVLVERLERSRLGLAKMVENLRKEVSERVLAQKLSIALDNIEKTSR

```

Figura 3. Alineamientos de los residuos 73-120 de homólogos de ArcB tipo I y II. EC) *E. coli*, SB) *S. boydii*, SE) *S. enterica*, PL) *P. luminescens*, YP) *Y. pestis*, ER) *E. carotovora*, VC) *V. cholerae*, PP) *P. profundum*, MS) *M. succiniciproducens*, AS) *A. succinogenes*, HI) *H. influenzae*, y PM) *P. multocida*. Se muestran sombreadas las leucinas conservadas correspondientes a las posiciones 73, 80, 87, 94, 108 y 115.

y aunque no se encontraron grandes diferencias con relación a su activación en condiciones anaeróbicas, estas mutantes estaban todavía sujetas a regulación redox. En contraparte, las sustituciones L87V o L94V o la combinación que incluyera alguna de estas mutaciones originaron fenotipos nulos de ArcB, demostrándose que la CS perdió tanto su actividad cinasa como fosfatasa. Interesantemente, la sustitución de las leucinas 108 y 115, que continúan el zipper de leucinas en una estructura súper-enrollada predicha, origina una proteína con actividad cinasa reducida, pero actividad fosfatasa comparable con la forma silvestre de ArcB, mientras que la sustitución de la Leu102 no produjo ningún fenotipo, lo que está de acuerdo con lo predicho por el modelo generado *in silico* (Fig. 2B). Estos resultados permitieron concluir que, no sólo el zipper de leucinas conformado por los residuos 73 a 94, sino que también la hélice anfipática que se continúa hasta el residuo 115, son esenciales para la regulación de la actividad de la CS ArcB¹⁵.

HOMÓLOGOS DE ARC B CARENTES DE LA REGIÓN LINKER

El sistema ArcB/A está ampliamente distribuido entre las γ -Proteobacterias. Así, géneros de las familias Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Pasteurellaceae y Alteromonadaceae tienen genes *arcB* ortólogos con diferentes grados de homología con *arcB*

de *E. coli*. En un trabajo reciente, se analizaron secuencias de proteínas ortólogas a ArcB de *E. coli* en diferentes genomas bacterianos³⁹. Este análisis permitió agrupar a los homólogos de ArcB en dos tipos, resaltando que la principal diferencia entre ambos grupos radica en la carencia de la región *linker* correspondiente a los residuos de aminoácidos 73-271 de ArcB de *E. coli*. El tipo I incluyó el ArcB de las siguientes especies: *E. coli*, *Shigella boydii*, *Salmonella enterica*, *Photobacterium luminescens*, *Yersinia pestis*, *Erwinia carotovora*, *Vibrio cholerae*, *Photobacterium profundum*; y el tipo II: *Mannheimia succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Haemophilus influenzae* y *Pasteurella multocida*³⁹.

Si se analiza el alineamiento de los homólogos de ArcB pertenecientes al tipo I, se puede observar que las leucinas en las posiciones 73, 80, 87, 94, 108 y 115 están altamente conservadas, sugiriendo que este dominio en la región *linker* de los homólogos de ArcB es también funcional (Fig. 3) y debido a su importancia en la señalización, ha sido conservado en las diferentes especies bacterianas. Por otra parte, los alineamientos realizados con los homólogos de ArcB correspondientes al tipo II, que carecen de la región *linker*, presentaron las leucinas conservadas 80, 87, 94 y 108 (excepto *M. succiniciproducens* que no contiene

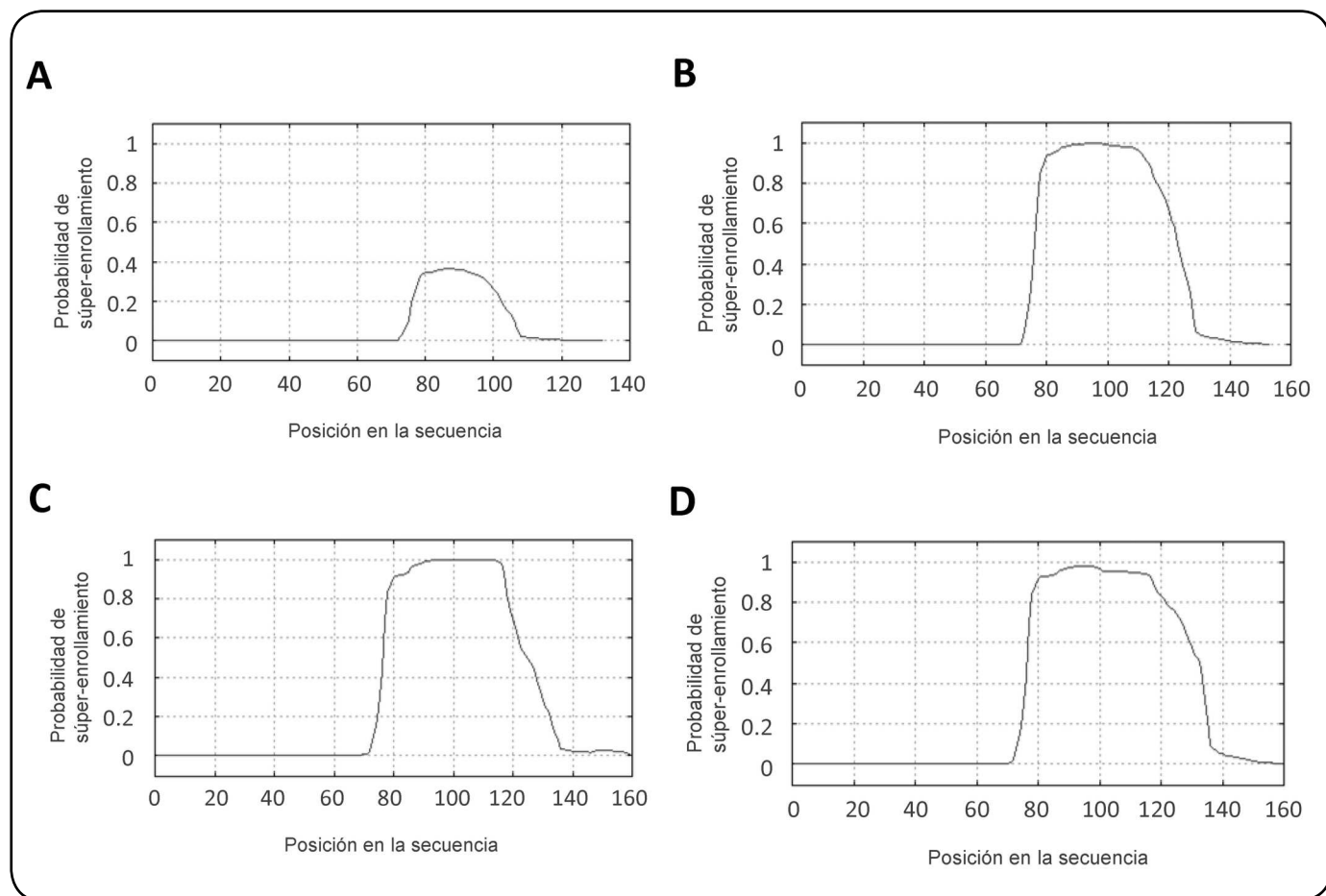


Figura 4. Predicción de los motivos súper-enrollados encontrados en la secuencia de homólogos ArcB de tipo II, obtenida por la herramienta COILS/PCOILS³⁸. A. *A. succinogenes*, residuos 1 a 132, B. *M. succiniciproducens*, residuos 1 a 153, C. *H. influenzae*, residuos 1 a 160 y D. *P. multocida*, residuos 1 a 160.

Leu94 y Leu108; nótese que *H. influenzae* conserva además Leu115) (Fig. 3). Dado que ArcBs correspondientes al tipo II contienen residuos conservados en el zipper de leucinas de ArcB de *E. coli*, realizamos la predicción de su estructura secundaria mediante el programa COILS/PCOILS³⁸ para determinar si presentan una estructura súper-enrollada que involucre a estos residuos. Las predicciones demostraron una estructura súper-enrollada para ArcB de *M. succiniciproducens*, *H. influenzae*, y *P. multocida*, y una pobre predicción de súper-enrollamiento para la proteína de *A. succinogenes* (Fig. 4). Esto sugiere que, aunque las formas homólogas de ArcB pertenecientes al tipo II carecen de la región linker, conservan en diferentes extensiones el motivo súper-enrollado que es esencial para la regulación de la CS ArcB de *E. coli*.

Interesantemente, el ArcB de *H. influenzae* es capaz de complementar una cepa de *E. coli* mutada en el gen *arcB*, con habilidad de mediar una respuesta similar a la observada con ArcB de *E. coli*⁴⁰. De manera similar, se observó que ArcB de

M. succiniciproducens puede reemplazar *in vivo* a su contraparte de *E. coli*³⁹. Lo anterior nos permite inferir, que los homólogos de ArcB del tipo II tienen un mecanismo de regulación similar al que tiene ArcB de *E. coli*, con un zipper de leucinas funcional.

ARC_B SE INACTIVA MEDIANTE LA FORMACIÓN DE PUENTES DISULFURO

Para todos los SDCs existen condiciones ambientales que hacen que el sistema esté activo y otras en las que el sistema está inactivo. Desde la identificación del sistema Arc se identificó a la carencia de oxígeno (anaerobiosis o microaerofilia) como la condición en la que el sistema se activa, mientras que en condiciones aeróbicas el sistema se silencia⁴¹. Sin embargo, en el estudio de estos sistemas, la caracterización de la señal específica que activa o inactiva el sistema, así como de los eventos moleculares que están involucrados en esta activación, es un reto muy importante y presenta múltiples dificultades. Así, en la mayoría de los SDC bacterianos se desconoce la señal a la cual responden. En el caso de ArcB,

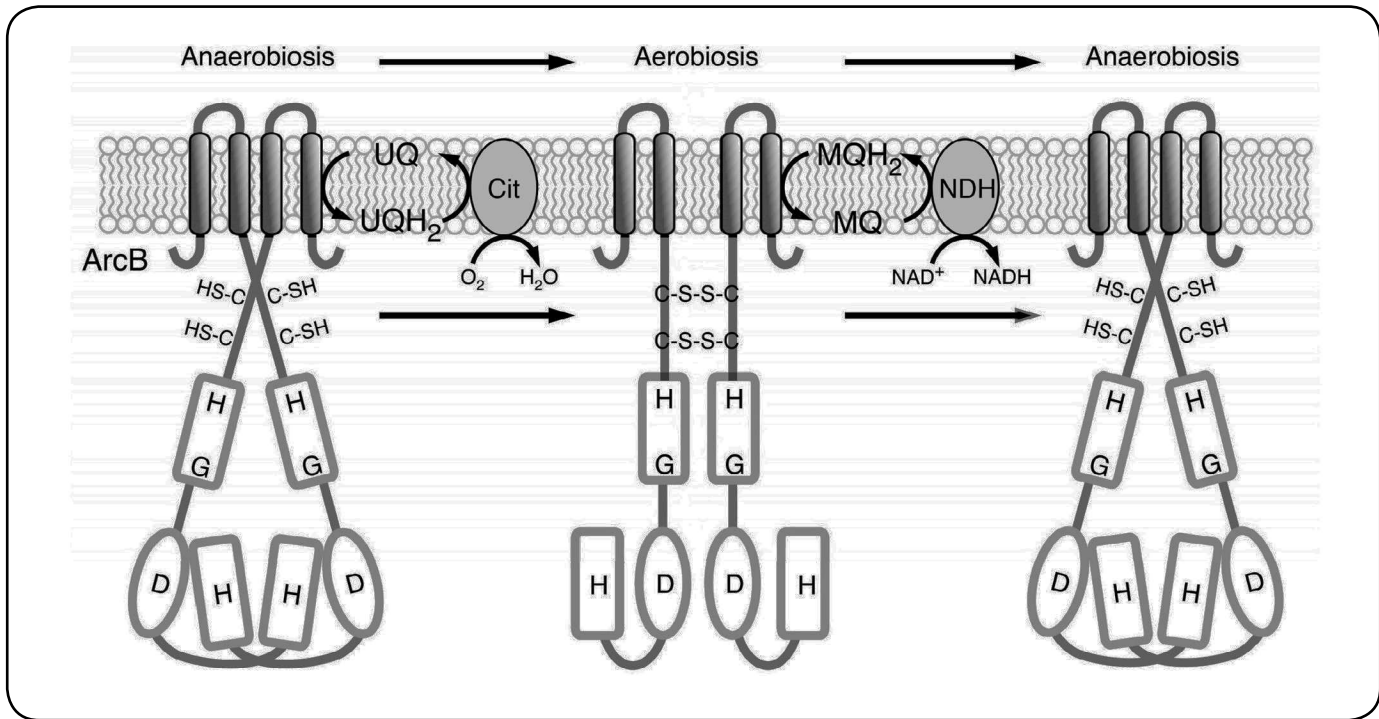


Figura 5. Modelo simplificado de activación e inactivación de ArcB. Cuando la bacteria cambia sus condiciones de crecimiento anaeróbicas a aeróbicas, las quinonas se oxidan. Esto permite la transferencia de electrones desde la Cys-180 de ArcB a las quinonas, lo que permite la formación de un enlace disulfuro intermolecular entre las Cys-180 de los dos monómeros, resultando en una disminución significativa de la actividad de la cinasa ArcB. Como los electrones rápidamente fluyen hacia el oxígeno más próximo vía Citocromo Oxidasa bd o bo, las quinonas mantienen su estado oxidado e inducen la formación de un segundo enlace disulfuro entre los dos residuos Cys-241, dando como resultado el completo silenciamiento de la actividad de la cinasa ArcB. Por el contrario, cuando las condiciones son microaeróbicas o cuando cambian de condiciones aeróbicas a anaeróbicas, las ubiquinonas son gradualmente reemplazadas por menaquinonas, que en estado reducido (menaquinol) son capaces de reducir los puentes disulfuro de ArcB, restaurando su conformación activa como cinasa y activando el sistema (tomado de Álvarez et al, 2013)¹⁰.

algunas observaciones y resultados independientes, dieron pistas importantes para caracterizar la activación del sistema. En primer lugar, el descubrimiento de que la adición al medio de cultivo aeróbico de agentes reductores como el ditioneitol (DTT) y el β -mercaptoetanol, capaces de permear la membrana interna activan a la cinasa ArcB, mientras que la adición de glutatión (GSH), un agente reductor que no es capaz de permear la membrana plasmática por su naturaleza lipofóbica, no tiene efecto, sugirió que la activación podría involucrar una reacción de reducción de ArcB y que la misma ocurre en la región citosólica de la proteína⁹. El hecho de que las porciones transmembranales y periplásmica de la proteína no fueran esenciales para la señalización apoyaba esta idea. Además, se sabía que la forma citosólica de ArcB (en la que los dominios transmembranales y periplásmico fueron truncados), tiene una actividad cinasa constitutiva tanto *in vivo* como *in vitro*⁷. Esta actividad se ve inhibida *in vitro* por agentes oxidantes como ubiquinona y cloramina-T. La cloramina T es un oxidante de cisteínas y metioninas, lo que sugirió que ArcB es inhibido por

oxidación de este tipo de residuos⁹. Finalmente en la región *linker* de ArcB se encuentran localizados los dos únicos residuos de cisteína de la proteína, la Cys180 y Cys241 (Fig. 1A y Fig. 5), los que posteriormente se demostró, son oxidados formando puentes disulfuro intermoleculares durante la inactivación de ArcB⁹. Teniendo en cuenta que para que ocurra la formación de puentes disulfuro, dos residuos de Cys de moléculas de ArcB diferentes tienen que estar a una distancia y orientación determinada, puede inferirse que la importancia del *zipper* de leucinas, que permite la formación de dímeros o multímeros de manera ordenada, radica en permitir la conformación tridimensional necesaria para la formación de los puentes disulfuro intermoleculares cuando las células se encuentran en condiciones aeróbicas.

Interesantemente, los dos residuos de Cys están altamente conservados en los diferentes homólogos de ArcB del tipo I, lo que sugiere fuertemente que el mecanismo de regulación es el mismo en todas estas proteínas homólogas. En contraste,

EC (321-368)	LKTIHVSAVTLGNIFNDIIDMDKMERRKVQLDNQPVDFTSFLADLENL
SB (321-368)	LKTIHVSAVTLGNIFNDIIDMDKMERRKVQLDNQPVDFTSFLADLENL
SE (321-368)	LKTIHVSAVTLGNIFNDIIDMDKMERRKVQLDNQPVDFTSFMADLENL
PL (321-368)	LKTIHVSAITLGNIFNDIIEMDKIERRKVQIDNQPIDFTGFMSDLENL
YP (321-368)	LKTIHVSAITLGNIFNDIIEMDKLERRKVQLDNQPVDFTFMFADLENL
ER (321-368)	LKTIHVSAITLGNIFNDVIEMDKQERRKVQLDNQPIDFTGFVLVDLENL
VC (321-368)	LQTINVSAVTLGNIFNDIIDMDKFDRRKLELFPAAALNFEDFVAEIEVL
PP (301-348)	MRTVHVSAITLGNIFNDIIDMDKSDRRRLELMPKPLDFNDFVTEMENI
MS (153-200)	LKTINVSASVSLGHIFNDIIDLEKLDGSRIELYKKETDFHALITDVYNV
AS (132-179)	LNTINVSASVSLGNIFNDVIDLEKIDSRKLELYKKETDFFSFINDINHI
HI (160-207)	LKTINISAVSLGYIFSDIIDLEKIDASRIELNRQPTDFPALLNDIYNF
PM (160-207)	LKTIHVSAISLGHIFSDIIDLEKIDARRIELNAKAVELNSFLNDISNV

Figura 6. Alineamientos de los residuos 321-368 de homólogos de ArcB tipo I y II. EC) *E. coli*, SB) *S. boydii*, SE) *S. enterica*, PL) *P. luminescens*, YP) *Y. pestis*, ER) *E. carotovora*, VC) *V. cholerae*, PP) *P. profundum*, MS) *M. succiniciproducens*, AS) *A. succinogenes*, HI) *H. influenzae*, y PM) *P. multocida*. Se muestran sombreados los residuos correspondientes al motivo L-(X3)-H-(X3)V/I.

los homólogos de ArcB del tipo II, que carecen de la región *linker*, no contienen estos residuos conservados. Sin embargo, conservan otros residuos de Cys que podrían estar involucrados en la regulación redox. Teniendo en cuenta que los dos homólogos de ArcB del tipo II que fueron estudiados hasta el momento (de *H. influenzae* y de *M. succiniciproducens*) son capaces de complementar funcionalmente a una mutante en *arcB* de *E. coli*^{39,40}, es de esperar que el mecanismo de regulación de esta familia de ArcBs sea el mismo que el identificado en ArcB de *E. coli*.

LAS UBIQUINONAS Y MENAQUINONAS SON LAS SEÑALES QUE INACTIVAN Y ACTIVAN A ARC B

Ya que un mecanismo redox está involucrado en la activación/inactivación de ArcB, resultaba de vital importancia conocer los agentes oxidantes y reductores que fungan como señal directa que regula el sistema en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. El oxígeno molecular, productos del metabolismo aerobio o anaerobio y los sistemas de reducción de proteínas citosólicas como el de las tiorredoxinas y las glutarredoxinas, fueron candidatos que se tomaron en cuenta como posibles responsables de la regulación de ArcB^{42,43}. Sin embargo, hoy sabemos que el estado redox de la poza de quinonas de la membrana interna de *E. coli*, es el que determina la oxidación o reducción de los residuos de cisteína de ArcB y por lo tanto, su actividad¹⁰.

Para entender el mecanismo de activación e inhibición de ArcB, es necesario saber que las quinonas sintetizadas por *E. coli* son tres: la ubiquinona (UQ), la menaquinona (MK) y

la dimetil-menaquinona (DMK), las cuales funcionan como adaptadores entre varios complejos de enzimas donadores y aceptores de electrones⁴⁴⁻⁴⁶. La ubiquinona es utilizada por la célula predominantemente en la respiración aeróbica, y durante la respiración anaeróbica cuando el nitrato es el aceptor de electrones; mientras que la menaquinona y la dimetil-menaquinona sirven como transportadores de electrones durante la respiración anaerobia o microaerobia. Es importante mencionar que las ubiquinonas (UQ) y menaquinonas (MK) conforman el 60% y 3% de las quinonas totales aeróbicas y el 10% y 74% respectivamente, cuando las células están creciendo anaeróticamente en presencia de fumarato. El resto del pool de quinonas se debe a las dimetil-menaquinonas (DMK)⁴⁷.

El modelo actual de regulación de la CS ArcB involucra la participación de la poza de quinonas de la cadena de transporte de electrones de *E. coli*. En primer lugar se demostró el papel de las UQs en la inactivación de ArcB como cinasa y se sugirió que la poza de MKs podría tener algún rol en dicha regulación⁴⁸. Posteriormente, el rol de las UQs como señal inactivadora del sistema Arc fue puesto en duda, mientras que se sugirió que las MKs podrían tanto activar como inactivar el sistema⁴⁹, basándose, sin embargo, en el modelo propuesto anteriormente de oxidación/reducción de puentes disulfuro⁹. Recientemente se logró esclarecer la función de UQs y MKs en la regulación del sistema Arc, mediante el seguimiento de la expresión de genes reporteros desde el momento del cambio de condiciones aerobias/anaerobias, en cepas mutantes en las

vías de síntesis de UQs y MKs, y mediante la determinación del potencial redox de ArcB. Esto posibilitó corroborar el papel de las UQs como señal inhibitoria e identificar a las MKs como señal activadora¹⁰. En el mismo trabajo se sugirió el posible papel de las DMKs en la inactivación del sistema Arc, en coordinación con las UQs¹⁰. Posteriormente, otro trabajo apoyó el rol sugerido de las DMKs en la regulación de la actividad cinasa de ArcB⁵⁰, aunque sin dejar claro la manera en que cada quinona participa en la regulación, de acuerdo a su potencial redox.

Finalmente, el modelo simplificado de regulación de la actividad de ArcB se puede resumir de la siguiente manera: cuando las células de *E. coli* crecen en aerobiosis o pasan de condiciones anaeróbicas a aeróbicas, el componente predominante de la poza de quinonas es la ubiquinona (Potencial redox, $E^{\circ}=+100$ mV). Ésta es capaz de oxidar a los residuos de Cys de la región *linker* de ArcB ($E^{\circ}=-41$ mV), permitiendo la formación de puentes disulfuro intermoleculares, e inhibiendo la actividad cinasa de la proteína^{10,48}. De esta manera, el sistema ArcB/A se encuentra inactivo. Por el contrario, cuando las células crecen en condiciones microaeróbicas o cuando cambian de condiciones aeróbicas a anaeróbicas, las ubiquinonas son gradualmente reemplazadas por menaquinonas ($E^{\circ}=-74$ mV), que en su estado reducido (menaquinol) son capaces de reducir los puentes disulfuro de ArcB, restaurando la conformación activa como cinasa y activando el sistema (Fig. 5)¹⁰.

Este mecanismo de regulación redox no es único para ArcB, como ha sido demostrado por la inhibición de la cinasa RegB durante anaerobiosis, que involucra la formación de un puente disulfuro intermolecular originando un tetrámero inactivo de RegB⁵¹. Como ArcB de *E. coli*, las CS BvgS y EvgS de *Bordetella pertussis* y *E. coli*, respectivamente, son inhibidas también por quinonas oxidadas *in vitro*⁵².

SITIO DE UNIÓN A QUINONAS

En la proteína DsbB ha sido identificado un sitio de unión a quinonas de alta afinidad^{53,54}. Este sitio ha sido identificado en otros componentes de sistemas respiratorios y fotosintéticos, unido a la membrana como el motivo L-X₃-H-X₃-T. Interesantemente, BvgS de *B. pertussis* tiene dos motivos cuya secuencia tiene las características reportadas por Fisher y colaboradores⁵⁵, uno en el dominio PAS, donde mutaciones realizadas a este motivo no afectaron significativamente la inhibición de la cinasa por las quinonas y otro en el dominio transmisor alrededor del sitio de autofosforilación en la His729, que no ha sido explorado⁵².

Dado que la proteína truncada ArcB78-778 carece de la región transmembranal, pero es sensible a la oxidación por quinonas, se sugiere que dicho sitio de unión a quinonas se podría localizar en su región *linker* o porción citosólica. Al realizarle un análisis bioinformático a ArcB se encontró que en el dominio H1 existe

un motivo L-X₃-H-X₃-T en la posición 386-394. En el análisis de alineamientos entre los grupos correspondientes al tipo I y II, este motivo sólo se conserva en los ArcB de *E. coli*, *S. boydii*, y *S. enterica*, aunque no en las enterobacterias *Y. pestis* y *E. carotovora*. Sin embargo, al analizar los alineamientos encontramos un nuevo motivo L-X₃-H-X₃-V/I que cumple con las características de sitio de unión a quinonas. Este motivo se encuentra en el dominio H1 entre el residuo His292 y la caja N, ubicado en la posición 321-329 y se encuentra conservado en ArcBs Tipo I y II que sintetizan menaquinonas y ubiquinonas, excepto por *V. cholerae* y *P. profundum* (Fig. 6). Sin embargo, aún es necesario determinar que las secuencias L-X₃-H-X₃-V/I o L-X₃-H-X₃-T son sitios de unión a quinonas funcionales en ArcB. La presencia de un dominio funcional de unión a quinonas explicaría como estos acarreadores de electrones embebidos en la membrana, pueden oxidar residuos de cisteínas citosólicas, ya sea por la cercanía al sitio de unión o por la formación de un microambiente hidrofóbico fuera de la membrana en el que las quinonas puedan interactuar con este sitio. Tanto la funcionalidad de los sitios de unión a quinona como la formación de microambientes hidrofóbicos que permitan a las quinonas llegar hasta las cisteínas citosólicas de ArcB son hipótesis que deben ser exploradas en el futuro.

CONCLUSIONES

El sistema ArcB/A es uno de los principales mecanismos mediante los cuales bacterias anaerobias facultativas como *E. coli* son capaces de adaptar su metabolismo energético a las condiciones redox del medio. El silenciamiento de la proteína ArcB durante la transición del crecimiento anaeróbico a aeróbico, involucra que los electrones de las cisteínas de la región *linker* fluyan a las quinonas, originando dos puentes disulfuro y el fosforelevo reverso Asp-54→His-717→Asp-576→Pi. Cuando las condiciones cambian y el oxígeno está ausente o en un ambiente de microaerobiosis, las menaquinonas transfieren sus electrones a los enlaces de cistina, reduciéndolos y activando a la cinasa ArcB, desencadenando el fosforelevo His-292→Asp-576→His-717→Asp-54. Así ArcA-P, es entonces activado como un regulador transcripcional para más de 300 operones. Además, para la adecuada regulación de su actividad, ArcB requiere de la integridad del *zipper* de leucinas, el cual es un motivo funcional que posibilita la correcta orientación entre dos monómeros de ArcB, necesaria para la formación de puentes disulfuro que silencia el sistema. De esta manera, la oxidación y reducción de las cisteínas en ArcB, a través del pool de quinonas y menaquinonas representa un mecanismo redox mediante el cual las señales son transducidas al aparato transcripcional, permitiendo a la bacteria una rápida adaptación a los cambios ambientales. La manera en que las quinonas membranales llegan hasta la región *linker* de ArcB y promueven la oxidación/reducción de los residuos de cisteína, sigue siendo desconocida y representa un tema que necesita ser abordado en el futuro.

AGRADECIMIENTOS

Durante los estudios de doctorado Luis Alberto Núñez-Oreza contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (Número de becario 195605) para la elaboración del presente trabajo.

Este trabajo fue financiado por los donativos 178033 del CONACYT e IN206412 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (PAPIIT-UNAM).

Luis Alberto Núñez-Oreza, agradece la asistencia técnica de la M. en C. Claudia Rodríguez Rangel y la QFB Miriam Vázquez Acevedo; así como el apoyo brindado por el Sr. Pedro Trujillo Hernández, durante sus estudios de doctorado.

REFERENCIAS

- Hoch, J.A. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 165–170 (2000).
- Stock, A.M., Robinson, V.L. & Goudreau, P.N. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 183–215 (2000).
- Parkinson, J.S. & Kofoid, E.C. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**, 71–112 (1992).
- Parkinson, J.S. Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* **73**, 857–871 (1993).
- Stock, J.B. in *Two-Component Signal Transduct.* (J.A., H. & Silhavy, T. J.) 25–51 (ASM Press, 1995). at <<http://ci.nii.ac.jp/naid/10007775828/en/>>
- Iuchi, S., Matsuda, Z., Fujiwara, T. & Lin, E.C. The arcB gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the arc modulon. *Mol. Microbiol.* **4**, 715–727 (1990).
- Kwon, O., Georgellis, D., Lynch, A.S., Boyd, D. & Lin, E.C. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region. *J. Bacteriol.* **182**, 2960–2966 (2000).
- Georgellis, D., Lynch, A. S. & Lin, E. C. *In vitro* phosphorylation study of the Arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 5429–5435 (1997).
- Malpica, R., Franco, B., Rodríguez, C., Kwon, O. & Georgellis, D. Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 13318–13323 (2004).
- Álvarez, A. F., Rodríguez, C. & Georgellis, D. Ubiquinone and menaquinone electron carriers represent the yin and yang in the redox regulation of the ArcB sensor kinase. *J. Bacteriol.* **195**, 3054–3061 (2013).
- Iuchi, S. & Lin, E.C. arcA (dye), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1888–1892 (1988).
- Liu, X. & De Wulf, P. Probing the ArcA-P modulon of *Escherichia coli* by whole genome transcriptional analysis and sequence recognition profiling. *J. Biol. Chem.* **279**, 12588–12597 (2004).
- Salmon, K.A. *et al.* Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: effects of oxygen availability and ArcA. *J. Biol. Chem.* **280**, 15084–15096 (2005).
- Iuchi, S., Cameron, D.C. & Lin, E.C. A second global regulator gene (arcB) mediating repression of enzymes in aerobic pathways of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**, 868–873 (1989).
- Núñez-Oreza, L.A., Álvarez, A.F., Arias-Olguín, I.I., Torres Larios, A. & Georgellis, D. The ArcB leucine zipper domain is required for proper ArcB signaling. *PLoS One* **7**, e38187 (2012).
- Zhulin, I.B., Taylor, B.L. & Dixon, R. PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 331–333 (1997).
- Swanson, R.V., Alex, L.A. & Simon, M.I. Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 485–490 (1994).
- Ishige, K., Nagasawa, S., Tokishita, S. & Mizuno, T. A novel device of bacterial signal transducers. *EMBOJ.* **13**, 5195–5202 (1994).
- Peña-Sandoval, G. R. & Georgellis, D. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli* autophosphorylates by an intramolecular reaction. *J. Bacteriol.* **192**, 1735–1739 (2010).
- Iuchi, S. & Lin, E.C. Purification and phosphorylation of the Arc regulatory components of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 5617–5623 (1992).
- Kwon, O., Georgellis, D. & Lin, E.C. Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the arc two-component system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**, 3858–3862 (2000).
- Iuchi, S. & Lin, E.C. Mutational analysis of signal transduction by ArcB, a membrane sensor protein responsible for anaerobic repression of operons involved in the central aerobic pathways in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 3972–3980 (1992).
- Lynch, A.S. & Lin, E.C. in *Escherichia coli Salmonella Cell. Mol. Biol.* (Neidhardt, F. C. *et al.*) 1526–1538 (Am. Soc. Microbiol., 1996).
- Georgellis, D., Kwon, O., De Wulf, P. & Lin, E.C. Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system. *J. Biol. Chem.* **273**, 32864–32869 (1998).
- Peña-Sandoval, G.R., Kwon, O. & Georgellis, D. Requirement of the receiver and phosphotransfer domains of ArcB for efficient dephosphorylation of phosphorylated ArcA *in vivo*. *J. Bacteriol.* **187**, 3267–3272 (2005).
- Tsuzuki, M., Ishige, K. & Mizuno, T. Phosphotransfer circuitry of the putative multi-signal transducer, ArcB, of *Escherichia coli*: *in vitro* studies with mutants. *Mol. Microbiol.* **18**, 953–962 (1995).
- Matsushika, A. & Mizuno, T. A dual-signaling mechanism mediated by the ArcB hybrid sensor kinase containing the histidine-containing phosphotransfer domain in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 3973–3977 (1998).
- Ogino, T., Matsubara, M., Kato, N., Nakamura, Y. & Mizuno, T. An *Escherichia coli* protein that exhibits phosphohistidine phosphatase activity towards the HPT domain of the ArcB sensor involved in the multistep His-Asp phosphorelay. *Mol. Microbiol.* **27**, 573–585 (1998).
- Matsubara, M. & Mizuno, T. The SixA phospho-histidine phosphatase modulates the ArcB phosphorelay signal transduction in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **470**, 118–124 (2000).
- Yamamoto, K. *et al.* Functional characterization *in vitro* of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**, 1448–1456 (2005).
- Mika, F. & Hengge, R. A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of sigmaS (RpoS) in *E. coli*. *Genes Dev.* **19**,

- 2770–2781 (2005).
32. Taylor, B.L. & Zhulin, I.B. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 479–506 (1999).
 33. Zhulin, I.B. & Taylor, B.L. Correlation of PAS domains with electron transport-associated proteins in completely sequenced microbial genomes. *Mol. Microbiol.* **29**, 1522–1533 (1998).
 34. Matsushika, A. & Mizuno, T. Characterization of three putative sub-domains in the signal-input domain of the ArcB hybrid sensor in *Escherichia coli*(1). *J. Biochem.* **127**, 855–860 (2000).
 35. Bornberg-Bauer, E., Rivals, E. & Vingron, M. Computational approaches to identify leucine zippers. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2740–2746 (1998).
 36. Vinson, C., Acharya, A. & Taparowsky, E.J. Deciphering B-ZIP transcription factor interactions *in vitro* and *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* **1759**, 4–12 (2006).
 37. Mason, J.M. & Arndt, K.M. Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *ChemBiochem.* **5**, 170–176 (2004).
 38. Gruber, M., Söding, J. & Lupas, A.N. REPPER--repeats and their periodicities in fibrous proteins. *Nucleic. Acids Res.* **33**, W239–243 (2005).
 39. Jung, W.S. *et al.* Characterization of the Arc two-component signal transduction system of the capnophilic rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens*. *FEMS Microbiol. Lett.* **284**, 109–119 (2008).
 40. Georgellis, D., Kwon, O., Lin, E.C., Wong, S.M. & Akerley, B.J. Redox signal transduction by the ArcB sensor kinase of *Haemophilus influenzae* lacking the PAS domain. *J. Bacteriol.* **183**, 7206–7212 (2001).
 41. Tseng, C.P., Albrecht, J. & Gunsalus, R.P. Effect of microaerophilic cell growth conditions on expression of the aerobic (cyoABCDE and cydAB) and anaerobic (narGHJI, frdABCD, and dmsABC) respiratory pathway genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**, 1094–1098 (1996).
 42. Iuchi, S., Chepuri, V., Fu, H.A., Gennis, R.B. & Lin, E.C. 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**, 6020–6025 (1990).
 43. Malpica, R., Sandoval, G.R., Rodríguez, C., Franco, B. & Georgellis, D. 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 (2006).
 44. Wissenbach, U., Kröger, A. & Uden, G. The specific functions of menaquinone and demethylmenaquinone in anaerobic respiration with fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate by *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **154**, 60–66 (1990).
 45. Uden, G. Differential roles for menaquinone and demethylmenaquinone in anaerobic electron transport of *E. coli* and their *fnr*-independent expression. *Arch. Microbiol.* **150**, 499–503 (1988).
 46. Meganathan, R. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. *Escherichia coli Salmonella Cell. Mol. Biol.* (American Society for Microbiology, 1996). at <[http://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Escherichia coli and Salmonella%3A Cellular and Molecular Biology&author=R Meganathan&publication_year=1996#0](http://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Escherichia%20coli%20and%20Salmonella%3A%20Cellular%20and%20Molecular%20Biology&author=R%20Meganathan&publication_year=1996#0)>
 47. Gennis, R. B. & Stewart, V. in *Escherichia coli Salmonella Cell. Mol. Biol.* (Neidhardt, F. C. & Others) 217–261 (American Society for Microbiology, 1996).
 48. Georgellis, D., Kwon, O. & Lin, E.C. Quinones as the redox signal for the Arc two-component system of bacteria. *Science* **292**, 2314–2316 (2001).
 49. Bekker, M. *et al.* 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 (2010).
 50. Sharma, P., Stagge, S., Bekker, M., Bettenbrock, K. & Hellingwerf, K. J. Kinase activity of ArcB from *Escherichia coli* is subject to regulation by both ubiquinone and demethylmenaquinone. *PLoS One* **8**, e75412 (2013).
 51. Swem, L. R. *et al.* Signal transduction by the global regulator RegB is mediated by a redox-active cysteine. *EMBO J.* **22**, 4699–4708 (2003).
 52. Bock, A. & Gross, R. The unorthodox histidine kinases BvgS and EvgS are responsive to the oxidation status of a quinone electron carrier. *Eur. J. Biochem.* **269**, 3479–3484 (2002).
 53. Bader, M. W., Xie, T., Yu, C. A. & Bardwell, J. C. Disulfide bonds are generated by quinone reduction. *J. Biol. Chem.* **275**, 26082–26088 (2000).
 54. Regeimbal, J. *et al.* Disulfide bond formation involves a quinhydrone-type charge-transfer complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13779–13784 (2003).
 55. Fisher, N. & Rich, P. R. A motif for quinone binding sites in respiratory and photosynthetic systems. *J. Mol. Biol.* **296**, 1153–1162 (2000).