



# UNIVERSIDAD DE LEÓN

## FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

ÁREA DE MICROBIOLOGÍA

**Mecanismos moleculares implicados en la resistencia a arsénico en  
*Corynebacterium glutamicum***

**“Molecular mechanisms involved in arsenic resistance in *Corynebacterium  
glutamicum*”**

*Efrén Ordóñez del Amo*

León, 2009











**Memoria que presenta para optar  
al grado de Doctor en Biología**

**Efrén Ordóñez del Amo  
León, 2009**





Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han apoyado en la elaboración y consecución de esta tesis doctoral, proporcionándome en cada momento todo lo necesario para continuar y llegar a la meta en esta "carrera de fondo".

En primer lugar me gustaría agradecer a los Doctores Luis Mariano Mateos Delgado y a José Antonio Gil Santos su aportación a lo largo de la realización de este trabajo. Y en especial me gustaría destacar no sólo su contribución científica, que está fuera de toda duda y sin la que por supuesto este trabajo no hubiese sido posible, sino también su disponibilidad continua, sus críticas constructivas que me han permitido mejorar día a día y los innumerables consejos, que han encauzado continuamente mi investigación.

A mis compañeros : Angelina, Noelia, María, Almudena, Astrid y en especial a Michal, sin los cuales el trabajo científico hubiese sido sólo eso "ciencia". Gracias por el apoyo constante en los buenos y malos momentos y por su amistad, por esos cafés con carácter científico y por los no tan científicos que me han permitido ser crítico y constructivo, y de donde han surgido siempre muy buenas ideas.

A Sonia, Cristina, Rosma, Juan Pablo, Maite, Katarina, Irene, y al resto de compañeros de laboratorio que han estado siempre dispuestos a echarme una mano cuando era necesario.

Agradezco a los Doctores Barry Philip Rosen y Joris Messens, su aportación a mi trabajo y la oportunidad que me han brindado al permitirme interactuar y trabajar con grupos de investigación de indudable calidad científica y humana , donde he completado mi formación y perfeccionado mi metodología de trabajo y método científico.

A los compañeros de los laboratorios del Dr. Rosen y del Dr. Messens por su profesionalidad y ayuda en esos momentos en que se pierde un poco el norte. Y en especial a Henry, Jie, Sheng, Elke, Karo, Khadija, Abel y por supuesto a mi amigo Sergio, por compartir conmigo todas aquellas tardes de enorme productividad y de apoyo moral.

A mis compañeros de Syva, por su amistad y porque en estos últimos meses de continuo aprendizaje me han inculcado una buena dosis de pragmatismo y un punto de vista diferente del concepto "trabajo".

A la junta de Castilla y León por la financiación recibida durante la realización de esta tesis doctoral.

A toda mi familia y en especial a mis padres y mi hermano por estar siempre cuando les necesito, por su apoyo, constancia y porque me han infundido la filosofía del trabajo y el esfuerzo como vía para conseguir mis objetivos.

Y por supuesto a Natalia, mi otra mitad, por ella, por transmitirme su confianza y por darme razones por las que seguir luchando cuando las cosas no salen como se espera. Gran parte de este trabajo se lo debo a ella.



Para Natalia



# ÍNDICE

Abreviaturas. ....	15
<b>1. Introducción. ....</b>	<b>17</b>
1.1. Arsénico: enfoque histórico y situación actual. ....	19
1.2. Características generales del arsénico. ....	20
1.3. Efectos del arsénico sobre la salud humana. ....	23
1.4. Mecanismos de entrada del arsénico en las células. ....	24
1.5. El arsénico y los microorganismos: versatilidad metabólica para un elemento tóxico. ....	26
1.5.1. Respiración desasimilativa del arseniato. ....	27
1.5.2. Oxidación del arsenito en microorganismos. ....	30
1.6. Mecanismos de resistencia a arsénico en microorganismos. ....	32
1.6.1. Metilación microbiana del arsénico. ....	34
1.6.2. Mecanismos de resistencia a arsénico, los operones “ars”. ....	37
1.6.2.1. Regulador transcripcional de arsénico “ArsR”. ....	38
1.6.2.2. ArsD, la metalochaperona de arsénico. ....	40
1.6.2.3. ArsA, la ATPasa de resistencia a arsénico. ....	42
1.6.2.4. Transportadores de resistencia a arsénico: ArsB y Acr3p. ....	44
1.6.2.4.1. Transportadores de tipo ArsB. ....	45
1.6.2.4.2. Transportadores de tipo Acr3. ....	46
1.6.2.4.3. Transportadores de tipo MRP. ....	48
1.6.2.5. Reducción de arseniato: arseniato reductasas. ....	48
1.6.2.5.1. Arseniato reductasas dependientes de tioredoxina. ....	49
Arsenato reductasa del plásmido pI258. ....	49
Arsenato reductasa de <i>B. subtilis</i> . ....	51
1.6.2.5.2. Arseniato reductasas dependientes de glutaredoxina y glutatión. ....	52
Arsenato reductasa del plásmido R773. ....	52
Acr2p, arseniato reductasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	54
1.6.2.5.3. La arseniato reductasa de <i>Synechocystis sp.</i> ; la ArsC híbrida. ....	56
1.6.2.6. Otras proteínas de resistencia a arsénico en microorganismos: ArsH y ArsO. ....	57
1.6.3. Metalotioneínas y fitoquelatinas: proteínas con capacidad quelante para metales tóxicos en organismos superiores. ....	58
1.6.3.1. Metalotioneínas. ....	58
1.6.3.2. Fitoquelatinas. ....	59
1.7. El arsénico en humanos: rutas de entrada y sistemas de detoxificación. ....	60
1.8. El género <i>Corynebacterium</i> . ....	63
1.9. Objetivos del presente trabajo. ....	65
<b>2. Publicaciones. ....</b>	<b>67</b>
2.1. Analysis of genes involved in arsenic resistance in <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032. ....	69
2.2. Evolution of metal(loid) binding sites in transcriptional regulators. ....	79
2.3. Arsenate reductase, mycothiol and mycoredoxin concert thiol/disulfide exchange. ....	89
<b>3. Resumen / Summary. ....</b>	<b>111</b>
<b>4. Discusión general. ....</b>	<b>115</b>
4.1. Sistemas de incorporación de arsénico en <i>C. glutamicum</i> . ....	118

4.1.1. La incorporación de As(V) en <i>C. glutamicum</i> se produce a través de los transportadores de fosfato. ....	118
4.1.2. La incorporación de As(III) en <i>C. glutamicum</i> se produce a través de un mecanismo desconocido. ....	120
4.2. Sistemas de resistencia a arsénico en <i>C. glutamicum</i> . ....	122
4.2.1. La región intergénica <i>arsR-acr3</i> dirige y controla la expresión de los operones con <i>CGArsR1</i> y <i>CGArsR2</i> actuando en “trans” sobre ellas. ....	123
4.2.2. Los reguladores de <i>C. glutamicum</i> presentan un sitio de unión a metales atípico y responden a variaciones ambientales de As(III) y Sb(III). ....	124
4.2.2.1. <i>CGArsR1</i> y <i>CGArsR2</i> tienen un sitio de unión a metales atípico. ....	124
4.2.2.2. Los residuos de cisteína de <i>CGArsR1</i> son esenciales para la metaloregulación. ....	126
4.2.3. Las arsenito permeasas de <i>C. glutamicum</i> ( <i>CGAcr3s</i> ) expulsan eficientemente As(III) por un mecanismo no acoplado energéticamente al ATP. ....	127
4.2.3.1. Las arsenito permeasas de <i>C. glutamicum</i> pertenecen a la superfamilia BART. ....	129
4.2.3.2. Las permeasas <i>CGAcr3(1)</i> y <i>CGAcr3(2)</i> participan en la detoxificación de As(III) y As(V), y su interrupción provoca la acumulación de As en <i>C. glutamicum</i> . ....	131
4.2.4. Las arseniato reductasas de <i>C. glutamicum</i> reducen As(V) a través de un mecanismo totalmente nuevo. ....	132
4.2.4.1. <i>CGArsC4</i> y <i>CGArsC1'</i> no son aparentemente funcionales en <i>C. glutamicum</i> . ....	135
4.2.4.2. Las reductasas <i>CGArsC1</i> y <i>CGArsC2</i> son funcionales en <i>C. glutamicum</i> . ....	137
4.2.4.3. Las reductasas <i>CGArsC1</i> y <i>CGArsC2</i> no están ligadas ni a GSH/Grx ni a Trx/TR en su mecanismo de reducción. ....	138
4.2.4.4. El sistema MSH/Mrx está presente en actinomicetos y condiciona la resistencia a As(V). ....	139
5. Conclusiones. ....	145
6. Bibliografía. ....	151

# ABREVIATURAS

**A:** adenosina  
**ACR:** Arsenic Compounds Resistance  
**ADP:** adenosina 5' difosfato  
**ABC:** *ATP-Binding Casette*  
**AG°:** *Energía libre de Gibbs*  
**ATCC:** *American Type Culture Collection*  
**ATP:** adenosina 5' trifosfato  
**ATPasa:** adenosina 5' trifosfatasa  
**ATSRD:** Agencia de Sustancias Tóxicas y Enfermedades de Estados Unidos  
  
**BART:** *Bile Arsenite Riboflavine Transporter*  
  
**C:** citidina  
**CCA:** Cromato cúprico de arsénico  
**cDNA:** DNA complementario sintetizado a partir de ARNm  
**cm:** centímetro  
**CMI:** concentración mínima inhibitoria  
  
**DMSO:** dimetilsulfóxido  
**DNA:** ácido desoxirribonucleico  
  
**EMSA:** *Electro mobility shift assays*  
**et al.:** *et alia* (y otros)  
**e<sup>-</sup>:** electrón  
**E°:** potencial redox  
  
**FMN:** flavin mononucleotide  
  
**g:** gramo  
**G:** guanosina  
**GFP:** *Green Fluorescent Protein*  
**GSH:** Glutación  
**GTP:** guanosina 5' trifosfato  
  
**HTH:** *Helix turn helix*  
  
**kb:** kilobases  
**kDa:** kilodalton  
**Kj:** kilojulio  
  
**M:** molar  
**MBD:** *Metal Binding Domain*  
**MFS:** *Major Facilitator Superfamily*  
**mM:** milimolar  
**MRP:** *Multidrug Resistance-Associated protein*  
**MSH:** Micotiol  
**MT:** Metalotioneina  
**mV:** milivoltio

**NAcGlc:** N-Acetilglucosamina  
**NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
**NBD:** *Nucleotide Binding Domain*  
**nM:** nanomolar  
  
**OMS:** Organización Mundial de la Salud  
**ORF:** marco de lectura abierto  
  
**pb:** pares de bases  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa  
**Pi:** ortofosfato  
**Pit :** *Phosphate inespecific transporter*  
**pNPP :** p-nitrofenilfosfato  
**ppb :** partes por billon (americano)  
**Pst :** *Phosphate specific transporter*  
  
**Q-PCR:** (PCR cuantitativa) *Quantitative Polymerase Chain Reaction*  
  
**RACE :** *Rapid Amplification of cDNA Ends*  
**RNA:** ácido ribonucleico  
**RNAr:** RNA ribosómico  
**RT-PCR:** (PCR reversa) *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*  
  
**TAT:** *Twin Arginine Transporter*  
**T:** timidina  
  
**µM:** micromolar  
**µm:** micrómetro

## Abreviaturas para aminoácidos

Ala	Alanina	A
Arg	Arginina	R
Asn	Asparagina	N
Asp	Ácido aspártico	D
Cys	Cisteína	C
Gln	Glutamina	Q
Glu	Ácido glutámico	E
Gly	Glicina	G
His	Histidina	H
Ile	Isoleucina	I
Leu	Leucina	L
Lys	Lisina	K
Met	Metionina	M
Phe	Fenilalanina	F
Pro	Prolina	P
Ser	Serina	S
Thr	Treonina	T
Trp	Triptófano	W
Tyr	Tirosina	Y
Val	Valina	V





# *Introducción*

---



## ***1. INTRODUCCIÓN.***

---

### **1.1 Arsénico: enfoque histórico y situación actual.**

El arsénico (As) ha estado íntimamente ligado a la actividad humana a lo largo de su historia. De sobra es conocida su fama como potente veneno y su uso habitual en toda clase de homicidios y conspiraciones. Pero muchos son también los casos donde se describen intoxicaciones accidentales como consecuencia de una exposición prolongada a materiales y ambientes que contienen As. Uno de los casos más controvertidos es el que se refiere a la muerte de Napoleón Bonaparte. Aunque las últimas investigaciones apuntan a un cáncer estomacal como la causa más probable de su muerte (Lugli et al., 2007), la hipótesis de una posible intoxicación más o menos “accidental” por As siempre ha estado muy presente (Kintz et al., 2007).

En la Inglaterra de la época victoriana el As formaba parte de la composición de muchos productos de consumo (papel pintado, juguetes, envoltorios para alimentos y ciertos productos textiles entre otros). En 1850 dos médicos ingleses observaron síntomas de intoxicación por As en su propio organismo. El origen de este As era el papel pintado que cubría las paredes de sus despachos, y que debía su color verde esmeralda (muy de moda en aquel período) al arsenito cúprico. Hacia 1980 se descubrió que en determinadas condiciones de humedad y temperatura,

se desarrollaba un hongo en el papel pintado (*Penicillium brevicaulis*), cuyo metabolismo provocaba la formación de di y trimetilarsinas (sustancias volátiles) a partir del arsenito cúprico, y cuya inhalación prolongada provocaba episodios de arsenicosis de gravedad variable (Scheindlin, 2005).

En la actualidad el As es uno de los metales más ubicuos en el medio natural, ocupando el lugar número 20 en la lista de elementos más frecuentes en la corteza terrestre (cerca del 0,0005 %), formando parte de la composición de muchos minerales. Este hecho, unido a su elevada toxicidad lo convierte en un problema de salud de primer orden a nivel mundial, y en el desastre medioambiental de mayor calado en muchas regiones ([www.atsdr.cdc.gov/cdrca/05list.html](http://www.atsdr.cdc.gov/cdrca/05list.html)). El reflejo más claro lo encontramos en determinadas zonas del planeta, que contienen en sus aguas superficiales niveles de As que superan ampliamente los 50 ppb (partes por billón americano) y por lo tanto superior a las 10 ppb recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Bhattacharya et al., 2007). La zona del planeta más castigada por la presencia de altos niveles de As en el agua para uso alimentario es Asia, destacando Bangla-Desh e India. Además en algunas zonas de Nepal, Vietnam y Camboya, cerca de 100 millones de personas se exponen diariamente a los efectos adversos derivados de la ingesta diaria de As. Otras zonas afectadas por este problema son determinadas regiones de Australia, zonas dispersas de Estados Unidos, Canadá y de países latinoamericanos como Méjico, Argentina, Bolivia, Brasil y Nicaragua (Silver and Phung, 2005a).

## 1.2. Características generales del arsénico.

El As es un metaloide perteneciente al grupo V de la tabla periódica de elementos, que posee características químicas tanto de los metales como de los no metales (Wackett et al., 2004). Se presenta en la naturaleza con cuatro estados de oxidación (+5, +3, 0 y -3), donde el arseniato [+5, As(V)] y el arsenito [+3, As(III)] son las formas inorgánicas más comunes.

El As elemental aparece de forma muy escasa en la naturaleza, no obstante, se han localizado masas microcristalinas de este elemento en Siberia, Alemania, Francia, Italia Rumania y EEUU. Lo más común es encontrar este As formando parte de minerales, en los que se combina con azufre o metales como el Mn, Fe, Co, Ni, Ag o Sn, destacando por su abundancia la arsenopirita (FeAsS). Los arseniatos y tioarseniatos naturales son frecuentes y la mayor parte de los minerales de azufre contienen As, la  $As_4S_4$  (rejalgar) y el  $As_2S_3$  (oropimente) son los más importantes. Otros arseniuros metálicos son los minerales FeAs<sub>2</sub> (löllingita), NiAs (niquelina), CoAsS (cobalto blanco brillante ó cobaltina), NiAsS (gersdorfit) y CoAs<sub>2</sub> (esmaltina).

La entrada del As en la biosfera se produce a través de dos vías principales:

(a) La vía geoquímica: liberado de minerales ricos en calcio y compuestos insolubles de hierro, como la ferrihidrita ( $Fe_5HO_8 \cdot 4H_2O$ ) y la arsenopirita (FeAsS), mineral éste último de gran

importancia económica, pues, constituye una tercera parte de las reservas mundiales de oro. Los fenómenos atmosféricos movilizan el As presente en los minerales para depositarlos en el agua, el aire o en el suelo (Oremland and Stolz, 2005).

El As presente en la atmósfera es consecuencia de la actividad volcánica y de la actividad microbiana. En condiciones anóxicas el As(III) puede ser reducido por los microorganismos del suelo a los compuestos volátiles “arsina” ( $\text{AsH}_3$ ) y metilarsinas, especies del As especialmente tóxicas. En la mayoría de los casos, este As termina disuelto en el agua de los acuíferos superficiales. En el caso específico del As disuelto en el agua de los pozos de Bangla Desh su origen obedece a una doble causa: (i) los procesos puramente químicos que liberan el As de los minerales; (ii) el metabolismo de determinados microorganismos, como las respiraciones desasimilativas del hierro y del As(V), que aceleran estos procesos y provocan la liberación del As al agua (Oremland and Stolz, 2005). Estos microorganismos en presencia de determinadas fuentes de carbono reducen el Fe(III) de los minerales sedimentarios a Fe(II), disminuyendo su capacidad de adsorción del As(V), solubilizándolo y dejándolo disponible para que los microorganismos respiradores de As(V) y los que desarrollan mecanismos de resistencia a As(V) lo reduzcan a As(III), forma más tóxica y reactiva que el As(V) (Oremland and Stolz, 2005).

(b) La vía antropogénica: el As no se moviliza fácilmente cuando se encuentra en forma combinada, pero como consecuencia de la acción humana esa movilización se ha acelerado, lo que ocasiona graves problemas sanitarios. El As se genera como un subproducto en muchos procesos industriales, incluyendo el refinado del cobre, plomo o zinc y la producción de oro (Eisler, 2004). Por lo que el As presente en la atmósfera no es sólo consecuencia de la actividad volcánica y la actividad microbiana como se ha mencionado previamente, sino que la extracción de minerales y el uso de combustibles fósiles contribuyen significativamente a la liberación de As a la atmósfera.

En agricultura y ganadería el uso de determinados agentes de control de plagas, como la roxarsona (ácido 4-hidroxi-3-nitrofenilarsónico), compuesto organoarsenicado sintético utilizado como paliativo frente a infecciones en granjas de cerdos y aves de corral, generan residuos con alta concentración del metaloide.

El 90 % de todos los compuestos manufacturados por el hombre que contienen As se usan como protectores de la madera (el más utilizado es el cromato cúprico de arsénico (CCA) (Khan et al., 2006). El 10% restante es utilizado en insecticidas, fertilizantes, fungicidas, en la producción de cristal (óxido de arsénico), semiconductores y aleaciones metálicas (como las existentes en las baterías de los coches). Es frecuente también su utilización en la fabricación de fármacos para el tratamiento de algunas enfermedades (tales como la enfermedad del sueño o la leucemia promielocítica crónica). La mayor parte de las aplicaciones terapéuticas se basan en su

naturaleza tóxica. Por otra parte los sulfuros de As se utilizan como pigmentos y en aplicaciones pirotécnicas.

El ciclo biológico del As se ha ampliado como resultado de la interferencia humana, por lo que cantidades enormes de este metaloide acaban en el ambiente y en los organismos (Mukhopadhyay et al., 2002). Centrando la atención en los ecosistemas marinos se puede describir perfectamente el ciclo geológico del As. En forma soluble el As se presenta, fundamentalmente, con dos estados de oxidación de relevancia biológica, el As(III) y el As(V). El As(III) puede oxidarse química o enzimáticamente a As(V), frecuente en zonas más superficiales de ambientes terrestres y acuáticos. El As(V), el compuesto del As más común en las aguas marinas, se incorpora por los organismos marinos (fitoplancton, peces, algas, moluscos y crustáceos), y se transforma en compuestos orgánicos sencillos (formas metiladas) o bien hacia compuestos de almacenamiento (arsenobetaina) que son finalmente liberados al ambiente. Parte de ese As es retenido por el fitoplancton y metabolizado a compuestos orgánicos complejos. La transformación del As inorgánico a compuestos liposolubles podría ser una respuesta adaptativa del fitoplancton marino para compensar la escasa disponibilidad de nitrato. Otros compuestos organoarsenicados más complejos incluyen organoazúcares hidrosolubles (dimetilarsenoazúcares y los arsenolípidos liposolubles) (Figura 1.1).

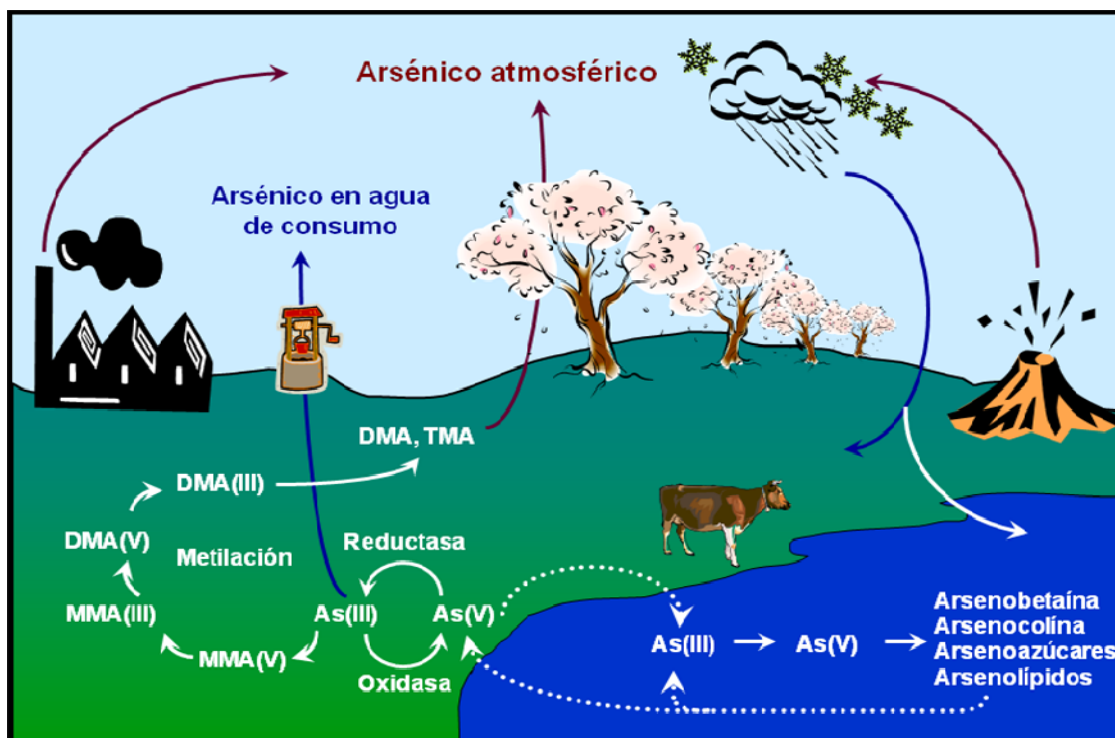


Figura 1.1: Ciclo geológico del arsénico. Modificado de Bhattacharjee and Rosen, (2007).

El fitoplancton y las algas son los principales productores de compuestos organoarsenicados complejos, pero estos organismos son también la ruta de entrada del As en las cadenas tróficas, por ser la fuente nutricional de los animales marinos. Los peces y los

invertebrados marinos retienen en sus tejidos el 99% del As acumulado en forma orgánica. El principal compuesto organoarsenicado aislado de los animales marinos es la arsenobetaína, que aparece en algas, almejas, langostas, gambas, y por ende en algunos de sus depredadores (tiburones...). No se conoce todavía cual es la ruta de conversión de los arsenoazúcares y arsenolípidos en arsenobetaína en los animales marinos superiores (Figura 1.1).

La arsenobetaína presente en los sedimentos de las aguas superficiales costeras es degradada por acción del metabolismo microbiano a ácido metilarsónico (MAS<sup>V</sup>) y a arsénico inorgánico, completando así el ciclo biológico del As en los ecosistemas marinos.

### **1.3. Efectos del arsénico sobre la salud humana.**

El As es uno de los elementos químicos con mayor toxicidad de los conocidos en la actualidad, según la Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades de Estados Unidos (ATSRD) ([www.atsdr.cdc.gov/cdrca/05list.html](http://www.atsdr.cdc.gov/cdrca/05list.html)). Como consecuencia de su ubicuidad en la corteza terrestre, la exposición de los seres humanos al As puede ser frecuente. En los animales y más concretamente en humanos, las vías de absorción habituales de As son principalmente tres: (i) ingesta de alimentos; (ii) ingesta de agua; (iii) inhalación del aire. Sin embargo, la exposición directa por contacto con suelos o agua que contengan As también es posible.

Los niveles de As en los alimentos son generalmente bastante bajos, pero en algunos casos, como en los productos procedentes del mar, estos niveles pueden llegar a ser mayores por la absorción directa a partir del agua. No obstante, las especies químicas del As que se acumulan en organismos marinos son generalmente formas de As orgánico de naturaleza menos tóxica (arsenobetaína). El verdadero problema del As ingerido se produce por el consumo de alimentos que presentan cantidades significativas de As inorgánico, o como en el caso de Bangla-Desh por el As inorgánico presente en el agua para uso alimentario (Mantovani et al., 2006).

Los riesgos de intoxicación son significativamente más altos en aquellas personas que trabajan en procesos en los que se utilizan o se generan As (Landrigan et al., 1982) (Katz and Salem, 2005), en individuos que toman grandes cantidades de vino (Aguilar et al., 1987) (Barbaste et al., 2003) (Greven et al., 2007), en inquilinos habituales de casas que contengan conservantes para la madera, como el CCA, o en consumidores de artículos con estos conservantes (Zagury et al., 2007) (Xue et al., 2006) o para los que vivan en granjas donde se hayan aplicado pesticidas con As en su composición (Robinson et al., 2007)

La mayor parte del As ingerido es rápidamente excretado por vía renal en pocos días, pero a pesar de ello, grandes cantidades de As se acumula en diferentes tejidos como huesos, piel, pelo y uñas. La identificación de las especies del As presentes en la orina revelan que del

As total excretado un 10-15% corresponde a arsénico inorgánico y ácido metilarsénico (MAs<sup>V</sup>). La mayor parte (60-80%) corresponde al ácido dimetilarsínico (DMAs<sup>V</sup>) (Csanaky and Gregus, 2002) (Meza et al., 2004). También están presentes trazas de ácido metilarsenoso (MAs<sup>III</sup>) y de ácido dimetilarsenoso (DMAs<sup>III</sup>), mucho más peligrosos que los anteriores.

La ingestión de elevadas cantidades de arsénico inorgánico provoca graves problemas de salud. Entre los efectos adversos más comunes encontramos irritaciones y afecciones gastrointestinales, además de alteraciones graves del sistema cardiovascular (Pi et al., 2005) y del sistema nervioso central (Vahidnia et al., 2007) que eventualmente causan la muerte. En etapas previas se observan disminuciones en la producción de glóbulos rojos y blancos (Heck et al., 2008), hemólisis, hepatomegalia, melanosis, polineuropatías y encefalopatías (Kapaj et al., 2006). La ingestión de arsénico inorgánico puede causar, además, patologías asociadas al sistema vascular periférico, que en casos extremos evoluciona hacia episodios gangrenosos, afección más comúnmente conocida como “pie negro” y documentada hasta la fecha sólo en Taiwán (Yoshida et al., 2004b). Las especies inorgánicas del As están clasificadas dentro del grupo A de carcinógenos potenciales y se sugiere que la ingesta de cantidades significativas, a través del agua, puede incrementar las posibilidades de desarrollo de cáncer, especialmente de piel, pulmón, hígado y del tejido linfático. Las comunidades que ingieren As presentan, además, problemas epidérmicos, como queratosis y cambios en la pigmentación de la piel.

El arsénico orgánico resulta menos nocivo y no provoca cáncer, ni tampoco alteraciones genéticas, aunque exposiciones a dosis elevadas puede causar lesiones neuronales y dolores estomacales (Soriano et al., 2007).

#### **1.4. Mecanismos de entrada del arsénico en las células.**

A pesar de su toxicidad, el As y el antimonio están presentes en algunos fármacos utilizados para el tratamiento de determinadas enfermedades. El ejemplo más conocido es el de la leucemia promielocítica aguda y el fármaco “Trisenox”, utilizado en el tratamiento paliativo de esta enfermedad y cuyo principio activo es el trióxido de arsénico (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (Akao et al., 2000). Fármacos parecidos se han utilizado también en el tratamiento de determinados tumores sólidos y hematológicos. En la lucha frente a enfermedades de carácter parasitario, como la leishmaniosis y la tripanosomiasis, son frecuentes los fármacos que contienen As (Thorsen et al., 2006), si bien en el caso particular de la leishmaniosis el fármaco más efectivo lo constituye un derivado del antimonio, denominado Pentostam (Gourbal et al., 2004).

Para que estos fármacos puedan actuar como antiparasitarios o quimioterápicos necesitan primero ser incorporados a las células y ejercer en ellas un efecto tóxico. Por lo tanto, el tratamiento efectivo de dichas enfermedades exige conocer y establecer los mecanismos a través de los cuales se incorporan los metaloides a las células y como ejercen este efecto tóxico. Pero la razón fundamental por la que se estudian estos sistemas de entrada es la necesidad de



evitar el desarrollo de resistencias asociadas generalmente a la utilización indiscriminada de estos fármacos. El origen de las mismas radica en la mutación o en la bajada de expresión de los genes que codifican para los transportadores de As (Gourbal et al., 2004).

A la hora de abordar los posibles mecanismos de incorporación de los metaloides es imprescindible conocer la naturaleza química de los mismos en el entorno extracelular, hecho que condiciona, en último término, el tipo de transportadores que utilizan las células para su incorporación. Así, aunque en fase sólida el As(III) se presente en forma de trióxido de arsénico ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) o de arsenito sódico ( $\text{NaAsO}_2$ ) (Liu et al., 2004b), en solución acuosa el As(V), el As(III) o el Sb(III) se presentan en forma de oxiácidos.

A pH neutro el ácido arsénico ( $\text{H}_3\text{AsO}_4$ ) se ioniza para formar el oxianión arseniato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ), que debido a su similitud estructural con el fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) lo sustituye en muchos de los procesos de fosforilación celular en los que se utiliza el fosfato como sustrato, siendo ésta la causa de la toxicidad asociada al As(V). El As(V) posee una pKa de 7.0, por lo que a pH neutro las especies  $\text{HAsO}_4^{2-}$  y  $\text{H}_2\text{AsO}_4^{1-}$  se mantienen en equilibrio (Silver and Phung, 2005a).

El As(V) entra en las células a través de los sistemas de transporte específicos para el fosfato inorgánico (Pi), que en el caso de *E. coli* son al menos los sistemas Pit y Pst (Willsky and Mallamy, 1980). El transportador de fosfato inorgánico de baja afinidad es energéticamente dependiente del motivo de fuerza protónica para el transporte de Pi y su expresión es constitutiva. Cuando el Pi es abundante *E. coli* utiliza este sistema de transporte, cuya constante de Michaelis Menten ( $K_m$ ) se sitúa entre 25 mM a 38 mM (Rosenberg et al., 1977; Willsky and Mallamy, 1980). Si la concentración externa de Pi presenta un rango de concentración pequeño (mM), se induce el sistema de transporte de fosfato específico de alta afinidad (Pst), con una  $K_m$  de 0,2 mM (Rosenberg et al., 1977) (Willsky and Mallamy, 1980).

El sistema Pst es un complejo de cuatro proteínas que pertenece a la familia de transportadores tipo ABC y donde la energía para el transporte la proporciona el ATP. En este sistema la proteína de unión al Pi capta el Pi libre producido en el periplasma y lo dirige al canal transmembrana de la membrana citoplasmática. Este canal está formado por dos proteínas (PstA y PstC) con seis y cinco hélices transmembrana respectivamente. En la región citoplasmática de estas dos proteínas se une PstB, cuya estructura presenta un sitio de unión a nucleótidos (ATP). La hidrólisis de este ATP proporciona energía al sistema para el transporte del fosfato (Rao and Torrani, 1990). El sistema Pst tiene dos funciones en *E. coli*: el transporte de Pi y el control negativo del regulón fosfato (un complejo de 20 proteínas la mayoría de las cuales intervienen de forma más o menos directa en el transporte de Pi). Estas dos funciones curiosamente no están relacionadas, ya que la represión del regulón esta ligada a la integridad estructural del sistema Pst (PibP/PstS+PstA+PstC+PstC) y no al transporte de Pi. (Lamarche et al., 2008) (Wanner, 1996) (Wanner, 1993).

En *Saccharomyces cerevisiae* los transportadores PHO86 y PHO87 están implicados en la incorporación tanto de fosfato como de As(V) (Bun-ya et al., 1996). Las evidencias muestran que en los organismos superiores el patrón de entrada del As(V) a las células sigue las mismas rutas que el fosfato, como es el caso del transportador PTH1 en plantas (Catarcha et al., 2007) (Huang et al., 2007) o en células animales (Solomon et al., 2007).

El trióxido de arsénico ( $As_2O_3$ ) o ácido arsenioso ( $H_3AsO_3$ ) por su parte, al igual que ocurre en el caso del Sb(III), está en equilibrio con el oxianión As(III), pero al poseer un pKa de 9.2, a pH neutro se encuentra totalmente protonado y sin carga, por lo que en solución se presenta como una molécula polihidroxilada  $As(OH)_3$  (Liu et al., 2004b) (Ramirez-Solis et al., 2004). Como consecuencia el As(III) entra en las células a través de transportadores para moléculas polihidroxiladas, entre los que se encuentran los transportadores de moléculas de agua o de glicerol (aquaporinas o aquaglicerolporinas). Las aquaglicerolporinas son canales multifuncionales de entrada de solutos orgánicos neutros como el glicerol o la urea, y se presentan en un amplio grupo de organismos, desde procariotas como *Escherichia coli* (GlpF) (Meng et al., 2004), hasta mamíferos (AQP7/9) (Liu et al., 2002), pasando por levaduras (Fps1p) (Wysocki et al., 2001) y en todos los casos se ha descrito su implicación en el transporte de As(III) y Sb(III).

Trabajos recientes han puesto de manifiesto que en el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, el trióxido de arsénico entra mayoritariamente en las células por los sistemas de transporte de hexosas, de hecho, la entrada a través de las aquaglicerolporinas queda reducida a un 25% del total (Liu et al., 2004b).

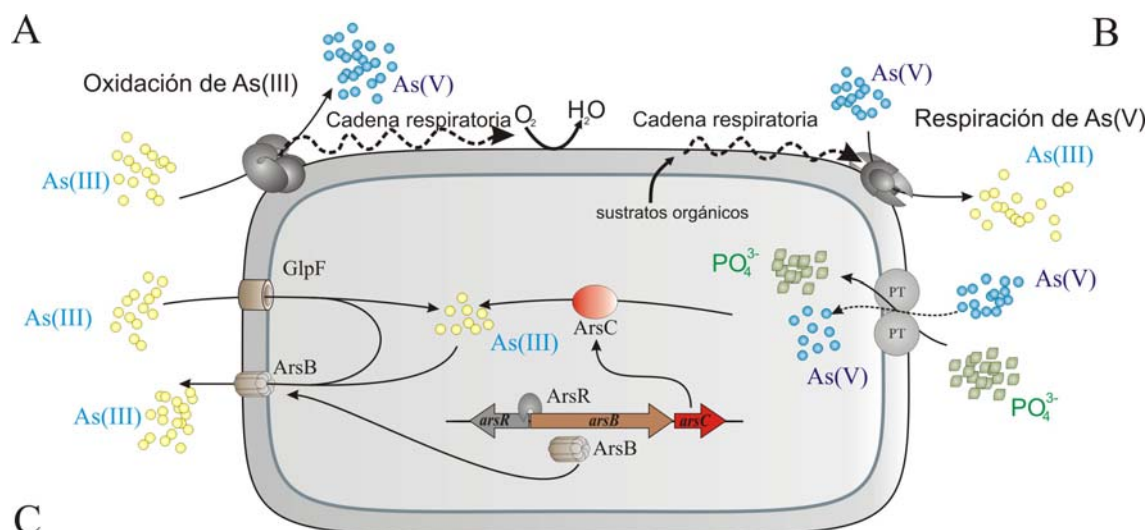
La toxicidad del As(III) reside en su comportamiento como un ion metálico débil, que le proporciona una capacidad de unión fuerte con grupos funcionales de los aminoácidos. Los grupos tiol de los residuos de cisteína y los grupos imidazol de los residuos de histidina (Rosen, 2002) son los grupos funcionales más reactivos. Estos aminoácidos se localizan frecuentemente en los centros activos de las proteínas, y la unión del As(III) a los mismos conduce a su inactivación. El As(III) provoca también sobrecruzamientos del tipo proteína-DNA y DNA-DNA (Kostal et al., 2004).

## **1.5. El arsénico y los microorganismos: versatilidad metabólica para un elemento tóxico.**

Generalmente el binomio As y vida son en sí mismo un contrasentido, pero ya se han descrito algunos ejemplos en los cuales el As es utilizado en medicina como fármaco con propiedades quimioterápicas o antiparasitarias.

A pesar de su reconocida fama como potente agente tóxico, el As es utilizado por algunos microorganismos en sus redes metabólicas como fuente de poder reductor o como

fuerza de energía, si bien lo más común son los microorganismos que simplemente desarrollan estrategias para evitar su toxicidad. Estos organismos son taxonómicamente diversos y metabólicamente versátiles. Así, por ejemplo, el As(III) es oxidado a As(V) por las bacterias oxidantes del As(III). Estos organismos quimioautótrofos utilizan oxígeno (respiración aerobia) y en algunos casos nitrato (respiración anaerobia) como aceptor terminal de electrones, a la vez que realizan la fijación de CO<sub>2</sub> atmosférico. Existen también microorganismos oxidadores de As(III) heterotróficos (mixotrofos), donde se utiliza el carbono orgánico como fuente de carbono.



**Figura 1.2:** Localización celular y función de la arsenito oxidasa (A), arseniato reductasa respiratoria (B) y de las proteínas implicadas en la detoxificación de As(III) y As(V) en los microorganismos (C).

En la vertiente contraria (la reductora), se presentan microorganismos que utilizan el As(V) como aceptor terminal de electrones, en lo que constituye una respiración anaeróbica típica. Estos organismos oxidan diferentes compuestos, ya sean de origen orgánico como lactato, acetato, formiato y compuestos aromáticos o bien inorgánicos como hidrógeno y sulfuros, provocando la formación de As(III). Estos son los denominados microorganismos que respiran As(V). Al margen de estos dos grupos mencionados, algunos microorganismos reducen As(V) a As(III) no con fines bioenergéticos, sino meramente como supervivencia, detoxificando un compuesto químico tóxico. Estos microorganismos usan una arseniato reductasa (ArsC) citoplasmática para reducir As(V) a As(III), siendo este As(III) expulsado al exterior posteriormente por una permeasa de As(III). Estos procesos metabólicos de respiraciones anaeróbicas, quimiolitotrofia y detoxificación donde las formas de As están implicadas se detallan a continuación (Figura 1.2).

### 1.5.1. Respiración desasimilativa del arseniato.

Considerando la elevada toxicidad del As, resulta cuanto menos chocante que algunos microorganismos anaerobios utilicen al As(V) como aceptor de electrones en sus respiraciones.

Este tipo de respiraciones son energéticamente favorables, principalmente si se acoplan a la oxidación de compuestos orgánicos, ya que el potencial redox ( $E^\circ$ ) del par As(V)/As(III) es de +135 mV. Un ejemplo de este proceso respiratorio lo constituyen *Sulfurospirillum arsenophilum* y *Sulfurospirillum barnesii*, dos representantes de las  $\epsilon$ - Proteobacterias. En estas bacterias el acoplamiento de la oxidación del lactato con la reducción del As(V) a As(III) presenta una variación en la energía libre de Gibbs ( $\Delta G^0$ ) = -295 KJ / mol de lactato (Laverman et al., 1995).

Los microorganismos respiradores de As(V) no pertenecen a un taxón concreto y su naturaleza es muy variada. Hasta la fecha hay descritas al menos 16 especies de origen taxonómico diverso y pertenecientes a grupos variados de bacterias (Proteobacterias, Gram positivos de bajo contenido en G+C y bacterias termófilas entre otras), así como de arqueas (Crenoarqueas) con capacidad para respirar As(V). Si variado es el abanico taxonómico de microorganismos, también lo es el de donadores de electrones que incluyen el hidrógeno, el acetato, formiato, piruvato, butirato, citrato, succinato, fumarato, malato, glucosa (Niggemyer et al., 2001) o moléculas aromáticas complejas como el benzoato e incluso el tolueno.

A pesar de que la respiración de As(V) sea un proceso energéticamente favorable, ninguno de los microorganismos utiliza como aceptor final de electrones exclusivamente el As(V), pudiendo utilizar otros aceptores de electrones como el sulfato. Sirva de ejemplo de lo indicado *Desulfotomaculum auripigmentum* (Newman et al., 1997) y la cepa Ben-RB de *Desulfomicrobium* (Macy et al., 2000), microorganismos capaces de llevar a cabo la respiración del sulfato y As(V).

A nivel molecular la enzima que hace posible este proceso es la denominada arseniato reductasa respiratoria (ARR), enzima generalmente heterodimérica, que en el caso de *Chrysiogenes arsenatis* está formada por dos subunidades de 87 (ArrA) y 29 (ArrB) kDa con localización periplásmica (Krafft and Macy, 1998). Estas características se repiten en la arseniato reductasa respiratoria de *Bacillus selenitirreducens* (Afkar et al., 2003), pero no en la de *Sulfurospirillum barnesii*, formada tan sólo por una subunidad de 48 kDa, si bien su localización sigue siendo periplásmica. Más recientemente, se ha descrito otra reductasa respiratoria de arseniato en la cepa *Shewanella* ANA-3, reductasa heterodimérica de localización también periplásmica que se diferencia de los heterodímeros ARR de *C. arsenatis* y *B. selenitirreducens* por sus parámetros cinéticos y por los metales que forman parte de sus cofactores. Un hecho excepcional en *Shewanella* ANA-3 es la coexistencia del sistema de respiración de As(V) y del sistema de destoxicación (Saltikov et al., 2003), codificados en dos operones diferentes. Estos sistemas están regulados de manera independiente y responden a diferentes niveles de As(III). Así, en el caso de la arseniato reductasa periplásmica, concentraciones de 100 nM de As(III) inducen el sistema, mientras que el sistema de destoxicación de ArsC necesita al menos de concentraciones extracelulares de As de 100  $\mu$ M para inducir la transcripción (Saltikov et al., 2005). Por otra parte, mientras las ARR de *Shewanella* ANA-3 y de *C. arsenatis* sólo reducen As(V) la enzima de *B. selenitireducens* reduce As(III), selenito y seleniato, además de As(V) (Malasarn et al., 2008).

Las enzimas ARR forman parte de una cadena respiratoria de transporte de electrones donde el As(V) actúa como aceptor final de la respiración (Stolz and Oremland, 1999) (Figura 1.2B). Trabajos recientes revelan que en *Shewanella* spp. ANA-3 y en *Shewanella putrefaciens* CN-32 el producto del gen *cymA* (que codifica para un citocromo tipo-C unido a membrana) es necesario para la respiración de As(V) (Murphy and Saltikov, 2007). Se ha sugerido que CymA es la molécula con la cual interacciona el heterodímero ARR para acoplarse al resto de la cadena transportadora de electrones. Dado que CymA participa en otros modelos de respiración [usando como aceptores finales Fe(III) Mn(IV) y fumarato], se ha postulado que para la respiración de As(V) sólo es necesaria la expresión de los genes *arrA* y *arrB*.

Aunque es cierto que las enzimas destoxicantes de As(V), y las implicadas en la respiración desasimilativa de As(V) comparten sustrato [As(V)] y producto [As(III)], su estructura y función es completamente diferente. En lo que respecta a las reductasas respiratorias ArrA y ArrB de *Shewanella* ANA-3 aceptan los electrones donados por un citocromo tipo-C anclado a la membrana citoplasmática. Este esquema de transferencia electrónica es básicamente el de una cadena bioenergética de respiración anaeróbica clásica. El acoplamiento de la reducción de As(V) a As(III) a procesos bioenergéticos impide que el As(V) se incorpore por lo tanto a la ruta de destoxicación.

La secuencia aminoacídica de ArrA presenta un péptido líder TAT (acrónimo de “Twin Arginine Transporter”) de 42 aminoácidos en su extremo N-terminal, que permite al heterodímero, una vez ensamblado y con los cofactores ya acoplados, su exportación al espacio periplásmico de las bacterias Gram negativas o al exterior de la célula en el caso de las Gram positivas (Silver and Phung, 2005a) (Saltikov et al., 2003). Además, la secuencia de ArrA incluye el motivo “C<sub>x2</sub>C<sub>x3</sub>C<sub>x27</sub>C” que actúa a modo de anclaje del grupo [4Fe-4S]. La subunidad ArrB contiene cuatro motivos tetracisteínicos que actuarían como anclaje de los grupos [Fe-S], con ausencia de la secuencia líder TAT (Malasarn et al., 2004) (Figura 1.3). Estas enzimas constituyen una clase diferente de arseniato reductasas en las cuales el par redox Mo(VI)/ Mo(IV) actúan como receptores de electrones, emulando en cierto modo la función que poseen los grupos tiol de las arseniato reductasas. Por lo tanto, en sentido estricto y simplificando mucho, esta respiración se puede considerar como una mera reducción de As(V) a As(III) pero en el exterior de la célula.

La actividad de ARR se inhibe en presencia de oxígeno, hecho que podría ser en sí mismo un contrasentido por su localización extracelular, pero probablemente esta inactivación está asociada a la necesidad de condiciones anaeróbicas tan sólo durante su ensamblaje en el proceso de localización citoplasmática. Esta situación no es ajena a otras reductasas como las de dimetilsulfóxido (DMSO), dentro de las cuales estas proteínas forman un grupo con entidad propia (Saltikov and Newman, 2003), que permite adivinar un origen evolutivo lejano. Medioambientalmente el significado es importante, ya que los sedimentos ricos en minerales con

As están frecuentemente expuestos a las condiciones oxigénicas de la atmósfera, por lo que la tasa de respiración del As(V) disminuye ostensiblemente.

La importancia de estos microorganismos en el medioambiente es evidente, pues manifiestan una capacidad dual para reducir tanto el As(V) presente en minerales tanto en fase sólida [ferrihidrita, alumina o escorodita (Redman et al., 2002)] como en solución. La reducción desasimilativa del As(V) es un proceso frecuente en las zonas superficiales de los acuíferos e influye, de manera determinante, en la movilización y especiación del As(V). Con la colaboración de las bacterias reductoras del Fe(III), los respiradores de As(V) movilizan y reducen el metaloide desde los minerales a las fases acuosas, alterando significativamente la calidad del agua.

### **1.5.2. Oxidación del arsenito en microorganismos.**

Desde un punto de vista evolutivo la respiración anaeróbica (en la que moléculas como el As(V) son utilizadas como aceptores terminales de electrones) debió aparecer pronto en la evolución y dadas las características anaeróbicas de la atmósfera terrestre primitiva resultó indispensable para la supervivencia de los microorganismos en tales condiciones. Posteriormente cuando la atmósfera se transformó en oxidante (como consecuencia de la fotosíntesis realizada por las cianobacterias) aparecieron las cadenas transportadoras de electrones con el oxígeno como aceptor final.

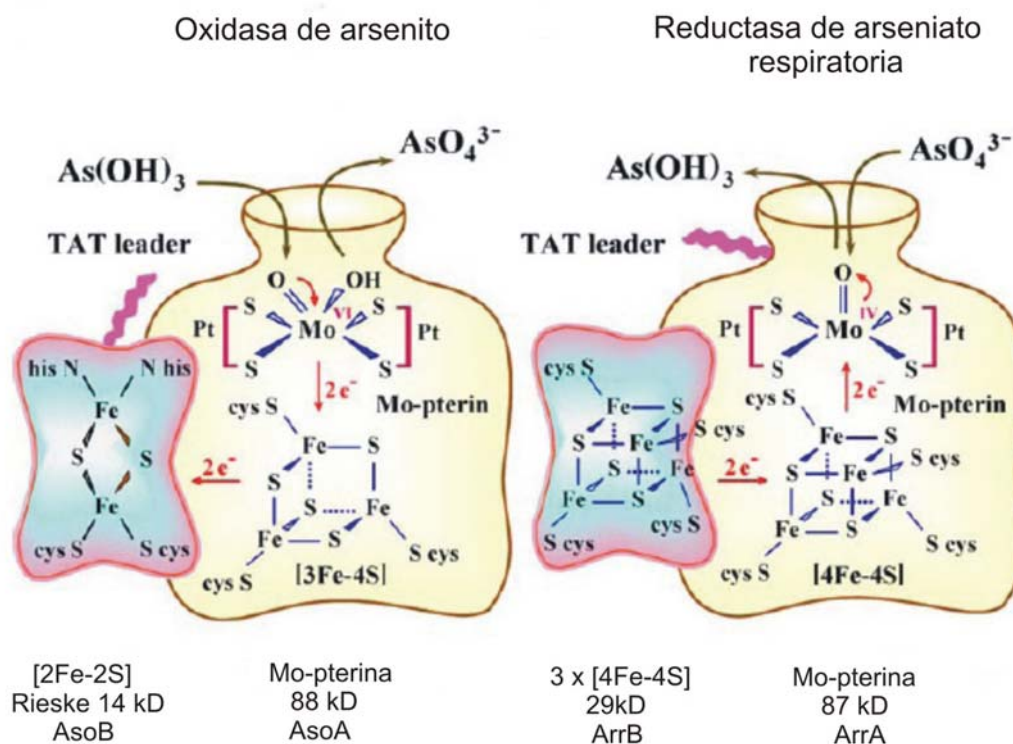
La oxidación microbiana del As(III) a As(V) es otro proceso fundamental en la movilización y transformación de las especies del As en el medio ambiente. La oxidación del As(III) se ha estudiado ampliamente en al menos 30 especies diferentes de bacterias ( $\beta$ - y  $\gamma$ -proteobacterias pertenecientes a más de nueve géneros distintos) y de arqueas (Oremland and Stolz, 2003).

La oxidación del As(III) a As(V) es un proceso metabólicamente versátil que incluye dos categorías nutricionales diferentes de quimiolitótrofos: (i) los oxidadores de As(III) heterotrófos (mixotrofos); (ii) los oxidadores de As(III) quimiolitotoautótrofos.

(i) La oxidación heterotrófica del As(III) se ha considerado habitualmente un proceso puramente detoxificador, que transforma el As(III) presente en las inmediaciones de la membrana plasmática en As(V), especie ésta menos tóxica que la anterior.

(ii) En la oxidación quimiolitotoautotrófica se acopla la oxidación del As(III) a la reducción del oxígeno o del nitrato, generando la energía necesaria para la fijación del CO<sub>2</sub> atmosférico. Como ocurre en cualquier otro autótrofo, este carbono constituye la base para la formación del esqueleto carbonado de las macromoléculas celulares. A pesar de que el proceso es ampliamente conocido, las arsenito oxidasas de los microorganismos que desarrollan este tipo de estrategia están aun por caracterizar.

La oxidación heterotrófica de As(III) está catalizada por una enzima de localización periplásmica, que a pesar de pertenecer a la familia de reductasas de DMSO no guarda relación alguna con el complejo ARR. Esta enzima heterodimérica está formada por una subunidad catalítica de 85 kDa con un átomo de molibdeno unido a dos cofactores pterina y a un grupo [3Fe-4S] y la otra subunidad del heterodímero (14 kDa) con un grupo tipo Rieske [2Fe-2S] (Ellis et al., 2001) en su estructura. La función de esta última subunidad pequeña sería la de actuar como transportador de electrones (Figura 1.3).



**Figura 1.3:** Modelos de los heterodímeros arsenito oxidasa y arseniato reductasa respiratoria. En el esquema se representan los centros activos (parte superior), los cofactores [Fe-S] y Mo-pterina, las rutas de transferencia de electrones (2e<sup>-</sup>) y los aminoácidos (Cys o His) que anclan los cofactores a los polipéptidos. Modificado de Silver and Phung, (2005a)

En la cepa de *Alcaligenes faecalis* NCIB8687 existe una región de DNA de 71 Kb que contiene los genes *asoA* y *asoB* que codifican para las dos subunidades de la arsenito oxidasa. En esta región existe además una serie de genes organizados aguas arriba y aguas abajo de los genes *aso* que codifican para funciones metabólicas y de resistencia a As. Esta región es la primera "isla génica" descrita para los genes de resistencia a As, lo que constituye un cambio conceptual importante ya que habitualmente la resistencia a As se organizaba en operones individuales. Dentro de las especies que exhiben operones de resistencia equivalentes para arsenito oxidasas, se encuentra *Cenibacterium arsenoxidans* (Muller et al., 2003), con un operón de cuatro genes denominado *aoxABCD*.

La nomenclatura de los genes que codifican para las subunidades de la arsenito oxidasa en *A. faecalis* y los correspondientes de *C. arsenoxidans* es diferente, por lo que resulta un tanto confusa, aunque el producto del gen *asoA* mantiene una identidad del 73% con el producto proteico del gen *aoxB*, al igual que *asoB* y *aoxA* mantienen un 62% identidad. En la cepa NT-26 (perteneciente al grupo de las  $\alpha$ -proteobacterias) se ha descrito una región de DNA que codifica para una teórica arsenito oxidasa, cuya estructura correspondería a un heterotetrámero con un peso molecular que duplica el correspondiente a la arsenito oxidasa de *A. faecalis* y donde la energía generada de la oxidación del As(III) sería reconducida y utilizada en el crecimiento quimiolitotrófico (Santini and vanden Hoven, 2004).

La importancia ecológica de este proceso oxidativo es indudable, pero no sólo se debe enfocar el proceso desde este punto de vista, ya que la oxidación de As(III) es en sí mismo un proceso biorremediador, pues el As(III) al transformarse en As(V) se puede inmovilizar fácilmente con diferentes adsorbentes (Battaglia-Brunet et al., 2002).

Actualmente se conoce que la oxidación de As(III) es un proceso limitado a unos pocos aislados de cada especie, de hecho, en el caso de *A. faecalis*, se han descrito aislados con actividad arsenito oxidasa (Osborne and Enrich, 1976) (Philips and Taylor, 1976) pero dicha actividad está ausente en las cepas tipo. Por lo tanto, es frecuente la aparición de aislados con capacidad para oxidar As(III) en especies pertenecientes al grupo de bacterias y de arqueas.

Un dato interesante refleja que aunque las oxidasas de los microorganismos quimioautótrofos y heterótrofos guardan ciertas semejanzas, las arseniato reductasas de los respiradores de As(V) y de los microorganismos con resistencia a As(V) son extremadamente diferentes (Mukhopadhyay et al., 2002).

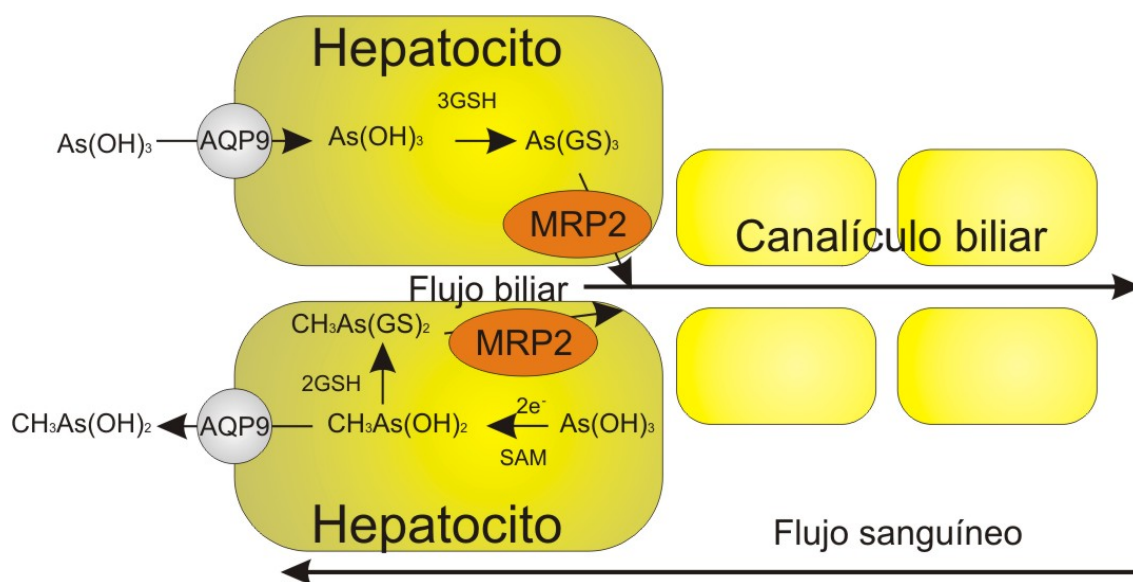
## **1.6. Mecanismos de resistencia a arsénico en microorganismos.**

Prácticamente todas las bacterias tienen genes de resistencia a metales tóxicos ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{AsO}_2^-$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{TeO}_3^{2-}$ ,  $\text{Tl}^+$  y  $\text{Zn}^{2+}$ ). La mayoría de estos sistemas de resistencia consisten en una expulsión del tóxico al exterior de la célula a través de proteínas transportadoras que implica un gasto energético (consumo de ATP mediado por una ATPasa, o bien un intercambio quimiosmótico entre el ion en cuestión y los protones del gradiente celular). Menos frecuentes son los procesos que incluyen las transformaciones enzimáticas (oxidaciones, reducciones, metilaciones y dimetilaciones) o la unión de estos metales a proteínas quelantes (Metalotioneínas como la SmtA, la chaperona CopZ, o la proteína periplásmica de unión a plata SilE) (Kihlken et al., 2008) (Silver et al., 1999) (Blindauer et al., 2001) (Figura 1.4).





Los átomos C, O, N, y S de las moléculas orgánicas funcionan frecuentemente como grupos aceptores en procesos metabólicos primarios y secundarios, pero también los metales-metaloides pueden utilizarse como grupos aceptores, generándose compuestos volátiles. El término “biometilación” hace referencia tanto a la formación de compuestos metilados volátiles como no volátiles de metales y metaloides. En el caso del As, la mayoría de los compuestos formados por biometilación tienen la estructura  $(\text{CH}_3)_n\text{AsH}_{3-n}$ , donde según sea el valor de  $n = 1, 2$  ó  $3$  los productos serán mono-, di- y trimetilarsina respectivamente. Los productos mayoritarios no volátiles son ácido metilarsónico ( $\text{MAs}^{\text{V}}$ ) y ácido dimetilarsínico ( $\text{DMAs}^{\text{V}}$ ) (Bentley and Chasteen, 2002). Un término relacionado con el de la biometilación es el de la “bioalkilación” donde grupos alquilo (etilo, propilo...), se unen a través de un átomo de carbono a un elemento pesado. El término bioalkilación ha sido empleado en ocasiones para moléculas complejas como la betaína-trimetilarsónico, el lípido O-fosfatidil trimetilarsoniolactato o el arseno-ribofuranosido (Bentley and Chasteen, 2002).



**Figura 1.5:** Esquema general de los procesos de destoxificación de As(III) en las células hepáticas de mamíferos. GSH (Glutación), SAM (S-adenosilmetiltransferasa), MRP2 (Multi drug resistance protein 2), AQP9 (Aquadlicerolporina de humanos).

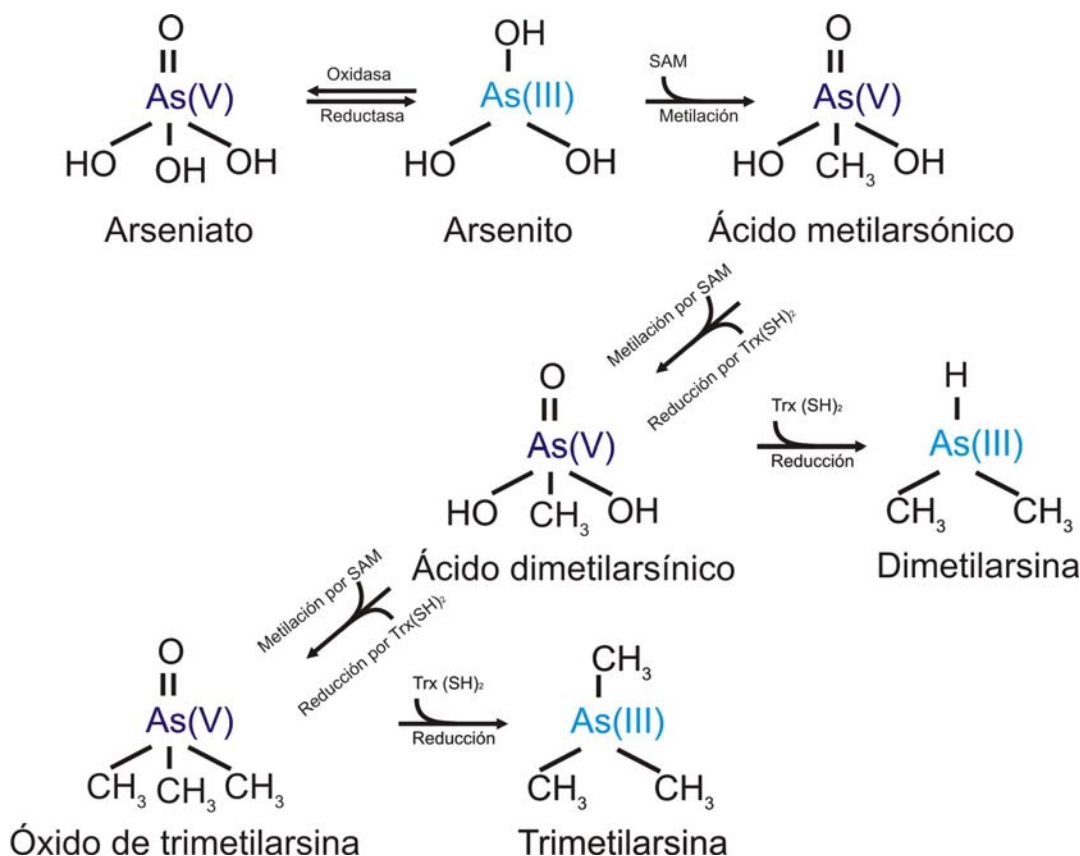
En los organismos eucariotas la destoxificación del As(III) implica su asociación con el glutatión (GSH), formando el complejo  $\text{As}(\text{GS})_3$ , y su expulsión de la célula por transportadores tipo ABC, como es el caso de Ycf1p, en *Saccharomyces cerevisiae* (Ghosh et al., 1999) localizada en las vacuolas ó de MRP2 en mamíferos (Kala et al., 2000) (Figura 1.5). En muchos mamíferos, entre los que incluimos al hombre, la metilación hepática del As, y su excreción por vía urinaria constituye una ruta alternativa para la destoxificación de As(III) (Styblo et al., 2002). La metilación hepática está catalizada por la enzima As3MT (Wood et al., 2006), enzima con actividad As(III)-S-adenosilmetiltransferasa, descrita en ratas y en humanos. En los roedores la actividad de la As3MT tiene localización multiorgánica, pero en humanos se limita a hígado, riñones y cerebro (Zakharyan et al., 1999).

De forma general, la metilación se ha considerado un proceso meramente detoxificador, pero en sentido estricto los procesos de metilación implican la producción de especies como la monometilarsina ( $\text{MAs}^{\text{III}}$ ) y la dimetilarsina ( $\text{DMAs}^{\text{III}}$ ) cuya toxicidad supera a la del propio  $\text{As}(\text{III})$ . Además los compuestos metilderivados del As son potentes inhibidores de determinadas enzimas como la glutatión reductasa (GOR), la tioredoxina reductasa (TR) y la piruvato deshidrogenasa.

Las bacterias y los hongos no son ajenos a estas reacciones de detoxificación y producen arsinas, compuestos altamente tóxicos y volátiles, sintetizados por proteínas homólogas a la  $\text{As3MT}$  y que se denominan genéricamente  $\text{ArsM}$ , y son codificadas por los genes *arsM* (Quin et al., 2006).  $\text{ArsM}$  es una S-adenosilmetiltransferasa que forma parte de los operones controlados por  $\text{ArsR}$  (regulador transcripcional de los operones *ars*), lo que indica que  $\text{ArsM}$  ha evolucionado de manera específica para conferir resistencia a As.

La expresión heteróloga del gen *arsM* de *Rhodopseudomonas palustris* en una cepa hipersensible de *E. coli* determina la aparición de un fenotipo resistente a As, con la detección de especies metiladas pentavalentes como el ácido dimetilarsínico ( $\text{DMAs}^{\text{V}}$ ) o el óxido de trimetilarsina ( $\text{TMA}^{\text{V}}$ ) o la trivalente trimetilarsina ( $\text{TMA}^{\text{III}}$ ) de naturaleza volátil. Fisiológicamente la relación entre la expresión de *arsM* y el fenotipo resistencia a As están íntimamente ligadas. El primer aspecto a tener en cuenta es la toxicidad "in vivo" de las distintas especies del As, siendo de mayor a menor:  $\text{TMA}^{\text{III}}$ ,  $\text{DMAs}^{\text{III}}$ ,  $\text{MAs}^{\text{III}}$  >  $\text{As}(\text{III})$  >  $\text{As}(\text{V})$  >  $\text{DMAs}^{\text{V}}$  >  $\text{MAs}^{\text{V}}$  >  $\text{TMA}^{\text{V}}$ . Este hecho, hace que la conversión del  $\text{As}(\text{V})$  a  $\text{DMA}^{\text{V}}$  o  $\text{TMA}^{\text{V}}$  se pueda considerar un proceso detoxificante, y aunque las formas  $\text{MAs}^{\text{III}}$  y la  $\text{DMAs}^{\text{III}}$  son más tóxicas que el  $\text{As}(\text{III})$ , éstas no se acumulan en las células que expresan  $\text{ArsM}$ , ya que son intermediarios de la formación de la  $\text{TMA}^{\text{III}}$  [más tóxica que el  $\text{As}(\text{III})$  pero de naturaleza volátil] lo que impide su acumulación en las células. Esto pone de manifiesto que la metilación del As constituye un proceso de detoxificación por metilación de las especies inorgánicas  $\text{As}(\text{III})$  y  $\text{As}(\text{V})$  (Figura 1.6). En estos procesos el  $\text{As}(\text{V})$  se reduce a  $\text{As}(\text{III})$ , reacción que precede a una serie de metilaciones y reoxidaciones, seguidas de reducciones de los intermediarios organoarsenicados.

La metilación y desmetilación de los compuestos inorgánicos del As y la incorporación del As inorgánico en moléculas orgánicas pequeñas como la arsenobetaína, los arsenolípidos y los arsenoazúcares (Mukhopadhyay et al., 2002) constituye otro de los procesos fundamentales de la bioquímica del As. El ácido dimetilarsínico ( $\text{DMAs}^{\text{V}}$ ) es el sustrato para la conversión fúngica a los mencionados arsenolípidos y a la arsenobetaína.



**Figura 1.6:** Cascada de metilación del arsénico inorgánico en microorganismos. La conversión del As(V) a trimetilarsina es un proceso compuesto de varias etapas donde inicialmente el As(V) se reduce a As(III). A través de metilaciones y reoxidaciones seguidas de reducciones este As(III) da lugar a la especie trimetilarsina, de naturaleza volátil. Modificada de Silver and Phung, (2005b).

Poco se conoce de la síntesis de los compuestos metilarsenicados y de los compuestos organoarsenicados más complejos. En ausencia de estudios estructurales y de mutagénesis, las conclusiones que se pueden extraer sobre los mecanismos de reducción son poco concluyentes. A día de hoy no están todavía identificadas ni las enzimas implicadas en la desmetilación ni los genes que las codifican, aunque este proceso sea imprescindible para completar el ciclo del As (Mukhopadhyay et al., 2002). La metilación se inicia a partir de As(III) en un proceso que tiene que estar obligatoriamente acoplado con la oxidación de un compuesto en estado de oxidación-reducción +3 a un producto en estado redox +5 (Quin et al., 2006) (Thomas et al., 2004). La reducción de los compuestos As(V)-metilados a compuestos As(III)-metilados implica necesariamente la interacción con los grupos tiol (-SH) de las cisteínas (Mukhopadhyay et al., 2002) (Quin et al., 2006), de un modo análogo a como lo hacen las reductasas de arsénico. Aunque se cree que la tioredoxina actúa en las catálisis de la metilación de mamíferos en estrecha colaboración con las reductasas de tioredoxina (Thomas et al., 2004), otros autores sostienen que la molécula realmente implicada en el proceso es el glutatión (GSH) (Waters et al., 2004a) (Waters et al., 2004b) (Hayakawa et al., 2005).

Una cuestión importante que todavía permanece sin respuesta es si la reducción está catalizada por la misma enzima que cataliza la metilación, o si la tioredoxina o cualquier fuente de poder reductor lleva a cabo la reducción de los compuestos As(V)-orgánicos a As(III)-orgánicos. En cualquier caso, los residuos de cisteína proporcionan el poder reductor necesario para la reducción de los compuestos As(V)-derivados generados en la metilación anterior a compuestos As(III)-derivados, compuestos que constituirán a su vez el sustrato de la próxima metilación (Quin et al., 2006) (Waters et al., 2004b). No obstante, esto es simplemente una hipótesis y otros autores como Hayakawa et al., (2005) han postulado un ciclo de metilación sin intermediarios del estado de reducción +5, donde los compuestos As(V)-metilderivados serían productos finales de la reacción, más que intermediarios en la metilación del As (Hayakawa et al., 2005).

### 1.6.2. Mecanismos de resistencia a arsénico, los operones “ars”.

Los genes de resistencia a As están generalmente organizados en operones, siendo los más representativos los formados por tres o cinco genes (*arsRBC* o *arsRDABC*) que conforman una unidad transcripcional. No obstante, se han encontrado operones de composición génica diversa, con variabilidad tanto en el número de genes como en la función y organización de los mismos (Paez-Espino et al., 2009). El sistema de tres genes está compuesto por un represor transcripcional de arsénico (ArsR) capaz de actuar en “trans” y que responde a las variaciones ambientales de As(III). Este represor controla la expresión de los genes que codifican para ArsB y ArsC. *arsB* codifica para una arsenito permeasa, y su función es la de expulsar As(III) [As(OH)<sub>3</sub>] fuera de las células asociada a una entrada de H<sup>+</sup> (Meng et al., 2004), mientras que el gen *arsC* codifica para una arseniato reductasa, que cataliza la reducción de As(V) a As(III) (Rosen, 2002). Los operones *ars* de tres componentes se han localizado en los cromosomas bacterianos de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y en otras enterobacterias, así como en los plásmidos pI258 (Ji and Silver, 1992b) y pSX267 (Rosenstein et al., 1992) del género *Staphylococcus*.

Alternativamente algunos operones *ars* como los codificados en los plásmidos de *E. coli* R773 y R46 tienen cinco genes. En estos operones además de los tres genes ya indicados contienen dos genes adicionales que codifican para los productos ArsD y ArsA. ArsD fue inicialmente considerado un represor transcripcional de respuesta a As(III) (Chen and Rosen, 1997), aunque recientemente se le considera una chaperona de arsénico que facilita la expulsión de As(III) en colaboración con la bomba ArsAB (Lin et al., 2007a). ArsA por su parte es una ATPasa intracelular que forma complejos proteicos con ArsB. La función de esta proteína es la de suministrar la energía necesaria para la expulsión del As(III) acoplándola a la hidrólisis del ATP. Con esta asociación protéica se consigue una mayor eficiencia en la expulsión de As(III) y por lo tanto mayor resistencia a As (Rosen, 2002).

Además de la tipología de los operones *ars* de tres y cinco elementos indicados, se ha estudiado una amplia variedad de operones formados por cuatro genes como el de *Bacillus subtilis* (Sato and Kobayashi, 1998), el de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Butcher and Rawlings, 2002) y la cianobacteria *Synechocystis* sp. (Lopez-Maury et al., 2003). Igualmente se ha descrito la presencia de dos operones *ars* en el cromosoma de la especie *Pseudomonas putida* (Canovas et al., 2003), así como en *Ochrobactrum tritici* (Branco et al., 2008) y *Desulfovibrio desulfuricans* (Li and Krumholz, 2007).

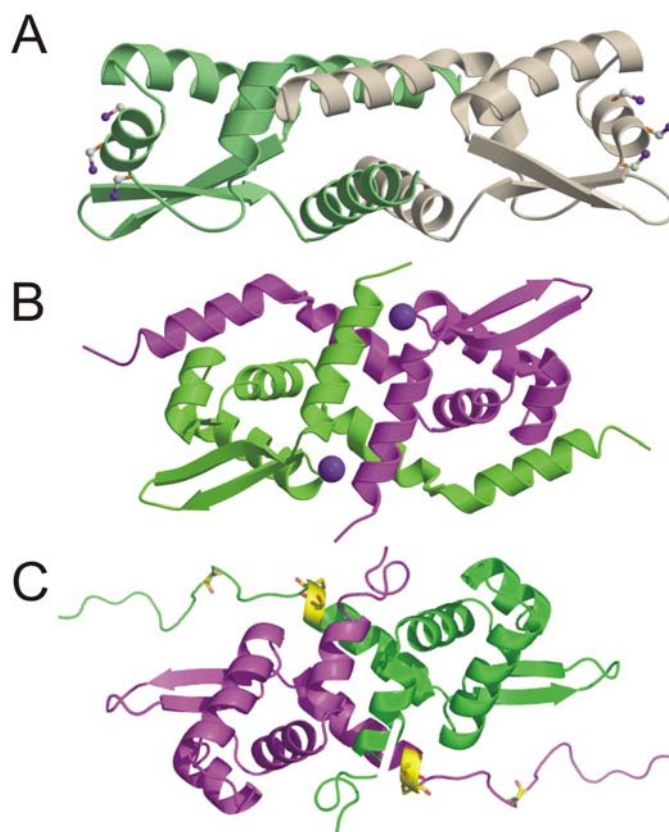
A continuación describimos cada uno de los genes que intervienen de forma global en la resistencia a As.

#### 1.6.2.1. Regulador transcripcional de arsénico “ArsR”.

El As presente en el medio ambiente desencadena en los microorganismos una respuesta que dispara los mecanismos de resistencia o detoxificación del metaloide. Esta respuesta la inician las proteínas metaloreguladoras de la familia ArsR/SmtB, a la cual pertenece ArsR. Se trata de reguladores transcripcionales que se unen de manera específica a los metales de transición, metales pesados o metaloides frente a los que actúan (As en el caso que nos ocupa), provocando una desrepresión de los genes presentes en el operón.

Algunos metaloreguladores de la familia ArsR/SmtB se han caracterizado desde un punto de vista bioquímico, aunque sólo tres de ellos (SmtB, CadC y CmtR) han sido analizados a nivel estructural (Cook et al., 1998) (Ye et al., 2005) (Banci et al., 2007) (Figura 1.7). Estas proteínas se comportan como homodímeros que tienen en común una región HTH (“helix turn hélix”) de unión al DNA al final de cada subunidad, cuyo origen podría tener un ancestro común (Qin et al., 2007). Estos reguladores a pesar de compartir ciertas características difieren en otras muchas, las más significativas las encontramos en las zonas de unión del metal/metaloide que actúa como inductor.

Dentro del grupo de los represores de arsénico, el ejemplo mejor estudiado es el del represor ArsR cuyo gen se localiza en el plásmido R773. Este represor se une a la región promotora de su propio operon *ars* en ausencia de As(III) o Sb(III) (Wu and Rosen, 1993). Cada monómero posee la secuencia “Cys<sup>32</sup>-Val-Cys<sup>34</sup>-Asp-Leu-Cys<sup>37</sup>” en la primera hélice de la región de unión al DNA (San Francisco et al., 1990) (Shi et al., 1994). Los tres residuos de cisteína de dicha secuencia forman un triple enlace coordinado intramolecular muy específico para el As(III) y el Sb(III) en lo que constituye el sitio de unión del metaloide.

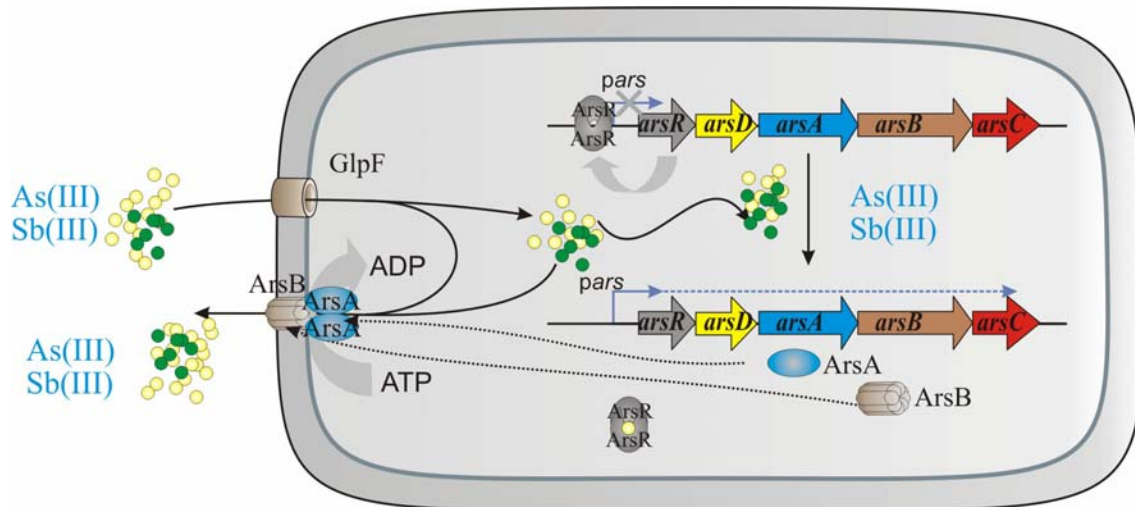


**Figura 1.7:** Estructuras tridimensionales de diferentes miembros de la familia ArsR/SmtB: (A) ArsR del plásmido R773 de *E. coli*. (B) CadC del plásmido pl258 de *S. aureus* (Ye et al., 2005) (C) ArsR de *A. ferrooxidans* (Quin et al., 2007).

La unión de estos metaloides a los grupos sulfidrilo de los residuos de cisteína provoca un cambio conformacional en el represor, ocasionando la disociación de este de la región operadora y por lo tanto, permitiendo la expresión de los genes que controla (Figura 1.8). Otro miembro de la familia de ArsR/SmtB es el represor ArsR de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, que presenta en su región de dimerización tres cisteínas (“Cys<sup>95</sup>-Cys<sup>96</sup>xxxx-Cys<sup>102</sup>”) (Butcher and Rawlings, 2002). Este represor fue descrito como “atípico” por no poseer el sitio de unión a metales “C<sub>x</sub>C<sub>xx</sub>C” del ArsR del plásmido R773, pero en realidad los tres residuos de cisteína forman como en el caso anterior, un triple enlace coordinado intramolecular con los metaloides trivalentes (Qin et al., 2007).

Por lo tanto, dentro de la familia ArsR/SmtB de represores metaloregulados el sitio de unión al inductor puede estar localizado cerca de la región de unión al DNA o en la zona de dimerización. Este sitio de unión a metales/metaloides está típicamente compuesto de pares o tríadas de residuos de cisteína, frecuentemente localizados en el extremo de la  $\alpha$ -hélice. Estas regiones son susceptibles de sufrir cambios conformacionales, por lo que la unión del metal genera un desenrollamiento de la  $\alpha$ -hélice, que permite la disociación del represor del DNA. Los sitios de unión a metales pueden estar formados por residuos aportados por uno de los

homodímeros (sitio de unión a metales intramoleculares) o por los dos homodímeros (intermoleculares).



**Figura 1.8:** Mecanismo de metaloregulación de ArsR en *E. coli* : el represor permanece unido al DNA en forma de dímero impidiendo la expresión del sistema *ars*. Sólo cuando el metaloide As(III) o Sb(III) se une al sitio de unión a metales de ArsR se produce un cambio conformacional en el represor que lo libera del DNA y permite la expresión del operón.

#### 1.6.2.2. ArsD, la metalochaperona de arsénico.

El abanico de metales regulados por la célula es muy amplio, y abarca desde los metales esenciales, que en concentraciones traza son indispensables pero que en exceso resultan tóxicos para las células (cobre, zinc), hasta los metales tóxicos (cadmio y plomo) o los metaloides tóxicos (As y antimonio). Los mecanismos para el control de la concentración intracelular de estos metales son variados e incluyen proteínas como las metalotioneínas (MT). Las MT son proteínas de pequeño tamaño con función quelante para metales de transición como el cobre o el zinc, y utilizadas con fines de almacenamiento o como proteínas con función quelante para metales tóxicos, como el cadmio, cuyo fin es la de detoxificación (Romero-Isart and Vasak, 2002). En plantas y hongos existe otro tipo de péptidos (las fitoquelatinas) con secuencias ricas en residuos de cisteína, cuyo efecto quelante se utiliza con fines detoxificantes (Cobbett and Goldsbrough, 2002).

Alternativamente a los péptidos y polipéptidos indicados se encuentran las metalochaperonas, proteínas de pequeño tamaño cuya función quelante está encauzada a facilitar el acceso de los metales a las proteínas/enzimas diana con los que se combina (Finney and O' Halloran, 2003) (Rae et al., 1999) (Rosenzweig, 2002). Entre las enzimas diana de las metalochaperonas tenemos a la superóxido dismutasa, donde la metaloenzima Lys-7 de *S. cerevisiae* facilita el cobre a la superóxido dismutasa (Culotta et al., 1997), o la ureasa, donde su metaloenzima proporciona níquel al centro activo de la ureasa durante su activación (Mulrooney



et al., 2005). Entre este tipo de metalochaperonas también se encuentra ArsD, proteína codificada en los operones de cinco genes de los plásmidos de bacterias Gram negativas (Rosen, 2002) y presente también entre otros en el operón de resistencia a As del plásmido pBD2 de *Rhodococcus erythropolis* (Ordóñez et al., 2005). Hasta la fecha se han localizado más de 50 agrupaciones génicas de resistencia a As donde los genes para ArsA y ArsD están adyacentes, aunque pudiendo alternarse el orden (Lin et al., 2007a).

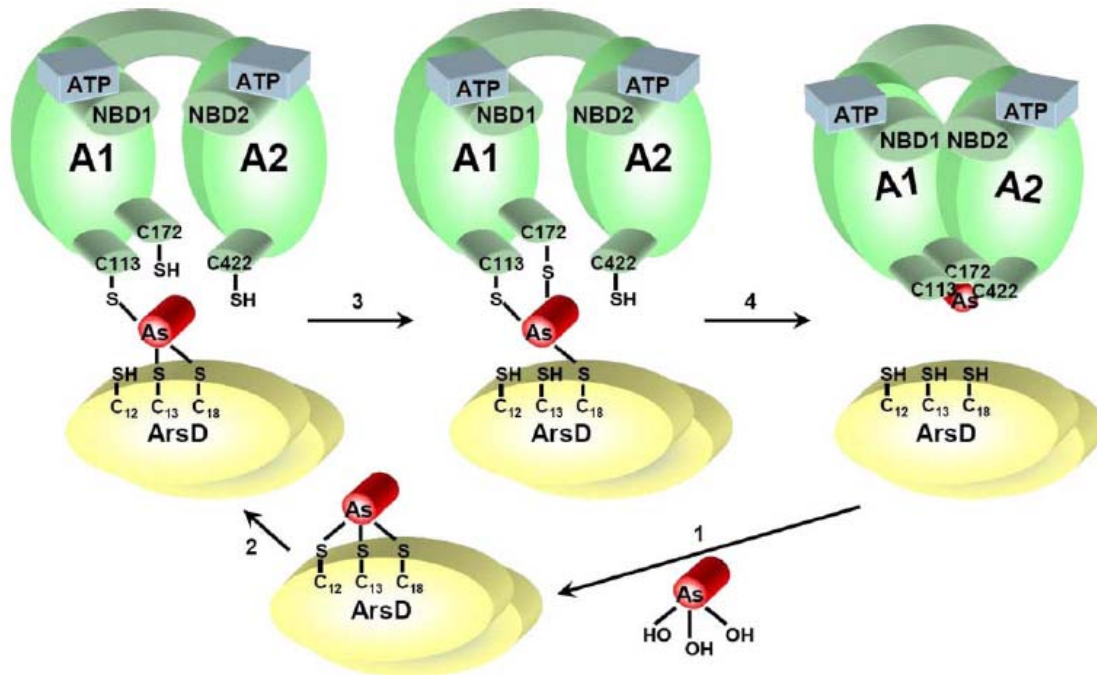
ArsD actúa como un homodímero compuesto por dos subunidades de 120 residuos cada una (Chen and Rosen, 1997), con tres pares de cisteínas próximos entre sí ("Cys<sup>12</sup>-Cys<sup>13</sup>", "Cys<sup>112</sup>-Cys<sup>113</sup>" y "Cys<sup>119</sup>-Cys<sup>120</sup>") en cada subunidad. Cada uno de estos pares de cisteínas es capaz de interactuar con una molécula de As(III) o Sb(III). La realización de ensayos de mutagénesis dirigida sobre las cisteínas de ArsD revela que los residuos Cys<sup>112</sup>, Cys<sup>113</sup>, Cys<sup>119</sup> y Cys<sup>120</sup> son prescindibles para la funcionalidad de ArsD. De hecho, la expresión de estos mutantes de ArsD "in vivo" no ejerce efecto alguno sobre la activación de ArsA y su resistencia a As(III), mientras que los mutantes en los residuos Cys<sup>12</sup>, Cys<sup>13</sup> o Cys<sup>18</sup> (residuos conservados en todos los homólogos de ArsD) pierden la capacidad antes indicada (Lin et al., 2007b) y por lo tanto, resultan críticos para la interacción ArsD-ArsA. Estas particularidades han conducido a la asignación de estos residuos como los responsables, en último término, de la captación y transferencia del As(III) a la proteína ArsA y de la activación de esta.

El fenotipo de complementación de la resistencia a As(III) asociado a ArsD es una consecuencia de la optimización de la cesión del metaloide a la bomba de expulsión ArsAB, es decir, ArsD actúa como una metalochaperona de As(III). En el modelo descrito ArsD interactúa con ArsA en ausencia del metaloide con baja afinidad (Lin et al., 2006), interacción que no se establece ni con ArsC ni con ArsR. Esta débil interacción entre ArsA y ArsD se incrementa cuando el As(III) se une al sitio de unión a metales de ArsD. La unión de As(III) a ArsD se produce como consecuencia de una afinidad muy superior a la que exhibe ArsA por el As(III).

La cesión del As(III) desde ArsD [con un sitio de unión a As(III) altamente específico] a ArsA (cuyo sitio de unión es menos específico) se debe producir a expensas de cambios conformacionales en las proteínas, ya que es un proceso termodinámicamente desfavorable. Es, por lo tanto, previsible que la interacción entre ellas posibilite cambios en la afinidad de los sitios de unión a metales implicados, de manera que los residuos de cisteína de ArsD implicados en la interacción con ArsA, se acerquen estéricamente al sitio de unión a metales de ArsA, desorganizando el sitio de unión a metales de ArsD y bajando su afinidad, lo que posibilitaría la transferencia del As(III) desde ArsD hasta ArsA (Figura 1.9).

En condiciones de no interacción con ArsA, la elevada afinidad del sitio de unión a metales de ArsD posibilita que esta proteína realice funciones de rastreo y captura de As(III) en el citosol a concentraciones muy inferiores a las del complejo ArsAB asociado a membrana. La  $K_m$  de ArsB actuando como transportador secundario es de 0,14 mM (Kuroda et al., 1997), lo que

sumado al hecho de que de forma natural el rango de concentraciones de As en el agua está entre 7nM y 70  $\mu$ M, hace que la interacción entre ArsD y ArsA cobre sentido para responder a estos rangos de concentraciones, bajando la concentración óptima de sustrato a la cual las bombas funcionan.



**Figura 1.9:** Mecanismo de transferencia de As entre ArsD y ArsA. *Paso 1:* ArsD se une al As(III) por interacción de los hidroxilos del  $\text{As}(\text{OH})_3$  con los grupos tiol de los residuos Cys<sup>12</sup>, Cys<sup>13</sup> y Cys<sup>18</sup> del sitio de unión a metales 1 (MSB1). *Paso 2:* intercambio entre un grupo tiol de ArsD que actúa como ligando con otro grupo tiol del MSB1 de ArsA. *Paso 3:* el As(III) intercambia un segundo tiol de ArsD por otro de ArsA. *Paso 4:* El As(III) es transferido al MSB1 de ArsA por un intercambio final de ligandos, lo que provoca un cambio conformacional en ArsA que incrementa la hidrólisis de ATP. Tomado de Lin et al., (2007a). El modelo puede no corresponder con el orden real de intercambio de ligandos.

ArsD no sólo actúa como facilitador de As(III) a ArsA, sino que la interacción entre las dos proteínas incrementa la actividad ATPasa de ArsA y la afinidad de ArsA por el As(III) sin variar la  $V_{\text{max}}$ , lo que hace a ArsA más efectiva a bajas concentraciones del metaloide (Lin et al., 2007a).

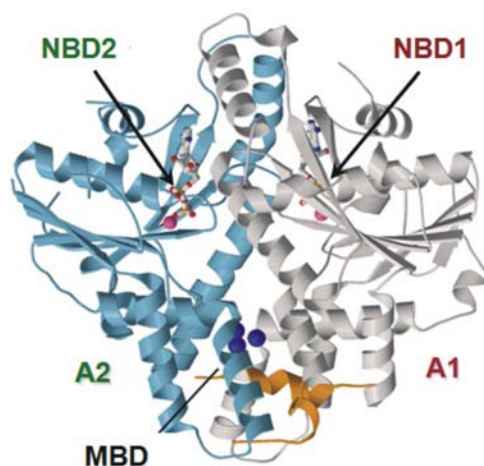
### 1.6.2.3. ArsA, la ATPasa de resistencia a arsénico.

La estrategia más empleada en la resistencia frente a compuestos citotóxicos es su expulsión al exterior de la célula a través de transportadores con mayor o menor especificidad. De forma general algunos miembros de la superfamilia de transportadores de membrana de tipo ABC (ATP Binding Cassette) confieren resistencia frente a algunos tóxicos, expulsándolos al exterior y por lo tanto disminuyendo su concentración en el citoplasma celular. Los

transportadores de tipo ABC están formados generalmente por dos mitades homólogas, cada una de las cuales contiene dos partes: un dominio transmembrana estructurado en 6  $\alpha$ -hélices, y un dominio de unión a nucleótidos (NBD) (Nucleotide Binding Domain).

La bomba de expulsión de arsénico ArsAB es el transportador de metaloides trivalentes [As(III) y Sb(III)] más extendido dentro de los procarionotes y exhibe muchas semejanzas con los transportadores de tipo ABC. En este transportador el componente ArsB es una proteína transmembrana con 12 hélices  $\alpha$  que actúa como translocador de oxianiones, mientras que ArsA es la subunidad catalítica, que acopla la hidrólisis de ATP a la translocación de estos oxianiones.

ArsA es una ATPasa dependiente de sustrato que presenta dos dominios de unión de nucleótidos (NBDs) con sus correspondientes sitios de unión alostéricos (Walmsley et al., 2001). ArsA está compuesta de dos mitades homólogas (A1: residuos 1-282 y A2: residuos 321-583), conectadas por un pequeño "linker" de 25 residuos (Figura 1.10).



**Figura 1.10:** Estructura tridimensional de ArsA (2,1 Å de resolución) tomada de Zhou et al., (2000). NBD1/2 (Nucleotide Binding Domain), MBD (Metal Binding Domain).

Tanto A1 como A2 exhiben actividad ATPasa independiente, actividad que se estimula de 30 a 40 veces, como resultado de la unión de los metaloides que transporta y que requiere la interacción de las dos mitades (Kaur, 1999). En ArsA se localizan dos dominios consenso de unión a nucleótidos NBD1 y NBD2 que hidrolizan ATP tanto en presencia como en ausencia de los sustratos As(III) y Sb(III), si bien esta hidrólisis se mantiene a un nivel basal y constante en ausencia de los metaloides y donde el dominio NBD1 controla la actividad ATPasa total (Jiang et al., 2005). Los análisis estructurales de ArsA demostraron que los NBDs están formados por residuos de A1 y A2, lo que sitúa a los NBDs en el interfase de A1 y A2. El dominio NBD1 está formado principalmente por residuos de A1 con una ligera aportación de residuos de A2 mientras que en el caso del dominio NBD2 es A2 la que aporta la mayoría de los residuos (Zhou et al., 2000). Mutaciones dirigidas en estas secuencias indican que los dos NBDs son necesarios para

los procesos de catálisis y la resistencia a metaloides (Karkaria et al., 1990) (Kaur and Rosen, 1992), y que estos NBDs interactúan durante la catálisis cooperando de forma positiva entre ellos (Li et al., 1996) (Figura 1.10).

El conector (“linker”) está situado cerca de los NBDs y participa activamente en los cambios conformacionales que se producen en ArsA ante la unión del sustrato. Cuando se coexpresan “in vivo” las dos mitades de ArsA (A1 y A2) de manera independiente, sólo cuando el conector está presente en una de las dos mitades se observa incremento en la resistencia a As (Jia and Kaur, 2001). Las deleciones en el conector conllevan la disminución significativa de la capacidad catalítica de ArsA, lo que probablemente está asociado a limitaciones en los cambios conformacionales que imposibilitan su función. Alternativamente se ha postulado que el acortamiento del conector limita la flexibilidad de ArsA, lo que en último término afectaría a la interacción de las cisteínas de los MBDs (Dominios de Unión a Metales).

Según esta teoría la unión del sustrato no mejoraría su interacción. Las mutaciones realizadas en el conector demuestran que el papel del conector no se limita simplemente a proporcionar flexibilidad a la proteína, sino que ejerce un papel crítico en la conformación final de los NBDs y en la función catalítica de ArsA; tanto es así, que las mutaciones G284S, R290S y D303G disminuyen drásticamente la catálisis de ArsA (Jia and Kaur, 2001).

#### **1.6.2.4. Transportadores de resistencia a arsénico: ArsB y Acr3p.**

La expulsión de As en los organismos unicelulares está mediada por proteínas transmembrana del tipo ArsB o Acr3 que llevan a cabo la extrusión del metaloide al exterior de la célula (Dey and Rosen, 1995), pero como ocurre en el caso de los hongos, esta resistencia puede implicar la acumulación del As en la vacuola (Ghosh et al., 1999).

En *Bacteria* existen dos tipos de transportadores de As(III): ArsB y Acr3. ArsB tiene un modo dual de obtención de energía (Dey and Rosen, 1995): (i) actuando como un transportador secundario, asociando la fuerza motriz de protones al proceso de transporte; (ii) formando un complejo con ArsA (ArsAB), donde la hidrólisis de ATP sea el motor que posibilitará dicho transporte. Todavía no se han encontrado proteínas ortólogas a ArsB en eucariotas.

En eucariotas, y más específicamente en el caso de *S. cerevisiae* existen también dos tipos de transportadores de As(III): (i) el sistema Acr3p, que es un homólogo de las Acr3 bacterianas; (ii) la proteína Ycf1p (“Yeast cadmium resistance factor” un miembro de la superfamilia de transportadores tipo ABC). Acr3p, al igual que ArsB es un transportador secundario localizado en la membrana plasmática que acopla el gradiente de protones a la expulsión de As(III) de las células. Ycf1p por su parte, bombea As(III) ligado a glutatión As(GS)<sub>3</sub> (conjugados compuestos de tres moléculas de GSH con una de As(III) dentro de la vacuola, lo

que compartimentaliza el metaloide y lo aísla del citosol, incrementando consecuentemente su resistencia (Ghosh et al., 1999).

#### 1.6.2.4.1. Transportadores de tipo ArsB.

Los sistemas de transporte de As en procariontas, como hemos mencionado con anterioridad, exhiben un modo dual de acoplamiento energético, en función de las subunidades que la conformen (Dey and Rosen, 1995).

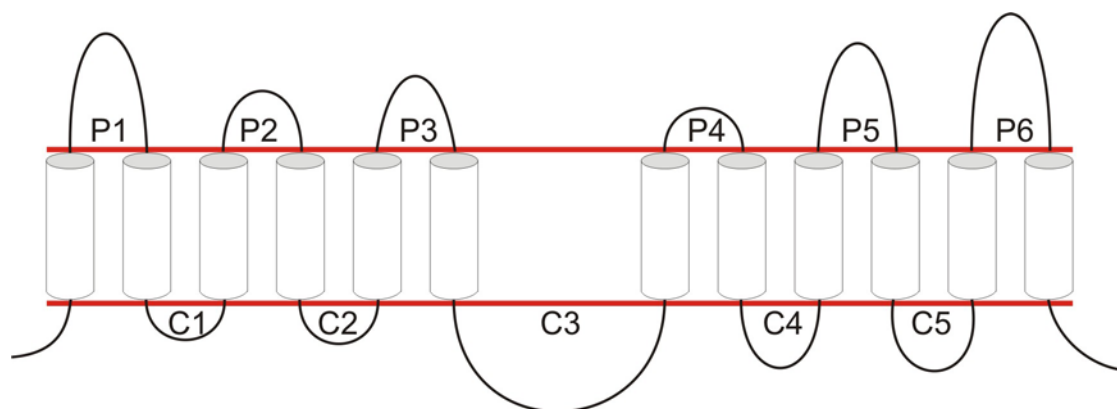
- (i) Con ArsA y ArsB presentes, la expulsión de As(III) se realiza a través de la ATPasa translocadora de aniones ArsAB. El componente ArsAB es un complejo proteico que actúa de forma independiente al gradiente electroquímico obteniendo la energía mediante la hidrólisis de ATP (Dey et al., 1994).
- (ii) Cuando ArsA está ausente, ArsB cataliza la expulsión de As(III) acoplándolo al gradiente electroquímico de membrana y expulsa el anión As(III) asociado al potencial de membrana que es positivo en el exterior (Kuroda et al., 1997).

ArsB es el determinante de resistencia a As más estudiado en bacterias y arqueas y se clasifica dentro de la superfamilia de transportadores de iones. Esta proteína (de 45 kDa) está formada por 12 segmentos transmembrana, y su topología es similar a la de muchas proteínas de transporte (Wu et al., 1992). Por otro lado, la especificidad de sustrato de ArsB no se limita tan sólo al As(III), sino que realiza también la expulsión de Sb(III) al exterior de la célula (Meng et al., 2004).

Considerando que el pKa del Sb(III) es de 11,2 y que el correspondiente al As(III) es de 9,2 (Ramirez-Solis et al., 2004), en condiciones fisiológicas de la célula (pH=7,5) la concentración de los oxianiones ( $\text{H}_2\text{SbO}_3^-$  y  $\text{AsO}_2^-$ ) o de los propios metaloides es insignificante (Slonczewski et al., 1981). En estas condiciones las especies más abundantes deberían ser las formas polihidroxiladas ( $\text{Sb}(\text{OH})_3$  y  $\text{As}(\text{OH})_3$ ), hecho por el cual es muy poco probable que ArsB actúe como un uniportador de iones de tipo electroforético (Meng et al., 2004). La expulsión de una molécula neutra al espacio extracelular (con un carácter ácido y con carga positiva) debe realizarse asociada a la entrada de un catión. La aplicación de un gradiente electroquímico de protones sobre membranas invertidas (gradiente creado o bien como potencial de membrana o bien como gradiente de pH), demostró que la expulsión de As(III) y de Sb(III) se realiza por un antiporte del metaloide con protones (Meng et al., 2004).

De la información topológica que se tiene de ArsB, se sabe que existen dos residuos de glutámico y cuatro de aspártico, que podrían estar localizados en las regiones transmembrana de ArsB y catalizar de algún modo la translocación de protones. Este análisis topológico sugiere 12 dominios transmembrana en hélices  $\alpha$ , cinco "loops" citoplasmáticos y seis "loops" periplásmicos.

Tres de los cinco “loops” citoplasmáticos (C1, C3 y C5) tienen una carga neta positiva, mientras que cinco de los seis “loops” periplásmicos o no están cargados (P1 y P3) o tienen una carga negativa (P2, P4 y P5) (Wu et al., 1992) (Figura 1.11).



**Figura 1.11:** Esquema que representa la topología de membrana de la ArsB del plásmido R773. Se representan las 12 hélices- $\alpha$  transmembrana unidas por cinco “loops” citoplasmáticos (C1-C5) y por seis “loops” periplásmicos (P1-P6). Adaptada de Wu et al. (1992).

Tisa and Rosen, (1990) demostraron que ArsB actúa como anclaje de membrana de ArsA y aunque todos los “loops” citosólicos son regiones potenciales de interacción, los “loops” más grandes, y entre ellos los que tienen residuos cargados son los más apropiados. Basándonos en esto, el loop citoplasmático C3 con 22 residuos (10 de los cuales están cargados), sería el más adecuado como punto de anclaje, sin descartar alguna función diferente. Hay otros dos loops citoplasmáticos C1 y C4, con 4 y 5 residuos cargados respectivamente, que son candidatos adecuados para la interacción de ArsA (Wu et al., 1992).

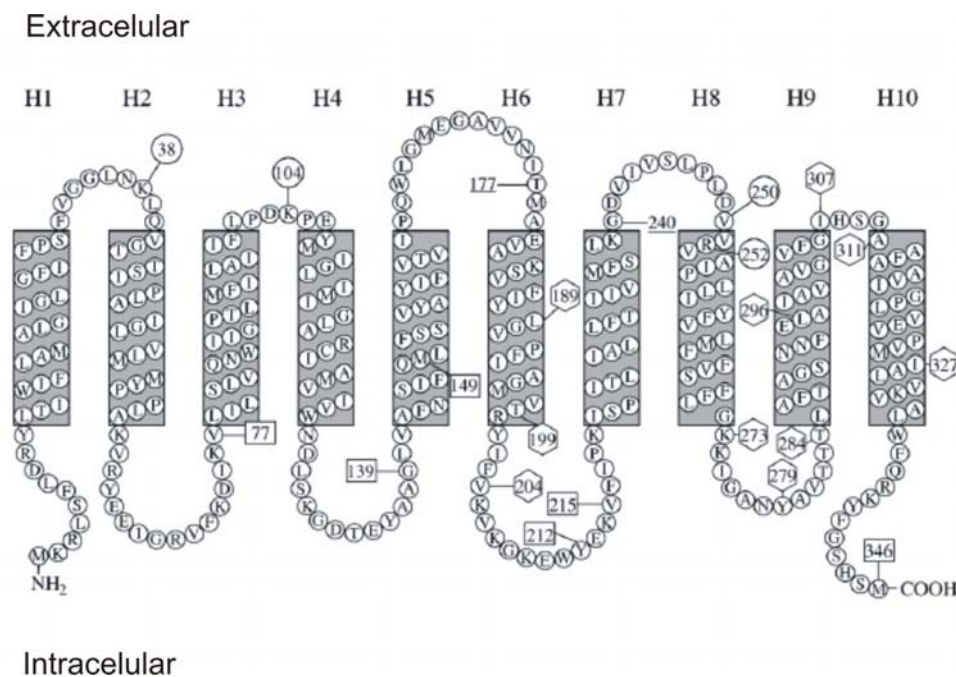
Igualmente se analizó la naturaleza del sustrato de ArsB por ensayos de competición y cotransporte utilizando Sb(III) y As(III). En base a los valores de  $pK_a$  del As(III) y del Sb(III), se sabe que las especies más abundantes en solución a pH neutro son los hidróxidos de As(III) y Sb(III), pero la naturaleza de los verdaderos sustratos de ArsB no está clara. As(III) inhibe la expulsión de Sb(III) por ArsB, mientras que Sb(III) estimula el transporte de As(III) por ArsB. En base a los experimentos indicados y a otros experimentos de cotransporte, los autores sostienen que los verdaderos sustratos de ArsB son polímeros de As(III) o Sb(III) o bien copolímeros de As(III) y Sb(III) (Meng et al., 2004).

#### 1.6.2.4.2. Transportadores de tipo Acr3.

La expulsión de As(III) en *Bacillus* y en *Saccharomyces* se produce a través de transportadores transmembrana que reciben el nombre genérico de Acr3 (Mansour et al., 2007). La proteína Acr3p de *Saccharomyces cerevisiae* tiene 404 residuos y un peso molecular de 45,8 kDa. Sin embargo, si analizamos la Acr3 de *Bacillus*, el tamaño se reduce hasta los 346 aminoácidos (Sato and Kobayashi, 1998). La Acr3p de *S. cerevisiae* y la ArsB del plásmido R773

de *E. coli* (de 429 residuos y 45,6 kDa) son similares en tamaño, y tanto Acr3 como ArsB son proteínas de membrana que catalizan la expulsión de As(III) desde el citosol al medio extracelular, pero exhiben diferencias muy significativas: (i) ArsB tiene 12 segmentos transmembrana, mientras que Acr3p tan sólo cuenta con 10 segmentos; (ii) Acr3p y ArsB exhiben una especificidad de unión diferente. ArsB confiere resistencia a As(III) y a Sb(III), mientras que Acr3p es una proteína de resistencia exclusivamente de As(III).

Achour et al., (2007) analizaron la presencia en varios microorganismos de los diferentes tipos de transportadores de As(III) y observaron que los transportadores de la familia de Acr3, son más comunes que los transportadores de As(III) tipo ArsB. Con el objetivo de obtener más información a nivel estructural Aaltonen and Silow, (2008), analizaron la topología transmembrana del Acr3 de *Bacillus subtilis* mediante fusiones traduccionales. De estos estudios dedujeron que el Acr3 de *Bacillus* está formado por diez regiones transmembrana, con los extremos N-terminal y C-terminal orientados hacia el citoplasma (Figura 1.12). También se hizo extensible esta topología a transportadores de As(III) de otros cinco microorganismos representativos de tres grupos muy diferentes: Gram negativos, Gram positivos y hongos (*M. tuberculosis*, *Nostoc punctiforme*, *Streptomyces coelicolor*, *Haemophilus influenzae* y *S. cerevisiae*). Estas proteínas, a pesar de tener entre sí identidades que varían desde un 24% a un 74%, comparten una topología común (Figura 1.12). Aunque en todos estos homólogos los “loops” son extremadamente cortos (las Acr3 de eucariotas tienen en general “loops” más largos que los homólogos bacterianos), los “loops” citoplasmáticos son en apariencia ligeramente más largos que los “loops” extracelulares.



**Figura 1.12:** Topología de membrana de la proteína transportadora de As(III) de *B. subtilis* Acr3 establecida en base a estudios experimentales y bioinformáticos. Tomada de Aaltonen and Silow, (2008).

Además, todos los homólogos mantienen residuos conservados en regiones transmembrana, con dos excepciones, el residuo Gly<sup>132</sup>, que se localiza en un “loop” intracelular entre las hélices H4 y H5 y el residuo Ser<sup>309</sup>, que se localiza en un “loop” extracelular entre las hélices H9 y H10. De todos los residuos conservados en estas proteínas, 8 son prolinas; aunque las prolinas no son comunes en los fragmentos transmembrana. La presencia de estos residuos en estas regiones podría sugerir que las hélices transmembrana de las proteínas Acr3 presentan cambios direccionales en varios lugares.

#### 1.6.2.4.3. Transportadores de tipo MRP.

El tercer tipo de transportador de resistencia a As pertenece a la MRP “multidrug resistance-associated protein” (MRP) un subgrupo de la superfamilia de transportadores tipo ABC (ATP-Binding-Cassette). Este subgrupo incluye transportadores de “drogas”, en el cual podemos incluir la MRP1 humana, frecuentemente amplificada en células cancerígenas. Además de conferir resistencia a muchos tóxicos, MRP1 confiere resistencia a As(III). Los transportadores MRP catalizan la expulsión de glutatión de las células y este transporte se incrementa en presencia de As(III), lo que sugiere que MRP funciona como un transportador de complejos As(GS)<sub>3</sub>.

En *S. cerevisiae* la relación existente entre el transportador tipo ABC y la resistencia a As(III) es clara. Así por ejemplo, la proteína Ycf1p (“Yeast cadmium resistance factor”, o factor de resistencia a cadmio) confiere también resistencia a As(III) de forma independiente a como lo hace Acr3p. De este modo, Ycf1p bombea conjugados de glutatión con cadmio u otros compuestos al interior de la vacuola celular. La interrupción del gen que codifica para Ycf1p origina un fenotipo sensible tanto a As(III) como a As(V), de forma equivalente a lo que ocurre con la interrupción de Acr3p. Sin embargo, la combinación de las mutaciones en genes para Ycf1p y Acr3p genera un fenotipo hipersensible. Por lo tanto, los mutantes en Ycf1p son capaces de expulsar As(III) de las células de manera normal, pero a la vez acumulan As(GS)<sub>3</sub>. Ycf1p asocia el transporte de los conjugados de glutatión con As(III) al ATP. Además, los transportadores Acr3p e Ycf1p se diferencian en la especificidad de los sustratos que transporta cada una de ellas, siendo Acr3p específico para As(III) y no confiere resistencia a Sb(III), mientras que Ycf1p es una proteína de transporte no específica, y proporciona resistencia a elementos como As(III), Sb(III) o Cd(II) entre otros citotóxicos.

#### 1.6.2.5 Reducción de arseniato: arseniato reductasas.

Las arseniato reductasas son proteínas citoplasmáticas monoméricas y de pequeño tamaño (131 residuos en el caso de *S. aureus* y 141 para *E. coli*). Durante la reducción catalítica del As(V) a As(III) en condiciones de pH neutro la especie de As(V) presente en solución es un oxianion tetrahédrico (manteniéndose un equilibrio de HAsO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y H<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub><sup>1-</sup>). Los valores de pK<sub>a</sub>



del As(V) (2,20; 6,97 y 11,53) son comparables a los valores de  $pK_a$  del fosfato (2,1; 7,2 y 12,7). Las arseniato reductasas descritas hasta la fecha presentan diferencias muy claras, asociadas no sólo a la heterogeneidad de sus secuencias y su conformación estructural, sino también a los mecanismos de reducción y a la localización de las cisteínas catalíticas, características éstas que permiten su diferenciación y su clasificación (Messens and Silver, 2006).

En esta clasificación se diferencian: (i) las arseniato reductasas dependientes de tioredoxina (Trx) y de tioredoxina reductasa (TR), cuyos mejores exponentes son la ArsC del pl258 de *S. aureus* y la ArsC de *B. subtilis*; (ii) las arseniato reductasas dependientes de glutaredoxina (Grx) y glutatión (GSH), que presentan dos grupos bien diferenciados: el representado por la ArsC del plásmido R773, y el grupo de la Acr2p de *Saccharomyces cerevisiae*.

En todos los casos se trata de enzimas citoplasmáticas de oxidación-reducción que reducen As(V) a As(III) gracias a la participación directa de tres grupos tiol con carácter nucleofílico, que funcionan a modo de cascada de oxidación-reducción. Las enzimas implicadas en la reducción de As(V) a As(III) trabajan en estrecha relación con los sistemas de oxidación/reducción de las células. En la mayoría de las células (eucariotas y bacterias Gram negativas) el estatus redox se mantiene por la oxidación-reducción cíclica del GSH, proceso en el que participan activamente la Grx y la glutatión reductasa. Las bacterias Gram positivas no producen GSH, pero los elevados niveles de coenzima A reducida sustituyen al GSH como especie principal donadora de grupos tiol. No obstante, en Gram positivas el sistema de reducción de puentes disulfuro más relevante es el que corresponde a la Trx y TR, sistema presente también en eucariotas y en otros procariontes.

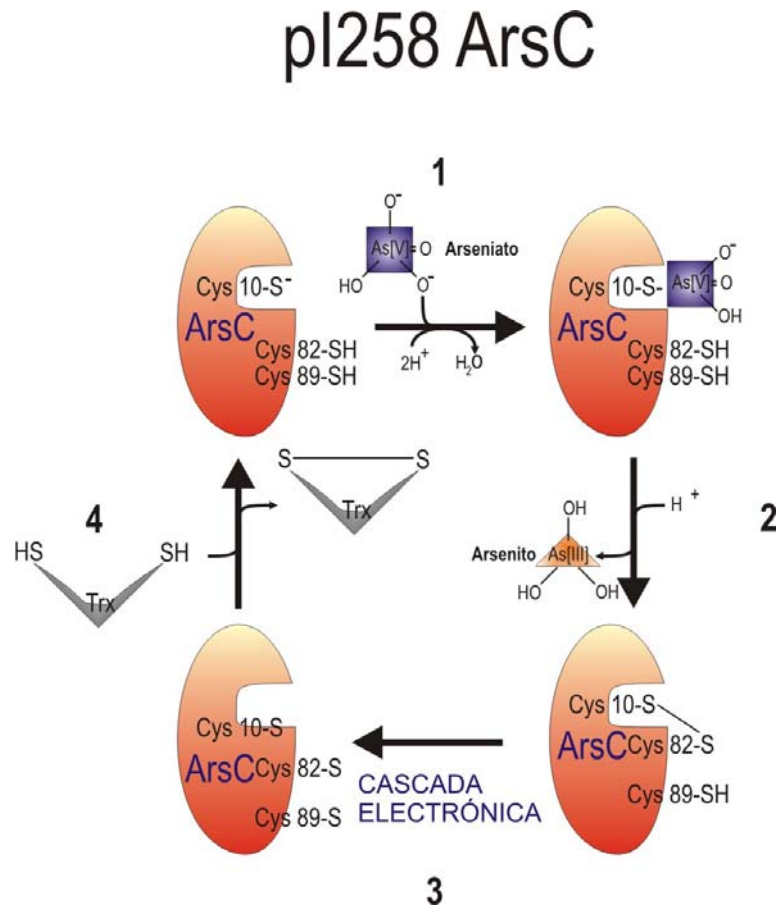
#### 1.6.2.5.1. Arseniato reductasas dependientes de tioredoxina.

Las arseniato reductasas dependientes de Trx y de TR mejor caracterizadas son: la ArsC del plásmido pl258 de *Staphylococcus aureus* (Ji and Silver, 1992b) y la ArsC cromosomal de *Bacillus subtilis* (Bennett et al., 2001). Estas dos ArsCs están relacionadas en estructura y función con las tirosin-fosfatasas de bajo peso molecular (LMWPTPasas), de amplia distribución entre los microorganismos, animales e incluso en humanos. Muchas de estas ArsCs se encuentran en bacterias Gram positivas de bajo contenido en G+C, pero existen ejemplos de su presencia en Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* (Cai et al., 1998) y *Thiobacillus ferrooxidans* (Butcher et al., 2000).

#### Arseniatoreductasa del plásmido pl258.

La arseniatoreductasa (ArsC) codificada en el plásmido pl258 de *S. aureus* es la mejor caracterizada de las dos. Los ensayos de mutagénesis revelan que en esta proteína las Cys<sup>10</sup>,

Cys<sup>82</sup> y Cys<sup>89</sup> son esenciales para la catálisis enzimática (Messens et al., 1999) (Figura 1.13). Su estructura molecular es muy parecida a la de las tirosín-fosfatasas de bajo peso molecular (LMW-PTPasa) de mamíferos, aunque este aspecto no se refleja a nivel de la homología de sus secuencias aminoacídicas (20%). Además, comparte con las LMW-PTPasas un plegamiento caracterizado por cuatro láminas- $\beta$  paralelas y tres hélices  $\alpha$  [característico también de las proteínas tirosín-fosfatasas de tipo I (PTPase I)] y su centro catalítico conservado (denominado también "P-loop"), que es donde el sustrato tirosina fosfato se aproxima a la cisteína activa (constituido por la Cys<sup>10</sup>).



**Figura 1.13:** Mecanismo de reacción de la ArsC del plásmido pI258 dependiente de Trx y TR. Adaptada de Messens and Silver, (2006).

La estabilidad estructural de este centro catalítico (P-loop) requiere la presencia de un oxianión tetraédrico, por lo que oxianiones como el fosfato y el sulfato (de geometría tetraédrica) actúan como activadores de la actividad de la arseniato reductasa, con una constante de activación de 11 mM y 16 mM respectivamente (Messens et al., 2003). En presencia de sulfato la ArsC del pI258 tiene una especificidad de sustrato alta ( $K_M = 68 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}}/K_M = 5.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ ) y su producto [As(III)] actúa como un inhibidor mixto (Messens et al., 2002a).

La combinación de las técnicas cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear y estudios de carácter cinético (Messens et al., 2002b) permitió la determinación del mecanismo de

reducción de esta enzima. Esta proteína combina un desplazamiento nucleofílico, tipo fosfatasa, con una cascada de oxidación-reducción, mediante el establecimiento de puentes disulfuro intramoleculares. Dentro de esta cascada, la formación del intermediario disulfuro entre la Cys<sup>10</sup> y la Cys<sup>82</sup> provoca un cambio conformacional fundamental que transfiere los equivalentes de oxidación desde una región interna a la superficie de la proteína; este cambio conformacional lleva asociado la liberación del As(III).

El mecanismo de reducción comienza con la Cys<sup>10</sup> realizando un ataque nucleofílico sobre el As(V) (Messens et al., 2002b) (Figura 1.13). Este ataque nucleofílico se ve favorecido por una serie de factores: (i) la Cys<sup>10</sup> está localizada en el extremo N-terminal de la primera hélice  $\alpha$ , y el dipolo de esta hélice  $\alpha$  apunta directamente hacia el grupo sulfidrilo de la Cys<sup>10</sup>; (ii) el valor de pK<sub>a</sub> de la cisteína nucleofílica (Cys<sup>10</sup>) ha sido reducido hasta 6,7 por un puente de hidrógeno establecido entre la Cys<sup>10</sup> y un catión K<sup>+</sup> como consecuencia del entorno generado por los residuos Asn<sup>13</sup> y la Ser<sup>17</sup>. La enzima ArsC de *S. aureus* es la única arseniato reductasa que tiene un sitio de unión específico para el potasio (localizado próximo al “P-loop”). La interacción del potasio con los residuos específicos de la ArsC del plásmido pI258 es un proceso que incrementa la actividad específica de esta enzima redox (Lah et al., 2003). El potasio condiciona de manera activa el entorno de la cisteína nucleofílica, provocando una disminución en su pK<sub>a</sub>. Además de estos residuos, la Arg<sup>16</sup> se conserva estructuralmente en la Acr2p (arseniato reductasa de *S. cerevisiae*) y en las proteínas tirosín-fosfatasas de bajo peso molecular, y resultan esenciales en el proceso catalítico (Mukhopadhyay et al., 2003). El Asp<sup>105</sup>, está también conservado estructuralmente y su función en ArsC sería la de estabilizar el estado de transición a través de la unión a una molécula de agua.

La ArsC del plásmido pI258 presenta actividad fosfatasa en presencia de p-nitrofenil fosfato (pNPP) (Zegers et al., 2001) con una k<sub>cat</sub> de 0,5 min<sup>-1</sup> y una K<sub>m</sub> para el pNPP de 146 mM. La versión oxidada de la enzima [en condiciones de estrés oxidativo se genera un puente disulfuro entre los residuos de cisteína Cys<sup>10</sup> y Cys<sup>15</sup> del P-loop (Messens et al., 2004)] y el mutante C10S no presentan actividad fosfatasa, mientras que los mutantes para cualquier otra cisteína mantienen, casi en su totalidad, la actividad fosfatasa. El As(V) actúa como inhibidor competitivo de la fosfatasa, con una constante de inhibición (K<sub>i</sub>) muy similar a la K<sub>M</sub> de la actividad arseniato reductasa.

#### Arseniato reductasa de *B. subtilis*.

La enzima ArsC de *B. subtilis* tiene un 65% de identidad aminoacídica con la ArsC del pI258. El residuo Arg<sup>16</sup> de esta proteína, al igual que ocurría en la ArsC del pI258, provoca una disminución de la pK<sub>a</sub> a través de un puente de hidrógeno establecido con los residuos Cys<sup>10</sup> y Cys<sup>82</sup>. Este fenómeno se observa también en las reductasas dependientes de Grx (Roos et al., 2006), por lo que el papel de este residuo de arginina como activador de la cisteína nucleofílica parece ser un mecanismo común en todas las reductasas de As(V). Una vez que el “P-loop” ha

adquirido su conformación más activa, el grupo tiol de la cisteína catalítica está preparado para llevar a cabo el ataque nucleofílico.

Las ArsCs del plásmido pI258 y la de *B. subtilis* son enzimas enormemente flexibles. La forma reducida de la proteína es capaz de llevar a cabo cambios conformacionales en el "P-loop" y en los residuos Cys<sup>82</sup> y Cys<sup>89</sup>, que pueden facilitar la formación de los intermediarios covalentes y la subsiguiente reducción del As(V).

En la forma oxidada, la cisteínas Cys<sup>82</sup> y Cys<sup>89</sup> muestran una elevada flexibilidad que podría facilitar la reducción de la enzima por la tioredoxina para regenerar ArsC (Guo et al., 2005). Esta secuencia comienza con la formación de un intermediario Cys<sup>10</sup>/Cys<sup>82</sup> de la hélice catalítica flanqueada por la Cys<sup>82</sup> y la Cys<sup>89</sup> (Messens et al., 2002 a) (Messens et al., 2002 b). Únicamente la forma oxidada Cys<sup>82</sup>/Cys<sup>89</sup> es reconocida por la tioredoxina (Messens et al., 2004), siendo esta enzima capaz de discriminar entre los plegamientos de la ArsC oxidada y los de la reducida.

Los parámetros cinéticos de la ArsC de *B. subtilis* no están afectados por el sulfato o el potasio (Roos et al., 2006).

#### 1.6.2.5.2. Arseniato reductasas dependientes de glutaredoxina y glutatión.

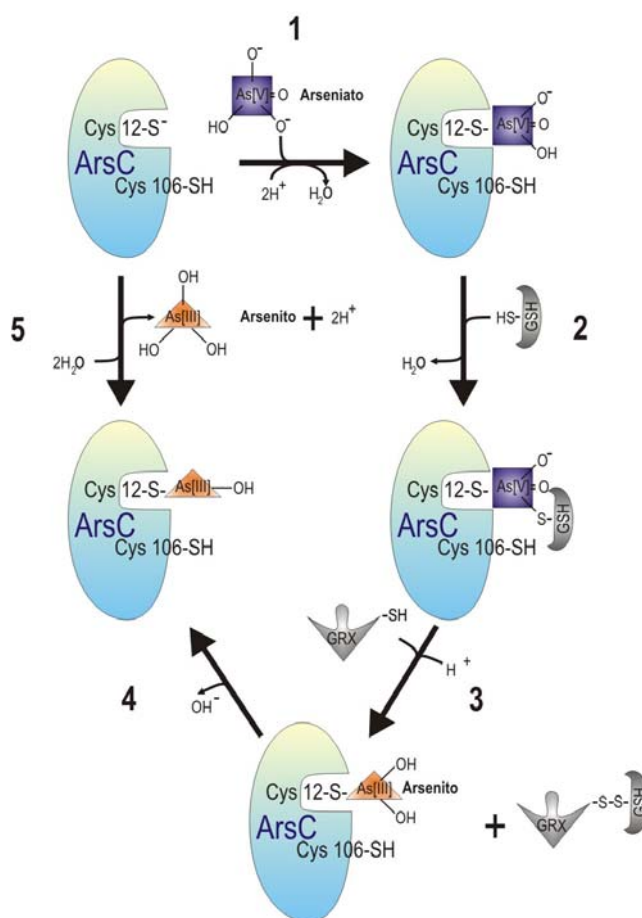
##### Arseniatoreductasa del plásmido R773.

La arseniatoreductasa del plásmido de resistencia R773 es la enzima dependiente de Grx y GSH mejor caracterizada desde el punto de vista estructural y enzimológico. Esta ArsC emplea en su catálisis tres residuos de cisteína (al igual que ocurre en las enzimas dependientes de Trx). La diferencia fundamental es que de los tres residuos indicados tan sólo uno de ellos lo aporta la enzima ArsC, mientras que los dos restantes los aportan el GSH y la Grx respectivamente (Figura 1.14). Los parámetros cinéticos de esta enzima están marcadamente alejados de los vistos para la ArsC del pI258, con una  $K_m$  de 15 mM para el As(V) (unas 100 veces mayor que la de ArsC de pI258) y una  $k_{cat}$  de 32 min<sup>-1</sup> (unas 10 veces más lenta que la de pI258). Otras diferencias significativas de esta reductasa, en relación con la ArsC codificada en el pI258, es que no presenta actividad ATPasa (Mukhopadhyay et al., 2000) ni sitios de unión a K<sup>+</sup> (Roos et al., 2006) y además, en su secuencia primaria aparecen dos residuos de cisteína (Cys<sup>12</sup> y Cys<sup>106</sup>), siendo sólo la Cys<sup>12</sup> necesaria para la reducción de As(V) (Liu et al., 1995). Igualmente el pH óptimo de la reacción es de 6,5 en contraposición al óptimo descrito para la ArsC del pI258 que es de 8.0.

Como se ha mencionado previamente, esta enzima está ligada a la actividad de la Grx y del GSH para completar su ciclo catalítico. La glutaredoxina es una proteína de pequeño tamaño que puede catalizar tanto la reducción de puentes disulfuro intramoleculares como

intermoleculares (puentes disulfuro establecidos entre los tioles de cisteínas proteicas y el GSH) (Bushweller et al., 1992). La cisteína N-terminal de Grx (Cys<sup>9</sup>) es necesaria para los dos tipos de reacciones, mientras que la segunda cisteína del sitio activo (Cys<sup>12</sup>) es necesaria tan sólo en la reducción de los puentes disulfuro intramoleculares, pero no en los intermoleculares. La mutación puntual y dirigida asociada a las dos cisteínas de la Grx arrojó luz sobre el tipo de catálisis llevada a cabo en la reducción del As(V) por esta ArsC. Las Grx mutadas en la segunda cisteína son capaces de acoplarse a la catálisis de ArsC, mientras que la cisteína N-terminal es imprescindible en la reducción de As(V). Estos resultados apuntan directamente a un mecanismo de reacción en el que se establece la formación de un puente disulfuro intermolecular entre la Cys<sup>12</sup> y el GSH. *E. coli* tiene cuatro glutaredoxinas (Fernandes et al., 2005), tres de las cuales Grx1, Grx2 y Grx3, conservan el sitio activo con la secuencia consenso Cys-Pro-Tyr-Cys (Aslund et al., 1994) y funcionan como ditiolos. De estas glutaredoxinas, la Grx2 es la oxidoreductasa de puentes disulfuros más importante y efectiva en *E. coli*, siendo también la más efectiva en la cesión de los electrones necesarios para la reducción del As(V) por ArsC (Shi et al., 1999).

## R773 ArsC



**Figura 1.14:** Mecanismo de reacción de la ArsC del plásmido R773 dependiente de Trx y TR. Adaptada de Messens and Silver, (2006).

La cristalización de la ArsC de R773 y la resolución de su estructura por cristalografía de rayos-X, así como la cristalización de la enzima ArsC unida al sustrato As(V) puso de manifiesto que la secuencia catalítica de la ArsC es "HX<sub>3</sub>CX<sub>3</sub>R", con una cisteína N-terminal que ocupa una posición homóloga a la que ocupa la Cys<sup>12</sup> en el "P-loop" de la ArsC del pI258. A pesar de esto no existe relación alguna entre las estructuras terciarias de las ArsCs de *E. coli*, *S. aureus* o *B. subtilis*, lo que apoya la teoría de un origen evolutivo distinto. Tanto la ArsC del pI258 como la ArsC del R773 presentan un núcleo central formado por 4 cadenas-β que conforman una lámina-β, pero con la diferencia de que en las dos enzimas de la familia dependiente de Trx las cadenas son paralelas, mientras que en el caso de la ArsC del R773 aparece una lámina-β antiparalela.

Los estudios de mutagenesis revelaron 6 aminoácidos críticos en la catálisis de la ArsC del R773 (His<sup>8</sup>, Cys<sup>12</sup>, Ser<sup>15</sup>, Arg<sup>60</sup> y Arg<sup>94</sup>). La cisteína catalítica (Cys<sup>12</sup>) está rodeada por cinco residuos básicos (His<sup>8</sup>, Arg<sup>16</sup>, Arg<sup>60</sup>, Arg<sup>94</sup> y Arg<sup>107</sup>) que disminuyen la pK<sub>a</sub> del grupo sulfhidrilo en posición γ a 6.4. (Gladysheva et al., 1996) (Martin et al., 2001). Tres de estas argininas (Arg<sup>60</sup>, Arg<sup>94</sup> y Arg<sup>107</sup>) interactúan directamente con los intermediarios del As(V) y del As(III) (Martin et al., 2001). De todas las mutaciones sólo las realizadas sobre Arg<sup>60</sup> (R60A, R60E y R60K) mantenían la actividad arseniato reductasa (Shi et al., 2003).

Los análisis cristalográficos han puesto de manifiesto los intermediarios covalentes Cys<sup>12</sup>-S-As(V) y Cys<sup>12</sup>-S-As(III) en el ciclo catalítico (Martin et al., 2001). Cuando el tiol (-SH) de la Cys<sup>12</sup> se mueve para formar el intermediario S-HAsO<sub>3</sub><sup>-</sup>, el grupo guanidina de la Arg<sup>94</sup> se retira del sitio activo manteniéndose a una distancia de un puente de hidrogeno de la Cys<sup>12</sup>. La Arg<sup>60</sup> entra entonces en acción para estabilizar este intermediario, mientras la Arg<sup>107</sup> permanece en su sitio. En el mapa de densidades electrónicas de esta ArsC se muestran los átomos unidos al As (S-As-O), que teniendo en cuenta la longitud del enlace, hace congruente la formación del intermediario Cys-S-As-OH (Martin et al., 2001) (Messens and Silver, 2006). En el segundo paso del mecanismo de reacción se formaría, por lo tanto, el complejo ternario ArsC Cys<sup>12</sup>-S-As(V)-S-GSH (Liu and Rosen, 1997), pero el hecho de haber realizado estos estudios en el mutante A11W pone en tela de juicio estos resultados, ya que el triptófano por el cual se sustituyó la alanina ha podido cambiar radicalmente el centro activo (Messens and Silver, 2006).

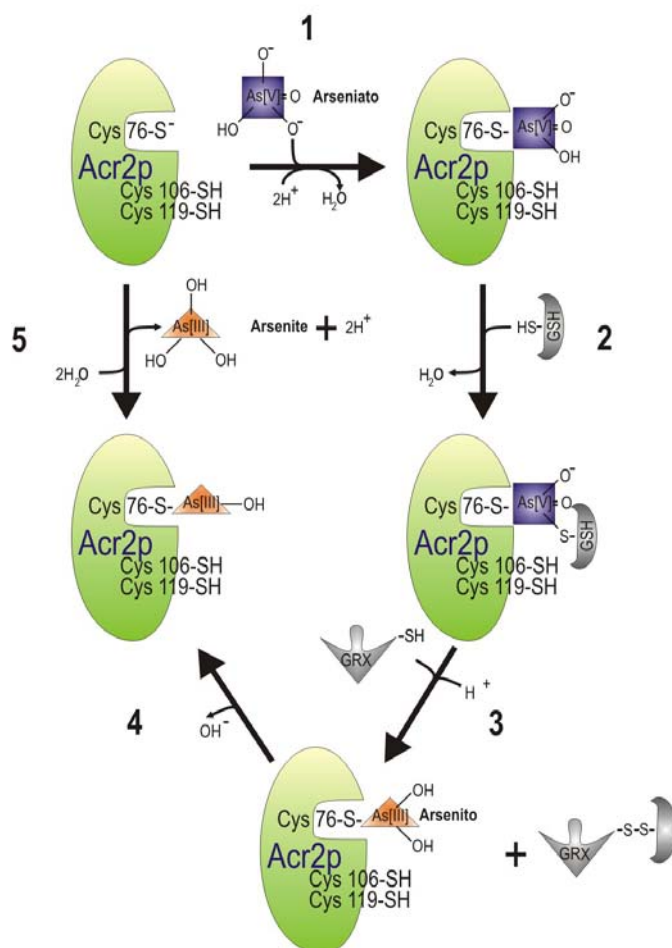
Más recientemente De Mel et al., (2004) sugirieron la existencia de un intermediario Cys<sup>12</sup>-tioldihidroxiarsenito, donde el átomo de As carece de carga. Estas conclusiones se alcanzaron basándose en la estructura de los mutantes de ArsC R60K y R60A.

#### Acr2p, arseniato reductasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Dentro de la familia de las ArsCs dependientes de Grx y GSH se encuentra Acr2p. Esta ArsC citoplasmática es, en términos evolutivos, independiente de las otras dos familias de reductasas y está vinculada a una clase diferente de tirosín-fosfatasa (clase que incluye

proteínas como Cdc25, la rodanasa y la tiosulfato transferasa). Acr2p presenta una homología muy elevada en su centro activo con las tirosín-fosfatasa s indicadas (Mukhopadhyay and Rosen, 2001) y comparte la secuencia motivo "HC(X)<sub>5</sub>R" con la proteína Cdc25a/b, secuencia ésta que forma parte del sitio activo de la familia Cdc25 (Messens and Silver, 2006). Acr2p de *S. cerevisiae* constituye el sistema de detoxificación de As(V) más importante en eucariotas. La codificación de esta proteína es cromosómica (cromosoma XVI de *S. cerevisiae*) y forma parte del agrupamiento ACR (Arsenic Compounds Resistance) constituido por los genes *ACR1*, *ACR2* y *ACR3*, que codifican respectivamente para un regulador transcripcional, una arseniato reductasa (Acr2p), y un transportador de membrana (Acr3p), que expulsa As(III) de la célula (Bobrowicz et al., 1997).

## *S. cerevisiae* Acr2p



**Figura 1.15:** Mecanismo de reacción de la Acr2p de *S. cerevisiae* dependiente de Trx y TR. Adaptada de Messens and Silver, (2006).

A diferencia de las arseniato reductasas procarionticas, Acr2p se comporta como un homodímero de 130 residuos aminoacídicos por cada monómero (Mukhopadhyay et al., 2000) y su actividad está ligada al sistema GSH/Grx como fuente de poder reductor para completar su

catálisis. Esta enzima es capaz de completar el ciclo catalítico en presencia del GSH y Grx de *S. cerevisiae* o cualquiera de las Grx de *E. coli* (Mukhopadhyay et al., 2000), y al igual que ocurre en el caso de la ArsC del R773 (*E. coli*) la mutación de la cisteína C-terminal de Grx no influye para nada en la catálisis, lo que de nuevo es reflejo de la formación de un puente disulfuro mixto en el intermediario de la reacción. Acr2p es capaz de complementar de forma heteróloga el fenotipo As(V) sensible de una cepa de *E. coli* que carece de su propia ArsC.

Una diferencia reseñable entre las dos clases de reductasas ArsC/Acr2p lo constituye la posición de la cisteína catalítica, mientras que en la ArsC del R773 tiene una posición N-terminal (Cys<sup>12</sup>), en la Acr2p tiene una posición más central (Cys<sup>76</sup>). La actividad enzimática de esta proteína está en función de la concentración de As(V), presentando cooperatividad positiva con un coeficiente de Hill de 2,7 ( $K_M=35$  mM,  $k_{cat}=6$  min<sup>-1</sup>), parámetros cinéticos comparables a los de la ArsC de R773.

El motivo "H<sup>75</sup>C<sup>76</sup>(X)<sub>5</sub>R<sup>82</sup>" está también implicado en la catálisis, ya que las mutaciones de los residuos Cys<sup>76</sup> y Arg<sup>82</sup> eliminan tanto la resistencia como la actividad arseniato reductasa "in vitro" (Mukhopadhyay and Rosen, 2001). El ataque nucleofílico del grupo tiol de la Cys<sup>76</sup> formaría un intermediario Cys-S-As, al igual que ocurría en la ArsC de pI258 (Figura 1.15).

La arginina de la secuencia motivo "HCX<sub>5</sub>R" del "P-loop" es esencial en la catálisis (Mukhopadhyay et al., 2000) y parece participar en la unión del sustrato y en la estabilización del estado de transición (Mukhopadhyay and Rosen, 2001).

Acr2p no cataliza la hidrólisis del pNPP (Mukhopadhyay et al., 2000), ya que no posee el "loop" de unión G<sub>x</sub>G<sub>xx</sub>G de muchas fosfatasa. La introducción de tres residuos de glicina en el sitio activo originó una enzima con mayor actividad fosfatasa, pero con una pérdida significativa de actividad arseniato reductasa (Mukhopadhyay et al., 2003). Esta actividad fosfatasa en la enzima con tres residuos de glicina extra se perdió cuando se eliminaron los residuos Arg<sup>82</sup> y Cys<sup>76</sup> (los residuos esenciales del sitio activo), actividad que también se inhibe en presencia de As(V).

#### 1.6.2.5.3. La arseniato reductasa de *Synechocystis* sp.: la ArsC híbrida.

La arseniato reductasa de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803, posee características mixtas de las ArsC de la familia dependiente de GSH/Grx y de las ArsC dependientes de Trx. Esta proteína contiene un "P-loop" con secuencias conservadas de las ArsCs dependientes de Trx, pero por su mecanismo catalítico (utiliza GSH y Grx como fuente de los equivalentes de reducción) se englobaría dentro de las reductasas dependientes de GSH/Grx (Li et al., 2003). Esta proteína presenta una actividad fosfatasa débil en ensayos realizados con p-nitrofenilfosfato y, al igual que sucedía en el caso de la Acr2p y de la reductasa de R773, forma un complejo con el GSH unido covalentemente al As(V). La ArsC de *Synechocystis* contiene en



su secuencia primaria tres residuos de cisteína esenciales (de manera idéntica a la ArsC de pl258), lo que entra en contraposición con las reductasas de *E. coli* y levaduras, enzimas éstas que necesitan tan sólo un residuo de cisteína para la catálisis. Estos residuos de cisteína con reacciones redox sucesivas trasladarían el enlace disulfuro a la superficie proteica dejándolo accesible para su reducción, aunque son necesarios análisis más detallados para establecer su mecanismo de reducción.

#### **1.6.2.6. Otras proteínas de resistencia a arsénico en microorganismos: ArsH y ArsO.**

En los operones de resistencia a As se presentan con frecuencia genes que codifican para proteínas diferentes a las analizadas con anterioridad. Dos de estas proteínas son ArsH, localizada en *Yersinia enterocolítica* (Neyt et al., 1997), en *Thiobacillus ferrooxidans* (Butcher et al., 2000), en *Pseudomonas putida* (Cánovas et al., 2003), en la cianobacteria *Synechocystis* sp (López-Maury et al., 2003) y en *Sinorhizobium meliloti* (Yang et al., 2005) y ArsO, proteína de *Streptomyces* con homología a las reductasas de unión a flavinas (FAD) (Wang et al., 2006).

En base a los estudios de homología de secuencias, y a la conservación de dominios consenso (T/S)<sub>x</sub>R<sub>xx</sub>S<sub>x</sub>(T/S), ArsH se ha catalogado como perteneciente a la familia de las FMN (flavin mononucleótido) reductasas dependientes de NADPH. ArsH está presente en un amplio grupo de organismos, 123 anotaciones en bacterias, 13 en hongos y 3 en un erizo de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*) y hasta la fecha ningún representante en arqueas o en otros eucariotas (Ye et al., 2007). La función de ArsH en el contexto de las rutas de destoxificación de As se puede catalogar como desconocida, y su importancia en la destoxificación de As es ambigua. Neyt et al., (1997) demostraron que ArsH contribuye a la resistencia frente a las dos especies inorgánicas de As [As(III) y As(V)] en *Y. enterocolítica*. En *Sinorhizobium meliloti* participa, además, en la destoxificación de Sb(III) (Yang et al., 2005). En *Synechocystis* o en la proteobacteria *T. ferrooxidans* no se observó cambio fenotipo aparente en el estudio de los mutantes, mientras que en otros muchos organismos como *Pseudomonas putida* no se ha analizado el fenotipo.

La ubicación de los miembros de la familia de las reductasas de FMN no es exclusiva de los operones de resistencia a As, sino que también es frecuente la presencia de genes fuera estos operones, aunque desempeñen la misma función. Esta duplicación funcional podría ser la razón por la cual en algunos organismos la eliminación de ArsH no implica cambio fenotípico observable (Vorontsov et al., 2007). Estos mismos autores demostraron, basándose en estudios estructurales y enzimáticos, que ArsH de *Shigella flexneri* está efectivamente relacionada con las proteínas de unión a FMN dependientes de NADPH. Esta ArsH tiene un plegamiento  $\alpha/\beta/\alpha$  típico de las proteínas de unión a FMN, cuya unidad asimétrica consta de 4 monómeros. Ye et al.,

(2007) han caracterizado la proteína ArsH de *S. meliloti* asociándola con una proteína de unión a FMN dependiente de NADPH que forma agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### **1.6.3. Metalotioneínas y fitoquelatinas: proteínas con capacidad quelante para metales tóxicos en organismos superiores.**

#### **1.6.3.1. Metalotioneínas**

Las metalotioneínas (MTs) fueron descubiertas en 1957 e identificadas como proteínas de bajo peso molecular ricas en residuos con grupos tiol/sulfidrilo. La mayoría de los tejidos de los mamíferos producen niveles basales de MTs, con funciones determinantes en la metaloregulación de procesos como el crecimiento y división celular.

Las MTs son proteínas intracelulares con elevada afinidad por iones divalentes de metales pesados (Kagi, 1991), caracterizadas por su alto contenido en residuos de cisteína (30%) y por la ausencia de aminoácidos aromáticos. Pertenecen a una familia de proteínas con más de 6000 miembros organizados en cuatro clases diferentes: MT-I, MT-II, MT-III y MT-IV. En el ser humano están codificadas por una familia de genes con diez isoformas funcionales, que dan lugar a proteínas clasificadas igualmente en cuatro grupos diferentes: MT-1, MT-2, MT-3 y MT-4.

Debido a este alto contenido en grupos tiol, las MTs son proteínas con alta capacidad quelante de metales traza como el cadmio, mercurio, platino, plata. Pero también desempeñan un papel fundamental en la protección de las células frente a la toxicidad asociada a los metales pesados. Ratones con mutaciones dobles en las metalotioneínas MT-1 y MT-2 presentan sensibilidad a cadmio (Klaassen et al., 1999), mercurio (Yoshida et al., 2004a), arsénico (Liu et al., 2000), cisplatino (Sato et al., 1997), así como a zinc o cobre (Park et al., 2001). Estos ratones son también más susceptibles a los efectos carcinogénicos del plomo (Waalkes et al., 2004) y del cisplatino (Waalkes et al., 2006) y juegan un papel fundamental en la protección de las células frente al estrés oxidativo (Kagi, 1991) (Klaassen et al., 1999). Por lo tanto, los niveles de expresión de las MTs condicionan enormemente la capacidad tóxica y carcinogénica de varios metales.

Su importancia en la atenuación de los efectos tóxicos de los arsenoderivados es evidente, una prueba tácita de ello es la inducción de los genes que las codifican en ratones y ratas en presencia de arsenoderivados (Albores et al., 1992) (Kreppel et al., 1993) (Liu et al., 2000), mientras que la baja expresión de las metalotioneínas hace que los ratones exhiban un fenotipo idéntico al que se obtenía en los ratones con la doble mutación en MT-1 y MT-2 (Liu et al., 2000), (Park et al., 2001).

Además de en los mamíferos, de forma ocasional se han descrito MTs de unión a As en otros organismos. Sirva a modo de ejemplo el alga *Fucus vesiculosus* (Merrifield et al., 2004). Sin embargo, hasta la fecha no se han descrito metalotioneínas en procariotas, con la salvedad de una metalotioneína codificada por el ORF MT0196 en el cromosoma de *Mycobacterium tuberculosis* con capacidad de unión para seis iones de Cu(I) (Gold et al., 2008)

A pesar de ello, una de las estrategias empleadas para la eliminación de As de las aguas residuales o para la inmovilización de dicho elemento es la utilización de biomasa como matriz adsorbente, biomasa que puede estar constituida por bacterias. Pero como consecuencia de los eficientes sistemas de expulsión de As codificados en los operones *ars*, son necesarias estrategias genéticas para optimizar esta bioadsorción.

Dentro de estas estrategias genéticas encontramos la expresión de proteínas con capacidades quelantes tipo metalotioneínas. La combinación de estrategias de mejora de incorporación de As(III) con la de expresión de proteínas heterólogas para la quelación de As(III), como es la MT de *Fucus vesiculosus* (Singh et al., 2008), constituye una solución barata para la eliminación de As(III) de las aguas residuales.

Alternativamente a las MTs, existen otras proteínas con capacidad quelante para el As(III) como el dímero de ArsR, que presenta, además, la ventaja de su enorme especificidad por el As(III) y el Sb(III). A diferencia de las MTs cuya especificidad es más bien escasa (Kostal et al., 2004).

#### **1.6.3.2. Fitoquelatinas.**

Las plantas responden a la toxicidad de los metales pesados de formas diversas. Entre estas respuestas se pueden incluir la inmovilización, la exclusión, la quelación y la compartimentalización de los tóxicos, sin olvidar, por supuesto, la expresión de proteínas de estrés y otros mecanismos de respuesta como la producción de etileno.

Un mecanismo general y recurrente para la destoxificación de metales pesados en plantas y otros organismos es la quelación de dicho metal por un ligando, y en algunas ocasiones, la posterior compartimentalización del complejo ion-ligando. La naturaleza de estos ligandos es muy variada, abarcando desde ácidos orgánicos como el citrato y el malato, determinantes en la resistencia a aluminio, hasta pequeños péptidos (metalotioneínas) codificados cromosomalmente que actúan como ligandos (Rauser, 1999).

Otros ligandos de iones metálicos lo constituyen las fitoquelatinas (PCs), pequeños péptidos con alto contenido en residuos de cisteína. Las PCs han sido identificadas en un amplio rango de especies de plantas (Rauser, 1995) y en algún microorganismo (Kneer et al., 1992).

Estos residuos de cisteína coordinan la unión de los iones metálicos a través de su grupo tiol (Pickering et al., 1999).

Las PCs están formadas por los residuos Glu, Cys y Gly, donde Glu y Cys está unidos por un enlace tipo  $\gamma$ -carboxilamida. Estructuralmente las PCs están formadas por repeticiones sucesivas del dipéptido  $\gamma$ -Glu-Cys, finalizadas por una Gly terminal ( $\gamma$ -Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly, siendo n un valor en el rango de 2-11 (Grill et al., 1987) (Zenk, 1996). La biosíntesis de PCs es el resultado de la transpeptidación de dipéptidos de  $\gamma$ -glutamilcisteína desde el GSH, catalizada por una fitoquelatina sintasa (Grill et al., 1989).

Las rutas biosintéticas de PCs mejor caracterizadas son las de *Schizosaccharomyces pombe* (Al-Lahham et al., 1999) y las de *Arabidopsis*.

Numerosos estudios fisiológicos, bioquímicos y genéticos confirman que el GSH es el sustrato para la biosíntesis de las PCs (Rauser, 1995) (Rauser, 1999) (Zenk, 1996). De hecho, estudios iniciales pusieron de manifiesto que la inducción de las PCs en presencia de cadmio coincide con la disminución transitoria de GSH. Y la inhibición de síntesis de GSH por inhibidores del tipo de la butionina sulfoximina, originaron fenotipos sensibles a cadmio, congruentes con la represión de la síntesis de PCs. Los estudios genéticos han confirmado que los mutantes deficientes en GSH de *Schizosaccharomyces* y *Arabidopsis* son también deficientes en PCs y en resistencia a cadmio.

El As(III) y el As(V) por su parte desencadenan la formación de fitoquelatinas en plantas (Grill et al., 1987) (Maitani et al., 1996), debido a la inducción de la expresión del gen para la fitoquelatina sintasa.

Las PCs también han sido utilizadas con fines biorremediadores, en este sentido la fitoquelatina sintasa de *Arabidopsis thaliana* (AtPCS) fue expresada de manera satisfactoria en *E. coli* (Sauge-Merle et al., 2003). La expresión heteróloga de PCs en las bacterias incrementó unas 50 veces la acumulación intracelular de As. En el citoplasma, las PCs secuestran los iones de As compitiendo con los sistemas de expulsión, secuestro que mitiga la toxicidad derivada del metaloide.

## **1.7. El arsénico en humanos: rutas de entrada y sistemas de detoxificación.**

La toxicidad del As condiciona la esperanza de vida de la población en determinadas regiones del planeta. Se han expuesto de manera detallada los mecanismos de defensa de los microorganismos frente a la intoxicación con As, pero no cómo responden las células humanas a concentraciones elevadas de As.

La principal vía de entrada de este metaloide en el ser humano se produce a través de la ingesta de alimentos o agua con alto contenido en arsénico inorgánico y en menor medida por inhalación. Este arsénico inorgánico es fácilmente absorbido por la mucosa gastrointestinal y rápidamente distribuido por todo el organismo, atravesando libremente determinadas barreras, como puede ser la placenta (fenómeno descrito en humanos y roedores).

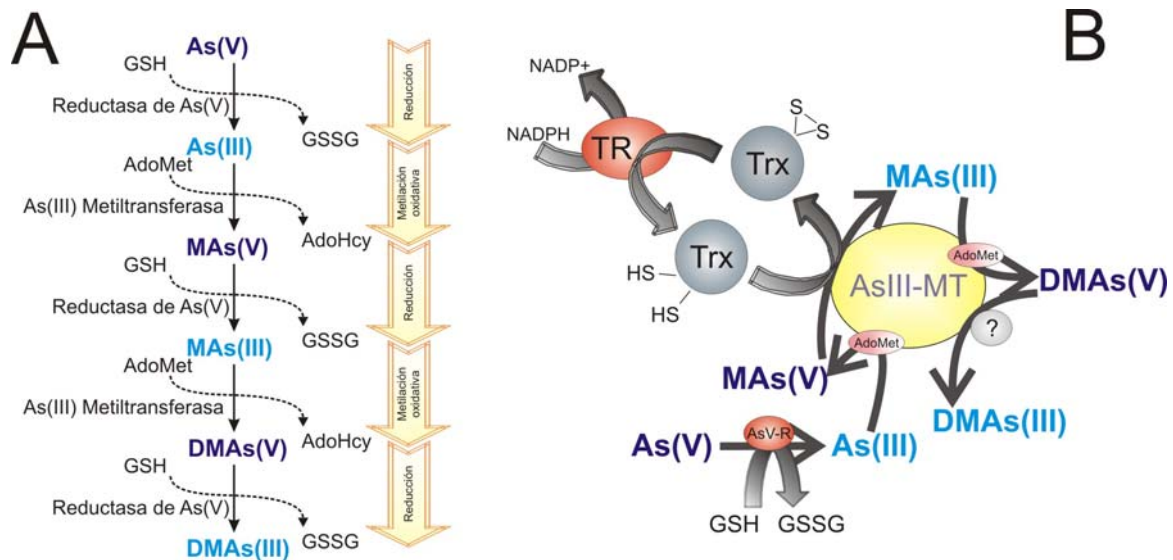
Tanto el As(III) como el As(V) son activamente transportados al interior de las células (Huang and Lee, 1996) (Liu et al., 2002) por mecanismos que implican transportadores de iones orgánicos (Bridges and Zalups, 2005), así como por transportadores de moléculas neutras de pequeño tamaño (Liu et al., 2002) o transportadores de hexosas tipo permeasa (Liu et al., 2004). Una vez en el citoplasma se ponen en marcha toda una serie de reacciones cuyo objetivo es minimizar los efectos tóxicos inherentes a la presencia de estos metaloides en las células. El metabolismo del As en las células humanas comprende dos tipos de reacciones básicas: (i) la reducción de As(V) a As(III); (ii) la metilación oxidativa de las especies trivalentes para generar compuestos metilados pentavalentes (Figura 1.5).

La principal ruta de detoxificación del As inorgánico ingerido es la metilación, pero es necesaria una reducción previa del As(V) a As(III) para que la metilación pueda ser llevada a cabo. En mamíferos se han identificado diferentes As(V) reductasas que catalizan esta reducción (Zakharyan and Aphosian, 1999) (Radabaugh and Aposhian, 2000) y en todos los casos el proceso es dependiente de la participación de moléculas con grupos tiol. El glutatión (GSH) es capaz de reducir las especies pentavalentes del arsénico [As(V), ácido metilarsónico y el ácido dimetilarsónico] en soluciones acuosas (Scott et al., 1993) (Delnomdedieu et al., 1994). En la reducción particular del  $MAs^V$  se ha descrito que la enzima implicada es la GSH S-transferasa omega (Zakharyan et al., 2001). Esta reducción también puede ser catalizada por las arseniato reductasas (Zakharyan et al., 1999) (Aphosian et al., 2000).

La metilación de las especies trivalentes del arsénico [As(III), y ácido metilarsenioso] está catalizada por las arsenito-metiltransferasas, enzimas que utilizan la S-adenosilmetionina como donadora de los grupos metilo (Zakharyan et al., 1995) (Lin et al., 2002) y que necesitan la presencia de grupos tiol para llevar a cabo la catálisis. Estas metiltransferasas son homologas en secuencia a la metiltransferasa CIT19 humana. La capacidad de las células para llevar a cabo esta metilación es variable, de hecho en algunas células diferenciadas como los queratinocitos (Patterson et al., 2003) o las células epiteliales prostáticas (brahim-Tallaa and Waalkes, 2008) esta metilación es escasa.

Tomando como base los estudios "in vitro" se sabe que la presencia de un ditiol es un requisito esencial para la actividad de la As(III) metiltransferasa en rata. Y en este sentido se postula que la tioredoxina (Trx) es un candidato adecuado para actuar como cofactor de esta enzima en las células de mamíferos. El mecanismo de interacción entre la Trx y la As(III)-metiltransferasa no se ha establecido aun, pero es muy probable que en las células de rata la Trx

esté implicada en la reducción del intermediario pentavalente  $\text{MAs}^{\text{V}}$  a  $\text{MAs}^{\text{III}}$  antes del segundo paso de metilación. También puede ser un donador de electrones para la reducción de los residuos cisteinil de la As(III)-metiltransferasa, responsables de la reducción de  $\text{MAs}^{\text{V}}$ . Las interacciones entre la Trx y la As(III)-metiltransferasa proporcionan la base del mecanismo hipotético que podría jugar un papel clave en la regulación de esta enzima (Figura 1.16B)



**Figura 1.16:** (A) Conversión metabólica de As inorgánico en humanos. AdoMet (S-adenosilmetionina), AdoHcy (S-adenosilhomocisteína), GSH (Glutación reducido), GSSG (Glutación oxidado), (B) Mecanismo hipotético de conversión del As inorgánico por la AsIII-Metiltransferasa. AsIII-MT (AsIII-Metiltransferasa), AsV-R (Reductasa de AsV), Trx (Tioredoxina), TR (Tioredoxina reductasa). Modificado de Styblo et al., (2002).

El As se metila primero a ácido metilarsénico ( $\text{MAs}^{\text{V}}$ ), que es reducido a ácido metilarsenoso ( $\text{MAs}^{\text{III}}$ ). El  $\text{MAs}^{\text{III}}$  es metilado posteriormente al ácido dimetilarsénico ( $\text{DMAs}^{\text{V}}$ ), especie reducida posteriormente a ácido dimetilarsenoso ( $\text{DMAs}^{\text{III}}$ ) (Figura 1.16A). En los seres humanos este proceso no es completo, y parte del As ingerido permanece como As inorgánico. Típicamente el As inorgánico es excretado en un 10-20% como As inorgánico, un 10-15% como  $\text{MAs}^{\text{V}}$  y un 60-75% como  $\text{DMAs}^{\text{V}}$  (Hopenhayn-Rich et al., 1993).

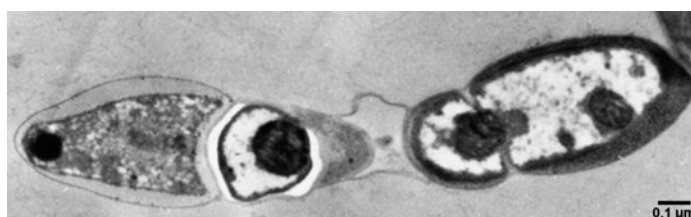
Puesto que el ácido metilarsónico ( $\text{MAs}^{\text{V}}$ ) y el ácido dimetilarsónico ( $\text{DMAs}^{\text{V}}$ ) son compuestos de toxicidad reducida, la metilación del arsénico inorgánico se ha considerado típicamente como un mecanismo de detoxificación. No obstante, los derivados metilados trivalentes del arsénico inorgánico (ácido metilarsenoso;  $\text{MAs}^{\text{III}}$ , y ácido dimetilarsenoso;  $\text{DMAs}^{\text{III}}$ ) son inhibidores enzimáticos y citotóxicos más potentes que el As(V) o el As(III), lo cual lleva rápidamente a descartar esta afirmación (Mass et al., 2001) (Styblo et al., 2000). El papel de las especies trivalentes en la carcinogénesis no está del todo establecida, aunque sí está perfectamente descrita la transformación maligna de las células del epitelio urinario humano *in vitro* como consecuencia de su exposición al ácido metilarsenoso (Bredfeldt et al., 2006). Las formas trivalentes del As ( $\text{MAs}^{\text{III}}$  y  $\text{DMAs}^{\text{III}}$ ) son oxidados de manera rápida en la orina y por lo tanto difícil de determinar en los estudios epidemiológicos.

Evidencias recientes indican que la proteína MRP1 (“multidrug resistance protein1”), implicada en transporte de As(III) al exterior, posee un sitio de unión a ATP, de forma que el ATP y el GSH juegan un papel fundamental. En este transporte el As(III) es expulsado de las células como un complejo triglutationilado (As-GS<sub>3</sub>) (Leslie et al., 2004), complejo originado por la actividad de la glutatión-S-transferasa-π (Liu et al., 2001); este hecho podría estar sometiendo a los sistemas redox de las células a un estrés continuo por la constante demanda de GSH (Figura 1.5).

Además de estos mecanismos, en humanos también se codifican y expresan metalotioneínas (MTs) con capacidad quelante. Por razones que no están del todo establecidas, su expresión es enormemente variable (Allan et al., 2000) (Wu et al., 2000). Así por ejemplo, los niveles de (MTs) en hígado en individuos sin patología asociada (aparente) oscilaban desde 0 a 104 µg/g de tejido (Sillevis Smitt et al., 1992), e incluso se ha descrito que los polimorfismos de los genes de determinadas MTs, como es el caso del gen *MT-2A*, pueden afectar de manera significativa a la expresión de las mismas (Kita et al., 2006). Por esta razón algunos autores postulan que los individuos con una capacidad reducida para la expresión de sus MTs son más susceptibles a la toxicidad asociada a los metales pesados (Liu et al., 2007).

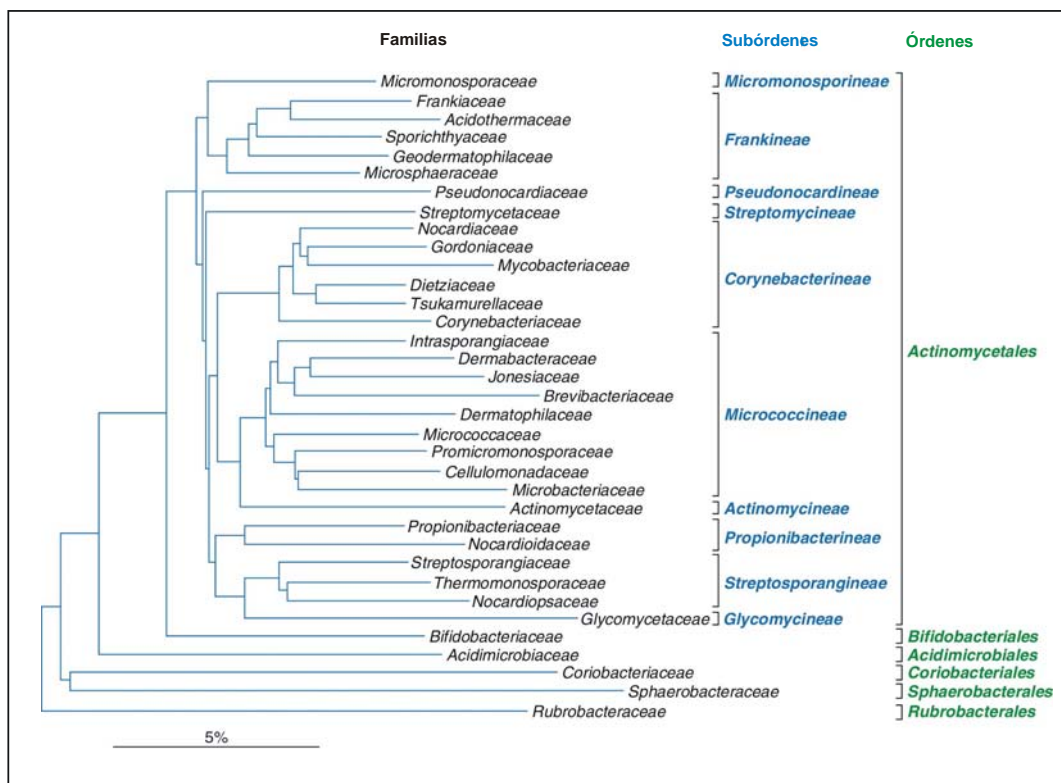
## 1.8. El género *Corynebacterium*.

El género *Corynebacterium* fue creado por Lehmann and Neumann, (1907) para clasificar taxonómicamente a los bacilos de la difteria. Inicialmente el género fue definido en base a características morfológicas, *corynebacteria* proviene del griego *κορυνη* (*corunē*): bastón nudoso y *βακτηριον* (*bacterion*): bastoncillo. En general las corinebacterias son bacilos Gram positivos, no esporulados, pleomórficos y no ramificados, con formas bacilares de diversa longitud y frecuentes engrosamientos en los extremos, que les confiere apariencia de clavo. Su tamaño oscila entre 2-6 µm de longitud y 0,5 µm de diámetro (Figura 1.17). La pared celular de las corinebacterias se estructura como un complejo entramado de peptidoglicano con ácido diaminopimérico en el interpéptido, polímeros de arabinogalactanos y cadenas de ácidos grasos saturados y no saturados de 21-36 átomos de carbono (Barksdale, 1970). La morfología de las corinebacterias cambia durante su ciclo de vida y se ve influenciada por las condiciones del cultivo (Cure and Keddie, 1973).



**Figura 1.17:** Morfología de *Coynebacterium glutamicum* obtenida por microscopía electrónica de transmisión (Letek et al., 2008).

A partir de estudios moleculares por rDNA 16S, las corinebacterias se agruparon en la subdivisión de bacterias Gram positivas de alto contenido en G+C en estrecha relación filogenética con *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e incluso *Streptomyces* (Woese, 1987) (Figura 1.18). A su vez, Goodfellow, (1989) definió el grupo de actinomicetos nocardiformes, en el que engloba los géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Tsukanella* y cuya característica principal es la presencia de ácidos micólicos y derivados en su pared celular. De acuerdo con estos criterios filogenéticos, en la segunda edición del Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Garrity et al., 2002) las corinebacterias aparecen en el volumen 4, sección XXIII, junto con el resto de microorganismos Gram positivos de elevado contenido en G+C, en lo que constituye la clase *Actinobacteria* y englobándose dentro del suborden *Corynebacterineae* (Prescott et al., 1999).



**Figura 1.18:** Clasificación de la clase *Actinobacteria*. Relaciones filogenéticas entre órdenes, subórdenes y familias basadas en los datos de rDNA16S. La barra representa sustituciones de cinco nucleótidos en cien nucleótidos. Tomada de (Stackebrandt et al., 1997).

Las corinebacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza encontrándose en el suelo, el agua y también en mucosas y piel del hombre y animales. Algunas especies de este grupo son conocidas por sus efectos perjudiciales sobre el hombre, siendo *Corynebacterium diphtheriae* el patógeno más conocido. Esta bacteria adquiere la capacidad de producir la toxina diftérica cuando es lisogenizada por el fago  $\beta$  (Costa et al., 1981).



Las especies de corinebacterias no patógenas han sido ampliamente utilizadas en la producción de metabolitos primarios (aminoácidos o nucleótidos) o secundarios (Martin, 1989). Entre los usos industriales más frecuentes de las corinebacterias podemos destacar, además, su interés en la producción de queso, bioconversión de precursores de ácido L-ascórbico, conversión de esteroides y oxidación de terpenoides. Algunas corinebacterias producen antibióticos (corinecinas), sustancias relacionadas con bacteriocinas y compuestos antitumorales (Kwaszewska and Szewczyk, 2007) (Gross and Vidaver, 1979). Otras aplicaciones industriales incluyen la degradación de hidrocarburos y producción de agentes emulsificantes. En el grupo heterogéneo constituido por las bacterias corineformes algunas cepas se caracterizan por excretar aminoácidos, entre ellos ácido glutámico. Este grupo incluye especies de los géneros *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter* y *Microbacterium* (Abe et al., 1967), aunque otras muchas cepas han sido aisladas y asignadas a diversos géneros.

En los últimos años la microbiología clínica de las corinebacterias patógenas no diftéricas ha aumentado en interés, debido principalmente a la identificación sistemática de un gran número de cepas resistentes a múltiples antibióticos, pertenecientes a este grupo de bacterias (Otsuka et al., 2005) (Otsuka et al., 2006). Este hecho ha llevado recientemente a la secuenciación del genoma de *Corynebacterium jeikeium* (Tauch et al., 2005), que junto con *Corynebacterium urealyticum* son consideradas bacterias patógenas claramente relacionadas con enfermedades humanas (Fernandez-Natal et al., 2001). Además, algunos miembros del grupo de corinebacterias no lipófilas han sido asociados a un número creciente de enfermedades en pacientes inmunosuprimidos, tales como *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium striatum* y *Corynebacterium freneyi* (de Miguel-Martínez et al., 1996) (Esteban et al., 1999) (Oteo et al., 2001) (Renaud et al., 1998) (Renaud et al., 2001).

## 1.9. Objetivos del presente trabajo

Dados los precedentes descritos hasta ahora, los objetivos del presente trabajo fueron los siguientes:

1.- Analizar y establecer la ruta de destoxificación y los mecanismos generales de resistencia a As en *C. glutamicum*.

2.- Caracterizar, desde un punto de vista molecular, las proteínas implicadas en los procesos de resistencia a As en este microorganismo ligadas a los operones *ars*.



*Publicaciones*

---



## Analysis of Genes Involved in Arsenic Resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032†

Efrén Ordóñez, Michal Letek, Noelia Valbuena, José A. Gil, and Luis M. Mateos\*

Departamento de Ecología, Genética y Microbiología, Área de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de León, 24071 León, Spain

Received 25 November 2004/Accepted 27 April 2005

*Corynebacterium glutamicum* is able to grow in media containing up to 12 mM arsenite and 500 mM arsenate and is one of the most arsenic-resistant microorganisms described to date. Two operons (*arsI* and *ars2*) involved in arsenate and arsenite resistance have been identified in the complete genome sequence of *Corynebacterium glutamicum*. The operons *arsI* and *ars2* are located some distance from each other in the bacterial chromosome, but they are both composed of genes encoding a regulatory protein (*arsR*), an arsenite permease (*arsB*), and an arsenate reductase (*arsC*); operon *arsI* contains an additional arsenate reductase gene (*arsC1'*) located immediately downstream from *arsC1*. Additional arsenite permease and arsenate reductase genes (*arsB3* and *arsC4*) scattered on the chromosome were also identified. The involvement of *ars* operons in arsenic resistance in *C. glutamicum* was confirmed by gene disruption experiments of the three arsenite permease genes present in its genome. Wild-type and *arsB3* insertional mutant *C. glutamicum* strains were able to grow with up to 12 mM arsenite, whereas *arsB1* and *arsB2* *C. glutamicum* insertional mutants were resistant to 4 mM and 9 mM arsenite, respectively. The double *arsB1-arsB2* insertional mutant was resistant to only 0.4 mM arsenite and 10 mM arsenate. Gene amplification assays of operons *arsI* and *ars2* in *C. glutamicum* revealed that the recombinant strains containing the *arsI* operon were resistant to up to 60 mM arsenite, this being one of the highest levels of bacterial resistance to arsenite so far described, whereas recombinant strains containing operon *ars2* were resistant to only 20 mM arsenite. Northern blot and reverse transcription-PCR analysis confirmed the presence of transcripts for all the *ars* genes, the expression of *arsB3* and *arsC4* being constitutive, and the expression of *arsR1*, *arsB1*, *arsC1*, *arsC1'*, *arsR2*, *arsB2*, and *arsC2* being inducible by arsenite.

*Corynebacterium glutamicum* is a biotechnologically important microorganism that is widely used for the large-scale production of amino acids such as L-glutamate and L-lysine (25, 42). Together with other members of the genera *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia*, and *Mycobacterium*, *Corynebacterium* belongs to the mycolata, a broad and diverse group of mycolic-acid-containing actinomycetes. Besides a thick peptidoglycan layer, the mycolata contain large amounts of mycolic acids and other lipids in their cell walls (43). Recently, the complete genome sequence of *C. glutamicum* strain ATCC 13032 was determined (44) and is predicted to contain 3,002 open reading frames (32).

Arsenic is one of the most prevalent toxic metals in the environment; it is mainly of geochemical origin (rocks and minerals) in an insoluble form but also derives from anthropogenic sources (41). In soluble forms, arsenic occurs as trivalent arsenite [As(III)] and pentavalent arsenate [As(V)]. Arsenate, a phosphate structural analogue, can enter the bacterial cell via the phosphate transport system. Its toxicity is due to its interference in normal phosphorylation processes by replacing cellular phosphate. It has recently been demonstrated that arsenite enters the cells, at neutral pH, by aqua-glyceroporins (glycerol transport proteins) in bacteria, yeasts, and mammals

(41) and that its toxicity lies in its ability to bind sulfhydryl groups of cysteine residues in proteins, thereby inactivating them. Arsenite is considered to be more toxic than arsenate and can be oxidized to arsenate chemically or microbiologically (20). In some gram-negative bacteria, arsenite is converted to arsenate by an arsenite oxidase, a periplasmic membrane-bound enzyme member of the dimethyl sulfoxide reductase family of molybdoenzymes (51). The toxic properties of arsenic are well known and have been exploited in the production of antimicrobial agents, such as the first specific antimicrobial drug Salvarsan 606, in addition to the commonly used wood preservative chromated copper arsenate (27).

Bacteria have developed a variety of mechanisms to avoid the toxicity of arsenic: (i) minimizing the uptake of arsenate through the system for phosphate uptake (16), (ii) by peroxidation reactions with membrane lipids (1), and (iii) using the best characterized microbial arsenic detoxification pathway involving the *ars* operon (55).

Bacterial operons encoding analogous arsenic resistance determinants (*ars*) have been found on the chromosome as well as on transmissible plasmids from gram-positive and gram-negative microorganisms. These operons generally consist of either three (*arsRBC*) or five (*arsRDABC*) genes that have been organized into a single transcriptional unit (55). The three-gene system, encoding the arsenic transcriptional repressor (*arsR*), arsenite permease (*arsB*), and arsenate reductase (*arsC*), was present on the chromosome of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (13), and other enterobacteria (18). The operon of three genes is also present in the *Staphylococcus* plasmids pI258 and pSX267 (24).

\* Corresponding author. Mailing address: Area de Microbiología, Departamento de Ecología, Genética y Microbiología, Universidad de León, 24071 León, Spain. Phone: 34-87-291126. Fax: 34-87-291409. E-mail: deglmd@unileon.es.

† Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

The five-gene operon (*arsRDABC*) encodes an arsenite-inducible repressor (*arsR*), a negative regulatory protein that provides the fine tuning of operon expression (*arsD*), an ATPase, and a membrane-located arsenite efflux pump (*arsA* and *arsB*, respectively), together with an arsenate reductase (*arsC*). This operon was initially discovered in the *E. coli* plasmids R773 and R46 (17) and then on plasmid pKW301 from *Acidiphilium multivorum* (57). In addition to the above-mentioned arsenic resistance operons, a broad diversity of four-gene operons have been described in different species, such as *Bacillus subtilis* (52), *Acidithiobacillus ferrooxidans* (11, 12), and a *Synechocystis* sp. (36). Two operons involved in arsenic resistance have recently been identified on the chromosome of the multiresistant *Pseudomonas putida*, although no molecular details were provided (14). In *Saccharomyces*, a cluster of three genes involved in arsenic resistance was identified; genes *acr1*, *acr2*, and *acr3* in *S. cerevisiae* (7) and genes *arr1*, *arr2*, and *arr3* in *S. douglasii* (37) seem to encode the regulator, arsenate reductase, and arsenite permease, respectively.

In view of the ubiquitous presence of arsenic in nature, we wished to determine whether the saprophytic soil bacterium *C. glutamicum* contained genes involved in resistance to arsenic and the possible use of *C. glutamicum* in the detoxification of episodic increases of arsenic in soil and water.

Here, we report the identification of genes involved in arsenic resistance in *C. glutamicum*, some of them forming two similar operons (called *ars1* and *ars2*), and two accessory genes (*arsB3* and *arsC4*) scattered throughout the chromosome. We also show that both operons (*ars1* and *ars2*) are functional and clearly involved in arsenic resistance.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, culture, and transformation conditions.** The bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. *E. coli* strains were grown in Luria-Bertani broth or Luria-Bertani agar (26) at 37°C. Corynebacterial strains were grown at 30°C in trypticase soy broth (TSB; complex medium), TSA (TSB supplemented with 2% agar), or minimal medium for corynebacteria (MMC) (33). When necessary, antibiotics were added at the following final concentrations: kanamycin, 50 µg/ml for *E. coli* and 25 µg/ml for corynebacteria; ampicillin, 100 µg/ml; chloramphenicol, 50 µg/ml for *E. coli* and 10 µg/ml for corynebacteria; apramycin, 50 µg/ml for *E. coli* and 25 µg/ml for corynebacteria. Transformation of *E. coli* strains was carried out by the Inoue method (28), and mobilization of plasmids from *E. coli* S17-1 (donor strain) to coryneform recipient strains in conjugation assays was essentially accomplished as described previously (39). Transconjugants were selected on TSA medium containing 50 µg/ml of nalidixic acid and an additional antibiotic (kanamycin, chloramphenicol, or apramycin), depending on the mobilizable plasmid used for the mating. For arsenic resistance tests, strains were grown on TSA-MMC plates and single colonies were transferred into TSB medium and grown at 30°C to an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of approximately 0.5. Ten microliters of cell suspension was streaked on plates of TSA-MMC (supplemented with an appropriate volume of either arsenate or arsenite) and incubated for up to 2 days at 30°C. Resistance was determined by the appearance of growth and defined as the highest concentration of either arsenate or arsenite that permitted growth.

**Molecular genetic methods.** Restriction endonuclease digestion, agarose gel electrophoresis, Southern blot analysis, and molecular cloning techniques were performed by using standard procedures (34). Primers for PCR were generated by using the *C. glutamicum* strain ATCC 13032 genome sequence and are listed in Table S1 in the supplemental material.

Isolation of RNA from *C. glutamicum* strain RES167 grown in MMC [supplemented or not with 5 mM As(III)], electrophoresis, transfer to nylon membranes, and hybridization were performed as described previously (45). Probes corresponding to internal fragments of *arsB1*, *arsB2*, *arsC1*, *arsC2*, and *arsC1'* were obtained by PCR amplification using specific primers (see Table S1 in the supplemental material).

For reverse transcription (RT)-PCR analysis (two-step procedure), 1 µg of RNA was used as template to generate single-strand cDNA from the desired genes using the first-strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (Roche) and following the manufacturer's recommendations. Primers used to generate cDNA from the corresponding transcripts were designed using the specific Applied Biosystems software (Primer express software, v2.0) and can be found in Table S1 in the supplemental material. cDNAs were used as template for the second PCR amplification reaction using specific primers (see Table S1 in the supplemental material); amplified DNAs were separated by electrophoresis through 1.6% agarose gels and stained with ethidium bromide. RNA samples were tested for contamination with genomic DNA by using each RNA sample as a template for PCR.

For quantitative-PCR (Q-PCR), 1/20 of each cDNA sample (from the first RT-PCR; see above) was used as template for amplification, adding a specific pair of primers for each gene (see Table S1 in the supplemental material), a suitable volume of the master reaction mix (Applied Biosystems), and water up to 25 µl. Reactions were performed in an ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems), and results were processed using specific software (ABI Prism 7000 SDS software). Results are indicated relative to the cycle threshold value. In all cases, the oligonucleotide primers used in Q-PCR were optimized to amplify fragments of the same length from each gene (around 50 nucleotides) and to ensure a similar melting temperature (59°C) according to the software instructions.

Computer analyses were performed with DNASTAR; database similarity searches were performed using BLAST and FASTA public servers (National Collection of Industrial Bacteria and European Bioinformatics Institute [EBI], Hixton Hall, United Kingdom), and multiple alignments of sequences were accomplished using ClustalW (EBI). Phylogenetic analyses were performed using MEGA2 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) software (35) by the neighbor-joining method with 21 *arsR* genes, 22 *arsB* genes, and 29 *arsC* genes; these analyses are shown in the supplemental material (Fig. S1, S3, and S4).

**Construction of recombinant plasmids.** To clone the whole *ars1* (*arsR1-B1-C1-C1'*) and *ars2* (*arsR2-B2-C2*) operons, 2.8- and 2.1-kb fragments were amplified with *Pfu* from the total DNA of *C. glutamicum* strain ATCC 13032 using primer pairs *ars1/ars2* and *ars37/ars38*, respectively (see Table S1 in the supplemental material). Primers were designed to include at their 5' ends sites for the restriction enzymes EcoRI and BamHI; the 2.8-kb PCR-amplified DNA band (*ars1*) was digested with EcoRI (Klenow fragment filled) and BamHI and ligated to the BglII- plus SmaI-digested bifunctional plasmid pECM2 (Table 1), affording plasmid pECAS1. The 2.1-kb PCR-amplified DNA fragment (*ars2*) was ligated to the SmaI-digested pECM2, obtaining the bifunctional plasmid pE-CAS2 (Table 1).

For the disruption of the *arsB1*, *arsB2*, and *arsB3* genes (encoding the three arsenite permeases present in the *C. glutamicum* genome), internal fragments of the genes were obtained by PCR amplification of total DNA from *C. glutamicum* ATCC 13032 by using primers *ars3/ars4* for *arsB1* (310 bp), *ars5/ars6* for *arsB2* (370 bp), and *ars7/ars8* for *arsB3* (260 bp) (Fig. 1A; see Table S1 in the supplemental material). Primers were designed to include restriction sites for BamHI (upper primers) and HindIII (lower primers); plasmid pK18mob digested with BamHI and HindIII was ligated with the internal fragments of the arsenite permease genes to afford plasmids pKA1, pKA2, and pKA3 (Table 1). Similarly, the internal fragments from *arsB1* and *arsB2* were cloned into plasmid pOJ260 (Table 1) to obtain pOJA1 and pOJA2, respectively.

To identify promoters in the upstream region of *arsB1* and *arsC1*, DNA fragments were amplified by PCR with the primers *ars9/ars10* (ParsB1, 158 bp) and *ars11/ars12* (ParsC1, 198 bp) (see Table S1 in the supplemental material); restriction enzyme sites for EcoRI and NdeI were included in the up and down primers, respectively. Amplified fragments were cloned into the promoter probe plasmids pJMF424 and pEGFP (Table 1) to afford plasmids pJMF-EP/pGFP-EP (permease promoter) and pJMF-ER/pGFP-ER (reductase promoter), respectively.

#### RESULTS

**Coryneform bacteria are highly resistant to arsenic.** Several gram-negative and gram-positive bacteria were assayed for their sensitivity/resistance to arsenic in TSA medium supplemented with sodium arsenate [AsO<sub>3</sub><sup>-</sup>, As(V)] or sodium arsenite [AsO<sub>2</sub><sup>-</sup>, As(III)]. Bacteria were classified as low resistant, moderately resistant, and highly resistant to arsenic (Table 2). As expected, the level of resistance to As(V) was

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant genotype or description <sup>a</sup>	Source or reference <sup>b</sup>
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	r <sup>-</sup> m <sup>-</sup> used for general cloning	26
<i>E. coli</i> S17-1	Mobilizing donor strain, <i>pro recA</i> , which has an RP4 derivative integrated into the chromosome	53
<i>E. coli</i> W3110	K-12 F <sup>-</sup> ( <i>rmD-rmE</i> )	3
<i>E. coli</i> AW3110	<i>E. coli</i> W3110 strain lacking the chromosomal <i>ars</i> operon ( $\Delta$ <i>ars::cam</i> )	15
<i>C. glutamicum</i> 13869	Wild-type strain	ATCC
<i>C. glutamicum</i> 13032	Wild-type strain	ATCC
<i>C. glutamicum</i> RES167	ATCC 13032 restriction-deficient derivative used as host of recombinant plasmids	59
<i>C. glutamicum</i> ArsB1	RES167 derivative containing plasmid pKA1 integrated in the <i>arsB1</i> gene	This work
<i>C. glutamicum</i> ArsB2	RES167 derivative containing plasmid pKA2 integrated in the <i>arsB2</i> gene	This work
<i>C. glutamicum</i> ArsB3	RES167 derivative containing plasmid pKA3 integrated in the <i>arsB3</i> gene	This work
<i>C. glutamicum</i> ArsB1-B2	ArsB1 derivative mutant, containing plasmid pOJA2 integrated in the <i>arsB2</i> gene	This work
<i>C. glutamicum</i> ArsB1-B3	ArsB3 derivative mutant, containing plasmid pOJA1 integrated in the <i>arsB1</i> gene	This work
<i>C. glutamicum</i> ArsB2-B3	ArsB3 derivative mutant, containing plasmid pOJA2 integrated in the <i>arsB2</i> gene	This work
<i>Staphylococcus aureus</i> 240	Wild-type strain	CECT
<i>Rhodococcus fascians</i> 3001	Wild-type strain	CECT
<i>Nocardia corynebacterioides</i> 14898	Wild-type strain	ATCC
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	Efficient plasmid transformation <i>M. smegmatis</i> strain	56
<i>Bacillus subtilis</i> 36	Wild-type strain	CECT
<i>Streptomyces lividans</i> 1326	Wild-type strain	JIC
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 378	Wild-type strain	CECT
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	<i>bdsMR</i>	22
<b>Plasmids</b>		
pK18mob	<i>E. coli</i> mobilizable plasmid containing <i>lacZ</i> and <i>kan</i>	54
pKA1	pK18mob derivative carrying the 310-bp internal fragment of the <i>arsB1</i> gene from <i>C. glutamicum</i>	This work
pKA2	pK18mob derivative carrying the 370-bp internal fragment of the <i>arsB2</i> gene from <i>C. glutamicum</i>	This work
pKA3	pK18mob derivative carrying the 260-bp internal fragment of the <i>arsB3</i> gene from <i>C. glutamicum</i>	This work
pOJ260	<i>E. coli</i> mobilizable plasmid containing <i>lacZ</i> and <i>apm</i>	6
pOJA1	pOJ260 derivative carrying the 310-bp internal fragment of the <i>arsB1</i> gene from <i>C. glutamicum</i>	This work
pOJA2	pOJ260 derivative carrying the 370-bp internal fragment of the <i>arsB2</i> gene from <i>C. glutamicum</i>	This work
pECM2	Mobilizable <i>E. coli-Corynebacterium</i> bifunctional plasmid containing <i>kan</i> and <i>cat</i>	30
pECAS1	pECM2 derivative carrying the whole <i>ars1</i> operon ( <i>arsRBCC</i> )	This work
pECAS2	pECM2 derivative carrying the whole <i>ars2</i> operon ( <i>arsRBC</i> )	This work
pJMFA24	<i>E. coli</i> promoter-probe vector containing <i>bla</i> and the promoterless <i>kan</i> gene from Tn5 as reporter gene	2
pJMF-EP	pJMFA24 derivative containing the putative promoter region of <i>arsB1</i> (ParsB1)	This work
pJMF-ER	pJMFA24 derivative containing the putative promoter region of <i>arsC1</i> (ParsC1)	This work
pEGFP	Bifunctional <i>E. coli-corynebacteria</i> promoter-probe vector containing <i>kan</i> as selective marker and <i>egfp2</i> gene under the <i>kan</i> promoter (Pkan) as reporter	M. Letek and L. M. Mateos, unpublished data
pGFP-EP	pEGFP derivative containing the putative promoter region of <i>arsB1</i> (ParsB1) instead of Pkan	This work
pGFP-ER	pEGFP derivative containing the putative promoter region of <i>arsC1</i> (ParsC1) instead of Pkan	This work
pEGNC	pEGFP derivative vector containing the promoterless <i>egfp2</i> gene	M. Letek and L. M. Mateos, unpublished data

<sup>a</sup> *kan*, *apm*, *bla*, *cat*, and *egfp2* are respectively genes for kanamycin, apramycin, ampicillin, chloramphenicol, and green fluorescent protein.<sup>b</sup> ATCC, American Type Culture Collection; CECT, Spanish Type Culture Collection; JIC, John Innes Centre, Norwich, United Kingdom.

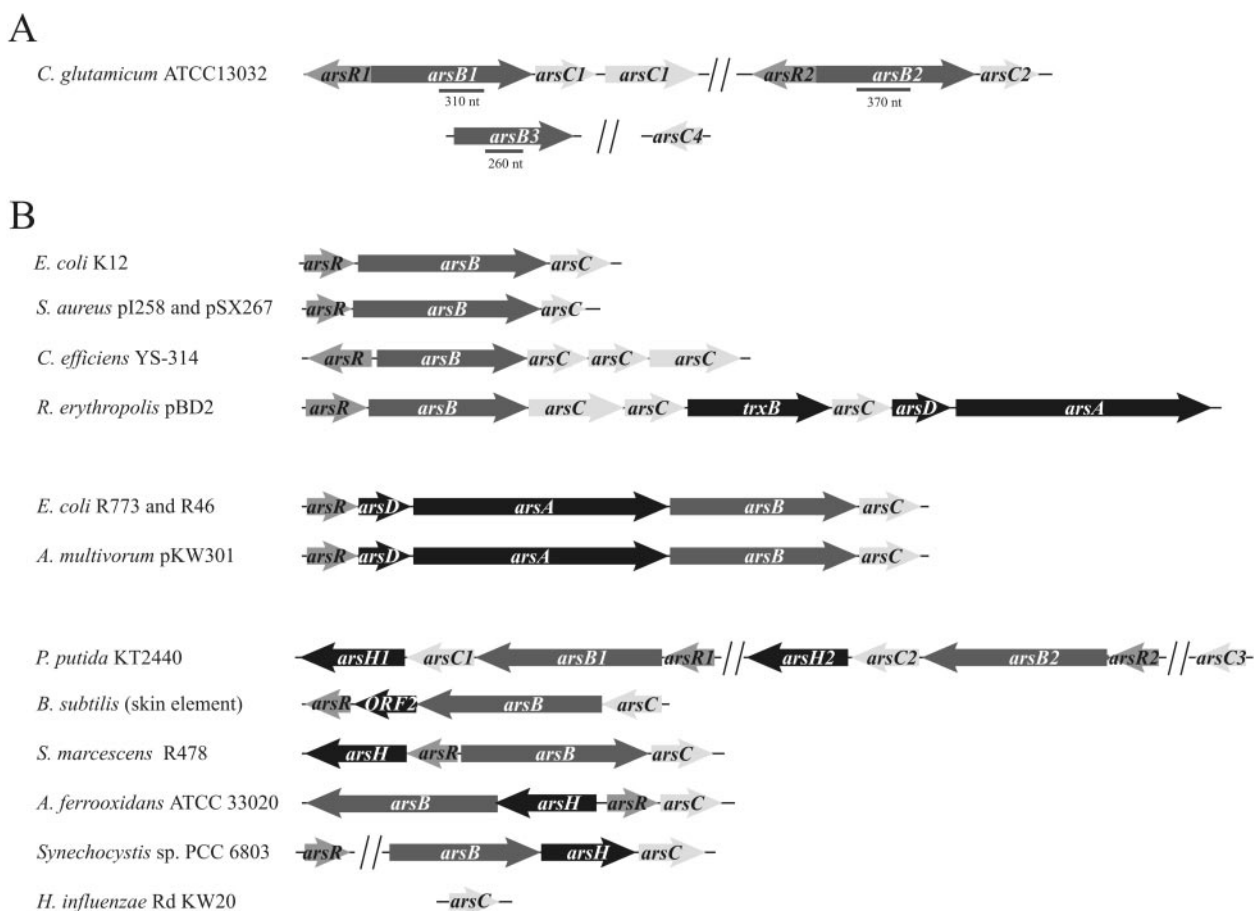


FIG. 1. Schematic representation of genes involved in arsenic resistance in *C. glutamicum* ATCC 13032 (A) and in other bacteria (B). (A) Operons *arsI* and *ars2* are indicated. Arrows represent open reading frames. Dashed boxes indicate the probes used for the cloning of internal fragments of the desired genes obtained by PCR amplification. (B) The three-gene operon (*arsRBC*), encoding the transcriptional repressor (*arsR*), an arsenite permease (*arsB*), and an arsenate reductase (*arsC*), is present in the *E. coli* K-12 chromosome (accession number NC\_000913), *Staphylococcus* plasmids pI258 (31) and pSX267 (48), *C. glutamicum* (NC\_003450), *C. efficiens* (NC\_004369), and *R. erythropolis* plasmid pBD2 (NC\_005073). The five-gene operon (*arsRDABC*), encoding an arsenite-inducible repressor (*arsR*), a negative regulatory protein (*arsD*), an oxyanion-protruding ATPase, an arsenite efflux pump (*arsA* and *arsB*, respectively), and an arsenate reductase (*arsC*), is present in the *E. coli* plasmids R773 and R46 (10, 17) and in plasmid pKW301 from *A. multivorum* (57). The four-gene operon has been found in different species, such as the skin element of *B. subtilis* (52), *A. ferrooxidans* (11), plasmid R478 from *S. marcescens* (49), a *Synechocystis* sp. (36), and *Pseudomonas putida* (NC\_002947). An isolated *arsC* gene is present in the genome of *Haemophilus influenzae* (NC\_000907), and two operons involved in arsenic resistance have been identified on the chromosome of *P. putida* and *C. glutamicum*.

TABLE 2. Resistance levels of different microorganisms to arsenite (AsIII) and arsenate (AsV)

Microorganism	AsIII resistance (mM)	AsV resistance (mM)
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1	25
<i>Nocardia corynebacteroides</i>	2	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	50
<i>Bacillus subtilis</i>	2.5	75
<i>Streptomyces lividans</i>	4	150
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	5	100
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6	200
<i>Pseudomonas putida</i>	7	200
<i>Corynebacterium glutamicum</i> 13032	12	>500
<i>Corynebacterium glutamicum</i> 13869	12	>500
<i>Rhodococcus fascians</i>	14	>500

10- to 20-fold (50 to 150 mM) higher than the resistance level to As(III), except for *C. glutamicum* and *Rhodococcus fascians*, whose resistance level reached 400 to 500 mM (close to the solubility level of sodium arsenate in the media).

From these experiments, it may be concluded that members of the coryneform group (*C. glutamicum* 13032, *C. glutamicum* 13869 [formerly *B. lactofermentum*], and *R. fascians* [formerly *Corynebacterium fascians*]) are much more resistant to arsenic than the rest of the bacteria analyzed. The genes responsible for the resistance to arsenic in *C. glutamicum* 13032 or *C. glutamicum* 13869 must be located within the bacterial chromosome because no plasmids bearing arsenic resistance genes have been described in these strains (38, 50, 58).

Several genes probably involved in arsenic resistance are present in *Corynebacterium glutamicum*. Once the complete nucleotide sequence of the *C. glutamicum* chromosome was available (44), and assuming that proteins of similar sequences



TABLE 3. Arsenite/arsenate resistance levels of different *E. coli* and *C. glutamicum* strains untransformed or transformed with plasmid pECAS1 (operon *ars1*) or pECAS2 (operon *ars2*)

Strain	As(III) resistance (mM)			As(V) resistance (mM)		
	Untransformed	pECAS1	pECAS2	Untransformed	pECAS1	pECAS2
<i>E. coli</i>						
DH5 $\alpha$	5	6	6	100	100	100
W3110	5	6	6	100	100	100
AW3110	0.2	6	6	2	20	20
<i>C. glutamicum</i>						
RES 167	12	60	20	500	500	500
ArsB1	4	60	15	200	500	500
ArsB2	9	60	20	500	500	500
ArsB3	12	60	20	500	500	500
ArsB1-B2	0.4	60	15	10	500	500

perform similar functions, the gene products possibly involved in arsenic resistance became available in the genome via homology-based analyses such as BLAST and FASTA (19). Thus, two operons, thereafter named *ars1* and *ars2*, located distant from each other on the chromosome were found and both of them showed similar genetic structures (*arsRBC*). The only difference was the presence of an additional gene (*arsC1'*, Cgl1455 in the database) at the end of the *ars1* operon (Fig. 1A). Genes homologous to *arsC1'* have also been found downstream from *arsC1* in *Corynebacterium efficiens* (accession number NC\_004369) and in plasmid pBD2 from *Rhodococcus erythropolis* (accession number NC\_005073). The organization of the *ars* genes in different bacteria is shown in Fig. 1B.

Based on BLAST analysis, the first genes of both clusters (*ars1* and *ars2*) are *arsR1* and *arsR2*, which encode putative arsenite regulatory proteins (*arsR1* was not described in the database, and *arsR2* was previously named Cgl 0275). *ArsR1* and *ArsR2* showed clear homologies to *ArsR* proteins from actinomycetes and *Acidithiobacillus ferrooxidans* (see Fig. S1 in the supplemental material). *ArsR1* and *ArsR2* from *C. glutamicum* (as in the *ArsR* from *A. ferrooxidans*) do not have the typical CXCXXC arsenite binding motif of R773 *ArsR* but have two joined cysteines close to the arsenite binding motif of R773 *ArsR*. Furthermore, *ArsR1* has two additional cysteines (there is only one in *ArsR2*) at the N-terminal extension, like CadC (21) (see Fig. S2 in the supplemental material). Interestingly, the *arsR* in both operons is expressed divergently from the rest of the *ars* genes.

The second genes, *arsB1* and *arsB2*, described as encoding an arsenite efflux pump, might encode enzyme arsenite permeases (formerly named Cgl 1453 and Cgl 0258 respectively). These are homologous to the arsenic protein carriers from actinomycetes, the skin element from *B. subtilis* (52), *Saccharomyces cerevisiae* Acr3p (61), and the arsenic protein carrier from a *Synechocystis* sp. (36) (see Fig. S3 in the supplemental material).

The rest of the genes in both clusters, *arsC1*, *arsC1'*, and *arsC2* (previously named Cgl 1454, Cgl 1455, and Cgl 0259, respectively), encode predicted protein tyrosine phosphatases with sequence similarity to the thioredoxin-dependent arsenate reductases from actinomycetes and, to a lesser extent, *Staphylococcus* (62) and *Bacillus* (4) (see Fig. S4 in the supplemental material).

In addition to the above operons probably involved in arsenic resistance (operons *ars1* and *ars2*), another putative arsenite permease gene (*arsB3*, Cgl 1414) and a putative arsenate reductase gene (*arsC4*, Cgl 1049) were present in the *C. glutamicum* genome (Fig. 1A). *ArsB3* did not show homologies with arsenite permeases from gram-negative bacteria and seems to be different from the *ArsB* clade from actinomycetes, the skin element from *B. subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* Acr3p, and the *ArsB* clade from a *Synechocystis* sp. *ArsC4* seems to be unrelated to the rest of *C. glutamicum* *ArsCs* and showed homologies with *ArsC* from gram-negative bacteria (see Fig. S4 in the supplemental material).

**Arsenite permeases *ArsB1* and *ArsB2* are involved in arsenic resistance in *C. glutamicum*.** To confirm the involvement of the above-described genes in arsenic resistance in *C. glutamicum*, the integrative plasmids pKA1, pKA2, and pKA3 (Table 1) containing internal fragments of the hypothetical arsenite permease genes *arsB1*, *arsB2*, and *arsB3* were introduced separately into *E. coli* strain S17-1 and transferred to *C. glutamicum* strain RES167 by conjugation. The arsenite permease gene was chosen for gene disruption because of the possible polar effect of its disruption on both *ars1* and *ars2* operons (Fig. 1A). Kanamycin-resistant transconjugants were obtained in all cases, suggesting that the integrative plasmids would have been incorporated into the host chromosome and that therefore the homologous chromosomal genes (and downstream *arsC1*, *arsC1'*, and *arsC2* genes) might be disrupted. Plasmid integration was confirmed both by Southern hybridization and by PCR amplification (data not shown). Ten transconjugants from each conjugation experiment were analyzed for arsenite and arsenate resistance; because the behaviors of all the transconjugants obtained with a given suicide plasmid (pKA1, pKA2, or pKA3) were identical, only one transconjugant of each conjugation experiment was selected and was named *C. glutamicum* *ArsB1*, *C. glutamicum* *ArsB2*, or *C. glutamicum* *ArsB3* (Table 1); the resistance to arsenite of these insertional mutant strains is shown in Table 3. When the above mutants were grown in TSA in the presence of arsenate, *C. glutamicum* *ArsB2* and *C. glutamicum* *ArsB3* were able to grow in up to 500 mM arsenate like *C. glutamicum* RES167 whereas *C. glutamicum* *ArsB1* was resistant to only 200 mM.

To construct the double arsenite permease mutant *C. glutamicum* *ArsB1-B2*, *C. glutamicum* *ArsB1* was used as recipient

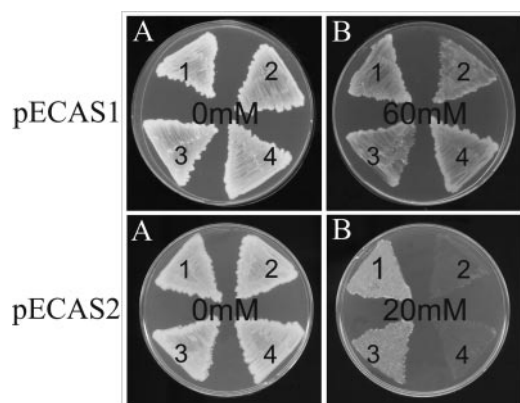


FIG. 2. Complementation of *C. glutamicum* *arsB* mutants by the *ars1* (pECAS1) and *ars2* (pECAS2) operons. *C. glutamicum* RES167 (1), *C. glutamicum* ArsB1 (2), *C. glutamicum* ArsB2 (3), and *C. glutamicum* ArsB1-B2 (4) transformed with pECAS1 or pECAS2 were inoculated in TSA containing increasing amounts of arsenite (0 mM to 60 mM), incubated at 30°C for 36 h, and photographed. Please note that some strains containing plasmid pECAS2 were unable to grow in the presence of 20 mM arsenite and that none of them were able to grow in 60 mM arsenite.

in the conjugation assay, using the mobilizable plasmid pOJA2 (Table 1); mutants ArsB1-B3 and ArsB2-B3 were obtained after the transfer of plasmid pOJA1 (Table 1) and plasmid pOJA2, respectively, to the recipient strain *C. glutamicum* ArsB3. One transconjugant from each assay was selected and checked by Southern blot analysis. *C. glutamicum* mutants ArsB1-B3 and ArsB2-B3 behaved exactly like the single mutants *C. glutamicum* ArsB1 and *C. glutamicum* ArsB2, respectively. The behavior of the double mutant *C. glutamicum* ArsB1-B2 in relation to its resistance to arsenite is indicated in Table 3; furthermore, this mutant was also unable to grow in 10 mM arsenate. The resistance level of the double mutant ArsB1-B2 was reduced 30-fold (from 12 mM to 0.4 mM) for arsenite and 50-fold (from 500 mM to 10 mM) for arsenate.

These results suggest that resistance to arsenite [and perhaps also to arsenate through the conversion of As(V) into As(III)] in *C. glutamicum* would mainly be due to the activity of operons *ars1* and *ars2*, operon *ars1* being more crucial than *ars2*.

**Gene dose effect of *ars1* and *ars2* on resistance to arsenic in *C. glutamicum* and *E. coli* strains.** To confirm the involvement of the *ars1* and *ars2* operons in the resistance to arsenic, we attempted to analyze the effect of the *C. glutamicum* *ars1* and *ars2* operons in several *E. coli* strains (heterologous complementation) or in *C. glutamicum* ArsB mutants by using the multicopy bifunctional plasmids pECAS1 and pECAS2 (Table 1). Resistance levels to arsenite for transformed and untransformed *E. coli* and *C. glutamicum* strains are shown in Table 3.

As can be observed in Fig. 2, mutations in *arsB1* and *arsB2* were clearly complemented by plasmid pECAS1 because transconjugants of mutants *C. glutamicum* ArsB1, ArsB2, and ArsB1-B2 were able to grow in up to 60 mM arsenite (Table 3; Fig. 2) and in up to 500 mM arsenate (Table 3). When plasmid pECAS2 was introduced into the *C. glutamicum* strains, a different behavior was observed (Table 3; Fig. 2); the control strain RES167 and mutant ArsB2 were resistant up to 20 mM arsenite, but the strains affected in the *arsB1* gene (mutants

ArsB1 and ArsB1-B2) were resistant only up to 15 mM arsenite. In conclusion, the presence of several copies (ca. 30 copies/cell) of the *ars1* and *ars2* operons not only complements the respective *arsB1* and *arsB2* mutations but also confers on *C. glutamicum* hitherto undescribed levels of resistance to arsenite.

Transformation of *E. coli* with plasmids pECAS1 and pECAS2 indicated that the *ars* mutation present in *E. coli* AW3110 was clearly complemented by both the *ars1* and *ars2* operons (Table 3) whereas the resistance level of transformed *E. coli* DH5 $\alpha$  and *E. coli* W3110 was only slightly increased (from 5 to 6 mM). Similar results were obtained when the transformed *E. coli* strains were analyzed for arsenate resistance; the super-sensitive strain AW3110 was complemented by both *ars* operons, and its resistance level to arsenate increased from 2 mM to 20 mM.

**Transcriptional analysis of the *ars* operons.** The genetic organization of the *ars1* and *ars2* operons suggests that genes *arsB1-C1-C1'* and *arsB2-C2* might be transcribed together and divergently with the transcription of *arsR1* and *arsR2*, respectively. To analyze this possibility, *C. glutamicum* cells were grown in MMC to mid-exponential phase in the presence or absence of 5 mM arsenite and total RNA was isolated and used in Northern blot experiments.

As can be observed in Fig. 3, transcription of both operons was induced in the presence of arsenite and transcription of operon *ars1* was more efficient than that of operon *ars2*, corroborating our earlier results with the insertional mutants. The presence of transcripts of 2.4 kb and 1.1 kb when an internal fragment from *arsB1* was used as probe (Fig. 3A) suggests that *arsB1-C1-C1'* is transcribed mainly as a single 2.4-kb polycistronic unit and that the 1.1-kb transcript might correspond to a transcript of the gene coding for the ArsB1 permease. When an internal fragment from *arsC1* was used as probe (Fig. 3A), the same 2.4-kb transcript was observed, as well as an additional 1.2-kb transcript corresponding to the dicistronic *arsC1-C1'* (Fig. 3A). Similar results were obtained when the internal fragment from *arsC1'* was used as probe.

The transcriptional organization of the *ars2* operon was very similar, with a transcript of 1.5 kb (dicistronic *arsB2-C2*) when an internal *arsB2* fragment was used as probe (Fig. 3B) and transcripts of 1.5 kb (dicistronic *arsB2-C2*) and 0.4 kb (monocistronic *arsC2*) when an internal *arsC2* fragment was used (Fig. 3B).

To confirm the expression of both *ars* operons, RT-PCR was performed using mRNA from cultures growing in the absence or presence of 5 mM arsenite. As can be observed in Fig. 4, *arsB1*, *arsC1*, and *arsC1'* were induced in the presence of this compound. Similar results were obtained with the *ars2* operon (data not shown).

To quantify more precisely the level of expression of all the genes probably involved in resistance to arsenic, Q-PCR analysis was performed with all nine genes described in this work (*arsR1*, *arsB1*, *arsC1*, *arsC1'*, *arsR2*, *arsB2*, *arsC2*, *arsB3*, and *arsC4*) by using specific primers (see Table S1 in the supplemental material). As can be observed in Table 4, the estimated numbers of specific mRNA molecules for *arsB3* and *arsC4* were similar in the presence or absence of 5 mM arsenite whereas a number of molecules of specific mRNA for *arsR1*, *arsB1*, *arsC1*, *arsC1'*, *arsR2*, *arsB2*, and *arsC2* were clearly in-

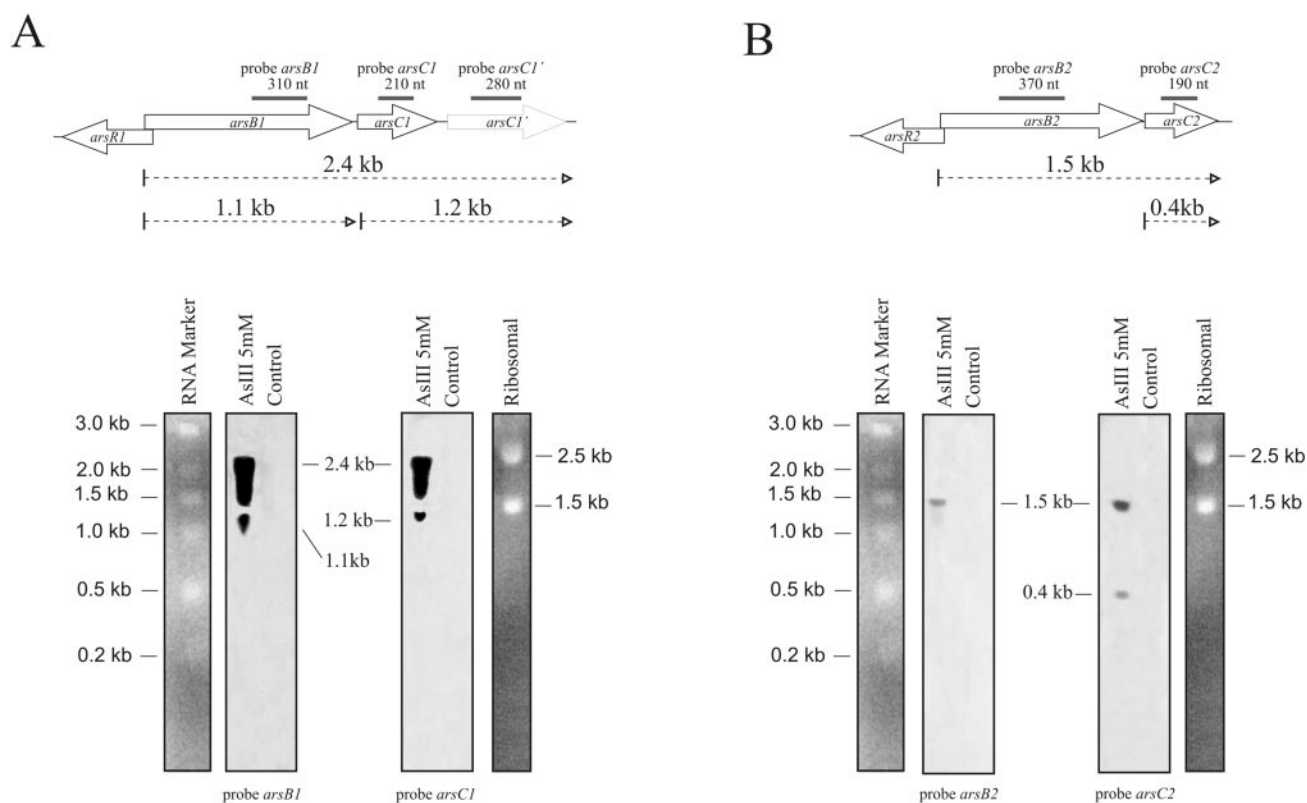


FIG. 3. Northern blot analysis of specific transcripts for *arsB1*, *arsC1*, *arsC1'*, *arsB2*, and *arsC2* from *C. glutamicum*. Total RNA (15  $\mu$ g) was isolated from *C. glutamicum* in the exponential phase ( $OD_{600} = 1.5$ ) in the absence (control) or presence of 5 mM arsenite, electrophoresed, transferred to nylon filters, and hybridized with internal fragments of *arsB1*, *arsC1*, *arsC1'*, *arsB2*, and *arsC2* obtained by PCR (dashed boxes) using the primers described in Table S1 in the supplemental material. Size controls corresponding to the migration of bands in the gel are indicated.

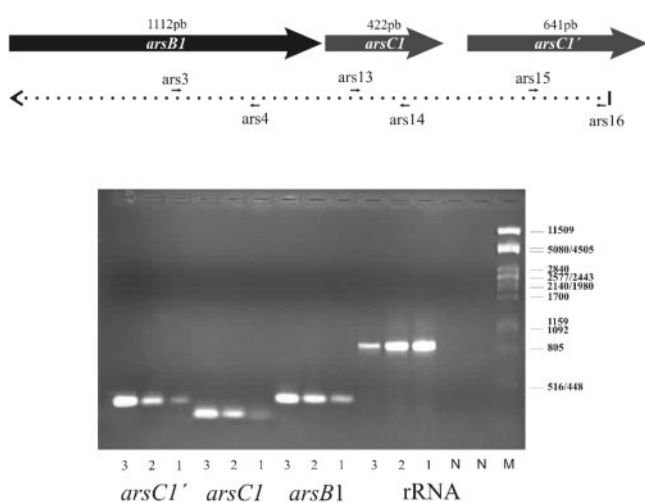


FIG. 4. Transcriptional analysis of *arsB1-CI-CI'* by RT-PCR. Total RNA isolated from *C. glutamicum* in the exponential phase ( $OD_{600} = 1.5$ ) in the absence (lanes 1) or presence (lanes 2) of 5 mM arsenite was used as the template in a reverse transcriptase reaction with primer *ars16* to generate cDNA and then amplified with primers (*ars3/4*, *ars13/14*, and *ars15/16*) internal to each gene. A positive control using *C. glutamicum* chromosomal DNA instead of cDNA was included (lanes 3), as well as RT-PCR of the 16S rRNA (rRNA) using primer *rrn2* for the synthesis of cDNA and primers *rrn1* and *rrn2* for PCR amplification (see Table S1 in the supplemental material). DNA contamination of the RNA samples was ruled out by performing PCR directly on the RNAs (N).

duced in the presence of 5 mM arsenite. From the results of this experiment, it is possible to conclude that the expression of *arsB3* and *arsC4* is constitutive whereas the expression of the rest of the genes is inducible by arsenite, the induction of both regulatory genes (*arsR1* and *arsR2*) being weaker than the rest of the *ars* genes.

**Promoter region analysis.** Taking into account the above results and the higher expression of the *ars1* operon (Fig. 3), we checked for the presence of DNA fragments with promoter activity upstream from *arsB1* or *arsC1* with a view to finding new regulated promoters for use in corynebacterial expression systems.

Plasmids pJMF-EP and pJMF-ER (containing the upstream regions of *arsB1* and *arsC1*, respectively) were transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$ , and transformants were able to grow in Luria-Bertani broth containing 200 and 100  $\mu$ g/ml of kanamycin, respectively. This indicated that both DNA fragments (ParsB1 and ParsC1) have promoter activity in *E. coli*, the permease promoter being stronger than that of reductase. Both promoter regions also showed promoter activity in *C. glutamicum* when plasmids pGFP-EP and pGFP-ER (Table 1) were present. Promoter activity in *C. glutamicum* was quantified by the level of green fluorescent protein, and as in *E. coli*, ParsB1 was stronger than ParsC1; the expression of ParsB1 was clearly induced in the presence of 0.01 to 5 mM arsenite/arsenate (Fig. 5), but no induction was observed in the case of ParsC1. Because in many microorganisms, the *ars* operon is

TABLE 4. Quantitative PCR of genes involved in arsenic resistance

Gene	$C_t^a$		Ratio [+As(III)/-As(III)] <sup>b</sup>
	- As(III)	+ As(III)	
<i>arsR1</i>	22.39	18.35	16
<i>arsB1</i>	26.70	21.35	121
<i>arsC1</i>	26.16	18.19	256
<i>arsC1'</i>	25.92	18.06	232
<i>arsR2</i>	23.12	19.07	17
<i>arsB2</i>	24.84	19.95	56
<i>arsC2</i>	23.12	16.33	111
<i>arsB3</i>	26.40	26.20	1.1
<i>arsC4</i>	24.28	23.68	1.5

<sup>a</sup>  $C_t$  is defined as the cycle at which fluorescence is determined to be statistically significant above background, being inversely proportional to the log of the initial copy number; this value was calculated automatically by the ABI Prism 7000 SDS software.

<sup>b</sup> +As(III)/-As(III) ratio indicates the relative number of specific mRNA molecules for each gene in the presence or absence of As(III). It was calculated assuming that at the threshold points, the number of amplified DNA molecules ( $N$ ) in the presence or absence of arsenite would be the same as and proportional to the initial number of RNA molecules ( $n$ ), as follows:  $N = n \times 2^{C_t}$ .

induced by antimonite and bismuth (5, 36, 47), we studied the possible effect of different elements or compounds such as bismuth, antimonite, phosphate, phosphite, nitrates, or nitrites on the induction of *ParsB1* and no induction was observed in any case.

Interestingly, 26 nucleotides upstream from the *arsB1* gene, a perfect inverted repeat (TGTCGATATT-N<sub>12</sub>-AATATCGACA) was found. Similarly, 56 nucleotides upstream from the *arsB2* gene, another inverted repeat with a unique mismatch (ATGTCCGTCA-N<sub>8</sub>-TGACGcACAT) was also found. No similar sequences were found upstream from any other *ars* genes by using the Palindrome program (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/palindrome.html>).

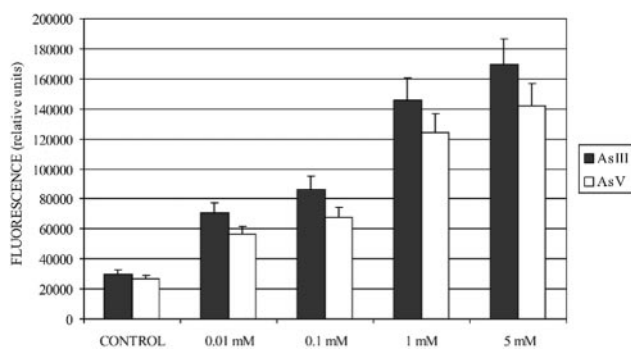


FIG. 5. The promoter of the *arsB1* gene is induced in the presence of arsenite or arsenate. *C. glutamicum* [pGFP-EP] was grown in the presence of subinhibitory concentrations of arsenite (black bar) or arsenate (empty bar). *C. glutamicum* [pEGNC] (Table 1) was used as a negative control, and its fluorescence level was subtracted from all the values obtained. In all cases, the fluorescence level of each sample was divided by the OD<sub>600</sub> of the sample. The values are the means of four determinations, and the standard deviation is indicated on the bar top. The fluorescence level ratio of green fluorescent protein/OD<sub>600</sub> was measured on a Biotek Sinergy HT fluorimeter.

## DISCUSSION

The *C. glutamicum* *ars* system confers resistance to arsenic up to 12 mM As(III) and 500 mM As(V), and hence, *C. glutamicum* is one of the most resistant microorganisms described to date. This could be due to the presence of two functional *ars* operons (*ars1* and *ars2*) and two accessory genes (*arsB3* and *arsC4*) described and analyzed here. The existence of two chromosomal *ars* operons involved in arsenic resistance and an additional arsenate reductase gene (*arsC3*) scattered throughout the chromosome has also been described in *P. putida* (Fig. 1B) (14), although the functionality of both operons was not studied.

An unusual characteristic of the *ars1* and *ars2* operons of *C. glutamicum* is the orientation of *arsR*; whereas in *C. glutamicum*, *arsR* (in both *ars* operons) was located upstream and in the opposite orientation from *arsBC*, in most of the analyzed bacteria, *arsR* was located in the same orientation as *arsBC* (Fig. 1B). Another exception is *A. ferrooxidans* and *Serratia marcescens*, where the chromosomal arsenic resistance operon contains two clusters (*arsCR-arsBH* for *A. ferrooxidans* and *arsBC-arsRH* for *S. marcescens*) which are transcribed in the opposite direction (12). The possible significance of this particular gene organization remains unknown, but a divergent expression could mean an independent or differential regulation to optimize the adaptation of the microorganism to nutritional or environmental changes (9). *ArsRs* from either *C. glutamicum*, actinomycetes, or *A. ferrooxidans* do not have a typical arsenite binding motif (CXCXXC) present in the *ArsR* proteins from the *E. coli* plasmid R773.

Another structural difference between operons *ars1* and *ars2* is the presence of an extra arsenate reductase gene (*arsC1'*) in operon *ars1*. It has been claimed that a single *arsC* was added to the original *ars* operon (*arsRB*) when molecular oxygen appeared in the atmosphere (46); subsequent horizontal gene transfer in the evolution of arsenate reductases and sequence divergence gave the distinct *arsC* classes that exist today (29). However, a convergent evolution of the two major *ArsC* branches cannot be discarded (40). Three families of arsenate reductases have been described previously (40), and those encoded by genes found in the *C. glutamicum* *ars1* and *ars2* operons (and also in *C. efficiens*, *R. erythropolis*, and *Streptomyces coelicolor* A3 [2]) belong to the group of *Bacillus* enzymes where arsenate reductases use thioredoxin and are similar to protein tyrosine phosphatases but form a separate subfamily (see Fig. S4 in the supplemental material). The arsenate reductase *ArsC4* from *C. glutamicum*, together with the *ArsC4* from *C. efficiens* and *ArsC* from *Corynebacterium diphtheriae*, seems to be more related to the R773 *ArsC* purified from *E. coli* which requires reduced glutathione (GSH) and the small thiol transfer protein glutaredoxin (Grx) for arsenate reductase activity (23). The presence of two functional *arsC* genes in the *ars1* operon from *C. glutamicum* is also intriguing, although three *arsC* genes are present in the unique *ars* operon of *C. efficiens* (accession number NC\_004369) and *R. erythropolis* (accession number NC\_005073) (Fig. 1B), all of them belonging to the mycolata group and being the most arsenite-resistant bacteria described to date (Table 2).

Genes encoding three hypothetical arsenite permeases were located in the genome of *C. glutamicum*, being the only case described up to date; permeases *ArsB1* and *ArsB2* are related

to each other, whereas ArsB3 is phylogenetically more distant, but all the permeases belong to the same clade (see Fig. S3 in the supplemental material). The presence of multiple permeases could circumvent the absence of the oxyanion ATPase (ArsA) described in the five-gene system (Fig. 1B). The *arsA* gene was not found in the genome sequence of *C. glutamicum*, and hence, the mechanism of arsenic resistance could be driven by the ArsB permease, as has been described for several other microorganisms. In some cases, heterologous cloning of the *arsA* gene from *E. coli* resulted in increased resistance to arsenite in *Staphylococcus aureus*, as previously described (8).

Insertional mutation of genes encoding the three arsenite permeases found in the genome of *C. glutamicum* clearly indicates that *arsB1* and *arsB2* are involved in resistance to arsenite but that insertional mutant *C. glutamicum* ArsB3 behaves like the wild type. Nevertheless, Q-PCR analysis clearly indicates that *arsB3* is expressed constitutively and that it is considered an accessory gene, like *arsC4*. The distinct level of transcription of both *ars1* and *ars2* operons, observed in RNA/DNA hybridization experiments, indicates that operon *ars1* is transcriptionally more active than *ars2*. This was also confirmed when operons *ars1* and *ars2* were introduced into *C. glutamicum* (Table 3).

Operons *ars1* (pECAS1) and *ars2* (pECAS2) were also used to transform *E. coli* strains, and the resulting transformed strains were slightly more resistant to arsenite than the untransformed strains DH5 $\alpha$  and W3110 (Table 3); operons *ars1* and *ars2* functionally replace the *ars* mutation of the supersensitive *E. coli* strain AW3110, which increases the resistance 30-fold (Table 3). These results confirmed the functionality of the *ars1* and *ars2* operons from *C. glutamicum* in *E. coli*.

The theoretical binding site for ArsR overlaps with the putative -10 and -35 promoter regions of the *arsB* genes, and both contain symmetric and nonidentical dyad sequences: TGTCGATATT-N<sub>12</sub>-AATATCGACA for *arsB1* and ATG TCCGTCAN<sub>8</sub>-TGACGcACAT for *arsB2*. Dyad sequences have been found in multiple regulatory sites involved in the binding of ArsR in *E. coli* (60) and *Synechocystis* (36). Induction of ParsB1 in the presence of As(III)/As(V) was demonstrated when plasmid pGFP-EP was used in the reporter system; however, antimonite [Sb(III)] was not able to induce pGFP-EP, although all ArsR repressors so far described do respond to Sb(III).

In conclusion, operons *ars1* and *ars2* are involved in arsenic resistance in *C. glutamicum*. Operon *ars1* seems to be the main arsenic detoxification system according to different lines of experimental evidence: (i) *C. glutamicum* ArsB1 is less resistant to arsenite than mutant *C. glutamicum* ArsB2; (ii) RNA/DNA hybridization experiments reveal a higher expression of *ars1* than *ars2*; (iii) the arsenic-supersensitive mutant *C. glutamicum* ArsB1-B2 transformed with the whole *ars1* operon becomes resistant to 60 mM arsenite at five times the level of resistance of the wild-type strain; and (iv) *C. glutamicum* ArsB1-B2 transformed with operon *ars2* becomes resistant to 15 mM arsenite at 1.25 times the level of resistance of *C. glutamicum*.

#### ACKNOWLEDGMENTS

E. Ordóñez, M. Letek, and N. Valbuena were the recipients of fellowships from the Junta de Castilla y León (E.O.) and Ministerio de Educación y Ciencia (M.L. and N.V.). This work was supported by

grants from the Junta de Castilla y León (LE 24/01 and LE 14/04) and the Ministerio de Ciencia y Tecnología (BIO 2002-03223).

Thanks are due to Barry Rosen (Detroit, Mich.) for providing *E. coli* strains W3110 and AW3110 and to N. Skinner for correcting the English version of the manuscript.

#### REFERENCES

1. Abdrashitova, S. A., G. G. Abdullina, and A. N. Ilaletdinov. 1986. Role of arsenites in lipid peroxidation in *Pseudomonas putida* cells oxidizing arsenite. *Mikrobiologiya* 55:212-216.
2. Adham, S. A., S. Rodriguez, A. Ramos, R. I. Santamaria, and J. A. Gil. 2003. Improved vectors for transcriptional/translational signal screening in corynebacteria using the *melC* operon from *Streptomyces glaucescens* as reporter. *Arch. Microbiol.* 180:53-59.
3. Bachmann, B. J. 1972. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol. Rev.* 36:525-557.
4. Bennett, M. S., Z. Guan, M. Laurberg, and X. D. Su. 2001. *Bacillus subtilis* arsenate reductase is structurally and functionally similar to low molecular weight protein tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:13577-13582.
5. Bhattacharjee, H., J. Li, M. Y. Ksenzenko, and B. P. Rosen. 1995. Role of cysteinyl residues in metalloactivation of the oxyanion-translocating ArsA ATPase. *J. Biol. Chem.* 270:11245-11250.
6. Bierman, M., R. Logan, K. O'Brien, E. T. Seno, R. N. Rao, and B. E. Schonher. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* 116:43-49.
7. Bobrowicz, P., R. Wysocki, G. Owsianik, A. Goffeau, and S. Ulaszewski. 1997. Isolation of three contiguous genes, ACR1, ACR2 and ACR3, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13:819-828.
8. Broer, S., G. Ji, A. Broer, and S. Silver. 1993. Arsenic efflux governed by the arsenic resistance determinant of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J. Bacteriol.* 175:3480-3485.
9. Browning, D. F., C. M. Beatty, A. J. Wolfe, J. A. Cole, and S. J. Busby. 2002. Independent regulation of the divergent *Escherichia coli* *nrfA* and *acsPI* promoters by a nucleoprotein assembly at a shared regulatory region. *Mol. Microbiol.* 43:687-701.
10. Bruhn, D. F., J. Li, S. Silver, F. Roberto, and B. P. Rosen. 1996. The arsenical resistance operon of IncN plasmid R46. *FEMS Microbiol. Lett.* 139:149-153.
11. Butcher, B. G., S. M. Deane, and D. E. Rawlings. 2000. The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an unusual arrangement and confer increased arsenic and antimony resistance to *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1826-1833.
12. Butcher, B. G., and D. E. Rawlings. 2002. The divergent chromosomal *ars* operon of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is regulated by an atypical ArsR protein. *Microbiology* 148:3983-3992.
13. Cai, J., K. Salmon, and M. S. DuBow. 1998. A chromosomal *ars* operon homologue of *Pseudomonas aeruginosa* confers increased resistance to arsenic and antimony in *Escherichia coli*. *Microbiology* 144:2705-2713.
14. Canovas, D., I. Cases, and V. de Lorenzo. 2003. Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. *Environ. Microbiol.* 5:1242-1256.
15. Carlin, A., W. Shi, S. Dey, and B. P. Rosen. 1995. The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *J. Bacteriol.* 177:981-986.
16. Cervantes, C., G. Ji, J. L. Ramirez, and S. Silver. 1994. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 15:355-367.
17. Chen, C. M., T. K. Misra, S. Silver, and B. P. Rosen. 1986. Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump. The plasmid-encoded arsenical resistance operon. *J. Biol. Chem.* 261:15030-15038.
18. Diorio, C., J. Cai, J. Marmor, R. Shinder, and M. S. DuBow. 1995. An *Escherichia coli* chromosomal *ars* operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 177:2050-2056.
19. Durand, P., L. Canard, and J. P. Mornon. 1997. Visual BLAST and visual FASTA: graphic workbenches for interactive analysis of full BLAST and FASTA outputs under MICROSOFT WINDOWS 95/NT. *Comput. Appl. Biosci.* 13:407-413.
20. Ehrlich, H. L. 2002. Bacterial oxidation of As(III) compounds, p. 313-329. In W. T. Frankenberger, Jr. (ed.), *Environmental chemistry of arsenic*. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
21. Endo, G., and S. Silver. 1995. CadC, the transcriptional regulatory protein of the cadmium resistance system of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J. Bacteriol.* 177:4437-4441.
22. Franklin, F. C., M. Bagdasarian, M. M. Bagdasarian, and K. N. Timmis. 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7458-7462.
23. Gladysheva, T. B., K. L. Oden, and B. P. Rosen. 1994. Properties of the arsenate reductase of plasmid R773. *Biochemistry* 33:7288-7293.

24. Gotz, F., J. Zabielski, L. Philipson, and M. Lindberg. 1983. DNA homology between the arsenate resistance plasmid pSX267 from *Staphylococcus xylosum* and the penicillinase plasmid pI258 from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **9**:126–137.
25. Gourdon, P., and N. D. Lindley. 1999. Metabolic analysis of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* **1**:224–231.
26. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557–580.
27. Hingston, J. A., C. D. Collins, R. J. Murphy, and J. N. Lester. 2001. Leaching of chromated copper arsenate wood preservatives: a review. *Environ. Pollut.* **111**:53–66.
28. Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23–28.
29. Jackson, C. R., and S. L. Dugas. 2003. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal *arsC* gene sequences suggests an ancient, common origin for arsenate reductase. *BMC. Evol. Biol.* **3**:18.
30. Jager, W., A. Schafer, A. Puhler, G. Labes, and W. Wohlleben. 1992. Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **174**:5462–5465.
31. Ji, G., and S. Silver. 1992. Regulation and expression of the arsenic resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J. Bacteriol.* **174**:3684–3694.
32. Kalinowski, J., B. Bathe, D. Bartels, N. Bischoff, M. Bott, A. Burkovski, N. Dusch, L. Eggeling, B. J. Eikmanns, L. Gaigalat, A. Goesmann, M. Hartmann, K. Huthmacher, R. Kramer, B. Linke, A. C. McHardy, F. Meyer, B. Mockel, W. Pfeifferle, A. Puhler, D. A. Rey, C. Ruckert, O. Rupp, H. Sahl, V. F. Wendisch, I. Wiegand, and A. Tauch. 2003. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* **104**:5–25.
33. Kaneko, H., and K. Sakaguchi. 1979. Fusion of protoplasts and genetic recombination of *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **43**:1007–1013.
34. Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, B. F. Chen, and D. A. Hopwood. 2000. *Practical Streptomyces genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, Conn.
35. Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen, and M. Nei. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**:1244–1245.
36. Lopez-Maury, L., F. J. Florencio, and J. C. Reyes. 2003. Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **185**:5363–5371.
37. Maciaszczyk, E., R. Wysocki, P. Golik, J. Lazowska, and S. Ulaszewski. 2004. Arsenical resistance genes in *Saccharomyces douglasii* and other yeast species undergo rapid evolution involving genomic rearrangements and duplications. *FEMS Yeast Res.* **4**:821–832.
38. Martin, J. F., R. I. Santamaria, H. Sandoval, G. del Real, L. M. Mateos, J. A. Gil, and A. Aguilar. 1987. Cloning systems in amino acid-producing corynebacteria. *Bio/Technology* **5**:137–146.
39. Mateos, L. M., A. Schafer, J. Kalinowski, J. F. Martin, and A. Puhler. 1996. Integration of narrow-host-range vectors from *Escherichia coli* into the genomes of amino acid-producing corynebacteria after intergeneric conjugation. *J. Bacteriol.* **178**:5768–5775.
40. Mukhopadhyay, R., and B. P. Rosen. 2002. Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environ. Health Perspect.* **110**(Suppl. 5):745–748.
41. Mukhopadhyay, R., B. P. Rosen, I. T. Phung, and S. Silver. 2002. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**:311–325.
42. Nakayama, K., K. Araki, and H. Kase. 1978. Microbial production of essential amino acid with *Corynebacterium glutamicum* mutants. *Adv. Exp. Med. Biol.* **105**:649–661.
43. Ochi, K. 1995. Phylogenetic analysis of mycolic acid-containing wall-chemotype IV actinomycetes and allied taxa by partial sequencing of ribosomal protein AT-L30. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:653–660.
44. Ohnishi, J., S. Mitsuhashi, M. Hayashi, S. Ando, H. Yokoi, K. Ochiai, and M. Ikeda. 2002. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**:217–223.
45. Ramos, A., M. P. Honrubia, D. Vega, J. A. Ayala, A. Bouhss, D. Mengin-Lecreux, and J. A. Gil. 2004. Characterization and chromosomal organization of the *murD-murC-ftsQ* region of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869. *Res. Microbiol.* **155**:174–184.
46. Rosen, B. P. 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.* **529**:86–92.
47. Rosen, B. P., H. Bhattacharjee, and W. Shi. 1995. Mechanisms of metal-oregulation of an anion-translocating ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**:85–91.
48. Rosenstein, R., K. Nikoleit, and F. Gotz. 1994. Binding of ArsR, the repressor of the *Staphylococcus xylosum* (pSX267) arsenic resistance operon to a sequence with dyad symmetry within the *ars* promoter. *Mol. Gen. Genet.* **242**:566–572.
49. Ryan, D., and E. Collieran. 2002. Arsenical resistance in the IncH2 plasmids. *Plasmid* **47**:234–240.
50. Santamaria, R. I., J. A. Gil, J. M. Mesas, and J. F. Martin. 1984. Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. *J. Gen. Microbiol.* **130**:2237–2246.
51. Santini, J. M., and R. N. vanden Hoven. 2004. Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. *J. Bacteriol.* **186**:1614–1619.
52. Sato, T., and Y. Kobayashi. 1998. The *ars* operon in the skin element of *Bacillus subtilis* confers resistance to arsenate and arsenite. *J. Bacteriol.* **180**:1655–1661.
53. Schafer, A., J. Kalinowski, R. Simon, A. H. Seep-Feldhaus, and A. Puhler. 1990. High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* **172**:1663–1666.
54. Schafer, A., A. Tauch, W. Jager, J. Kalinowski, G. Thierbach, and A. Puhler. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**:69–73.
55. Silver, S., and L. T. Phung. 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:753–789.
56. Snapper, S. B., R. E. Melton, S. Mustafa, T. Kieser, and W. R. Jacobs, Jr. 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* **4**:1911–1919.
57. Suzuki, K., N. Wakao, T. Kimura, K. Sakka, and K. Ohmiya. 1998. Expression and regulation of the arsenic resistance operon of *Acidiphilium multivorum* AIU 301 plasmid pKW301 in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:411–418.
58. Tauch, A., A. Puhler, J. Kalinowski, and G. Thierbach. 2003. Plasmids in *Corynebacterium glutamicum* and their molecular classification by comparative genomics. *J. Biotechnol.* **104**:27–40.
59. Wehmeier, L., O. Brockmann-Gretza, A. Pisabarro, A. Tauch, A. Puhler, J. F. Martin, and J. Kalinowski. 2001. A *Corynebacterium glutamicum* mutant with a defined deletion within the *rplK* gene is impaired in (p)ppGpp accumulation upon amino acid starvation. *Microbiology* **147**:691–700.
60. Wu, J., and B. P. Rosen. 1993. Metalloregulated expression of the *ars* operon. *J. Biol. Chem.* **268**:52–58.
61. Wysocki, R., P. Bobrowicz, and S. Ulaszewski. 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *J. Biol. Chem.* **272**:30061–30066.
62. Zegers, I., J. C. Martins, R. Willem, L. Wyns, and J. Messens. 2001. Arsenate reductase from *S. aureus* plasmid pI258 is a phosphatase drafted for redox duty. *Nat. Struct. Biol.* **8**:843–847.

# Evolution of Metal(loid) Binding Sites in Transcriptional Regulators\*<sup>[S]</sup>

Received for publication, April 28, 2008, and in revised form, June 12, 2008. Published, JBC Papers in Press, June 30, 2008, DOI 10.1074/jbc.M803209200

Efrén Ordóñez<sup>†1</sup>, Saravanamuthu Thiyagarajan<sup>§1</sup>, Jeremy D. Cook<sup>§</sup>, Timothy L. Stemmler<sup>§</sup>, José A. Gil<sup>‡</sup>,  
Luís M. Mateos<sup>‡</sup>, and Barry P. Rosen<sup>§2</sup>

From the <sup>‡</sup>Departamento de Biología Molecular, Área de Microbiología, Facultad de Biología-Ambientales, Universidad de León, 24071 León, Spain and the <sup>§</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Wayne State University, School of Medicine, Detroit, Michigan 48201

Expression of the genes for resistance to heavy metals and metalloids is transcriptionally regulated by the toxic ions themselves. Members of the ArsR/SmtB family of small metalloregulatory proteins respond to transition metals, heavy metals, and metalloids, including As(III), Sb(III), Cd(II), Pb(II), Zn(II), Co(II), and Ni(II). These homodimeric repressors bind to DNA in the absence of inducing metal(loid) ion and dissociate from the DNA when inducer is bound. The regulatory sites are often three- or four-coordinate metal binding sites composed of cysteine thiolates. Surprisingly, in two different As(III)-responsive regulators, the metalloid binding sites were in different locations in the repressor, and the Cd(II) binding sites were in two different locations in two Cd(II)-responsive regulators. We hypothesize that ArsR/SmtB repressors have a common backbone structure, that of a winged helix DNA-binding protein, but have considerable plasticity in the location of inducer binding sites. Here we show that an As(III)-responsive member of the family, CgArsR1 from *Corynebacterium glutamicum*, binds As(III) to a cysteine triad composed of Cys<sup>15</sup>, Cys<sup>16</sup>, and Cys<sup>55</sup>. This binding site is clearly unrelated to the binding sites of other characterized ArsR/SmtB family members. This is consistent with our hypothesis that metal(loid) binding sites in DNA binding proteins evolve convergently in response to persistent environmental pressures.

Arsenic, a toxic metalloid, is currently and has always been ranked first on the Superfund List of Hazardous Substances (available on the World Wide Web), in part because of its environmental ubiquity. As a consequence, nearly all organisms

have genes that confer resistance to arsenic. Environmental arsenic is sensed by members of the ArsR/SmtB family of metalloregulatory proteins (1–3). These winged helix repressor proteins specifically bind to arsenic and other toxic metals. Consequently, they control expression of genes involved in arsenic biotransformation and efflux. For example, the ArsR repressor encoded by *Escherichia coli* plasmid R773 binds to the promoter region of its respective *ars* operon in the absence of As(III) or Sb(III) (4). This homodimeric repressor has the sequence Cys<sup>32</sup>-Val-Cys<sup>34</sup>-Asp-Leu-Cys<sup>37</sup> in the DNA binding domain of each monomer (5, 6). The three sulfur thiolates of the cysteine residues form a very specific three-coordinate binding site for the trivalent metalloids As(III) and Sb(III). Binding of metalloids to R773 ArsR is presumed to induce a conformational change, leading to dissociation from the DNA and hence derepression. The *Staphylococcus aureus* CadC is a Cd(II)/Pb(II)/Zn(II)-responsive member of the ArsR/SmtB family that has four cysteine residues in the inducer binding domain (7). Of these four cysteine residues, two come from one subunit, whereas the other two come from the other subunit of the homodimer (8, 9). The position of this metal binding site in CadC is congruent to that of the R773 ArsR but is formed between two monomers. CadC also has a second type of metal binding site (DXHX<sub>10</sub>HX<sub>2</sub>E) for Zn(II) at the dimer interface that is not a regulatory site. This site, however, is identical to the regulatory Zn(II) site of SmtB from *Synechococcus* PCC 7942 (10). Another member of the ArsR/SmtB family is the ArsR from *Acidithiobacillus ferrooxidans* (AfArsR),<sup>3</sup> which has three cysteine residues (Cys<sup>95</sup>, Cys<sup>96</sup>, and Cys<sup>102</sup>) at the dimer interface rather than in or near the DNA binding domain (11). These three cysteine residues form a three-coordinate or S<sub>3</sub> binding site for trivalent metalloids (12). Although both the As(III) binding site of AfArsR and the Zn(II) binding site of SmtB are at the C-terminal dimerization domain, the former is formed of three cysteine residues within a single subunit (two sites per dimer), whereas the latter is formed by four residues, two residues from one monomer and two from the other. Thus, metal(loid) binding sites appear to arise by convergent evolution, even in homologous proteins.

\* This work was supported, in whole or in part, by National Institutes of Health Grants R01 AI043428 (to B. P. R.), R01 DK068139 (to T. L. S.), and LE040A07, BIO2005-02723, and BIO2008-00519 (to J. A. G. and L. M. M.). The Stanford Synchrotron Radiation Laboratory Structural Molecular Biology Program is supported by the Department of Energy, Office of Biological and Environmental Research, and by the National Institutes of Health, National Center for Research Resources, Biomedical Technology Program. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>[S]</sup> The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental "Materials and Methods."

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed: Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Wayne State University, School of Medicine, Detroit, MI 48201. Tel.: 313-577-1512; Fax: 313-577-2765; E-mail: brosen@med.wayne.edu.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: AfArsR, ArsR from *A. ferrooxidans*; CgArsR, ArsR from *C. glutamicum*; XAS, x-ray absorption spectroscopy; EXAFS, extended x-ray absorption fine structure; bBBR, dibromobimane; o/p, operator/promoter; MOPS, 4-morpholinepropanesulfonic acid.

In the present study, we focused on two CgArsRs, which regulate expression of the *ars* operons of *Corynebacterium glutamicum*, and their arsenic binding properties. *C. glutamicum* is a Gram-positive nonpathogenic rod-shaped soil bacterium with high intrinsic resistance to arsenic. Analysis of the arsenic resistance mechanisms in *C. glutamicum* revealed the presence of two inducible *ars* operons (*ars1* and *ars2*) that are located distant from each other in the chromosome (13). Expression of both operons is induced by arsenite. Their repressors, CgArsR1 and CgArsR2, which are 66% identical, both have three cysteine residues, two N-terminal residues (Cys<sup>15</sup> and Cys<sup>16</sup>) that have no counterpart in any of the other characterized members of the ArsR/SmtB family and a third cysteine residue (Cys<sup>55</sup>) that is near but not within the putative DNA binding domain of the regulatory proteins. The positions of these cysteine residues in the two CgArsRs resemble those of CadC but appear to have arisen independently. Homology modeling of CgArsR1 suggests two As(III) binding sites, each of which is formed by Cys<sup>15</sup> and Cys<sup>16</sup> from one subunit and Cys<sup>55</sup> from the other subunit. The results of *in vivo* and *in vitro* studies support this hypothesis. Thus, CgArsR1 provides a fresh instance of convergent and parallel evolution of metal(loid) binding sites built on the framework of a common DNA-binding protein.

## MATERIALS AND METHODS

**Strains, Media, and Reagents**—*Escherichia coli* cells were grown in LB medium at 37 °C. *C. glutamicum* was grown in Tryptone soya broth (or Tryptone soya broth with 2% agar added) at 30 °C (14). Media were supplemented with 100 µg/ml ampicillin, 25 µg/ml kanamycin, 12.5 µg/ml tetracycline, or 25 µg/ml chloramphenicol (8 µg/ml for *C. glutamicum*), as required. *E. coli* strain Top 10 (Invitrogen) was used for plasmid construction and mutagenesis, strain BL21(DE3) (Novagen, Madison, WI), was used for protein expression analysis and strain S17-1 (13) as the donor in conjugation assays. Bacterial growth was monitored as  $A_{600\text{ nm}}$ . All reagents were obtained from commercial sources.

**Construction of Strains and Plasmids and Mutagenesis**—For CgArsR1 and CgArsR2 expression in *E. coli*, plasmids pETArsR1 and pETArsR2 were constructed; in both plasmids, the *arsR* genes were under control of the T7 promoter and fused to a C-terminal His tag. Cysteine mutants were constructed with these plasmids.

For *in vivo* reporter gene expression, a *C. glutamicum* host strain lacking the two chromosomal *ars* operons, including *arsR1* and *arsR2*, was constructed. This strain, termed 2Δ*ars*, was made for incorporation of wild type *arsR1* and seven mutants in single copy at the original position on the chromosome based on the use of the mobilizable plasmid pK18mob (15). A bifunctional plasmid containing the original regulatory region from the main operator/promoter site of the *ars1* operon (o/p) fused in the *arsB* direction to the *egfp2* reporter gene were used for further *in vivo* analysis. The methods for strain and plasmid construction and for construction of mutants are given in the supplemental materials.

**Purification of Wild Type and Mutant CgArsRs**—*E. coli* BL21(DE3) bearing pETarsR1, pETarsR2, or the seven *arsR1* mutants were cultured and induced with 0.3 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside. Cells were harvested, washed once with a buffer consisting of 50 mM MOPS-KOH, pH 7.5, containing 20% (v/v) glycerol, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, and 10 mM 2-mercaptoethanol (buffer A) and suspended in 10 ml of buffer A/g of cells. The cells were lysed with a French press at 20,000 p.s.i. with the addition of diisopropyl fluorophosphate (2.5 µl/g) and further centrifugation (150,000 × *g* for 1 h). The supernatant was loaded onto a Ni(II)-nitrilotriacetic acid column pre-equilibrated with buffer A at a flow rate of 0.5 ml/min. The column was washed with 150 ml of buffer A, followed by elution with 60 ml of buffer A containing 0.2 M imidazole. The eluted protein was concentrated with a 10 kDa cut-off Amicon Ultra-centrifugal filter (Millipore Corp., Billerica, MA) and further purified by gel filtration using Superdex 75 (Amersham Biosciences) in a 45 × 1.5-cm column with a total bed volume of 80 ml. The protein was eluted with a buffer consisting of 50 mM MOPS-KOH, pH 7.5, 0.5 M NaCl, 20% (v/v) glycerol, 0.2 mM EDTA, and 2 mM dithiothreitol at a flow rate of 0.3 ml/min. CgArsR1 was identified by SDS-PAGE (16). Fractions containing wild type and mutant proteins were concentrated by ultra-filtration centrifugation. Protein concentrations were estimated by the method of Bradford (17) or by determining the  $A_{280\text{ nm}}$  using a calculated extinction coefficient of 1615 cm<sup>-1</sup> (18).

**Cross-linking Assays**—Dibromobimane (bBBr) (Invitrogen) cross-linking was performed as described (8). CgArsR1 was reduced in the presence of 2 mM tris(2-carboxyethyl) phosphine on ice for 30 min. Reductants were removed by dialysis prior to the assay. Purified CgArsR1 (30 µM, except for C15S, which was 100 µM) was incubated with a 3–10-fold molar excess of bBBr. Samples were analyzed by SDS-PAGE using 16% gels. The gels were visualized under UV<sub>365 nm</sub> light and then stained with Coomassie Blue.

**X-ray Absorption Spectroscopy (XAS)**—Purified wild type and mutant CgArsR1 at 4 mM concentration were incubated on ice for 90 min with 2–3 mM sodium arsenite in a buffer consisting of 50 mM MOPS-KOH, pH 7.5, and 0.5 M NaCl. Glycerol, 30% (v/v) final concentration, was added, and arsenic-loaded protein was injected into Lucite cells covered with Kapton tape. Sample cells were flash-frozen in liquid nitrogen. XAS data were collected at the Stanford Synchrotron Radiation Laboratory on beamline 9-3 in a manner previously described (12). Data reduction and analysis was performed using the EXAFSPAK software suite (available on the World Wide Web). Prior to data reduction and averaging, each fluorescence channel of each scan was examined for spectral anomalies. Published XAS spectra represent the average of five scans. Data reduction involved fitting the pre-edge spectral region with a second order polynomial and the EXAFS region with a cubic spline constructed of three regions. Following spline subtraction, EXAFS data were converted into *k* space using an  $E_0$  at 11,885 eV. The  $k^3$  weighted EXAFS was truncated at 13.0 Å<sup>-1</sup> (due to monochromator glitches at higher *k*), Fourier-transformed, and simulated. The final published fitting results are from analysis of the raw unfiltered data. Data were fit using single scat-



## A Novel Arsenic Binding Site in the *C. glutamicum* ArsR Repressor

tering amplitude and phase functions generated using the Feff 7.2 for theoretical model generation (19). Single scattering Feff models were calculated for oxygen, sulfur, and arsenic coordination to simulate arsenic-nearest neighbor ligand scattering. Values for the scale factor ( $S_c$ ) and  $E_0$ , obtained previously from fitting crystallographically characterized arsenic models compounds, were equal to 0.98 and  $-10$ , respectively (20). During the fitting analysis, the scale factor and  $E_0$  were fixed. The coordination number was fixed but manually varied at half-integer values. Values for the bond length and Debye-Waller factor were allowed to vary freely. The lowest mean square deviation between data and fit, corrected for the number of degrees of freedom ( $F'$ ), was used to judge best fit EXAFS simulations and to justify the addition of supplemental interactions within the simulation.

**DNA Footprinting**—DNA footprinting was performed as described (12). Complementary DNA primers in which one was labeled at the 5'-end with WellRED D3 fluorescence dye (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA), as indicated, were used to amplify the *C. glutamicum* *arsI* o/p region. Two pairs of primers were used, one for determining the *arsRB* direction, and the other for the *arsBR* direction. After optimization, a high molar excess of CgArsR1 was added at room temperature for 30 min. As a negative control, 5  $\mu\text{M}$  bovine serum albumin was used in place of CgArsR. The samples were loaded into 96-well plates and assayed with a CEQ 2000XL DNA sequencer (Beckman Coulter, Fullerton, CA). The data were analyzed with CEQ 2000 fragment analysis software.

**DNA Mobility Shift Assays**—DNA mobility shift assays were performed as described (21). Two probes corresponding to the *arsR-arsB* intergenic region from operon *arsI* (igR1B1) and *ars2* (igR2B2) were PCR-amplified from *C. glutamicum* ATCC13032 chromosomal DNA.

**DNA Binding by Fluorescence Anisotropy**—DNA binding studies by fluorescence anisotropy were performed as described (12) using a Photon Technology International spectrofluorimeter fitted with polarizers in the L format. Complementary 30-mer oligonucleotides, one of which was labeled at the 5'-end with carboxyfluorescein, were synthesized (Integrated DNA Technologies, Inc.) based on the DNA footprinting results. Wild type or mutant CgArsR1s were titrated with 0.4 ml of 30 nM fluorescein-labeled *arsI* o/p DNA. Changes in anisotropy were calculated after each addition using the supplied Felix32 software. To measure DNA dissociation of CgArsR1 upon binding to As(III)/Sb(III), 30 nM carboxyfluorescein-labeled DNA was saturated with 10  $\mu\text{M}$  wild type or mutant CgArsR1. CgArsR1 was treated with methyl methanethiosulfonate to modify the cysteine thiolates to  $-S-S-CH_3$ . Dissociation of CgArsR1 was induced by the addition of varying amounts of As(III) or Sb(III).

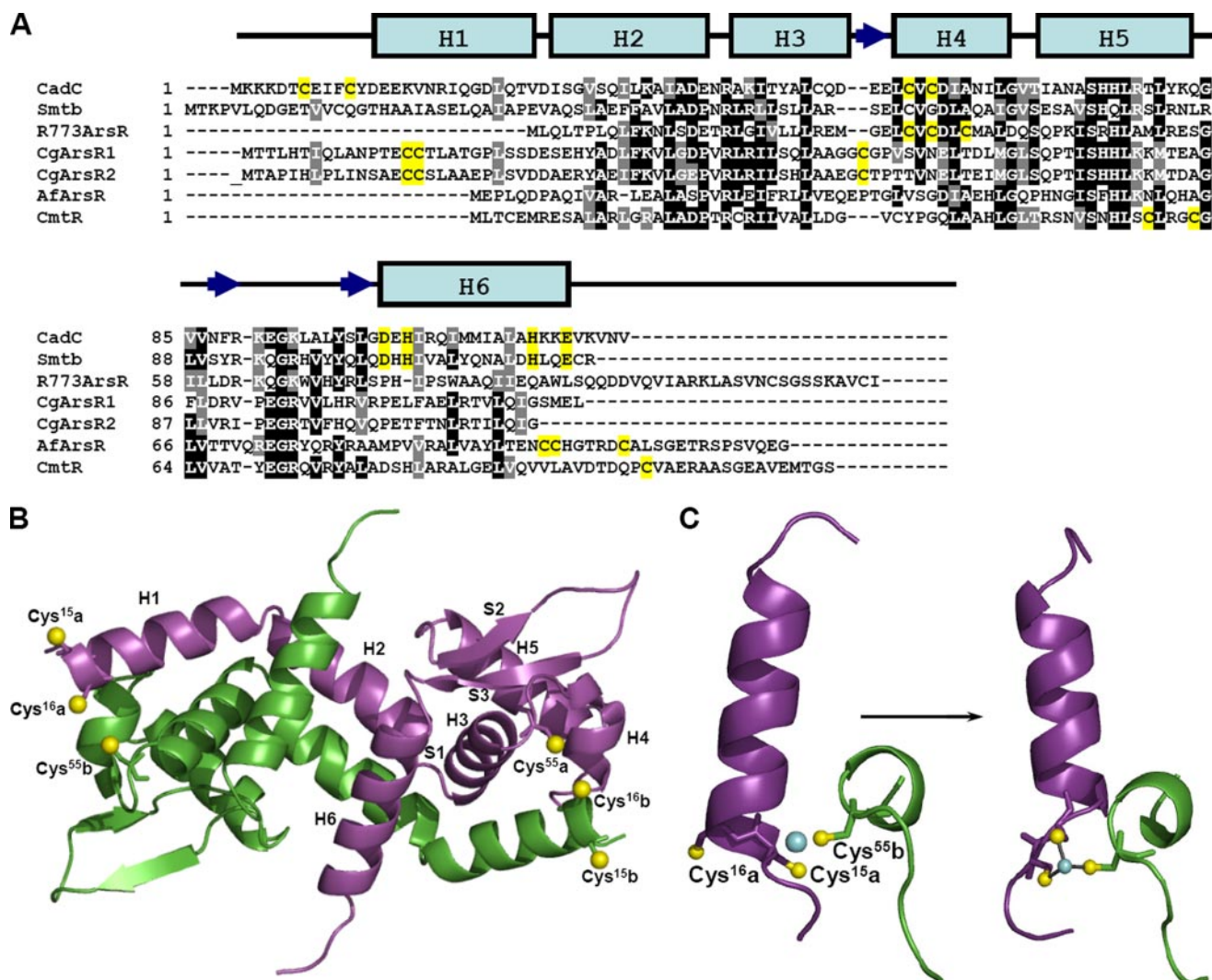
## RESULTS

**CgArsR1 and CgArsR2 Have Atypical Metalloid Binding Sites**—A structure-based multiple alignment of CgArsR1 and CgArsR2 with other ArsR homologues and CadC was performed using the structure of CadC (9) (Fig. 1A). CgArsR1 and CgArsR2 are 66% identical to each other and exhibit high similarity to other members of the ArsR/SmtB family. Notably,

both CgArsR1 and CgArsR2 lack the typical Cys<sup>32</sup>-Cys<sup>34</sup>-Cys<sup>37</sup> three-coordinate As(III) binding site of the well characterized R773 ArsR. They also lack the Cys<sup>95</sup>-Cys<sup>96</sup>-Cys<sup>105</sup> As(III) binding site of AfArsR (12). CadC binds Cd(II) in a four-coordinate binding site composed of four cysteine residues. CadC has a second, nonregulatory four-coordinate Zn(II) binding site composed of residues Asp<sup>101</sup> and His<sup>103</sup> from one monomer and His<sup>114</sup>' and Glu<sup>117</sup>' from the other monomer. The two CgArsRs lack the acidic and histidine residues of those sites as well. How do these ArsRs respond to environmental As(III), and where are the metalloid binding sites? Although they lack the binding sites identified in homologous metalloregulators, they have three cysteine residues, Cys<sup>15</sup>, Cys<sup>16</sup>, and Cys<sup>55</sup> that, from the alignment, do not correspond to metal(loid) ligands of homologues. From the structure-based alignment with CadC, a homology model of CgArsR1 was constructed (Fig. 1B). Like CadC, CgArsR1 has a putative helix-turn-helix DNA binding domain consisting of  $\alpha 4$  and  $\alpha 5$ . In CadC, the Cd(II) binding domain is composed of Cys<sup>58</sup> and Cys<sup>60</sup> in  $\alpha 4$  of one subunit and Cys<sup>7</sup> and Cys<sup>11</sup> from the N-terminal region of the other subunit. Although CgArsR1 has no corresponding cysteine residues, Cys<sup>55</sup> is proposed to be located just before  $\alpha 4$ , and Cys<sup>15</sup> and Cys<sup>16</sup> are in  $\alpha 1$ . Either Cys<sup>15</sup> or Cys<sup>16</sup> can be positioned close enough to Cys<sup>55</sup> to form a two-coordinate complex with As(III). Since the side chains of Cys<sup>15</sup> or Cys<sup>16</sup> would face in opposite directions, the  $\alpha 1$  helix would have to be unraveled from the N-terminal end to allow them to form a three-coordinate complex with Cys<sup>55</sup> (Fig. 1C). Our working hypothesis, therefore, is that these three cysteine residues form a three-coordinate As(III) binding site, where Cys<sup>15</sup> and Cys<sup>16</sup> come from one subunit and the Cys<sup>55</sup> comes from the other. The experiments below were designed to test that hypothesis.

**The As(III) Binding Site in CgArsR1 Is Composed of Three Sulfur Thiolates**—Binding of As(III) and the geometry of the binding site was analyzed by XAS. Near edge x-ray absorption fine structure analysis indicates that arsenic in purified wild type CgArsR1 is stably bound as As(III) (data not shown). The observed value for the first inflection point energy is 11,866 eV, consistent with the observed values for As(III) binding sites (20). Simulation analysis of the EXAFS data for CgArsR1 was best fit with a single nearest neighbor ligand environment constructed with only three sulfur atoms (Fig. 2, A and B). The average bond length of arsenic-sulfur was calculated to be 2.25 Å. Attempts to simulate these data with a mixed sulfur and oxygen nearest neighbor environment were unsuccessful. These results are consistent with an As(III) binding site composed of the sulfur thiolates of Cys<sup>15</sup>, Cys<sup>16</sup>, and Cys<sup>55</sup> (Fig. 2C).

**Contribution of CgArsR1 Cysteine Residues to Metalloregulation in Vivo**—To examine whether Cys<sup>15</sup>, Cys<sup>16</sup>, and Cys<sup>55</sup> are involved in As(III) sensing *in vivo*, the double *ars* operon-deleted  $2\Delta_{ars}$  was constructed. In an additional step, wild type and mutant copies of the *arsR1* gene were integrated into the chromosome of *C. glutamicum*  $2\Delta_{ars}$  at the same position of the original *arsI* operon, creating strains encoding wild type ArsR1 ( $2\Delta_{ars}wt$ ) and variants C15S, C16S, C55S, C15S/C16S, C15S/C55S, C16S/C55S, or C15S/C16S/C55S. These strains were used as host for the bifunctional mobilizable plasmid pECGFPars, which contains the original *arsI* o/p regulatory



**FIGURE 1. Multiple alignment of CgArsR homologues and homology modeling.** A, representative ArsR homologues (accession numbers in parentheses) are from plasmid pI258 CadC (P20047), *Synechocystis* sp. PCC 7942 SmtB (P30340), plasmid R773 ArsR (P15905), *C. glutamicum* CgArsR1 (YP\_225794) and CgArsR2 (NP\_599514), *A. ferrooxidans* AfArsR (AAF69241), and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv CmtR (NP\_216510). The structure-based multiple alignment was calculated using 3DCoffee (Pubmed ID 15201059). B, modeling of As(III)-free CgArsR was performed with SWISS-MODEL (Pubmed ID 12824332) (26), using the crystal structure of CadC (9) as template. The two monomers are colored in purple (subunit a) and green (subunit b), respectively. The cysteines are shown in ball-and-stick models. The DNA binding domain is  $\alpha$ 4-turn- $\alpha$ 5. The model was drawn using PyMOL (27). The side chain sulfur atoms of Cys<sup>15</sup>, Cys<sup>16</sup>, and Cys<sup>55</sup> are shown as yellow spheres. C, binding is proposed to occur in two steps: 1) As(III) (blue sphere) binds first to the thiolates of Cys<sup>55</sup> of one subunit and either Cys<sup>15</sup> or Cys<sup>16</sup> (shown here for only Cys<sup>15</sup>) in  $\alpha$ 1 of the other subunit, forming a low affinity S<sub>2</sub>O site, and 2) the end of  $\alpha$ 1 unravels to allow the adjacent cysteine residue to become the third ligand to As(III), forming a high affinity S<sub>2</sub> site. The model of the As(III)-bound form was built by manually adjusting the N termini so that the geometry of As(III) coordination derived from the EXAFS results.

region fused in the *arsB* direction to the reporter gene *egfp2* (a variant of *gfp*) that has been commonly used for expression analysis in corynebacteria.

Cells of *C. glutamicum* lacking the two *ars* operons had constitutive GFP expression (Fig. 3). Cells with wild type *arsR1* expressed *egfp2* at repressed levels in the absence of metalloids, and the addition of either As(III) or Sb(III) induced expression. As(III) induced well at 10  $\mu$ M. Sb(III) is not taken up very well by *C. glutamicum* and is therefore not as effective as an inducer as As(III). Even so, Sb(III) induced more at 30  $\mu$ M than at 10  $\mu$ M. All of the *C. glutamicum* strains containing the single (C15S, C16S, and C55S), double (C15S/C16S, C15S/C55S, and C16S/C55S), or triple (C15S/C16S/C55S) *arsR1* mutants repressed the *egfp2* expression, demonstrating that the mutant ArsR1s were capable of binding to the *arsI* o/p. In contrast, no induc-

tion was observed with any of the mutants, suggesting that they do not dissociate from the DNA in the presence of As(III) (Fig. 3A) or Sb(III) (Fig. 3B). These results are consistent with the hypothesis that each of the three cysteine residues contributes to the inducer binding site.

**DNA Binding Properties of CgArsR1 and CgArsR2 and Contribution of Cysteine Residues to Metalloregulation in Vitro**—To examine the DNA binding properties of CgArsRs and the contribution of cysteine residues to metalloids-induced dissociation from the DNA, protein-DNA interactions were analyzed in several ways. First, binding was examined by DNA mobility shift assays. In the two *C. glutamicum* *ars* operons, the gene organization is different from the R773 *arsRDABC* in that the corresponding *arsRs* genes are expressed divergently from the other *ars* genes. The ability of CgArsR1 and CgArsR2 to bind to their

## A Novel Arsenic Binding Site in the *C. glutamicum* ArsR Repressor

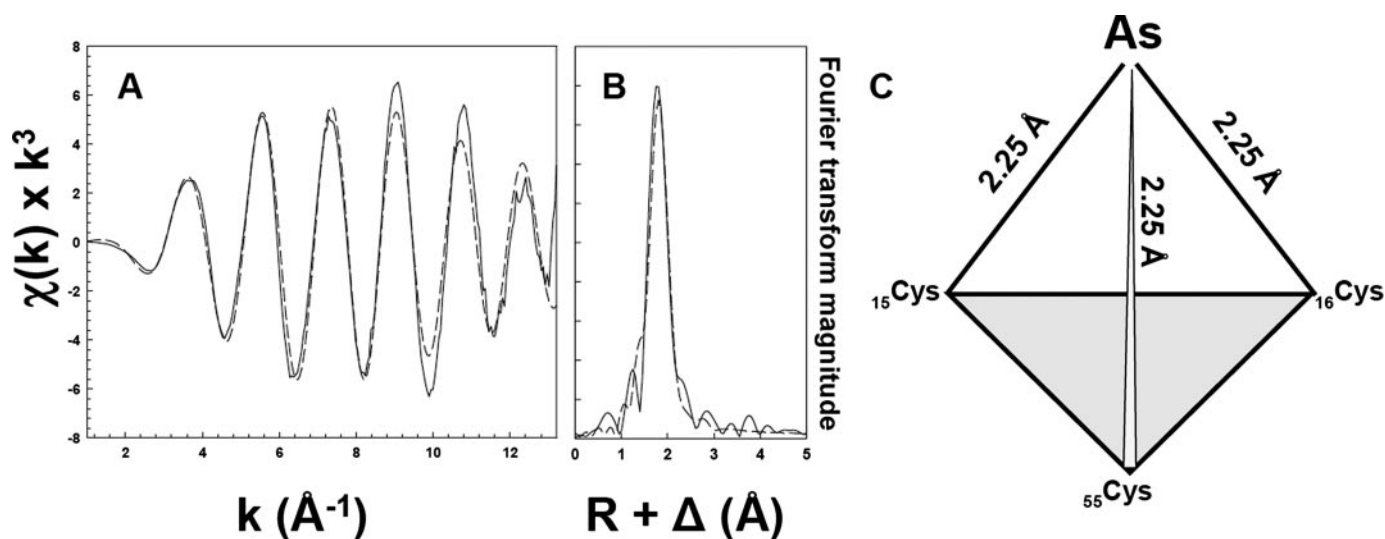


FIGURE 2. EXAFS and Fourier transforms of CgArsR1 XAS data. EXAFS spectra of CgArsR1 with bound As(III) (A) and the corresponding Fourier transform (B) are shown as dashed lines, with the simulations of EXAFS and FT data shown as solid lines. A schematic representation of the putative coordination environment in CgArsR1 is shown in C. Sample preparation was as described under "Materials and Methods."

own *ars* intergenic regulatory DNA (in *cis*) and also their ability to bind to the other *ars* intergenic DNA (in *trans*) were determined. In both cases, bands corresponding to the amplified intergenic regions from either *ars1* (igR1B1) (Fig. 4) or *ars2* (igR2B2) (data not shown), respectively, were retarded by either CgArsR1 or CgArsR2. These probes were 150 bp (igR1B1) and 180 bp (igR2B2) and contained a portion of the *arsR* gene as well as the sequence past  $-70$ . As shown below, this probe has two sequences that footprint with CgArsR1, but only the upstream sequence binds with low affinity and should not affect DNA mobility in this assay. Instead, the slight differences in mobility can be attributed to increasing concentrations of repressor. Either repressor bound to either promoter site, despite the fact that they have different palindromic sequences in their intergenic regions. Since both repressors appeared to have similar binding abilities, subsequent biochemical analysis was performed with only CgArsR1.

Second, to examine DNA binding properties in more detail, the sequence in the intergenic region between the *arsR1* and *arsB1* genes to which CgArsR1 binds was determined by DNase I footprinting (Fig. 5). CgArsR1 were observed to bind to two regions of 30 base pairs, from  $-7$  to  $-37$  bp and  $-47$  to  $-77$ , each numbered relative to the start of *arsB*.

DNA binding was further analyzed by fluorescence anisotropy (Fig. 6) Double-stranded oligonucleotides of 30 bp, each corresponding to the  $-7$  to  $-37$  and  $-47$  to  $-77$  sequences, were labeled with carboxyfluorescein for anisotropy measurements. The free probes tumble rapidly in solution and hence have relatively low optical anisotropy. Binding of CgArsR1 and hence the emitted light is partially polarized. Dissociation of the repressor from the DNA reverses the increase in polarization. CgArsR1 bound strongly to the  $-7$  to  $-37$  probe (Fig. 6A). Despite the footprinting results, CgArsR1 bound only weakly to the  $-47$  to  $-77$  probe. It is possible that binding of the repressor to the  $-7$  to  $-37$  region cooperatively increases binding to the  $-47$  to  $-77$  region. Wild type CgArsR1 bound to the  $-7$  to  $-37$  probe with an apparent affinity of  $0.15 \mu\text{M}$ . Each single,

double, and triple cysteine mutant bound to the  $-7$  to  $-37$  probe, although with reduced affinity ranging from  $0.5$  to  $2 \mu\text{M}$ . When the cysteine residues in wild type CgArsR1 were chemically modified with methyl methanethiosulfonate, the affinity of the modified repressor was similar to that of the cysteine mutants. These results demonstrate that none of the cysteine residues is required for binding to *ars1* o/p DNA.

The effect of binding of As(III) (Fig. 6B) or Sb(III) (Fig. 6C) on dissociation of the repressor from the *ars1* o/p DNA was assayed by fluorescent anisotropy. Wild type CgArsR1 exhibited half-maximal dissociation at  $0.15 \text{ mM}$  As(III). The concentration of Sb(III) required for half-maximal dissociation was  $\sim 10 \mu\text{M}$ . For unexplained reasons, the addition of reduced glutathione increased the apparent affinity for As(III) but not Sb(III). In contrast to the *in vivo* results (Fig. 3), Sb(III) was more effective *in vitro* than As(III). This may represent relatively poor uptake of Sb(III) *in vivo* compared with As(III). However, none of the single, double, or triple mutants dissociated from the DNA with concentration of As(III) or Sb(III) as high as  $1 \text{ mM}$ . These data indicate that each of the three cysteine residues is necessary for dissociation from the DNA and hence derepression.

*Cys<sup>15</sup> and Cys<sup>16</sup> from One Subunit Are in Proximity of Cys<sup>55</sup> in the Other Subunit*—In CadC, the Cd(II) binding site is composed of two cysteine residues from the N-terminal region of one subunit and two cysteine residues from  $\alpha 4$  of the DNA binding domain of the other subunit of the homodimer (9). In the homology model of CgArsR1 built on the CadC structure, the three-coordinate As(III) binding site is proposed to consist of Cys<sup>15</sup> and Cys<sup>16</sup> from one subunit and Cys<sup>55</sup> from the other (Fig. 1C). A testable prediction of that model is that the thiolates of either Cys<sup>15</sup> or Cys<sup>16</sup> should be close enough to the thiolate of Cys<sup>55</sup> to cross-link with a bifunctional thiol reagent, such as bBBBr, which forms a fluorescent adduct following reaction with two thiolates that are within  $3\text{--}6 \text{ \AA}$  of each other (22). If so, then the homodimer would not dissociate upon SDS-PAGE following bBBBr treatment. Purified wild type CgArsR1 migrated as a

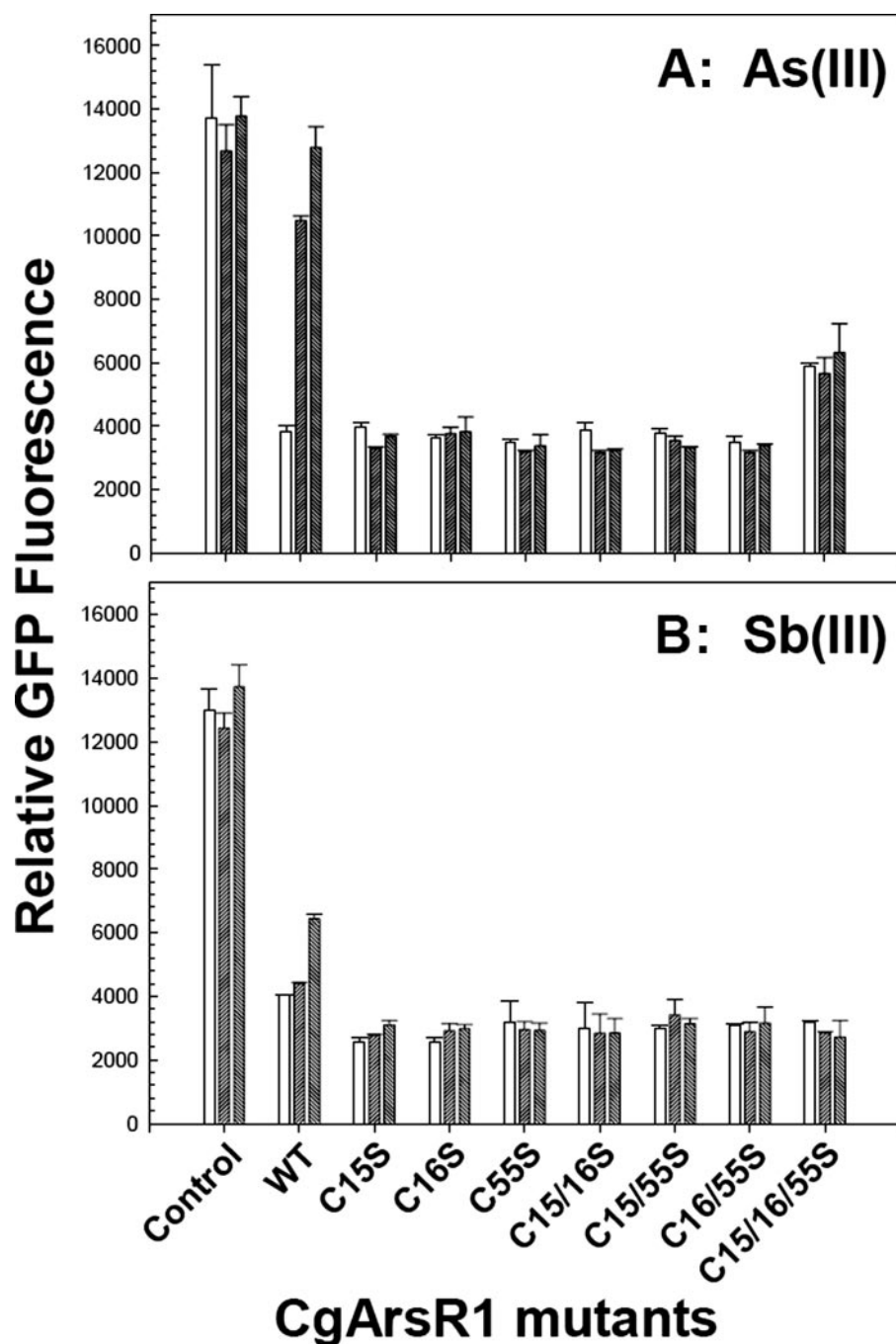


FIGURE 3. *In vivo* regulation of *egfp2(gfp)* expression from the *arsB* promoter using *CgArsR1* and the seven Cys mutants in the presence or absence of As(III) or Sb(III). Construction of *C. glutamicum*  $\Delta ars$ , further integration of *arsR1* derivatives, mobilization of the reporter gene (*gfp*), sample preparation, and fluorescence measurements were performed as described under "Materials and Methods." Strains *C. glutamicum*  $\Delta ars$  (Control),  $\Delta ars$  containing the *arsR1* integrated ( $\Delta ars_{wt}$ ; WT), and the single (C15S, C16S, and C55S), double (C15S/C16S, C15S/C55S, and C16S/C55S), or triple (C15S/C16S/C55S) *arsR1* mutant integrated were analyzed in the absence of arsenite (left bars) or the presence of 10  $\mu\text{M}$  (middle bars) or 30  $\mu\text{M}$  (right bars) As(III) (A) or in the absence (left bars) or presence of 10  $\mu\text{M}$  (middle bars) or 30  $\mu\text{M}$  (right bars) Sb(III) (B).

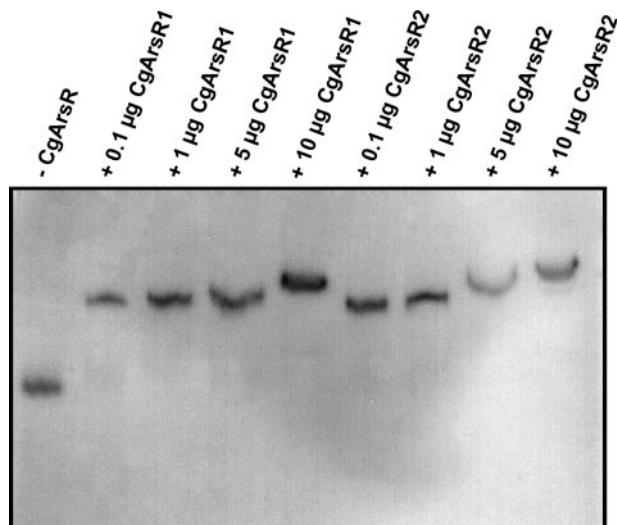
monomer on SDS-PAGE (Fig. 7A, lane 2). Following treatment with bBBR, a portion of the protein migrated as a fluorescent dimer (Fig. 7, A and B, lanes 1). The band corresponding to the monomer was also fluorescent, which could result from bimane adduct formation between Cys<sup>15</sup> and Cys<sup>16</sup> from the same monomer or from formation of bimane adducts between cys-

teine thiolates and solvent molecules. The single C15S and C16S mutants similarly formed fluorescent dimers (Fig. 7B, lanes 3 and 5). The triple C15S/C16S/C55S mutant did not dimerize or become fluorescent (data not shown). These results indicate that both Cys<sup>15</sup> and Cys<sup>16</sup> from one subunit are within 3–6 Å of the thiolate of Cys<sup>55</sup> in the other subunit (but not necessarily simultaneously, as suggested in Fig. 1C). These results are consistent with the hypothesis that the *CgArsR1* As(III) binding site is composed of two cysteine residues from one subunit and one cysteine residue from the other.

## DISCUSSION

The ArsR/SmtB family of metal-loreulatory proteins is large and diverse, with more than 3000 members identified in archaea, prokaryotic genomes, and plasmids. They respond to a number of transition metals, heavy metals, and metalloids (1–3). Only a few have been examined at the structural level (9, 23, 24), but a striking observation is that, although they all appear to have evolved from a common winged helix repressor, their metal(loid) binding appears to have evolved independently from each other and occurs in different spatial locations in their respective structures (3, 12, 25) (Fig. 8). These inducer binding sites can be located either near the DNA binding domain, such as found in R773 ArsR or CadC, or near the C-terminal dimer interface, as in SmtB, CmtR, or AfArsR. For softer metals and metalloids, such as As(III), Sb(III), and Cd(II), the binding sites are composed of three or four cysteine residues for As(III) or Cd(II). For harder metals, such as the Zn(II) binding site of SmtB and CadC, carboxylate oxygens and imidazole nitrogens form the sites. Moreover,

## A Novel Arsenic Binding Site in the *C. glutamicum* ArsR Repressor

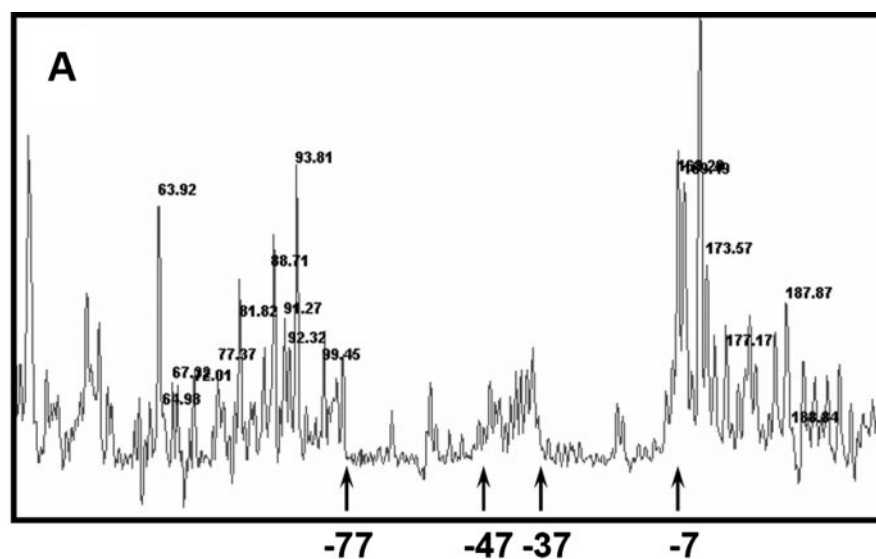


**FIGURE 4. Electrophoretic mobility shift assays of CgArsR-DNA binding.** The igR1B1 PCR-amplified band (150 bp) was assayed in the presence (+) or absence (-) of CgArsR1 or CgArsR2 at the indicated concentrations of protein. In each case, a retarded band was observed upon PAGE using a 10% nondenaturing gel when the repressor protein was present.

promoter DNA. Ends are preferred, because it would undoubtedly take more energy to break the helix if they were located in the middle.

However, that reasoning is based on only a small number of examples from the thousands of homologous sequences in data bases. For that reason, we characterized two other members of the ArsR/SmtB family encoded by the two *ars* operons of *C. glutamicum* (13). As(III) induces gene expression in cells of *C. glutamicum*, justifying their designations as As(III)-responsive repressors CgArsR1 and CgArsR2. It was clear from the structure-based alignment that they lack the As(III) binding sites of the other two known As(III)-responsive repressors from plasmid R773, which has an  $S_3$  site in the DNA binding site, and *A. ferrooxidans*, which has an  $S_3$  site in the C-terminal dimerization domain.

From the near edge x-ray absorption fine structure results, CgArsR1 also binds As(III), and the EXAFS shows that it is an  $S_3$  site. Since CgArsR1 has only three cysteine residues, Cys<sup>15</sup>, Cys<sup>16</sup>, and Cys<sup>55</sup>, these are the logical candidates for the  $S_3$  site. Consistent with this idea, mutations in any of the three resulted in loss of As(III) responsiveness *in vivo* and loss of dissociation from the *ars* operator/promoter DNA *in vitro*. The CgArsR1 model suggests that the  $S_3$  site is formed intermolecularly

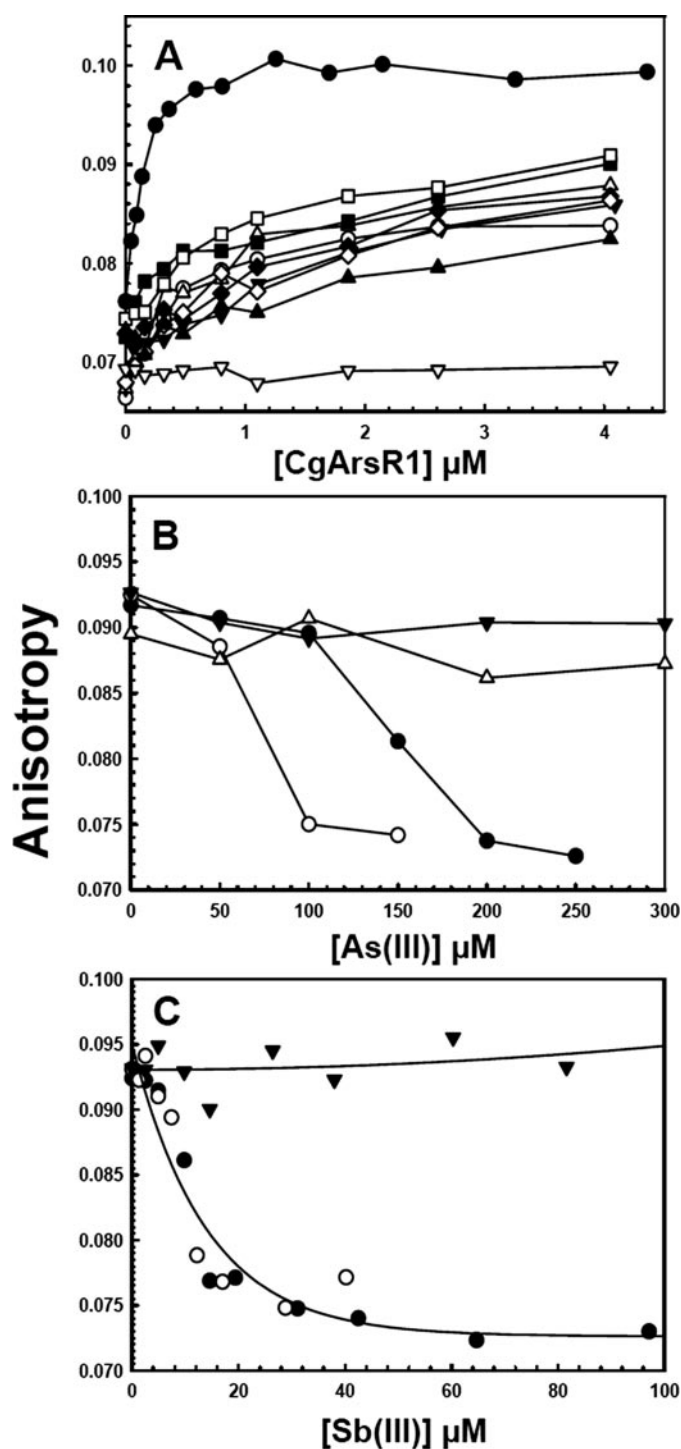


**B**  
 GGCATAGTGTTCAGATTCATCACTGGACAGGGGTCCCGTAGCAAGGGTGCAAACTCGGTTGGATTGGCTAATTGAATTGTGTGGAGA  
 A Y H E S E D S S L P G T A L T C C E T P N A L Q I T H L

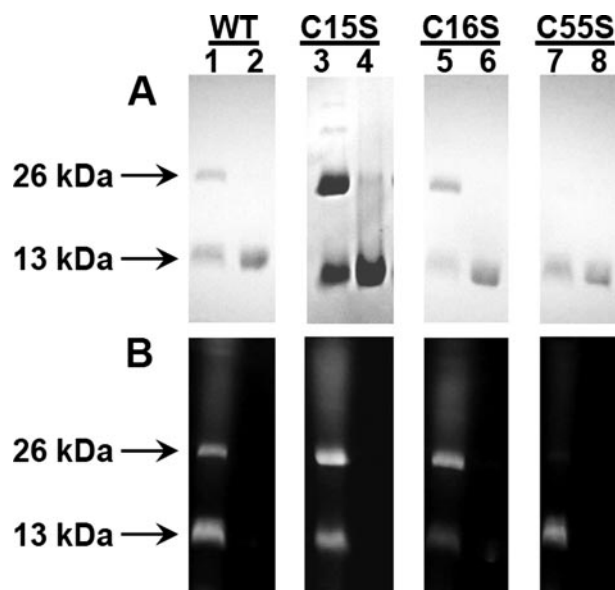
← *arsR*  
 GTGGTCATAAA **TCCACTATATATTGACGAATGTCGATATTC** AAAGTATTTT **GAATATCGACAGGTATCAATATACCGAAAG** GTGTCCG  
 T T M

*arsB* →  
 ATGACAAACTCAACTCAGACGCGGGCCAAGCCAGCCGAATCTCATTCTTGATAAATACATTCCACTTTGGATTATTTTGGCGATGG  
 M T N S T Q T R A K P A R I S F L D K Y I P L W I I L A M

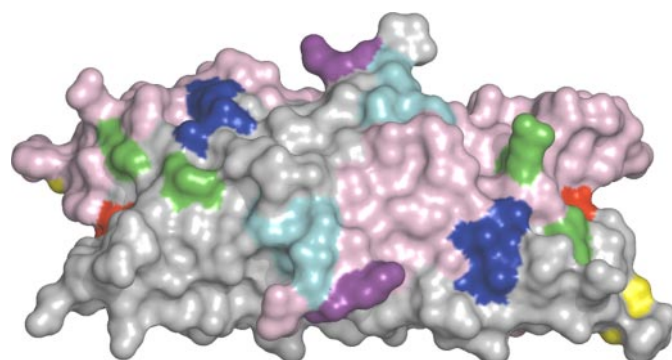
**FIGURE 5. DNA footprinting.** A, DNase I footprinting was performed as described under "Materials and Methods" using WellRED D3 dye-labeled double-stranded DNA. The sizes of major fragments in nucleotides are shown at the top of the peaks. The sequences bound to CgArsR1 are shown *between* the arrows. The positions -7, -37, -47, and -77 indicate nucleotides upstream of the start of the *arsB* gene. B, the sequence of the double-stranded DNA is shown with the binding sequences boxed. The highlighted sequences indicate a palindromic repeat in the intervening region between the *arsR* and *arsB* genes of the *ars1* operon. The start sites of the *arsR* and *arsB* genes are indicated.



**FIGURE 6. CgArsR1 binding to DNA assayed by fluorescence anisotropy.** DNA binding assays were performed as described under "Materials and Methods." **A**, fluorescently labeled double-stranded DNA was titrated with the indicated concentrations of wild type CgArsR1 (●), methyl methanethiosulfonate-modified wild type CgArsR1 (▲), C15S (○), C16S (▼), C55S (△), C15S/C16S (■), C15S/C55S (□), C16S/C55S (◇), C15S/C16S/C55S (◆), and wild type CgArsR1 preincubated with 0.3 mM sodium arsenite (▽). **B**, double-stranded DNA with bound wild type CgArsR1 was titrated with the indicated concentrations of sodium arsenite without GSH in the assay buffer (●) and with 2 mM GSH (○), C16S (▼), or methyl methanethiosulfonate-modified wild type CgArsR1 (△) titrated with the indicated concentrations of sodium arsenite. **C**, double-stranded DNA with bound wild type CgArsR1 (●), CgArsR1 with 2 mM GSH (○), or C16S (▼) titrated with the indicated concentrations of potassium antimonyl tartrate.



**FIGURE 7. Reaction of CgArsR1 with dibromobimane.** Wild type CgArsR1 (lanes 1 and 2) and single mutants C15S (lanes 3 and 4), C16S (lanes 5 and 6), and C55S (lanes 7 and 8) were analyzed by SDS-PAGE on 16% polyacrylamide gels with (lanes 1, 3, 5, and 7) or without (lanes 2, 4, 6, and 8) reaction with dibromobimane. The gels were stained with Coomassie Blue (**A**) and visualized on a transilluminator for fluorescence (**B**). The positions of the 13-kDa monomer and 26-kDa dimer are indicated by the arrows.



**FIGURE 8. Location of metal(loid) binding sites in ArsR/SmtB repressors.** Metal(loid) binding sites in members of the ArsR/SmtB family of repressor proteins are shown on a surface model of the CadC aporepressor structure either by coloring CadC residues corresponding to each binding site as identified from the structure-based alignment (Fig. 1A) or, in the case of CmtR, by overlaying the two structures. The  $S_3$  As(III) binding site of the R773 ArsR (red) formed within each monomer overlaps with the corresponding  $S_4$  Cd(II) binding site of CadC (yellow) formed between the N terminus of one subunit and the DNA binding domain of the other subunit. Zn(II) binding sites of CadC and SmtB (cyan) formed between the antiparallel C-terminal  $\alpha 6$  helices also overlap. The  $S_3$  binding sites of CgArsR1 (green), CmtR (blue), and AfArsR (purple) are at a variety of locations distributed over the surface of the repressor.

between Cys<sup>15</sup> and Cys<sup>16</sup> in  $\alpha 1$  and Cys<sup>55</sup>, which is located just before  $\alpha 4$  of the helix-turn-helix DNA binding domain. This is reminiscent of the  $S_4$  Cd(II) binding site of CadC, but none of the cysteine residues in CgArsR1 align with those in CadC. Thus, it is highly likely that the As(III) binding site in CgArsR1 evolved independently of the As(III) binding sites in R773 ArsR or AfArsR or the Cd(II) binding sites of CadC or CmtR.

As discussed above, we have noted that the metal(loid) binding site in each of these repressors has ligands that are located near the start or end of an  $\alpha$  helix and have suggested that unraveling of a helix from one end is involved in the conforma-

## A Novel Arsenic Binding Site in the *C. glutamicum* ArsR Repressor

tional change that dissociates the repressor from its cognate DNA sequence. We propose that this is the mechanism of derepression in CgArsR1. Although recognizing that a homology model is not a structure, it predicts that Cys<sup>15</sup> and Cys<sup>16</sup> are close enough to Cys<sup>55</sup> to simultaneously coordinate to As(III), and the bBBr cross-linking results support that idea. How do they form a three-coordinate binding site? Cys<sup>15</sup> and Cys<sup>16</sup> are a vicinal cysteine pair, which should form one of the strongest types of As(III) binding sites. However, they are predicted to be at the beginning of  $\alpha 1$  (Fig. 1C), and their thiolates cannot approach each other closely enough to bind As(III) two-coordinately. We propose that Cys<sup>55</sup> and either Cys<sup>15</sup> or Cys<sup>16</sup> first bind As(III) in a weak complex. This is followed by unraveling the beginning of  $\alpha 1$ , exposing the third thiolate, which then completes the high affinity As(III) binding site and dissociation of CgArsR1 from the DNA.

In summary, the identification of a third As(III)-responsive repressor in which the inducer binding site is different from that of R773 ArsR, AfArsR, CadC, SmtB, or CmtR supports our hypothesis that the binding sites are the result of independent and recent evolutionary events. Just as animals have a body plan of bilateral symmetry, these repressors are built using a preexisting scaffold of an ancestral winged helix DNA binding protein. Just as animals such as birds, bats, flying squirrels, and flying fish evolved wings convergently, so too have the inducer binding sites of ArsR/SmtB homologues evolved in diverse locations on the surface of the protein in response to environmental pressures by spatial positioning of residues to form three- or four-coordinate metal(loid) binding sites (Fig. 8).

*Acknowledgments*—A portion of this research was carried out at the Stanford Synchrotron Radiation Laboratory, a national user facility operated by Stanford University on behalf of the United States Department of Energy, Office of Basic Energy Sciences.

### REFERENCES

- Xu, C., and Rosen, B. P. (1999) in *Metals and Genetics* (Sarkar, B. ed) pp. 5–19, Plenum Press, New York
- Busenlehner, L. S., Pennella, M. A., and Giedroc, D. P. (2003) *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 131–143
- Campbell, D. R., Chapman, K. E., Waldron, K. J., Tottey, S., Kendall, S., Cavallaro, G., Andreini, C., Hinds, J., Stoker, N. G., Robinson, N. J., and Cavet, J. S. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 32298–32310
- Wu, J., and Rosen, B. P. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 52–58
- San Francisco, M. J., Hope, C. L., Owolabi, J. B., Tisa, L. S., and Rosen, B. P. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 619–624
- Shi, W., Wu, J., and Rosen, B. P. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 19826–19829
- Yoon, K. P., Misra, T. K., and Silver, S. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 7643–7649
- Wong, M. D., Lin, Y. F., and Rosen, B. P. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 40930–40936
- Ye, J., Kandegedara, A., Martin, P., and Rosen, B. P. (2005) *J. Bacteriol.* **187**, 4214–4221
- Turner, J. S., Glands, P. D., Samson, A. C., and Robinson, N. J. (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**, 3714–3721
- Butcher, B. G., and Rawlings, D. E. (2002) *Microbiology* **148**, 3983–3992
- Qin, J., Fu, H. L., Ye, J., Bencze, K. Z., Stemmler, T. L., Rawlings, D. E., and Rosen, B. P. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 34346–34355
- Ordóñez, E., Letek, M., Valbuena, N., Gil, J. A., and Mateos, L. M. (2005) *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6206–6215
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Fernández-González, C., Gil, J. A., Mateos, L. M., Schwarzer, A., Schäfer, A., Kalinowski, J., Puhler, A., and Martin, J. F. (1996) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 554–558
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- Gill, S. C., and von Hippel, P. H. (1989) *Anal. Biochem.* **182**, 319–326
- Ankudinov, A. L., and Rehr, J. J. (1997) *Phys. Rev. B Condens. Matter* **56**, R1712–R1715
- Ramírez-Solis, A., Mukopadhyay, R., Rosen, B. P., and Stemmler, T. L. (2004) *Inorg. Chem.* **43**, 2954–2959
- Letek, M., Valbuena, N., Ramos, A., Ordóñez, E., Gil, J. A., and Mateos, L. M. (2006) *J. Bacteriol.* **188**, 409–423
- Kosower, N. S., Kosower, E. M., Newton, G. L., and Ranney, H. M. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 3382–3386
- Cook, W. J., Kar, S. R., Taylor, K. B., and Hall, L. M. (1998) *J. Mol. Biol.* **275**, 337–346
- Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Ciofi-Baffoni, S., Cavet, J. S., Dennison, C., Graham, A., Harvie, D. R., and Robinson, N. J. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 30181–30188
- Harvie, D. R., Andreini, C., Cavallaro, G., Meng, W., Connolly, B. A., Yoshida, K., Fujita, Y., Harwood, C. R., Radford, D. S., Tottey, S., Cavet, J. S., and Robinson, N. J. (2006) *Mol. Microbiol.* **59**, 1341–1356
- Marti-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., Sanchez, R., Melo, F., and Sali, A. (2000) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 291–325
- DeLano, W. L. (2001) *The PyMOL User's Manual*, DeLano Scientific, San Carlos, CA
- Mateos, L. M., Schafer, A., Kalinowski, J., Martin, J. F., and Puhler, A. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 5768–5775
- Ramos, A., Honrubia, M. P., Valbuena, N., Vaquera, J., Mateos, L. M., and Gil, J. A. (2003) *Microbiology* **149**, 3531–3542





## Arsenate reductase, mycothiol and mycoredoxin concert thiol/disulfide exchange

Efrén Ordóñez<sup>1</sup>, Karolien Van Belle<sup>2,3,4</sup>, Goedele Roos<sup>2,3,4,6</sup>, Sandra De Galan<sup>5</sup>, Michal Letek<sup>1</sup>, Jose A. Gil<sup>1</sup>, Lode Wyns<sup>3,4</sup>, Luis M. Mateos<sup>1,\*</sup> and Joris Messens<sup>2,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, Area of Microbiology, University of León, Spain

<sup>2</sup>Brussels Center for Redox Biology, Brussels, Belgium

<sup>3</sup>Department of Molecular and Cellular Interactions, VIB, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium

<sup>4</sup>Structural Biology Brussels, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium

<sup>5</sup>Analytical Chemistry, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium

<sup>6</sup>General Chemistry, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium

\*joint corresponding authors: [joris.messens@vib-vub.be](mailto:joris.messens@vib-vub.be) and [luis.mateos@unileon.es](mailto:luis.mateos@unileon.es)

Running title: A mycothiol-mycoredoxin dependent arsenate reductase

Keywords: *Corynebacterium glutamicum* / redox mechanism/ kinetics/ *in vivo* knockouts/reactivity analysis

We identified the first enzymes, which use mycothiol and mycoredoxin in a thiol/disulfide redox cascade. The enzymes are two arsenate reductases from *Corynebacterium glutamicum* (Cg\_ArsC1 and Cg\_ArsC2), which play a key role in the defence against arsenate. *In vivo* knockouts showed that the genes for Cg\_ArsC1 and Cg\_ArsC2 and those of the enzymes of the mycothiol biosynthesis pathway confer arsenate resistance. With steady-state kinetics, arsenite analysis, and theoretical reactivity analysis, we unravelled the catalytic mechanism for the reduction of arsenate to arsenite in *C. glutamicum*. The active site thiolate in Cg\_ArsCs facilitates adduct formation between arsenate and mycothiol. Mycoredoxin - a redox enzyme for which the function was never shown before - reduces the thiol-arseno bond, forms arsenite and a mycothiol-mycoredoxin mixed disulfide. A second molecule of mycothiol recycles mycoredoxin and forms mycothione that on its turn is reduced by the NADPH-dependent mycothione reductase. Cg\_ArsCs show a low specificity constant of  $\sim 5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , typically for a thiol/disulfide cascade with nucleophiles on three different molecules. With the *in vitro* reconstitution of this novel electron transfer pathway, we have paved the way for the study of redox mechanisms in actinobacteria.

The frequent abundance of arsenic in the environment has guided the evolution of enzymes for the reduction of arsenate [As(V)] (1). Arsenate reductases (ArsCs) are unusual among well-studied enzyme classes, because there is not a single family of evolutionary related sequences. The structural folds and mechanisms that they are using, are fundamentally different and arose independently during evolution (2). Arsenate reductases are small cytoplasmic redox enzymes that reduce arsenate to arsenite [As(III)] by the sequential involvement of three different thiolate nucleophiles that function as a redox cascade. As such, arsenate reductases from different organisms often work together with the thiol/disulfide mechanism in the cell.

The major and most ubiquitous system for protection against oxidative stress and to maintain the intracellular thiol homeostasis is the thioredoxin system that is composed of thioredoxin (Trx) and thioredoxin reductase (TrxR) (3). In addition to the thioredoxin system, most living organisms contain low molecular weight thiol compounds that serve as a buffer to avert disulfide stress. In eukaryotes and Gram-negative bacteria, the redox level is maintained by redox cycling of glutathione (GSH) with glutaredoxin (Grx) and glutathione reductase (4). Gram-positive bacteria, like *Staphylococcus aureus*, produce no glutathione, but millimolar

quantities of reduced coenzyme A is the predominant thiol, which is kept reduced with a NADPH-dependent flavo-enzyme, coenzyme A disulphide reductase (5). Also actinobacteria, like *Corynebacterium glutamicum*, produce no GSH, but instead they contain millimolar concentrations of mycothiol (MSH - chemically: 1D-myoinosityl-2-[N-acetyl-L-cysteiny] amido-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside), a pseudodisaccharide containing a cysteine moiety as a reactive thiol (6). Its oxidized form is mycothione (MSSM). In actinobacteria, mycothione reductase (MTR) is the NADPH-dependent flavo-enzyme that reduces MSSM in order to maintain the intracellular redox homeostasis to allow the proper functioning of a variety of biological functions (7).

Arsenate reductases are part of a defence mechanism of the cell against toxic arsenate. Their genes are most of the time found in an operon together with arsenite sensing and efflux genes (8). Based on the mechanism used to reduce arsenate to arsenite, two distinct ArsC classes can be defined. The first one is the thioredoxin-coupled ArsC class represented by *S. aureus* pI258 ArsC and *Bacillus subtilis* ArsC (9-11). Both enzymes use the structural fold of low-molecular-weight tyrosine phosphatase and need Trx to start a second catalytic cycle (12-14). The second class is the GSH/glutaredoxin-coupled class represented by *Escherichia coli* plasmid R773 ArsC (15,16), the eukaryotic Acr2p reductase from *Saccharomyces cerevisiae* (17), and ArsC from *Leishmania major* (18). In this second class, two different structural folds are found; *E. coli* R773 ArsC partially resembles glutaredoxin (19), while the eukaryotic ArsCs have a rhodanese-fold like the Cdc25a cell cycle control phosphatase (20). Notably, all arsenate reductases have a thiolate nucleophile at the N-terminal end of an  $\alpha$ -helix. The active site of the ArsCs with a phosphatase-like scaffold is conserved [root mean square deviation (r.m.s.d.) 0.54 Å] with a catalytic important Arg on position Cys+6.

In *C. glutamicum*, there are four *arsC* genes located on different places in the chromosome (21): one orphan *arsC* gene (*arsC4*) and three *arsC* genes (*arsC1-arsC1'* and *arsC2*) present in two *ars* operons. We show here that two of the encoded proteins, Cg\_ArsC1 and Cg\_ArsC2 (with 66% sequence identity) are members of a new

third class, the mycothiol and mycoredoxin dependent arsenate reductases. Both the genes of *arsC1* and *arsC2*, together with the genes for the enzymes of the mycothiol biosynthesis pathway are involved in arsenate resistance in *C. glutamicum*. We have reconstituted *in vitro* a novel electron transfer network containing next to Cg\_ArsC1 or Cg\_ArsC2, mycothiol, mycoredoxin, and mycothione reductase. As such, the mechanism for the reduction of arsenate by *C. glutamicum* could be unravelled.

### Experimental procedures

**Knockouts involved in mycothiol biosynthesis**—MshB, MshC and MshD mutant strains from *C. glutamicum* were described previously (22). Mutant strains *C. glutamicum* MshA and Mtr were kindly supplied by Dr. Kalinowski (Bielefeld, Germany). In all these mutants the *msh/mtr* structural genes were removed by the site specific gene deletion system based on the plasmid pK18*mobsacB* (23); recombinant plasmids containing the up and down regions of the *msh/mtr* genes were mobilized to the recipient strain RES167 and integrated into a specific site of the chromosome, allowing for marker-free deletion of the target genes when antibiotic pressure and sucrose was adequate.

**As(V) and As(III) resistance assays**—Single colonies of the *C. glutamicum* strains were inoculated into fresh MMC or TSB and grown for 16 h at 30°C in aerobic conditions. Mid exponential phase cells were diluted 100-fold into fresh, pre-warmed low phosphate MMC or TSB containing respectively the indicated concentrations of As(V) or As(III) in the form of sodium arsenate or sodium arsenite. Cells were grown at 30°C in aerobic conditions for 48 h. Growth was monitored (OD<sub>600</sub>) after 12, 24, 36 and 48 h. Cell cultures were diluted to be in the linear OD range and the obtained values multiplied with the respective dilution factors.

**Arsenate reductase activity assay**—Cg\_ArsCs were injected on a Superdex75HR column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) equilibrated in 50 mM Hepes pH 8.0, 150 mM NaCl to obtain a pure monomeric sample. Mrx1<sub>wt</sub>, MTR and MSH were purified as described in the Supplementary data. NADPH (Sigma) was dissolved in water to a

stock concentration of 10 mM and stored at 4°C. Arsenate ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Sigma) was freshly dissolved in water at a concentration of 2 M for making the dilution series.

The final assay mixture was prepared by diluting all components, except Cg\_ArsC1 (or Cg\_ArsC2) and its substrate arsenate, in the assay buffer solution to obtain the final concentration of 10  $\mu\text{M}$  Mrx1\_wt, 3  $\mu\text{M}$  MTR, 0.47 mM MSH, and 250  $\mu\text{M}$  NADPH (=component mixture) taking into account the subsequent addition of arsenate and the respective Cg\_ArsC enzyme.

The component mixture and different dilution series of substrate were mixed and incubated for 20 minutes at 37°C in a 96-well plate (PolySorb, Nunc, Denmark) (180  $\mu\text{L}$ /well) in a SPECTRAMax 340PC (Molecular Devices, Sunnyvale, California). The assay was started by the addition of enzyme (200 nM) 20  $\mu\text{L}$ /well to obtain a final volume of 200  $\mu\text{L}$ /well. As a background control for the assay, buffer solution was added.

The arsenate reduction coupled to NADPH oxidation ( $\Delta\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) was measured by following the decrease in absorption at 340 nm. The path length was measured after each run for each well with the PathCheck Sensor of the system and was used for  $k_{\text{cat}}$  calculations. Initial rates were calculated with SPECTRAMaxPro (Molecular Devices). Kinetic plots were made with Prism 4.0 using the Michaelis-Menten (MM) expression to calculate  $V_{\text{max}}$  and  $k_{\text{cat}}$  values. Adding 100 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$  and 100 mM sodium phosphate to the assay buffer solution in the component mixture tested the influence of oxyanions on the assay.

For the Trx/TrxR pathway, Trx (*trxA*), Mrx2 and TrxR (*trxB*) were used at the same concentrations as Mrx1\_wt and MTR.

*Inhibition and activation of the Mrx1/MSH pathway by respectively arsenite and arsenate*—Arsenate and arsenite (each at 1 mM and 50 mM) were incubated for 20 min at 37°C with 470  $\mu\text{M}$  MSH, 3  $\mu\text{M}$  MTR, 250  $\mu\text{M}$  NADPH in 50 mM Hepes, pH 8.0. The reaction was started with the addition of 50 mM oxidized Mrx1 and monitored at 340 nm in function of time. Oxidized Mrx1 was prepared by the addition of a 10-molar excess of diamide, followed by size-exclusion chromatography (SEC) on Superdex75 HR in 50 mM Hepes, pH 8.0, 150 mM NaCl.

*Arsenite analysis*—All components (or an experimentally designed selection) were mixed in 20 mM Tris/HCl pH 6.5 to obtain 250  $\mu\text{M}$  NADPH, 3  $\mu\text{M}$  MTR, 10  $\mu\text{M}$  Mrx1, 0.47 mM MSH, 200 nM Cg\_ArsCs, and 100 mM As(V) (varying concentrations) incubated for different times at 37°C. A pH of 6.5 guarantees most arsenate in its dianionic form and arsenite as  $\text{As}(\text{OH})_3$ . The reaction was stopped by removing the proteins on a solid phase extraction cartridge (Waters Oasis HLB). The excess of arsenate was removed on Dowex 21K/XLT anion exchange resin (Supelco) pre-treated with NaCl in Tris/HCl pH 6.5 and thoroughly washed with water. The flow through fraction was 0.2  $\mu\text{m}$  filtered, argon flushed and injected on a Hamilton PRP-X100 anion exchange column (250 x 4.1 mm) operated in 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 6.0 at 1 ml/min. The HPLC-effluent was mixed with 1.5 M HCl and 2.5%/0.4%  $\text{NaBH}_4/\text{NaOH}$  to form gaseous arsine ( $\text{AsH}_3$ ). The arsines were analyzed and quantified using an atomic fluorescence spectrometer (Excalibur, PS Analytical, Orpington, UK) calibrated with a standard of arsenite and arsenate.

*Softness difference calculation*—The ArsC-arseno adduct is modelled as  $\text{CH}_3\text{S-AsO}_3^{2-}$  and  $\text{CH}_3\text{S-HAsO}_3^-$ . The geometries of mycothiol (MSH), glutathione (GSH),  $\text{HAsO}_4^{2-}$ ,  $\text{CH}_3\text{S-AsO}_3^{2-}$  and  $\text{CH}_3\text{S-HAsO}_3^-$  were optimized at the B3LYP/6-31+G\*\* level. Subsequent single point calculations were performed in a polarized continuum (PCM)(24) aqueous solvent model at the B3LYP/6-31+G\*\* level. All calculations were performed with the Gaussian package (25).

The preferred reactivity between the attacking nucleophilic sulphur atom of MSH and GSH and the accepting electrophilic arsenate or sulphur atom of  $\text{HAsO}_4^{2-}$ ,  $\text{CH}_3\text{S-AsO}_3^{2-}$  and  $\text{CH}_3\text{S-HAsO}_3^-$  can be extracted from the difference in the local softness between the reacting partners (hard and soft acids and bases principle, HSAB) (26). The smaller this difference, the higher the reactivity.

$$\Delta s = |s^+(\text{As/S})_{\text{electrophile}} - s^-(\text{S})_{\text{nucleophile}}|$$

The local softness was calculated as described (27).

*Supplementary data*

- Strains, plasmids, oligonucleotides and media
- Construction of *arsC* knockout strains and plasmids for complementation experiments
- Cloning of *arsC1*, *arsC2*, *mrx1*, *mrx1* mutated versions, *mrx2*, *trxA*, *trxB* and *mtr* genes from *C. glutamicum* for *E. coli* expression.
- Purification of the *C. glutamicum* mycothiol and the enzymes ArsC1, ArsC2, Trx, Mrx2, Mrx1, Mrx1CXXA, Mrx1AXXC, Mrx1AXXA, TrxR and MTR.
- Analytical reversed phase chromatography
- Mass spectrometry and concentration determination
- Selwyn's test of enzyme inactivation

## Results

*Cg\_ArsC1* and *Cg\_ArsC2* are involved in the defence against arsenate—Resistance analyses of *C. glutamicum* strains showed a high tolerance to As(V) (28). With single ArsC mutant strains (*C. glutamicum* ArsC1 or ArsC2), the same resistance levels were obtained as for wild type (Fig. 1A). The double mutant (ArsC1-C2), however, was very sensitive to arsenate and showed resistance levels, which were 20 to 30 times lower. This double disruption mutant strain was further used as a host for homologous complementation analyses (Fig. 1B). Bifunctional plasmids containing the constitutively expressed *arsC1*, *arsC2*, *arsC1'* and *arsC4* genes from *C. glutamicum* (pECars derivatives; Table S1 in Supplementary data) were transferred to this double knockout strain. Only strains containing either the *arsC1* or the *arsC2* gene were able to complement the arsenate reductase activity. When the single cysteine in the *arsC1* and the *arsC2* genes was mutated to a serine the complementation was lost (Fig. 1B). As such, the single cysteine in *Cg\_ArsCs* is involved in the reaction mechanism.

We also checked the effect of the absence of *Cg\_ArsC1* and *Cg\_ArsC2* on As(III) resistance. Removing *arsC1*, *arsC2* or both genes had no effect on the resistance against As(III) and equivalent resistance levels as for wild type were obtained (data not shown). As such, the *arsC1* and *arsC2* genes confer only As(V) resistance.

To test whether these four *arsC* genes could rescue arsenate reductase activity across different species, we did a heterologous complementation analyses.

Cloning of the four respective *arsC* genes from *Cr Cutanicum* (*arsC*, *Cr*, *Cs* and *Cr*) in a WC3110 *ar c i* mutant lacking arsenate reductase activity (21,29) was successful. However, none of the *arsC* genes increased the survival of the WC3110 strain in arsenate (data not shown). This might indicate that the genes for arsenate reductases in *C. glutamicum* have evolved to become host-specific enzymes, which depend on the proper cellular environment. It suggests that next to *Cg\_ArsC1* or *Cg\_ArsC2*, there are *C. glutamicum*-specific molecules involved in the enzymatic reduction mechanism of arsenate.

*Mycothiol is involved in arsenate defence*—As *C. glutamicum* produces no glutathione unlike *E. coli*, but instead millimolar concentrations of mycothiol, we tested the influence of removing the genes of the biosynthesis pathway of MSH on the arsenate and arsenite resistance of *C. glutamicum*. In *Mycobacterium* species, the genes *mshA*, *mshB*, *mshC*, and *mshD* were found to encode for the enzymes that sequentially catalyze the formation of MSH starting from UDP-N-Acetyl-glucosamine and inositol-P (30). Orthologs of these *msh* genes have been located in the genome data of *Corynebacterium glutamicum* (31,32).

With mutants from *C. glutamicum* (*mshA*, *mshB*, *mshC*, *mshD* and *mtr*), the arsenate and arsenite resistance was tested. In all mutants, clear differences in resistance to arsenate were observed (Fig. 1C). Some of the *msh/mtr* mutants have a similar susceptibility to As(V) as observed for the ArsC1-C2 double mutant strain, suggesting a possible relation between MSH and the arsenate reductase activities. For arsenite, this was not the case and only a slight decrease of the resistance level as compared to wild type was observed (Fig. 1D).

Next to the mycothiol redox system, *C. glutamicum* has a transcriptional thioredoxin unit consisting of *trxB-trxA* (thioredoxin reductase and thioredoxin; NCg12984-2985) (32). In the case of *S. aureus* plasmid pI258 ArsC, TrxR and Trx are the redox enzymes responsible for electron transport from NADPH (12,33). By the construction of *trx*-gene disruption mutants, we checked the possible involvement of *trxB* and *trxA* in As(V) resistance in *C. glutamicum*. Unfortunately, the inactivation of the *trx* genes seems to be lethal because no transconjugants

were obtained after many attempts, suggesting their importance and essential role for *C. glutamicum*. Their involvement in the defence mechanism against arsenate could not be ruled out *in vivo*.

*Electron transfer pathways in vitro reconstructed*—In *C. glutamicum*, we located two hypothetical mycoredoxins: Mrx1 (NCgl0808) and Mrx2 (NCgl2445). The corresponding *mrx* genes were identified by homology with the *E. coli* glutaredoxin genes (*grx*) (16). Mrx2 shows 76% sequence identity (NCBI BLAST program) (34) with NrdH-redoxin from *Corynebacterium ammoniagenes* for which the structure shows a domain-swapped dimer (35). Mycoredoxin1 (Mrx1) is characterized with the same active site sequence motif as glutaredoxin (Grx), i.e. ‘CPYC’. Grx is a redox enzyme with a high specificity for the tripeptide glutathione (GSH) (36). Based on this knowledge, the *in vitro* electron transfer functionality of two pathways was tested, the Trx/TrxR-pathway and the MSH/Mrx1-pathway (Fig. 2A and 2B). Whether Mrx2 could accept electrons from MTR or TrxR was also tested. For this kinetic study, we used only enzymes of *C. glutamicum*, because it is well known that while the active site cysteines of redox enzymes are essential for protein reduction, the participation of the integral structure in the target recognition process modulates its efficiency in doing so (37). All enzymes of both pathways were recombinantly overexpressed in *E. coli*, and purified to homogeneity (see Supplementary data).

The redox enzymes Trx, Mrx1 and Mrx2 were oxidized with 10-molar excess of diamide, which was subsequently removed on a size exclusion column (SEC). By monitoring the consumption of NADPH as a function of time in progress curves, the electron transfer chains for all three enzymes were tested in both pathways (Fig. 2). Mrx1 was found to be specific for the MSH/Mrx1 pathway (Fig. 2B), while the function of Mrx2 and Trx is restricted to accept electrons from TrxR (Fig. 2A). We have reconstituted two thiol/didulfide redox pathways from *C. glutamicum* and showed for the first time the functionality of two hypothetical mycoredoxins: Mrx1 and Mrx2.

*Cg\_ArsC1 and Cg\_ArsC2 receive electrons from the mycothiol/mycoredoxin1 pathway*—The

following objective was to investigate whether *Cg\_ArsCs* are reducing arsenate to arsenite with electrons coming from the Trx/TrxR-pathway or from the MSH/Mrx1- pathway. Both *Cg\_ArsC1* and *Cg\_ArsC2* were recombinantly overexpressed in *E. coli* (see Supplementary data). With progress curves using varying concentrations of enzymes, arsenate, and NADPH, we found that both *Cg\_ArsC1* and *Cg\_ArsC2* are only connected with the MSH/Mrx1-pathway (Fig. 2C). No electron transfer was observed with the Trx/TrxR-pathway. Remarkably was that electron transfer was only possible with a MSH concentration of at least 0.1 mM (Fig. 2B). For the *in vivo* situation, the cellular concentration of MSH was published to be in the millimolar range (6), which might explain this observation.

*The Cg\_ArsCs kinetics are slow*—In order to correctly interpret the kinetic parameters generated in an enzymatic assay with several components, it is of uppermost importance that the enzymes stay active during the course of the enzymatic assay (14). Especially for enzymes that contain oxidation sensitive cysteines and in assays where products are formed that could react with cysteines (like arsenite) extra attention is needed (14). We showed that millimolar concentrations of As(III) are inhibiting, while As(V) is activating the MSH/Mrx1-pathway (Fig. 3A). To ensure that product inhibition by As(III) is negligible, initial velocities were measured.

In the assay the concentration of MSH, Mrx1 and MTR have to be high enough so that their action is not rate limiting. Otherwise, the progress curves will show a lag-phase and the use of initial rates for calculating kinetic plots will lead to false cooperativity. We varied the concentrations of *Cg\_ArsC*, MSH, Mrx1 and MTR with a constant concentration of 250  $\mu$ M NADPH. After concentration optimisation, the various components in the coupled enzyme assay necessary to yield Michaelis-Menten kinetics (Hill factor of one) were found to be 200 nM *Cg\_ArsC*, 0.47 mM MSH, 10  $\mu$ M Mrx1, 3  $\mu$ M MTR and 250  $\mu$ M NADPH. As arsenate is already inducing non-enzymatic background electron transfer in the MSH/Mrx1-pathway (Fig. 3B), the reaction was started with the addition of *Cg\_ArsC*. Removing the components one-by-one and testing different combinations resulted in lower initial velocities.

As such, all components contribute to the electron transfer pathway.

Thiol/disulfide exchange reactions are pH dependent. We tested the pH-dependency of the reaction by comparing the initial rates in the presence of 10 mM arsenate at various pHs (6.5, 7.0, 7.5 and 8.0). Increasing pH resulted in increasing initial velocities, with the highest value at pH 8.0.

Finally, we measured the kinetic parameters of Cg\_ArsC1 (Fig. 3C) and Cg\_ArsC2 (Fig. 3D) under the optimised conditions in the presence and absence of the oxyanions phosphate and sulphate (Table 1). Phosphate and sulphate have been shown to stabilize pI258 ArsC from *S. aureus*, and increase its  $K_M$  and  $k_{cat}$  values (14). For Cg\_ArsCs, the stabilizing effect is only marginal (for Selwyn test see Fig. S2 in Supplementary data). The  $K_M$  drops with a factor of 2 and the effect on the  $k_{cat}$  is insignificant. All together, Cg\_ArsCs have slow kinetics ( $k_{cat}$  of 32 min<sup>-1</sup> and 17 min<sup>-1</sup>; see Table 1) with a specificity constant of ~5 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>.

*Cg\_ArsC and mycoredoxin1 show strict specificity to mycothiol, and mycoredoxin1 functions as a monothiol oxidoreductase*—Mycoredoxin1 (Mrx1) seems to function in *C. glutamicum* as a glutaredoxin. Therefore, we tested whether electron transfer is also possible, when mycothiol is replaced by glutathione. We analysed NADPH consumption at 340 nm in the presence of MTR, Mrx1, GSH, Cg\_ArsC and arsenate (Fig. 4A). Progress curves showed no electron transfer in the presence of GSH. The coupled redox cascade reaction is strictly linked to MSH.

Glutaredoxins are functioning either with one or two cysteines in the active site (38,39). In the case of a monothiol, first a mixed disulfide between glutaredoxin and glutathione is formed. By a subsequent thiol-disulfide exchange with reduced glutathione the enzyme is regenerated. In the case of a dithiol mechanism, a mixed disulfide between the enzyme and the protein substrate is formed. This intermediate is released by a nucleophilic attack by the second cysteine residue in the active site of Grx.

To check whether Mrx1 is using one or two active site cysteines in the reaction mechanism related to Cg\_ArsCs, we mutated the first, the second and both cysteines of the 'CXXC' motif to alanines.

Their functionality was tested in progress curves and compared with wild type Mrx1 (Fig. 4B). Mutant Mrx1 'CXXA' is almost as functional, as wild type. Its initial velocity dropped less than 10% (Figs. 3B and 4B). On the other hand, electron transfer was drastically reduced to background levels when Mrx1 'AXXC' or Mrx1 'AXXA' were present. As such, Mrx1 is functioning as a monothiol mixed disulfide reductase with an essential N-terminal nucleophilic cysteine.

*Cg\_ArsC1 catalyses the MSH/Mrx1-dependent reduction of arsenate to arsenite*—In a comparative study, we analyzed the catalyzed versus the non-catalyzed formation of arsenite in function of time using the optimized assay conditions (vide supra) (Fig. 5A). Cg\_ArsC1 is clearly decreasing the activation energy towards product formation during the reaction. Nevertheless, non-catalyzed As(III) formation is also observed and this phenomenon is even more striking during an overnight experiment at 37 °C (Fig. 5C). Cg\_ArsCs incubated with arsenate do not produce As(III). At least MSH is needed, but the reaction is more efficient in the presence of MSH and Mrx1. Under the latter conditions, the importance of the N-terminal nucleophilic cysteine of Mrx1 is confirmed.

Both Cg\_ArsC1 and Cg\_ArsC2 are producing about the same amount of As(III) in a 2h incubation experiment at 37°C (Fig. 5B). Increasing the concentration of wild type Mrx1 from 10 μM to 465 μM (equivalent to the concentration of MSH in the reaction), in the absence of MTR and NADPH, increases the level of As(III) (Fig. 5B). To produce arsenite, MTR and NADPH are not explicitly needed, and with a reaction mixture of Cg\_ArsC, arsenate, MSH and Mrx1 similar high levels of As(III) are obtained. As such, the functional role of MTR and NADPH is most probably only to recycle the formed mycothione or the mixed disulfide between mycothiol and mycoredoxin.

*Cg\_ArsC forms an arseno adduct to facilitate As(V)-SM formation*—To scrutinize the reaction, MSH was tested as neutral and thiolate entity [pKa is 8.3 (40)] for its nucleophilic attack towards arsenate and towards a Cg\_ArsC arseno-thiol adduct. We address the question whether MSH is

performing a nucleophilic attack towards the sulphur or towards the arsenic atom in the arseno-thiol adduct.

With a  $pK_{a2}$  of 6.9, the majority of arsenate is present as  $HAsO_4^{2-}$  at pH 8. The protonation state of the Cg\_ArsC arseno-thiol adduct is not known, but will be mono- or di-anionic, as such both  $CH_3S-AsO_3^{2-}$  and  $CH_3S-HAsO_3^-$  are considered as simplified models for the enzyme arseno-thiol adduct (Table 2). The reactivity of MSH towards  $HAsO_4^{2-}$  is compared with the reactivity towards  $CH_3S-AsO_3^{2-}$  and  $CH_3S-HAsO_3^-$ . We found that according to the principle of minimal softness (HSAB), the reactivity to the As atom is larger (lower difference in softness) than to the S atom in both  $CH_3S-AsO_3^{2-}$  and  $CH_3S-HAsO_3^-$  (Table 2). We also observed that the reactivity of MSH towards the thiol-arseno adduct is higher than towards arsenate. These data suggest that Cg\_ArsCs form an arseno adduct that facilitates As(V)-SM formation. Similar results were obtained with GSH (Table 2).

## Discussion

Most of the cellular arsenate resistance is associated with the presence of cellular arsenate reductases (ArsC/Acr2p). In *C. glutamicum*, we have found a completely new enzymatic mechanism for the reduction of arsenate in which the electron transfer is coupled to mycothiol (MSH) and mycoredoxin1 (Mrx1) (Fig. 6). No link with the Trx/TrxR-pathway was observed.

With MSH-biosynthesis-pathway mutants (22), we showed a clear link between the production of mycothiol and the level of arsenate resistance. Newton and Fahey (41) showed that MshA and MshC activities are essential for MSH production, whereas MshB and MshD mutants are still producing trace amounts of MSH in *Mycobacterium*. The arsenate resistance levels observed for *C. glutamicum* mutants (MshA, MshB, MshC and MshD) are consistent with their findings. MshA and MshC mutants of *C. glutamicum* displayed equivalent resistance levels as observed for the double disruption ArsC1-C2 mutant, whereas in the MshB and MshD mutants the resistance to As(V) was not so dramatically decreased (Fig. 1C). In a *C. glutamicum* Mtr mutant strain with the MSSM reduction blocked, a

constitutive production of MSH maintains the arsenate resistance at a basal level of 3 mM.

Even though As(III) is a stronger oxidant and more toxic than As(V), the resistance levels to As(III) for the mutants of the MSH biosynthetic pathway did not decrease to the same extent as observed for As(V) (Fig. 1D). In these mutants, the slight decrease in resistance at higher As(III) concentration might be associated with the lack of the redox buffer capacity in the absence of MSH. In *E. coli*, a similar gradual decrease of the resistance to As(III) was observed in the absence of GSH (42).

We showed that for the arsenate reduction mechanism, Cg\_ArsC1 and Cg\_ArsC2 depend not only on the presence of MSH, but also on the presence of the N-terminal cysteine in both Cg\_ArsC and Mrx1. As such, the reaction proceeds via a thiol/disulfide exchange mechanism. This is also confirmed by the necessity of the presence of MTR and NADPH to reduce MSSM or the MSH-Mrx1 mixed disulfide. In the absence of MTR and NADPH, no electrons are consumed and the reaction cannot be followed spectrophotometrically at 340 nm. Adding As(V), MTR and NADPH to MSH and Mrx1, in the absence of Cg\_ArsCs, resulted already in a background level reaction (Fig. 3B). Arsenate reacts with MSH and forms arsenite (Fig. 5). For *C. glutamicum*, the reaction of arsenate with millimolar concentrations of MSH in the cell might even be the first line of defence against arsenate entering the cell via the phosphate uptake system (2). Arsenite induces the *ars* operon, as the Cg\_ArsR repressor can only be released from the *ars* operator/promoter region with As(III) and not with As(V) (43). A slightly different model has been suggested for *Desulfovibrio desulfuricans* (44); here, the constitutively expressed orphan *arsC* gene is producing arsenite to induce the *ars* operon.

In the absence of Cg\_ArsCs, MSH is capable of reducing As(V) to As(III). This reaction strongly suggests the formation of a MS-As(V) adduct (Fig. 6A) that will be reduced by MSH to generate As(III) (Fig. 5) and MSSM. MSH in its thiolate form seems to be the preferred nucleophile for this reaction (Table 2). MSSM will be further reduced by MTR with the consumption of NADPH. The reduction of MS-As(V) is more efficient in the presence of Mrx1 and causes the background level

in the kinetic and the arsenite assays. Mrx1 uses its N-terminal nucleophilic cysteine to attack the MS-As(V) adduct with the formation of a Mrx1-S-SM complex. Subsequently, Mrx1-S-SM enters the MSH/MTR-pathway (Fig. 6B). Unfortunately, we do not have experimental evidence for As(V)-SM adduct and the Mrx1-S-SM mixed disulfide complex formation, because these transiently occurring forms are instantly reduced by MSH and/or Mrx1.

It looks as if Cg\_ArsCs are not necessary to reduce As(V) to As(III), although its catalytic role was clearly shown in a short time range, where the electron transfer and the production of arsenite is increased in the presence of Cg\_ArsCs (Fig. 5A). After the formation of an arseno-sulfur complex in Cg\_ArsC, the nucleophilic attack with mycothiol shows regioselectivity for the As atom. As such, an As-SM arseno mycothiol complex is formed (Fig. 6A). We also showed the involvement of Mrx1. Based on all our analyses, a reaction as shown in Figure 6 will most likely occur: (i) the active site thiolate in Cg\_ArsC facilitates adduct formation between arsenate and mycothiol; (ii) Mrx1 reduces the thiol-arseno bond and forms arsenite and a mixed disulfide between mycothiol and Mrx1; (iii) a second molecule of MSH recycles Mrx1 and forms mycothione (MSSM); (iv) MSSM on its turn is reduced by the NADPH-dependent mycothione reductase (MTR). At a first glance, the mechanism with the formation arseno-glutathione intermediate looks similar to what has been proposed for *E. coli* R773 ArsC, which is coupled to GSH and Grx (19,45). However, in the mechanism suggested for *E. coli*, a monohydroxy positively charged arsenite intermediate is formed on R773 ArsC and arsenite is only released from the enzyme after hydroxylation. In *C. glutamicum*, the mechanism is different; the active site thiolate in Cg\_ArsC lowers the energy barrier to facilitate adduct formation between arsenate and mycothiol. Here, arsenite is released after a nucleophilic attack of Mrx1.

Cg\_ArsC1 and Cg\_ArsC2 are very slow arsenate reductases (Table 1). We compared the kinetic constants of both Cg\_ArsCs with other small cytoplasmic arsenate reductases (Table 3). Low

specificity constants are also observed for the GSH/Grx coupled arsenate reductases. Common is that arsenate reductases are using the sequential involvement of three different thiolate nucleophiles that function as a redox cascade. In pI258 ArsC from *S. aureus* (11) with all three thiolate nucleophiles in a single molecule a higher catalytic efficiency is obtained; the specificity constant is several orders of magnitude higher. All arsenate reductases produce arsenite with relatively small  $k_{cat}$  values. Low  $k_{cat}$ 's might be explained because arsenite is more toxic compared to the substrate arsenate (46). To guarantee an immediate efflux of the reactive arsenite, the Acr3p efflux pump (28,47) has to work in concert with the Cg\_ArsCs.

GSH and MSH are low molecular weight redox buffer components for which evolution might have selected a similar active site in glutaredoxin and mycoredoxin. We showed that Cg\_ArsC and Mrx1 are not functioning with glutathione, but they have a strict specificity for mycothiol in the reaction coupled to MTR and NADPH.

Since its discovery in 1993 (6,48), MSH has been shown to be involved in many processes. Next to its role as a storage form of cysteine in *Mycobacterium smegmatis* (49) and its detoxification role for alkylating agents (50), there are only two enzymes described that depend on MSH for functioning. Formaldehyde dehydrogenase MscR (51), later identified as nitrosomycothiol reductase with a role in the protection against oxidative stress (52) and maleylpyruvate isomerase (22,53). We present the first enzymes, arsenate reductase 1 and 2 from *C. glutamicum*, which depend for their function on as well mycothiol as on mycoredoxin with a clear link to the mycothione reductase pathway. The postulated role for transferring electrons from mycothiol to disulfide substrates has only recently been suggested for an hypothetical mycoredoxin from *Streptomyces coelicolor* (54). With the thiol/disulfide reaction path used by Cg\_ArsC, we have proven that the postulated electron transfer mechanism is a reality.



## REFERENCES

1. Messens, J., and Silver, S. (2006) *J. Mol. Biol.* **362**, 1-17
2. Mukhopadhyay, R., Rosen, B. P., Phung, L. T., and Silver, S. (2002) *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 311-325
3. Arner, E. S. J., and Holmgren, A. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 6102-6109
4. Fahey, R. C., Brown, W. C., Adams, W. B., and Worsham, M. B. (1978) *J. Bacteriol.* **133**, 1126-1129
5. delCardayre, S. B., and Davies, J. E. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 5752-5757
6. Newton, G. L., Arnold, K., Price, M. S., Sherrill, C., Delcardayre, S. B., Aharonowitz, Y., Cohen, G., Davies, J., Fahey, R. C., and Davis, C. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 1990-1995
7. Rawat, M., and Av-Gay, Y. (2007) *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 278-292
8. Silver, S. (1996) *Gene* **179**, 9-19
9. Zegers, I., Martins, J. C., Willem, R., Wyns, L., and Messens, J. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**, 843-847
10. Bennett, M. S., Guan, Z., Laurberg, M., and Su, X. D. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 13577-13582
11. Messens, J., Martins, J. C., Van Belle, K., Brosens, E., Desmyter, A., De Gieter, M., Wieruszkeski, J. M., Willem, R., Wyns, L., and Zegers, I. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8506-8511
12. Ji, G., Garber, E. A., Armes, L. G., Chen, C. M., Fuchs, J. A., and Silver, S. (1994) *Biochemistry* **33**, 7294-7299
13. Ji, G., and Silver, S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9474-9478
14. Messens, J., Martins, J. C., Brosens, E., Van Belle, K., Jacobs, D. M., Willem, R., and Wyns, L. (2002) *J. Biol. Inorg. Chem.* **7**, 146-156
15. Gladysheva, T. B., Oden, K. L., and Rosen, B. P. (1994) *Biochemistry* **33**, 7288-7293
16. Shi, J., Vlami-Gardikas, A., Aslund, F., Holmgren, A., and Rosen, B. P. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 36039-36042
17. Mukhopadhyay, R., and Rosen, B. P. (1998) *FEMS Microbiol. Lett.* **168**, 127-136
18. Zhou, Y., Messier, N., Ouellette, M., Rosen, B. P., and Mukhopadhyay, R. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 37445-37451
19. Martin, P., DeMel, S., Shi, J., Gladysheva, T., Gatti, D. L., Rosen, B. P., and Edwards, B. F. (2001) *Structure* **9**, 1071-1081
20. Mukhopadhyay, R., Bisacchi, D., Zhou, Y., Armirotti, A., and Bordo, D. *J. Mol. Biol.* **29 juli 2008**; doi:10.1016/j.jmb.2008.07.05
21. Mateos, L. M., Ordóñez, E., Letek, M., and Gil, J. A. (2006) *Int. Microbiol.* **9**, 207-215
22. Feng, J., Che, Y., Milse, J., Yin, Y. J., Liu, L., Ruckert, C., Shen, X. H., Qi, S. W., Kalinowski, J., and Liu, S. J. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 10778-10785
23. Schäfer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. (1994) *Gene* **145**, 69-73
24. Mennucci, B., and Tomasi, J. (1997) *Chem. Phys.* **106**, 5151-5158
25. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., J. A. Montgomery, J., T. Vreven, K. N. K., J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M Hada, M. Ehara, k. Toyota, R. Fukuda, Hasegawa, J., M. Ishida, T. nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J.

- B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J.A. Pople. (2003) *Gaussian 03, Revision A.1*, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA
26. Pearson, R. G. (1997) *Chemical Hardness*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany
  27. Roos, G., Loverix, S., Brosens, E., Van Belle, K., Wyns, L., Geerlings, P., and Messens, J. (2006) *Chembiochem* **7**, 981-989
  28. Ordóñez, E., Letek, M., Valbuena, N., Gil, J. A., and Mateos, L. M. (2005) *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6206-6215
  29. Mukhopadhyay, R., Shi, J., and Rosen, B. P. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 21149-21157
  30. Newton, G. L., Buchmeier, N., and Fahey, R. C. (2008) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 471-494
  31. Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B. J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Kramer, R., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Mockel, B., Pfefferle, W., Puhler, A., Rey, D. A., Ruckert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V. F., Wiegrabe, I., and Tauch, A. (2003) *J. Biotechnol.* **104**, 5-25
  32. Ikeda, M., and Nakagawa, S. (2003) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 99-109
  33. Messens, J., Hayburn, G., Desmyter, A., Laus, G., and Wyns, L. (1999) *Biochemistry* **38**, 16857-16865
  34. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402
  35. Stehr, M., and Lindqvist, Y. (2004) *Proteins* **55**, 613-619
  36. Holmgren, A. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2275-2279
  37. Bunik, V., Raddatz, G., Lemaire, S., Meyer, Y., Jacquot, J. P., and Bisswanger, H. (1999) *Protein Sci.* **8**, 65-74
  38. Gravina, S. A., and Mieyal, J. J. (1993) *Biochemistry* **32**, 3368-3376
  39. Yang, Y., Jao, S., Nanduri, S., Starke, D. W., Mieyal, J. J., and Qin, J. (1998) *Biochemistry* **37**, 17145-17156
  40. Spies, H. S., and Steenkamp, D. J. (1994) *Eur. J. Biochem.* **224**, 203-213
  41. Newton, G. L., and Fahey, R. C. (2002) *Arch. Microbiol.* **178**, 388-394
  42. Latinwo, L. M., Donald, C., Ikediobi, C., and Silver, S. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**, 67-70
  43. Ordóñez, E., Thiyagarajan, S., Cook, J. D., Stemmler, T. L., Gil, J. A., Mateos, L. M., and Rosen, B. P. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 25706-25714
  44. Li, X., and Krumholz, L. R. (2007) *J. Bacteriol.* **189**, 3705-3711
  45. DeMel, S., Shi, J., Martin, P., Rosen, B. P., and Edwards, B. F. (2004) *Protein Sci.* **13**, 2330-2340
  46. Healy, S. M., Wildfang, E., Zakharyan, R. A., and Aposhian, H. V. (1999) *Biol. Trace Elem. Res.* **68**, 249-266
  47. Achour, A. R., Bauda, P., and Billard, P. (2007) *Res. Microbiol.* **158**, 128-137
  48. Newton, G. L., Fahey, R. C., Cohen, G., and Aharonowitz, Y. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 2734-2742
  49. Bzymek, K. P., Newton, G. L., Ta, P., and Fahey, R. C. (2007) *J. Bacteriol.* **189**, 6796-6805
  50. Newton, G. L., Av-Gay, Y., and Fahey, R. C. (2000) *Biochemistry* **39**, 10739-10746
  51. Misset-Smits, M., van Ophem, P. W., Sakuda, S., and Duine, J. A. (1997) *FEBS Lett* **409**, 221-222
  52. Vogt, R. N., Steenkamp, D. J., Zheng, R., and Blanchard, J. S. (2003) *Biochem. J.* **374**, 657-666

53. Wang, R., Yin, Y. J., Wang, F., Li, M., Feng, J., Zhang, H. M., Zhang, J. P., Liu, S. J., and Chang, W. R. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 16288-16294
54. den Hengst, C. D., and Buttner, M. J. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 1201-1216
55. Duan, G. L., Zhou, Y., Tong, Y. P., Mukhopadhyay, R., Rosen, B. P., and Zhu, Y. G. (2007) *New Phytol.* **174**, 311-321

#### **Abbreviations**

As(III): arsenite; As(V): arsenate; Grx: glutaredoxin; Mrx: mycoredoxin; Trx: thioredoxin; TrxR: Thioredoxin reductase; GSH: glutathione; MSH: mycothiol; MSSM: mycothione; MTR: mycothione reductase; PCR: polymerase chain reaction; SEC, size exclusion chromatography.

#### **Acknowledgements**

This work was made possible thanks to financial support from the following institutions (i) Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB); (ii) the Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek Vlaanderen (FWO); (iii) the Onderzoeksraad of the Vrije Universiteit Brussel, and (iv) the Science and Technology Ministry from Spain (BIO2008-03234 and BIO2005-02723). GR thanks the FWO for a postdoctoral fellowship. JM is a project leader of the VIB. We would like to thank John Blanchard, Gerald Newton, Bob Fahey for sending mycothiol control samples, Jörn Kalinowski for sending the Msh-Mtr mutants, Tomas G. Villa for high-scale *C. glutamicum* culture, Georges Laus and Guy Vandebussche for mass spectrometry analysis, and Elke Brosens, Khadija Wahni for technical assistance.

## Figure legends

Figure 1: **The *arsC1*, *arsC2* genes and the genes of the MSH pathway confer As(V) resistance.** In all panels the cell density ( $OD_{600nm}$ ) of the culture in function of increasing concentration of arsenate or arsenite is shown. **A.** Resistance to arsenate of *C. glutamicum* strains: RES167 (wild type), mutant *ArsC1* (*arsC1*'), mutant *ArsC2* (*arsC2*') and mutant *ArsC1-C2* (*arsC1' arsC2'*). **B.** Resistance to arsenate of strain *ArsC1-C2* after homologous complementation analyses using genes *arsC1* (+pECarsC1), *arsC2* (+pECarsC2), *arsC1'* (+pECarsC1') and *arsC4* (+pECarsC4). Also mutant copies of the *arsC1* and *arsC2* genes with the Cys codon replaced by Ser were used for the complementation analyses (+pECarsC1\* and +pECarsC2\*) **C and D.** Resistance to arsenate (panel C) or arsenite (panel D) of *C. glutamicum* wild type (RES167) and mutant strains involved in mycothiol biosynthesis or its regeneration (*msh/mtr*). See Table S1 for details.

Figure 2: **Cg\_ArsC1/2 thiol/disulfide exchange is linked to the MSH/Mrx1-pathway.** **A.** Oxidized Trx (*trxA*) and Mrx2 as substrates for 0.2  $\mu$ M TrxR (*trxB*) were analysed in progress curves and the consumption of 500  $\mu$ M NADPH is monitored at  $OD_{340 nm}$ . **B.** Different concentrations of oxidized Mrx1 were analysed in the presence of 10  $\mu$ M (open symbols) and 100  $\mu$ M MSH (solid symbols) and the consumption of 500  $\mu$ M NADPH by 2  $\mu$ M MTR was measured at 340 nm. **C.** Progress curves with 200 nM Cg\_ArsC1 or Cg\_ArsC2, 0.47 mM MSH, 10  $\mu$ M Mrx1, 3  $\mu$ M MTR, 250  $\mu$ M NADPH and progress curves with 200 nM Cg\_ArsC1 or Cg\_ArsC2, 3  $\mu$ M Trx, 3  $\mu$ M TrxR, and 500  $\mu$ M NADPH in the presence of 100 mM As(V) are shown. ox: oxidized; red: reduced.

Figure 3: **The Cg\_ArsC kinetics are slow.** **A.** Several concentrations of arsenite and arsenate are tested in the presence of 0.47 mM MSH, 10  $\mu$ M Mrx1, and 250  $\mu$ M NADPH. **B.** Progress curves in the presence of 3  $\mu$ M MTR and 250  $\mu$ M NADPH and in which all possible combinations of As(V) (100 mM), Cg\_ArsC1 (200 nM), MSH (0.47 mM) and Mrx1 (10  $\mu$ M) were tested, are shown. **C and D.** Michaelis-Menten curves with 200 nM Cg\_ArsC1 (panel C) and Cg\_ArsC2 (panel D), 10  $\mu$ M Mrx1, 3  $\mu$ M MTR, 0.47 mM MSH, and 250  $\mu$ M NADPH in the presence of varying As(V) concentrations in 50 mM Hepes pH 8 are shown.

Figure 4: **For the reduction of arsenate with Cg\_ArsC, mycothiol and the N-terminal cysteine of Mrx1 are essential for thiol/disulfide exchange.** **A.** MSH cannot be replaced by GSH. Progress curves are shown for 0.47 mM MSH with and without 200 nM Cg\_ArsC1, and for 0.47 mM GSH with and without 200 nM Cg\_ArsC1. **B.** The N-terminal cysteine of Mrx1 is essential. Active site mutants of Mrx1 were compared in progress curves. The concentrations of As(V), Mrx1, MTR and NADPH are the same as in Fig. 3B.

Figure 5: **Cg\_ArsC1 catalyses the MSH/Mrx1-dependent reduction of arsenate to arsenite.** **A.** In 20 mM Tris/HCl pH 6.5 as buffer solution, 100 mM As(V), 0.47 mM MSH, 10  $\mu$ M Mrx1, 3  $\mu$ M MTR and 250  $\mu$ M NADPH were incubated without (grey) and with 200 nM Cg\_ArsC1 (black) at 37 °C during 30', 60' and 120'. Relative percentages of the produced As(III) are shown. **B.** Relative percentages of the produced As(III) after two hours incubation with varying sample compositions are shown. The same concentrations as in panel A were used, except when indicated. 200 nM of *ArsC2* was used. **C.** Same as in panel B., but after 16 h of incubation.

Figure 6: **The thiol/disulfide linked reaction mechanism of Cg\_ArsC.** **A.** The gas phase optimized (hf/6-31G level) mycothiol-arseno structure is shown. MSH is shown in stick, and the sulphur (S), arsenic (As) and the As(V)-oxygens in ball presentation. The optimized S-As inter-

atomic distance is 2.5 Å. **B.** Cg\_ArsC catalyzed mycothiol-arseno adduct formation. Mrx1 reduces the thiol-arseno bond, forms As(III) and a mixed mycothiol-mycoredoxin disulfide (Mrx1-S-SM). A second molecule of MSH recycles Mrx1 and forms MSSM that is reduced by the NADPH-dependent mycothione reductase (MTR).

**Table 1** Kinetic parameters of Cg\_ArsC1 and Cg\_ArsC2 under different conditions

Cg_ArsC	buffer solution	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	h
Cg_ArsC1	50 mM Hepes, pH 8	142 ± 19	32 ± 2.3	3.8	1
	50 mM Hepes, pH 8, 100 mM phosphate	130 ± 7	36 ± 1.3	4.6	1
	50 mM Hepes, pH 8, 100 mM sulfate	46 ± 3	14 ± 0.6	5.1	2.8
Cg_ArsC2	50 mM Hepes, pH 8	82 ± 13	17 ± 1.2	3.4	1
	50 mM Hepes, pH 8, 100 mM phosphate	36 ± 8	10 ± 1.1	4.6	1
	50 mM Hepes, pH 8, 100 mM sulfate	38 ± 5	7 ± 0.6	3	1.8

**Table 2:** Softness difference calculation

<i>electrophiles</i>	<i>Nucleophiles</i>		
	<i>S atom of GSH</i> $\Delta s$ (a.u.)	<i>S atom of MSH</i> $\Delta s$ (a.u.)	<i>S atom of MS</i> $\Delta s$ (a.u.)
As in $\text{HAsO}_4^{2-}$	1.47	1.37	1.15
As in $\text{CH}_3\text{S-HAsO}_2^-$	<b>0.002</b>	<b>0.09</b>	<b>2.62</b>
S in $\text{CH}_3\text{S-HAsO}_2^-$	1.19	1.28	3.81
As in $\text{CH}_3\text{S-AsO}_2^{2-}$	<b>0.87</b>	<b>0.78</b>	<b>1.74</b>
S in $\text{CH}_3\text{S-AsO}_2^{2-}$	1.35	1.44	3.96

**Table 3:** Kinetic parameters of arsenate reductases linked with different thiol nucleophiles

ArsCs	nucleophiles	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	h	references
Cg_ArsC1	MSH/Mrx	$142 \pm 19$	$32 \pm 2.3$	3.8	1	This work
Cg_ArsC2	MSH/Mrx	$82 \pm 13$	$17 \pm 1.2$	3.4	1	This work
Sc_Acr2p	GSH/Grx	35	6	2.8	2.7	Mukhopadhyay <i>et al.</i> (29)
Ec_ArsC R773	GSH/Grx	15	32	35	1	Gladysheva <i>et al.</i> (15)
Os_Acr2	GSH/Grx	12	20	27	1	Duan <i>et al.</i> (55)
Lm_Acr2	GSH/Grx	10	$5.5 \times 10^{-3}$	$10^{-2}$	1	Zhou <i>et al.</i> (18)
Sa_ArsC pI258	Trx	$68 \times 10^{-3}$	215	$5.2 \times 10^4$	1	Messens <i>et al.</i> (14)



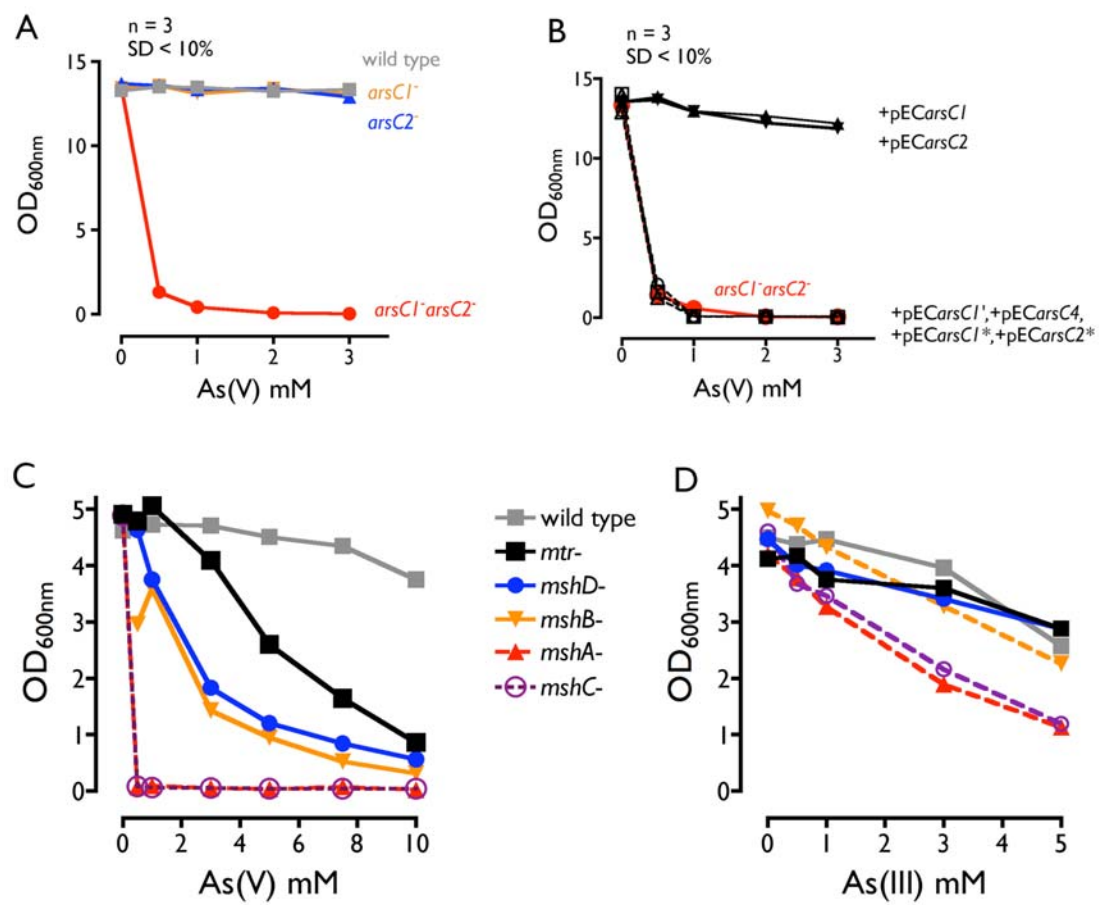


Figure 1

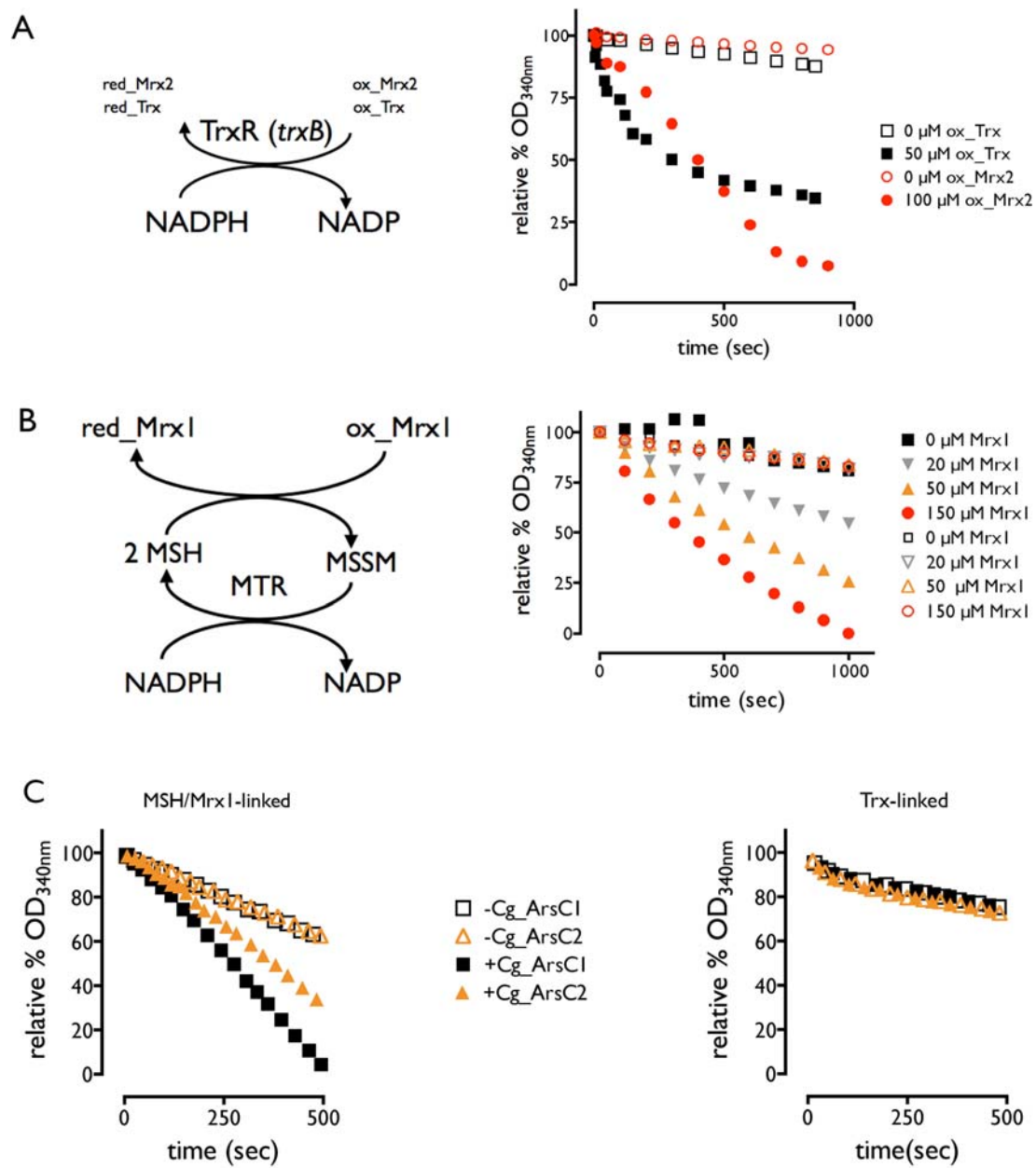


Figure 2

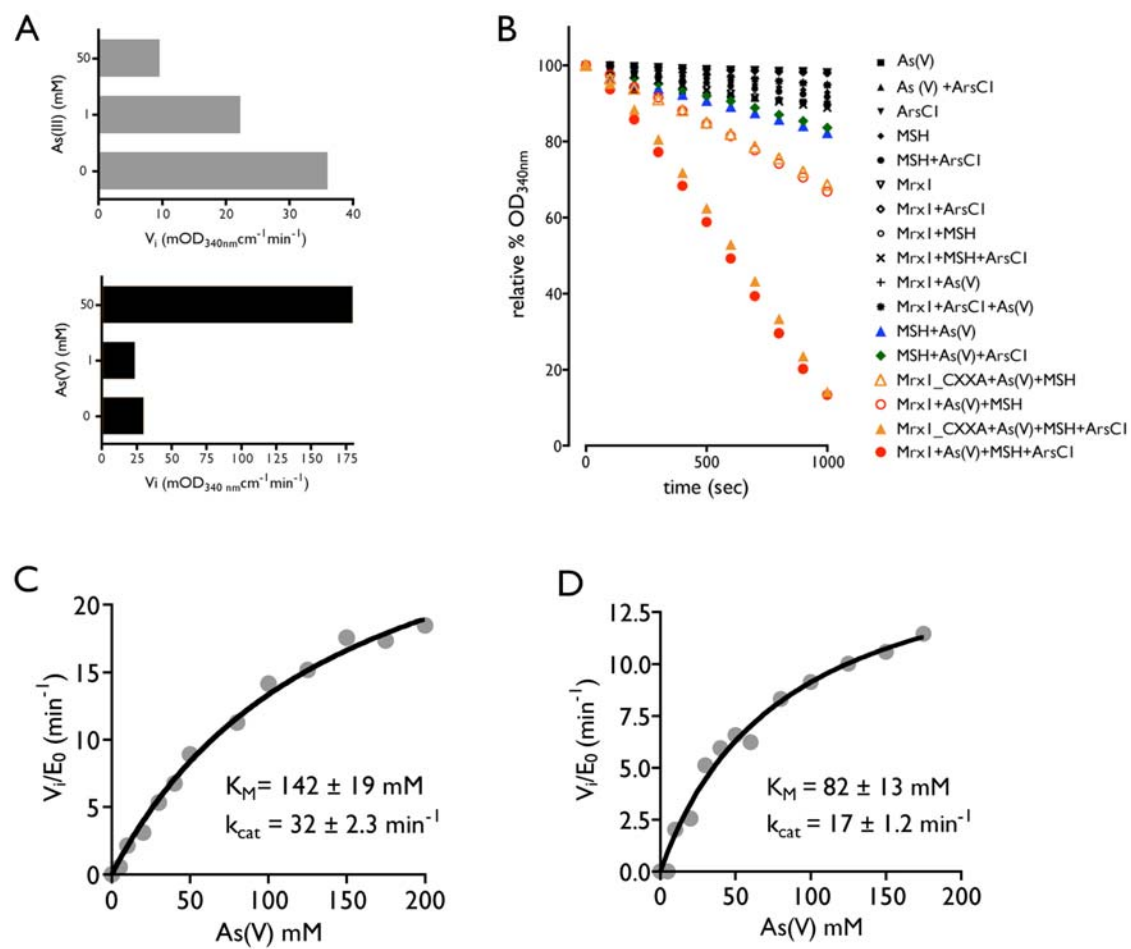


Figure 3

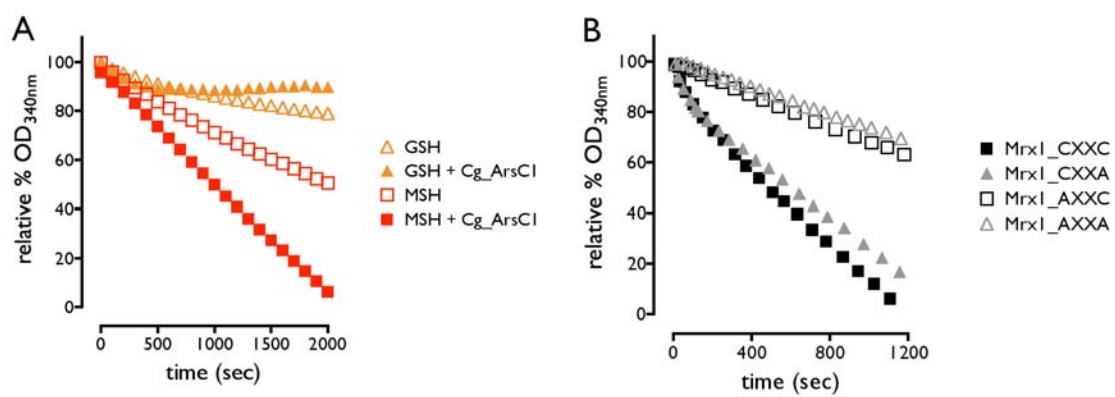


Figure 4

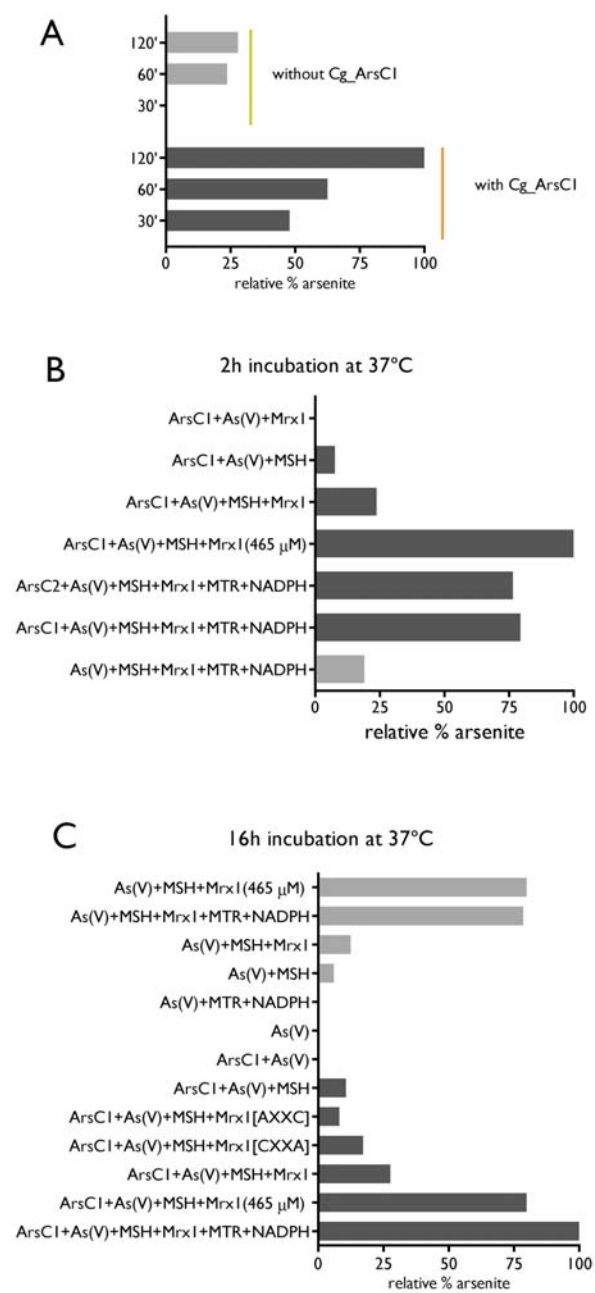


Figure 5

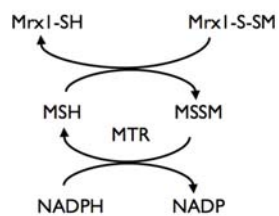
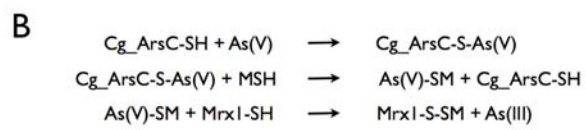
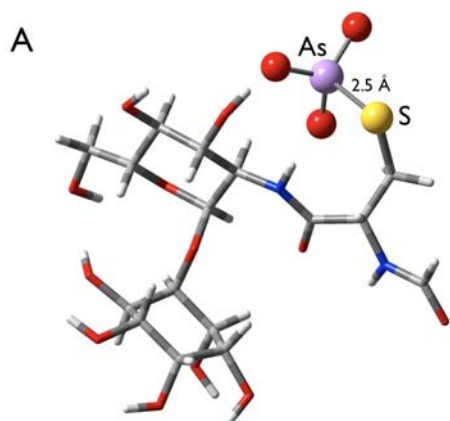


Figure 6

## *Resumen / Summary*

---





### **3. RESUMEN.**

---

En la presente memoria se ha establecido y analizado la ruta de entrada y los mecanismos moleculares de detoxificación de Arsénico (As) en la actinobacteria *Corynebacterium glutamicum*. La forma reducida de As [arsenito, As(III)] entra en las células por un sistema todavía desconocido, y es expulsado a través de las permeasas de arsenito ( $_{CG}Acr3s$ ), canales transmembrana que actúan como antiportadores de As(III). El arseniato [As(V)], al igual que ocurre en otros organismos, entra en las células a través de los sistemas de transporte específicos e inespecíficos de fosfato (tipo Pst y Pit respectivamente). El As(V) en el citoplasma es reducido a As(III) mediante la catálisis realizada por las arseniato reductasas ( $_{CG}ArsCs$ ), enzimas dependientes de micotiol (MSH) y de micorredoxina (Mrx1). El As(V) reducido a As(III) es eliminado por la ruta de expulsión de As(III) antes indicada.

En *C. glutamicum* los procesos de detoxificación de As están basados en la presencia de dos operones cromosomales de resistencia a arsénico (*ars1* y *ars2*) que contienen genes para proteínas represoras ( $_{CG}ArsR$ ), para arsenito permeasas ( $_{CG}Acr3$ ) y para arseniato reductasas ( $_{CG}ArsC$ ). La expresión de los operones *ars* es inducible por As(III), o por As(V) siempre que éste sea previamente reducido a As(III). La presencia de As(III) en el interior de la célula permite su interacción con el sitio de unión a metales del regulador  $_{CG}ArsR$  (constituido por tres cisteínas). Esto provoca cambio conformacional del represor, que le permite liberarse de la región

operadora de los operones *ars*. Las regiones promotoras de los operones quedan ahora accesibles para que las RNA polimerasas inicien la expresión de los sistemas *ars*. La reducción del As(V) citoplasmático es un proceso enzimático dependiente de las arseniato reductasas 1 y 2 ( $_{CG}ArsC1$  y  $_{CG}ArsC2$ ) que utilizan un mecanismo de acción hasta ahora desconocido y ligado al par redox MSH/Mrx1. Independientemente del mecanismo de reducción de las arseniato reductasas, una pequeña proporción de As(V) es reducido directamente mediante su interacción con el MSH. El As(III) generado sirve de señal sensorial para inducir la expresión de los operones *ars*.

## **SUMMARY.**

In the current written paper we have established and analyzed the pathway for the uptake and detoxification of arsenic in *Corynebacterium glutamicum*. As(III) enters the cells by an unknown mechanism and is directly extruded by the As(III) permeases ( $_{CG}Acr3$ ).  $_{CG}Acr3$ s are transmembrane channels acting as antiporters for As(III). As(V) enters the cells through the phosphate uptake systems (Pit and Pst). Once in the cytoplasm, As(V) is reduced to As(III) by the arsenate reductases ( $_{CG}ArsCs$ ). These enzymes depend on mycothiol (MSH) and mycoredoxin (Mrx1) for catalysis. The resulting As(III) is extruded from cells through the  $_{CG}Acr3$ s transporters.

The detoxification system for arsenic in *C. glutamicum* is based on the presence of two chromosomal As(III) inducible operons (*ars1* and *ars2*) coding for repressor proteins ( $_{CG}ArsR$ ), arsenite permeases ( $_{CG}Acr3$ ) and arsenate reductases ( $_{CG}ArsC$ ). The As(III) Metal Binding Site at the ArsR is formed by three cysteins, and undergoes a conformational change when As(III) interacts with ArsR, releasing the ArsR from the DNA. As a consequence, the *ars* promoter regions become accessible for the RNA polymerases to start the expression of the *ars* systems. The reduction of As(V) in the cytoplasm is associated to the arsenate reductases 1 and 2 ( $_{CG}ArsC1$  y  $_{CG}ArsC2$ ) which present a novel mechanism of action based on the presence of the redox pair MSH/Mrx1. In addition, As(V) can be converted to As(III) by direct interaction with MSH. This reaction, produced at a very low level, is independent of arsenate reductases and is considered a sensor mechanism that uses As(III) for induction of the *ars* operons.

## *Discusi3n general*

---



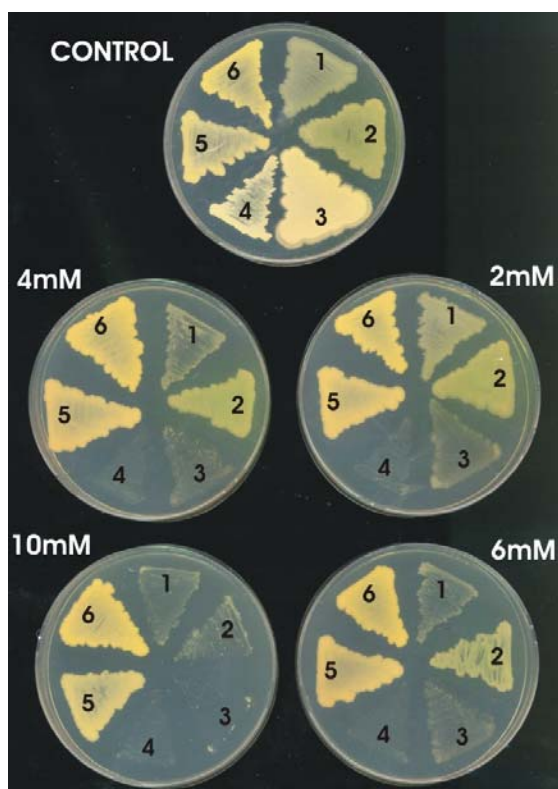
## **4. DISCUSIÓN GENERAL.**

---

Los microorganismos poseen toda una batería de genes que codifican para sistemas de resistencia y destoxificación de un amplio abanico de elementos tóxicos (Silver and Phung., 2005b). *Corynebacterium glutamicum*, como microorganismo saprófito del suelo cuenta con muchos de estos sistemas, entre ellos el sistema de resistencia a arsénico.

Las especies del género *Corynebacterium* (*C. glutamicum* ATCC 13032 y *C. glutamicum* ATCC 13869) y la especie filogenéticamente relacionada *Rhodococcus fascians* exhiben alta resistencia a arsénico. De hecho los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) a arsénico de estos microorganismos con relación al resto de especies analizadas fue significativamente superior (Ordoñez et al., 2005) (Figura 4.1).

Para la evaluación de los niveles de resistencia (CMI) se tuvieron en cuenta dos factores principales: (i) la refractariedad de las células a la incorporación del metaloide como consecuencia de unos sistemas de transporte inexistentes o incapaces de discriminar más eficientemente los diferentes sustratos; (ii) la eficiencia de los sistemas de destoxificación de arsénico.



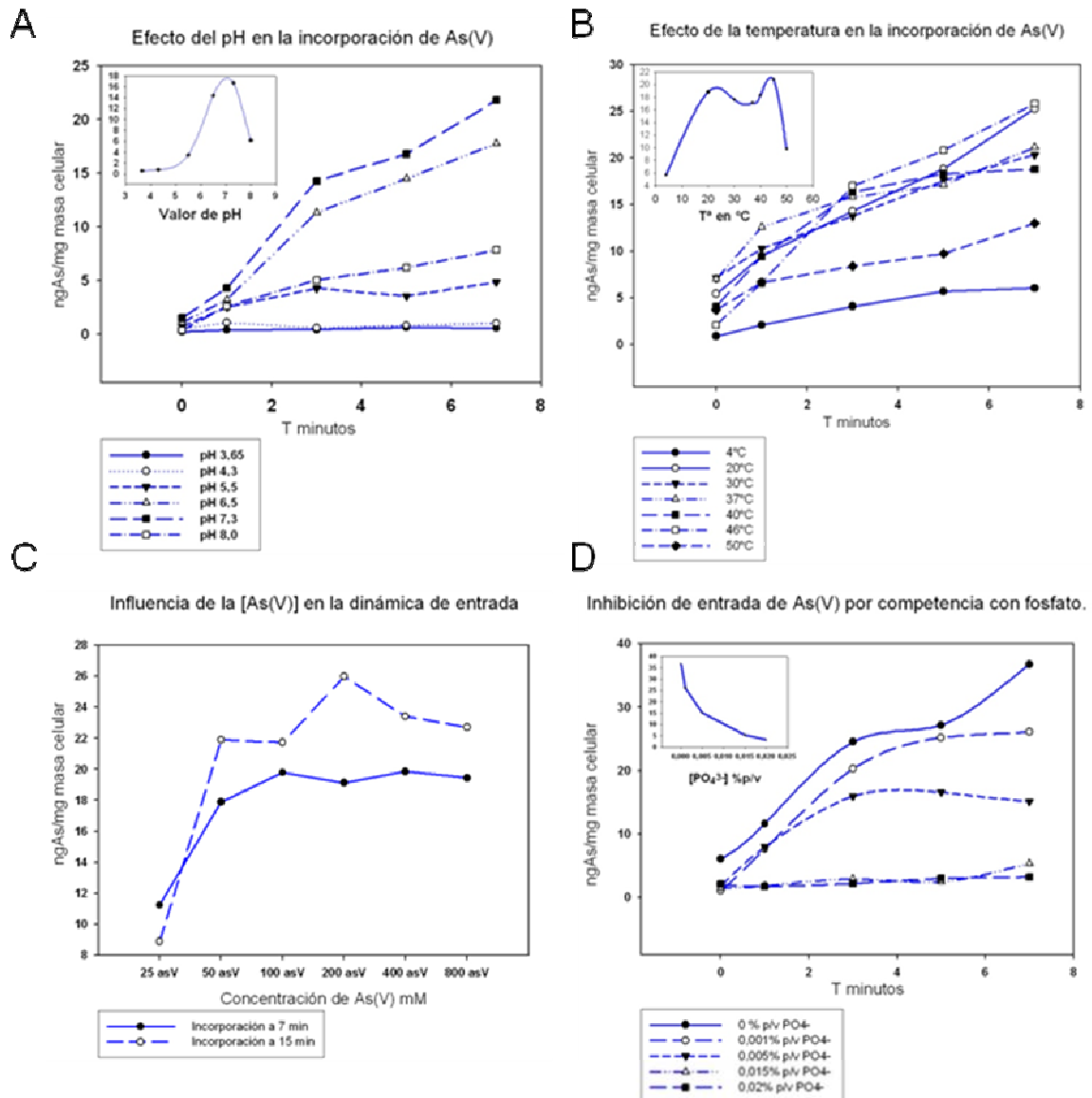
**Figura 4.1:** Analisis de resistencia a arsénico de diferentes microorganismos. En la parte superior se indican las concentraciones finales de As(III) utilizadas. (1) *Escherichia coli* (2) *Pseudomonas fluorescens* (3) *Bacillus subtilis* (4) *Staphylococcus aureus* (5) *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (6) *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869.

#### **4.1. Sistemas de incorporación de arsénico en *C. glutamicum*.**

##### **4.1.1. La incorporación de As(V) en *C. glutamicum* se produce a través de los transportadores de fosfato.**

Los sistemas de incorporación de arsénico en las células están muy conservados en todos los grupos de microorganismos (Rosen, 2002) (Meng et al., 2004) (Liu et al. 2004a).

En *C. glutamicum*, al igual que ocurre en la mayoría de los organismos, existen sistemas homólogos a los transportadores Pit y Pst. El sistema Pst (Phosphate specific transporter) de *C. glutamicum* está codificado por los ORFs Ncgl2486 (PstS) (componente secretado del sistema de transporte de fosfato); Ncgl2485 (PstC) (permeasa del sistema de transporte de fosfato); Ncgl2484 (PstA) (permeasa del sistema de transporte de fosfato) y Ncgl2483 (PstB) (ATPasa del sistema de transporte de fosfato) cuya identidad con los genes PstS, PstC, PstA y PstB del sistema Pst de *E. coli* es respectivamente del 25.3%, 34.1%, 36.7% y 53% (Rao and Torriani, 1990) El sistema Pit (Phosphate inespecific transporter) está codificado por el ORF Ncgl0445 con un 22% y 22,1% de identidad con PitA y PitB de *E. coli* (Harris et al., 2001).



**Figura 4.2:** Análisis de incorporación de As(V) en “células en reposo” de *C. glutamicum*. Influencia del pH (A) y de la temperatura (B) en la incorporación del metaloide al interior de la célula. (C) Velocidad de incorporación a concentraciones variables de As(V). (D) Influencia del fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en la incorporación de As(V). Los ensayos fueron realizados utilizando células de *C. glutamicum* RES167 en fase exponencial cultivadas en medio mínimo de corinebacterias con limitación de fosfato (Feo et al., 2007).

Los análisis llevados a cabo en células en reposo (“resting cells”) demostraron que la entrada de As(V) en *C. glutamicum* varía en función de parámetros como el pH y la temperatura (Figura 4.2A / 4.2B) y su dinámica de entrada se ajusta a un transporte saturable. En esta cinética la incorporación de As(V) es proporcional a la concentración extracelular del mismo a concentraciones bajas, pero a concentraciones mayores el transportador se satura y la línea de tendencia se vuelve asintótica (Figura 4.2C).

Por analogía al resto de microorganismos analizados (Alfasi et al., 1979) se supone que el As(V) entra en *C. glutamicum* a través de los sistemas de transporte de fosfato, como

consecuencia de la similitud estructural entre el oxianion  $\text{AsO}_4^{3-}$  y el oxianion  $\text{PO}_4^{3-}$ . De hecho las evidencias experimentales apoyan esta hipótesis, ya que la presencia de fosfato en el entorno extracelular inhibe competitivamente la entrada del metaloide (Figura 4.2D).

#### **4.1.2. La incorporación de As(III) en *C. glutamicum* se produce a través de un mecanismo desconocido.**

A pesar de que las “aquaglicerolporinas” son prácticamente ubicuas (Meng et al., 2004) (Liu et al., 2004a) (Liu et al., 2002), no están presentes en el género *Corynebacterium*. La única excepción la constituye la corinebacteria patógena *Corynebacterium diphtheriae*, en cuyo cromosoma se ha identificado la única “aquaglicerolporina” (GlpF, DIP2236) localizada hasta la fecha en el género *Corynebacterium*. La ausencia de genes *glpF* para “aquaglicerolporinas” puede ser una de las causas de la elevada resistencia de este grupo microbiano a As(III) (Ordóñez et al., 2005).

La existencia o no de “aquaglicerolporinas”, la existencia o no de operones *ars* y el tipo de ambiente o hábitat donde se desarrolla cada microorganismo parecen estar estrechamente relacionados. En este sentido los actinomicetos patógenos cuyo hospedador va a presentar habitualmente concentraciones muy bajas de metaloide podrían presentar “aquaglicerolporinas”. Los no patógenos carecerían de “aquaglicerolporinas” pero en cambio codifican operones *ars* complejos como respuesta adaptativa a ambientes con elevadas concentraciones de metaloides.

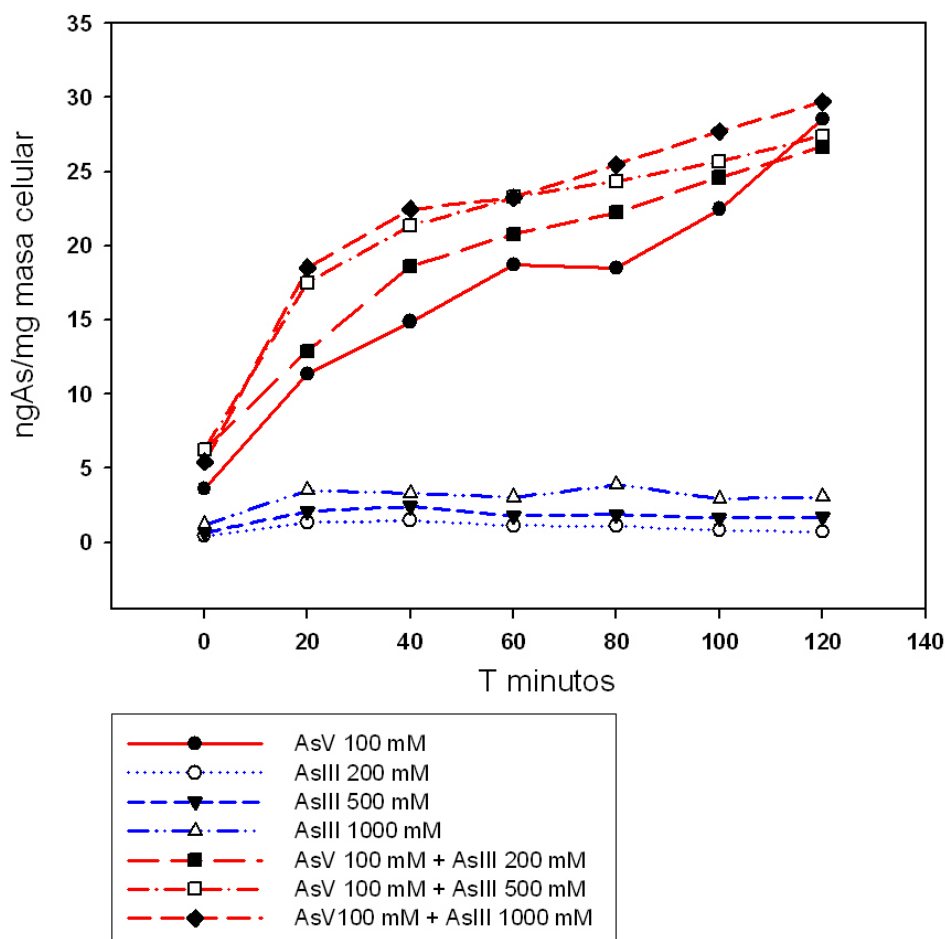
En *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito un grupo de permeasas de hexosas responsables de la incorporación de hasta un 80% de todo el As(III) que entra en la célula (Liu et al., 2004b) relegando la incorporación a través de las “aquaglicerolporinas” a niveles marginales. A pesar de que en procariotas existen transportadores de hexosas ortólogos, no se ha descrito todavía ningún caso de incorporación de As(III) por este tipo de sistemas. Uno de los microorganismos con estas permeasas de hexosas es *Streptomyces coelicolor*, actinomiceto filogenéticamente próximo a *C. glutamicum* que incorpora glucosa por las permeasas codificadas en los ORFs Sco7153 (GlcP1) y Sco5578 (GlcP2, idéntica en secuencia a GlcP1 pero no funcional) (van Wezel et al., 2005). El mecanismo de transporte de estas permeasas es diferente al de las permeasas de hexosas tipo PTS (Phosphotransferase System), cuya incorporación implica una fosforilación a nivel de sustrato (Yuan et al., 2006).

En el genoma de *C. glutamicum* se han localizado al menos dos proteínas homologas a GlcP1 de *S. coelicolor* codificadas por los “ORFs” Ncgl0175 y Ncgl2852, con una identidad del 29,4% y 26,9% respectivamente. La interrupción y la sobreexpresión homóloga y heteróloga de estos ORFs no ha modificado significativamente la dinámica de incorporación de As(III) ni en *C. glutamicum* ni en la cepa OSBR1 de *E. coli* (mutante para la aquaglicerolporina GlpF) (Sanders et al., 1997).



Al contrario de lo que sucede en *S. cerevisiae*, la presencia de azúcares en el medio extracelular tampoco modifica la cinética de incorporación de As(III) (Liu et al., 2004b). Todos estos datos sugieren que las proteínas codificadas por los ORFs Ncgl0175 y Ncgl2852 de *C. glutamicum* no participan en la incorporación de As(III).

### Incorporación de As(V) vs As(III)



**Figura 4.3:** Análisis comparativo de incorporación de As(V) y As(III). En este ensayo se pone de manifiesto que el As(V) en condiciones limitantes de fosfato entra de manera más rápida que el As(III) en *C. glutamicum*. De hecho el As(III) a concentraciones de hasta diez veces superior a las del As(V) se incorpora diez veces menos en las células.

La diferencia en la incorporación de As(V) y As(III) en *C. glutamicum* es un reflejo de la refractariedad de las células a determinados metales/metaloideos e incluso a distintas especies de los mismos. El valor absoluto de As(V) incorporado en relación al de As(III) a concentraciones equivalentes de los dos metaloides en el medio extracelular es considerablemente mayor para la forma pentavalente (Figura 4.3). En este sentido podemos afirmar que *C. glutamicum* es altamente refractario a la especie As(III), pero no a As(V). Desde un punto de vista medioambiental este aspecto tiene una importancia relevante ya que las corinebacterias, por su metabolismo aerobio ocupan nichos donde la especie predominante es As(V).

## 4.2. Sistemas de resistencia a arsénico en *C. glutamicum*.

El otro factor que condiciona la resistencia a arsénico en un microorganismo es la presencia o ausencia de sistemas celulares de resistencia/destoxificación. *C. glutamicum* posee dos operones de resistencia a arsénico con una estructura básica similar (*arsRBC*), pero con diferencias evidentes entre ellos (Ordóñez et al., 2005).

El operón *ars1* está formado por un regulador ( $_{CG}ArsR1$ , con una orientación contraria a la del resto de genes del operón) una permesa de As(III) [ $_{CG}Acr3(1)$ ] y dos reductasas de As(V) ( $_{CG}ArsC1$  y  $_{CG}ArsC1'$ ). Estudios posteriores pusieron de manifiesto la existencia de otro gen, de función desconocida, situado aguas arriba y coexpresado con *arsR1*. A este gen se le denominó *arsO* y a la proteína correspondiente  $_{CG}ArsO$ , que guarda homología con posibles monooxigenasas y/o con flavoproteínas implicadas en procesos redox aún no definidos (Wang et al., 2006). El operón *ars2* mantiene una estructura equivalente a la indicada para *ars1* pero carece de los genes para la reductasa  $_{CG}ArsC1'$  y para  $_{CG}ArsO$ . La expresión divergente del gen para el regulador en ambos operones con relación al resto de genes se relacionaría con un mayor control de la expresión (Ordóñez et al., 2005).

Los análisis y estudios llevados a cabo con posterioridad a una de las publicaciones de la presente memoria (Ordóñez et al. 2005) nos ha permitido profundizar en el conocimiento de los sistemas *ars* de *C. glutamicum*, de manera que algunos datos existentes en el trabajo indicado han sido adaptados para una mejor comprensión de los mismos. Entre estas adaptaciones cabe destacar: (i) la inclusión del gen *arsO* dentro de la estructura del operón *ars1* (ya indicado anteriormente); (ii) el cambio de nomenclatura de los genes *arsB1*, *arsB2* y *arsB3*, que pasan a denominarse *acr3(1)*, *acr3(2)* y *acr3(3)* [ $_{CG}Acr3(1)$ ,  $_{CG}Acr3(2)$  y  $_{CG}Acr3(3)$  a sus proteínas correspondientes] para ser fieles a sus relaciones filogenéticas; (iii) los genes *arsR1* y *arsR2* vieron recortados sus tamaños a consecuencia de los análisis moleculares realizados a posteriori.

La organización génica de los operones, los análisis por "Northern" Blot y los ensayos de PCR reversa pusieron de manifiesto que la expresión de los genes *acr3(1)-arsC1-arsC1'* y *acr3(2)-arsC2* se produce mediante transcritos únicos y divergentes en relación a la transcripción de *arsR1-arsO* (que forman un dicistrón) y de *arsR2* respectivamente (Ordóñez et al., 2005). Por ensayos de PCR cuantitativa (QPCR) o de PCR reversa se sabe que *acr3(3)* y *arsC4* (los dos genes *ars* no asociados a los operones) no se inducen en presencia de As(III). Por ello se considera que su papel en la resistencia a arsénico es meramente marginal, o simplemente inexistente. En lo referente a *arsO*, *arsR1*, *acr3(1)*, *arsC1*, *arsC1'*, *arsR2*, *acr3(2)*, y *arsC2* existe un incremento en el número de transcritos tras su inducción con As(III), pero este incremento no se produce en la misma cuantía en todos los genes, de hecho los genes *arsR1*, *arsO* y *arsR2* mantienen una inducción significativamente menor que la del resto de genes estructurales del operón.

Mediante estudios “in vitro” de anisotropía de fluorescencia se determinó que el As(III) y el Sb(III) [pero no el As(V)] promueven la liberación del represor  $_{CG}ArsR1$  de la región promotora/operadora de los operones *ars* y por lo tanto la desrepresión del sistema. Usando vectores sonda de promotores que utilizan la fluorescencia de la proteína verde (GFP) como indicador de expresión (“gen reporter”) se determinó “in vivo” que el sistema se induce por As(III) [y por As(V) previa conversión a As(III)] pero no lo hacen otros elementos como el Sb(III), el bismuto, fosfato, fosfito, nitratos o nitritos al contrario de lo que sucede en otros microorganismos (Rosenstein et al., 1992) (Ji and Silver., 1992a).

La razón de la inducción del sistema por parte del Sb(III) “in vitro” pero no “in vivo” tiene relación con la geometría del sitio de unión a metales del represor  $_{CG}ArsR1$  y se abordara con mayor profundidad más adelante. De hecho el Sb(III) interacciona muy eficientemente con el sitio de unión a metales de  $_{CG}ArsR1$  y libera el regulador de la región operadora (Ordóñez et al., 2008). La ausencia de inducción “in vivo” parece ser consecuencia de la baja permeabilidad de *C. glutamicum* al Sb(III).

El As(V) no induce el sistema “in vitro” por su incapacidad para interactuar con el sitio de unión a metales del regulador (Ordóñez et al., 2008). La inducción “in vivo” es por lo tanto consecuencia de su reducción a As(III). Inicialmente se creía que una expresión basal de las reductasas sería la responsable de la reducción inicial del As(V) a As(III), pero estudios empíricos posteriores (Ordóñez et al., 2009) pusieron de manifiesto que el micotiol (MSH) es capaz por si solo de reducir el As(V) sin necesidad de actividad enzimática alguna.

Los análisis funcionales de los operones *ars1* y *ars2* realizados mediante deleciones, interrupciones y sobreexpresiones homólogas y heterólogas pusieron de manifiesto que los dos operones son funcionales y condicionan la resistencia a As(III) y a As(V) en *C. glutamicum*. *C. glutamicum*  $2\Delta ars$  (Ordóñez et al., 2008), cepa que carece de los operones *ars1* y *ars2* es hipersensible tanto a As(III) como a As(V). Sus valores de CMI para el As(III) y el As(V) son de 0,5 mM en ambos casos [donde la CMI de la cepa silvestre es de 12 mM para As(III) y 100 mM para As(V)]. La expresión en multicopa del operón *ars1* [*arsR1-acr3(1)-arsC2*] y *ars2* [*arsR2-acr3(2)-arsC2*] en *C. glutamicum*  $2\Delta ars$  o en cualquiera de los mutantes adecuadamente diseñados revirtió los fenotipos de las cepas receptoras, superándose en todos los casos la CMI de la cepa silvestre y alcanzando valores de CMI de [hasta 60 mM para As(III) y 500 mM para As(V)].

#### **4.2.1. La región intergénica *arsR-acr3* dirige y controla la expresión de los operones con $_{CG}ArsR1$ y $_{CG}ArsR2$ actuando en “trans” sobre ellas.**

En las regiones intergénicas *arsR1-acr3(1)* (80 nt) y *arsR2-acr3(2)* (81 nt) se localizan las regiones promotoras/operadoras de ambos operones, secuencias de reconocimiento de RNA polimerasas y de  $_{CG}ArsRs$ , de cuya interacción va a depender la pauta de expresión de los 2

operones *ars*. La caracterización bioinformática y empírica (ensayos por huella genética y amplificación al azar "RACE") de la región intergénica de *ars1* reveló la existencia de una región palindrómica donde interaccionan los  $_{CG}ArsRs$ .  $_{CG}ArsRs$  y RNA polimerasas ocupan un espacio estérico equivalente en el DNA, de manera que la unión del homodímero de  $_{CG}ArsR$  a la secuencia palindrómica del operador (Ji and Silver, 1992a) (Bose et al., 2006) (Wu and Rosen, 1993) (Lopez-Maury et al., 2003) imposibilita la interacción de las RNA polimerasas con los promotores. Sólo cuando  $_{CG}ArsR$  es liberado del DNA por unión de los metaloides a su sitio de unión a metales, la RNA polimerasa es capaz de interaccionar con los promotores e iniciar la expresión del operón. Los regiones promotoras tienen una orientación enfrentada, y en ambos casos contienen parte de la secuencia del palíndrome del operador. Esto permite una expresión diferencial de una y otra parte del operón y un control más preciso de la expresión.

La homología existente entre las regiones intergénicas de *ars1* y *ars2* (72,5%) sugiere un mecanismo de control común para los dos operones. De hecho  $_{CG}ArsR1$  y  $_{CG}ArsR2$  (reguladores con una identidad protéica del 63,1%) son capaces de interaccionar con la propia región promotora/operadora (en "cis") y con la región promotora/operadora del otro operon (en "trans") (Ordóñez et al., 2008). Es decir,  $_{CG}ArsR1$  puede reprimir eficientemente la expresión del operón *ars2* en ausencia de  $_{CG}ArsR2$  y viceversa.

#### **4.2.2. Los reguladores de *C. glutamicum* presentan un sitio de unión a metales atípico y responden a variaciones ambientales de As(III) y Sb(III).**

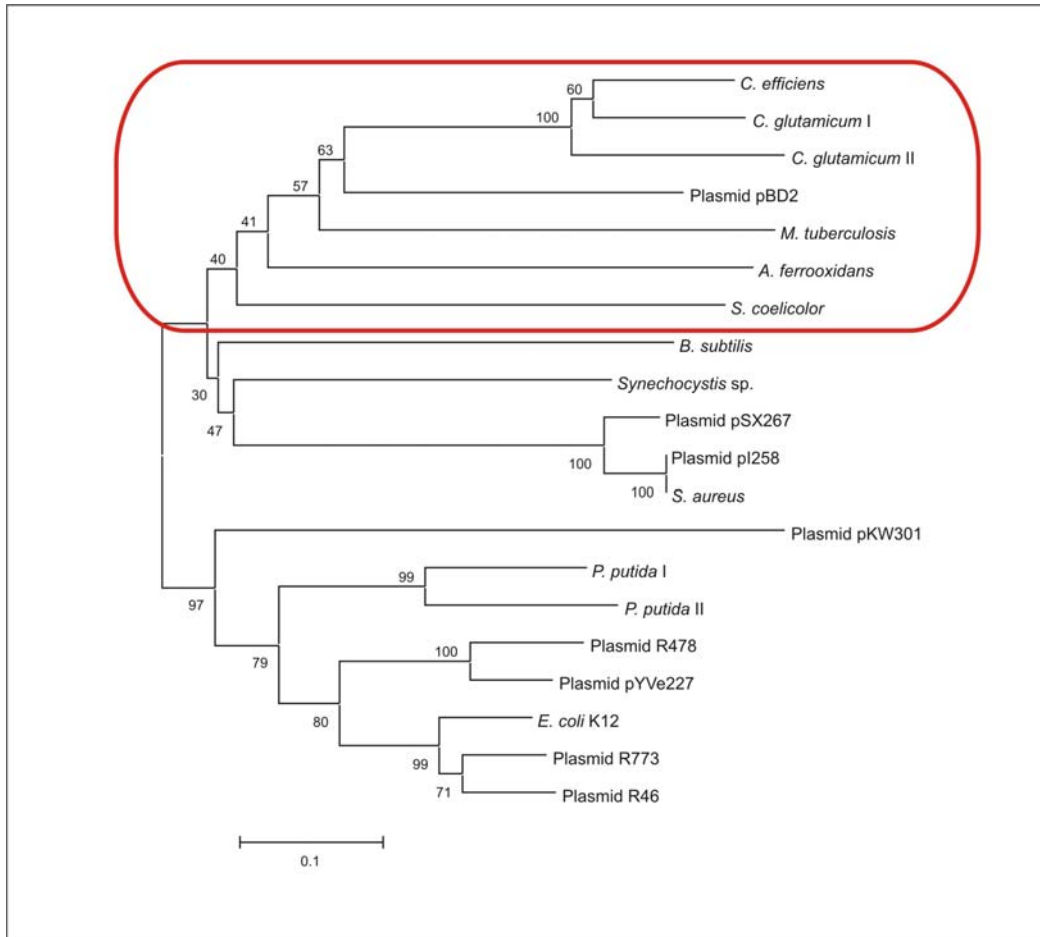
El arsénico presente en el citoplasma de las células produce una serie de efectos nocivos, frente a los cuales la célula responde poniendo en marcha una serie de mecanismos de defensa. Pero ¿cómo percibe la célula la existencia de metaloides en su citoplasma? Los miembros de la familia de proteínas metaloreguladores *ArsR/SmtB* son los responsables de esta función (Bose et al., 2006). Estos metaloreguladores se unen específicamente al arsénico y a otros metales tóxicos, controlando de esta forma la expresión de los genes implicados en su transformación y/o expulsión.

Los reguladores de *C. glutamicum* ( $_{CG}ArsR1$  y  $_{CG}ArsR2$ ) son los metaloreguladores de respuesta a As en este microorganismo. En su secuencia protéica se localizan tres residuos de cisteína, dos de los cuales se encuentran en el extremo N-terminal de la proteína, mientras que el tercer residuo se encuentra cerca de la región central de unión al DNA (centro activo), pero no incluida en la misma.

##### **4.2.2.1. $_{CG}ArsR1$ y $_{CG}ArsR2$ tienen un sitio de unión a metales atípico.**

El alineamiento múltiple de  $_{CG}ArsR1$  y  $_{CG}ArsR2$  con otros homólogos de *ArsR* y *CadC* utilizando como base del mismo la estructura secundaria de estos homólogos (Ordóñez et al.,

2008) revela que  $_{CG}ArsR1$  y  $_{CG}ArsR2$  guardan una homología del 66% entre si y mantienen un alto grado de conservación en relación a otros miembros de la familia de metaloreguladores ArsR/SmtB. Desde un punto de vista filogenético se observa como los reguladores de *C. glutamicum* y los microorganismos de los taxones relacionados (actinomicetos) forman un grupo propio y claramente diferenciado (Figura 4.4).



**Figura 4.4:** Analisis filogenético obtenido por el método de *neighbour-joining* mostrando las distancias evolutivas existentes entre los diferentes represores de arsénico de la familia ArsR/SmtB (Kumar et al., 2004). Los números representados son porcentajes obtenidos por “bootstrapping” (1000 réplicas). Los represores ArsRs de actinomicetos se engloban en un grupo común (resaltado con un marco rojo) que se diferencia con claridad de los reguladores de bacterias Gram positivas de bajo contenido en G+C y a mayor distancia de las Gram negativas.

Aunque  $_{CG}ArsR1$  y  $_{CG}ArsR2$  carecen de los sitios de unión identificados en los metaloreguladores homólogos (San Francisco et al., 1990) (Shi et al., 1994) (Quin et al., 2007) (Yoon et al., 1991), conserva en su secuencia aminoacídica tres residuos de cisteína (Cys<sup>15</sup>, Cys<sup>16</sup> y Cys<sup>55</sup>). Al igual que ocurre en el metaloregulador CadC de *S. aureus*,  $_{CG}ArsR1$  tiene un dominio HTH (“Helix Turn Helix”) de unión al DNA formado por las hélices 4 y 5 (Ordóñez et al., 2008). En el CadC el sitio de unión a Cd(II) esta formado por los residuos Cys<sup>58</sup> y Cys<sup>60</sup> de la hélice 4 de una de las subunidades y la Cys<sup>7</sup> y Cys<sup>11</sup> de la región N-terminal de la otra subunidad. Puesto que  $_{CG}ArsR1$  no tiene sus residuos de cisteína localizados en esas

posiciones, se propone que Cys<sup>55</sup> está localizado justo antes de la hélice 4 y que Cys<sup>15</sup> y Cys<sup>16</sup> están en la hélice 1. Esos tres residuos de cisteína formarían un triple enlace coordinado con el As(III), pero en este caso Cys<sup>15</sup> y Cys<sup>16</sup> pertenecen a una subunidad y Cys<sup>55</sup> pertenece a la otra.

#### **4.2.2.2. Los residuos de cisteína de *c<sub>CG</sub>ArsR1* son esenciales para la metaloregulación.**

Los ensayos realizados sobre *c<sub>CG</sub>ArsR1* demostraron la implicación de estas cisteínas en la metaloregulación. En los estudios “In vivo” utilizando una cepa carente de reguladores, los genes controlados por los promotores *ars* se expresan de manera constitutiva. La codificación cromosomal de cualquiera de las versiones de *c<sub>CG</sub>ArsR1* reprime la expresión de los genes controlados por los promotores *ars*, y tan solo la versión silvestre de *c<sub>CG</sub>ArsR1* es capaz de liberarse del operador cuando el As(III) [y en menor medida el Sb(III)] está presente en el citoplasma (Ordóñez et al., 2008).

Resultados similares se obtuvieron en los análisis “in vitro” por anisotropía de fluorescencia. Tanto la versión silvestre de *c<sub>CG</sub>ArsR1* como los diferentes mutantes de cisteína son capaces de unirse a la región intergénica aunque con afinidades que varían desde los 0,5  $\mu$ M hasta los 2  $\mu$ M. Solamente la versión silvestre es capaz de revertir el incremento en la polarización y consecuentemente su interacción con el operador tras la adición de As(III) o Sb(III) a la mezcla de reacción, obteniendo constantes de disociación de 150  $\mu$ M y 10  $\mu$ M respectivamente.

Por lo tanto los residuos de cisteína no son necesarios para la unión de *c<sub>CG</sub>ArsR1* a la región promotora/operadora de los operones *ars*, pero sí para su disociación del operador. De hecho, el triple mutante de cisteínas de *c<sub>CG</sub>ArsR1* es capaz de reprimir la expresión del gen indicador “in vivo” y de incrementar “in vitro” la polarización de la luz cuando se añade a la mezcla de reacción en los análisis por anisotropía.

Con los ensayos tipo EMSA (Electro Mobility Shift Assays) se demostró que *c<sub>CG</sub>ArsR1* y *c<sub>CG</sub>ArsR2* interactúan tanto en “cis”, como en “trans” sobre las señales reguladoras de los operones *ars1* y *ars2* y todo ello a pesar de que estas regiones intergénicas poseen secuencias palindrómicas diferentes (Ordóñez et al., 2008).

Los ensayos de sobrecruzamiento de *c<sub>CG</sub>ArsR1* pusieron de manifiesto que *c<sub>CG</sub>ArsR1* se ajusta al modelo en el que los grupos tiol de los residuos Cys<sup>15</sup> y Cys<sup>16</sup> de uno de los monómeros están lo suficientemente cerca del tiolato del residuo Cys<sup>55</sup> del otro monómero como para establecerse un sobrecruzamiento/interacción entre sí en presencia de un agente como el dibromobimano (Ordóñez et al., 2008). Los resultados obtenidos indican que los residuos de cisteína son necesarios para la dimerización y la emisión de fluorescencia y que los residuos Cys<sup>15</sup> y Cys<sup>16</sup> están a una distancia de 3-6 Å del grupo tiol del residuo Cys<sup>55</sup>. Estos resultados

son también congruentes con la hipótesis de que el sitio de unión a As(III) de *CGArsR1* está compuesto por dos residuos de cisteína de una subunidad y otro residuo de cisteína de otra subunidad.

El modelo de *CGArsR1* sugiere por lo tanto que el complejo ternario As-S<sub>3</sub> se forma intermolecularmente entre las cisteínas Cys<sup>15</sup> y Cys<sup>16</sup> en la hélice H1 de un monómero y la Cys<sup>55</sup>, localizada justo antes de la hélice H4 del HTH del centro activo del otro monómero. Esta situación se podría considerar una reminiscencia del sitio de unión a Cd(II) en CadC, el cual está formado por cuatro grupos sulfidrilo localizados en dos subunidades diferentes. Sin embargo la posición de los residuos de cisteína de *CGArsR1* no se alinea con lo observado para CadC. Por lo tanto y en base a estos datos, es bastante probable que el sitio de unión a As(III) de *CGArsR1* evolucionase de manera independiente a lo observado para otros reguladores ArsR (R773 de *E. coli* o de *Acidithiobacillus ferrooxidans*), o a los sitios de unión a Cd(II) de CadC.

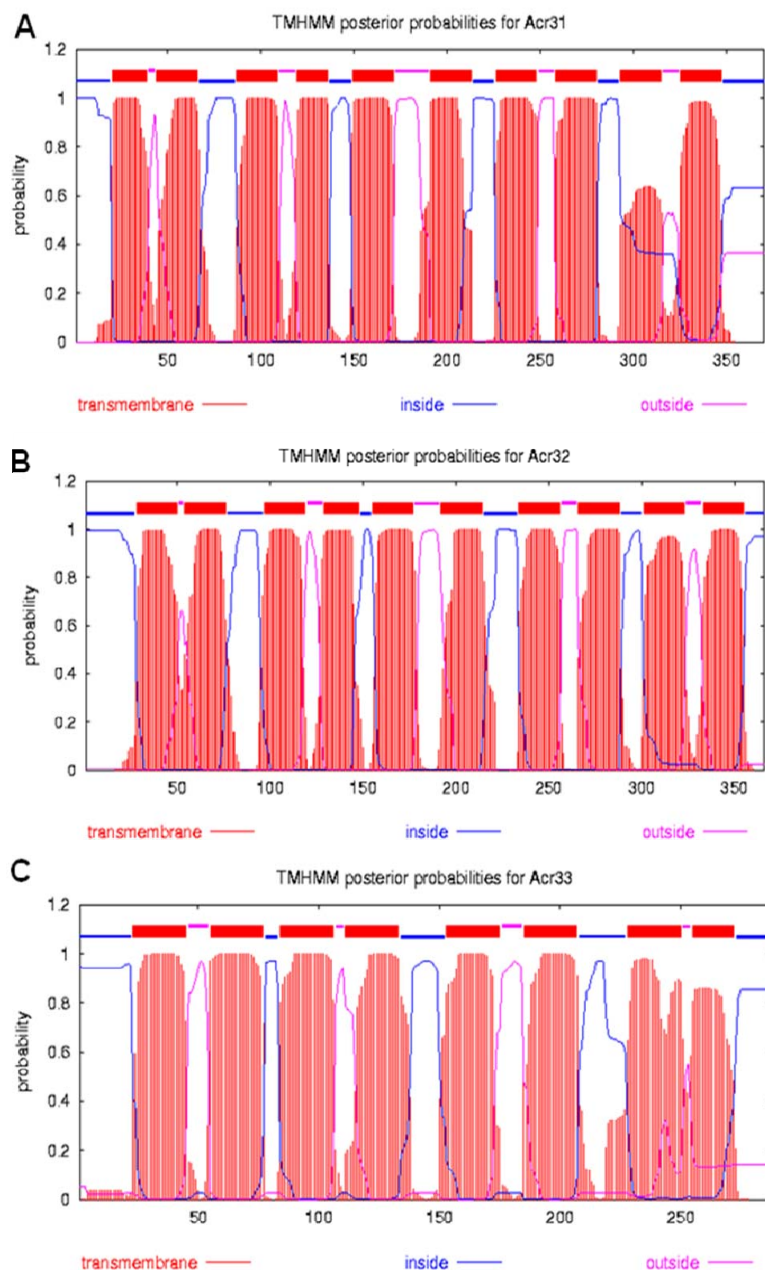
Como se ha discutido previamente los residuos para la interacción con los metaloides se localizan al inicio o al final de una hélice  $\alpha$ , donde el desenrollamiento de la misma a partir de uno de los extremos provocaría un cambio conformacional que ocasiona su disociación de la región operadora. Este mecanismo es exactamente el mismo que se propone para *CGArsR1*.

#### **4.2.3. Las arsenito permeasas de *C. glutamicum* (*CGAcr3s*) expulsan eficientemente As(III) por un mecanismo no acoplado energéticamente al ATP.**

Los sistemas de expulsión de As(III) en procariontes están formados por proteínas transmembrana que presentan dos mecanismos básicos de acoplamiento energético: (i) acoplamiento con el potencial de membrana (electroquímico), actuando como uniportadores que expulsan el anión As(III) en respuesta al potencial positivo del exterior de la membrana; (ii) acoplamiento energético a una ATPasa (ArsA) que hidroliza el ATP para proporcionar la energía suficiente como para expulsar el As(III).

En bacterias, arqueas y hongos se han identificado tres tipos diferentes de canales transmembrana para la detoxificación de As(III) (Ghosh et al., 1999) (Meng, et al., 2004) (Sato and Kobayashi, 1998), que podemos clasificar en base al número de segmentos transmembrana, el tipo de sustratos que transportan y la familia a la que pertenecen: ArsB en *Escherichia coli*, Aqps en *Sinorhizobium meliloti* (Yang et al., 2005) y Acr3p en *Saccharomyces cerevisiae* (Bobrowicz et al., 1997).

ArsB al igual que otras proteínas de la familia MFS (Major Facilitator Superfamily) (Abramson et al., 2004) tiene una topología con 12 segmentos transmembrana y posee capacidad de transporte dual, tanto para As(III) como para Sb(III) (Meng et al., 2004); hasta la fecha no se ha descrito ninguna proteína ortóloga a ArsB en eucariotas, situación que no ocurre con las otras dos familias.



**Figura 4.5:** Análisis predictivo de regiones transmembrana mediante al algoritmo TMHMM (Krogh et al., 2001) de las diferentes  $c_{6}Acr3s$  de *C. glutamicum*. Es destacable en este análisis la existencia de 10 segmentos transmembrana en  $c_{6}Acr3(1)$  y  $c_{6}Acr3(2)$  (figuras A y B) mientras que en  $c_{6}Acr3(3)$  (figura C) se reducen a 6-8 segmentos.

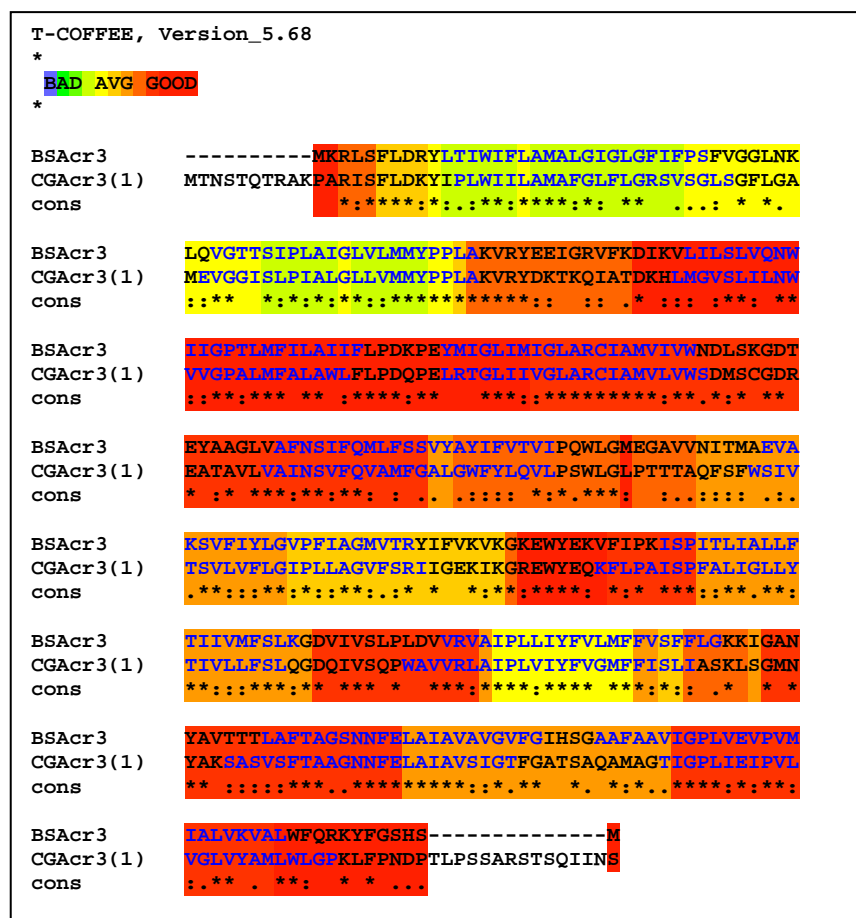
Las proteínas de la superfamilia BART (Bile Arsenite Riboflavine Transporter) a la que pertenecen la Acr3p de *S. cerevisiae* cuenta con representantes tanto en procariotas como en eucariotas y poseen una topología con 10 segmentos transmembrana (Aaltonen and Silow, 2008). La presencia de miembros de la familia de Acr3 en microorganismos es más frecuente que los representantes de la familia de ArsB, en contra de lo que inicialmente se pensaba. La proteína Acr3 está presente en la membrana plasmática y expulsa As(III), acoplado al motivo de fuerza protónica pero no As(V), Sb(III), telurito, cadmio u óxido de fenilarsina (Wysocki et al., 1997). No obstante Sato and Kobayashi, (1998) describieron que la proteína Acr3 de *Bacillus*



*subtilis* ( $_{BS}Acr3$ ) (denominada ArsB por los autores) expulsa tanto As(III) como Sb(III). En este grupo de proteínas el mecanismo de transporte aun no ha sido establecido con exactitud, pero parece probable que se trate de un uniportador o bien un antiportador catiónico (Aaltonen and Silow, 2008).

La aquaglicerolporina AqpS de *Sinorhizobium meliloti* (Yang et al., 2005) expulsa As(III) a favor de gradiente de concentración, por lo que la destoxicación de As(III) es posible sólo cuando el As(V) existente en el exterior se reduce citoplasmáticamente a As(III).

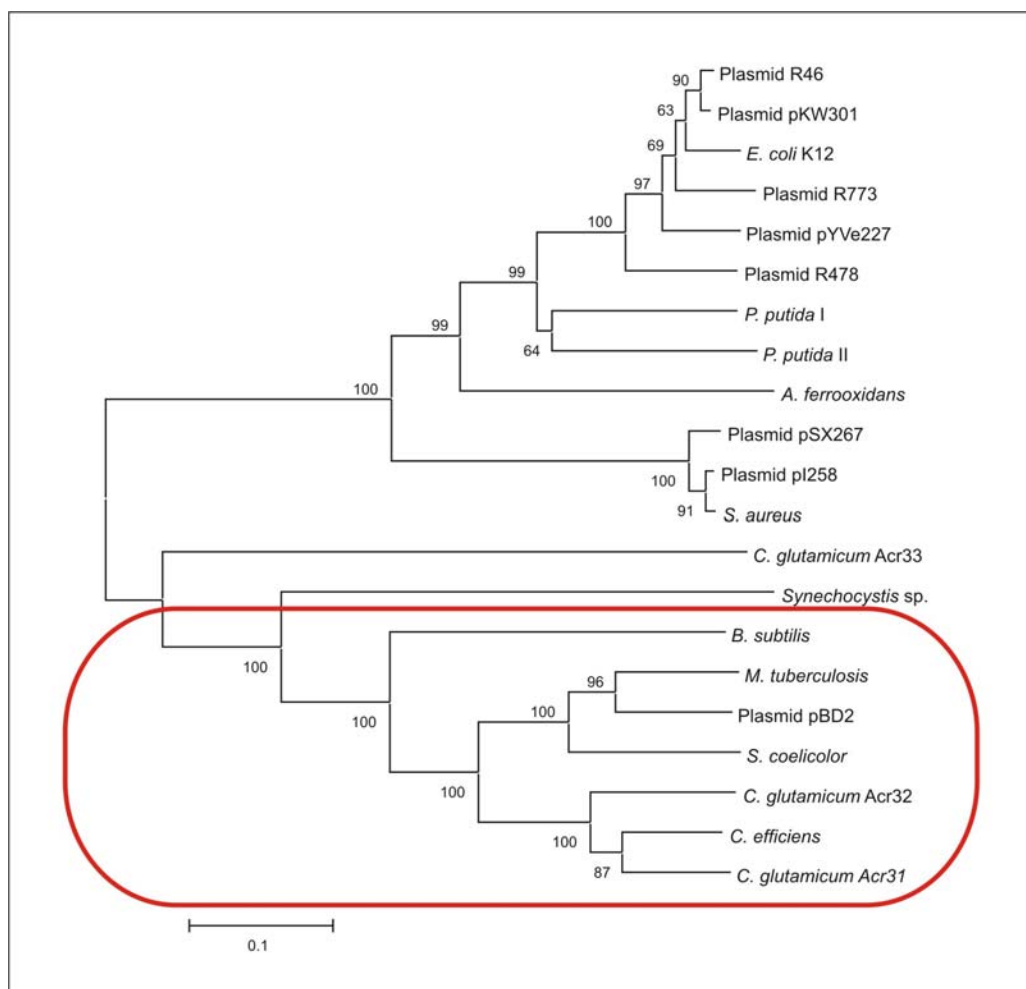
#### 4.2.3.1. Las arsenito permeasas de *C. glutamicum* pertenecen a la superfamilia BART.



**Figura 4.6:** Alineamiento de  $_{BS}Acr3$  (antes ArsB y denominada en la figura BS Acr3) y  $_{CG}Acr3(1)$  de *C. glutamicum* [denominada en la figura CG Acr3(1)] realizado mediante el algoritmo T- Coffee (Poirot et al., 2003). En este alineamiento se pretende resaltar el paralelismo existente entre las dos proteínas a nivel de sus segmentos transmembrana (color de fuente en azul). Los datos de hidrofobicidad de  $_{CG}Acr3(1)$  obtenidos mediante TMHMM (Krogh et al., 2001) y los obtenidos a partir de la topología de  $_{BS}Acr3$  (Aaltonen and Silow, 2008) permiten sugerir que estas dos proteínas son funcionalmente equivalentes.

Las proteínas  $_{CG}Acr3(1)$  y  $_{CG}Acr3(2)$  poseen un perfil hidrofóbico con diez teóricos segmentos transmembrana (Figura 4.5), aunque el noveno segmento de  $_{CG}Acr3(1)$  posee un

carácter hidrofóbico bajo. La permeasa  $_{CG}Acr3(3)$  posee tan solo de 6 a 8 segmentos transmembrana, por lo que posiblemente  $_{CG}Acr3(3)$  sea un transportador truncado y por lo tanto no funcional. Si analizamos la topología de la proteína  $_{BS}Acr3$  y la combinamos con los resultados de hidrofobicidad de  $_{CG}Acr3(1)$  observamos como la posición relativa de los segmentos transmembrana de estas proteínas se conservan de manera muy fidedigna (Figura 4.6).



**Figura 4.7:** Análisis filogenético obtenido por el método *neighbour-joining* mostrando las distancias evolutivas existentes entre los diferentes transportadores de As(III) (Kumar et al., 2004). Los números representados son porcentajes obtenidos por "bootstrapping" (1000 réplicas). Los transportadores de As(III) de actinomicetos se engloban en un grupo común (resaltado con un marco rojo) que se diferencia con claridad de los transportadores de As(III) de bacterias Gram positivas de bajo contenido en G+C y de las Gram negativas. Es de reseñar la clara división de los transportadores en dos grupos, uno de los cuales engloba a transportadores de la superfamilia MFS y el otro a los de la superfamilia BART (parte superior e inferior respectivamente).

En el análisis comparativo de  $_{CG}Acr3(1)$ ,  $_{CG}Acr3(2)$  y  $_{CG}Acr3(3)$  con la  $Acr3p$  de *S. cerevisiae* ( $_{SC}Acr3p$ ) o con la permeasa  $_{BS}Acr3$  se obtienen identidades del 70,9 %, 31,2 % y 31,7 % y del 46,5 %, 47 % y 16,7% respectivamente. Mientras que la identidad con proteínas pertenecientes a la superfamilia MFS ( $_{R773}ArsB$  de *E. coli*) se reduce a niveles del 17,3 %, 16,5% y 12,9%

Filogenéticamente  $_{CG}Acr3(1)$  y  $_{CG}Acr3(2)$  y en menor medida  $_{CG}Acr3(3)$  forman un grupo propio que engloba a los teóricos transportadores de As(III) de los actinomicetos, y un poco más alejadas estarían  $_{BS}Acr3$  y la  $_{SC}Acr3p$ , proteínas pertenecientes al grupo de transportadores de la superfamilia BART (Figura 4.7). Las proteínas de la superfamilia MFS, con representantes tanto de Gram positivos como de Gram negativos se encuentran en un grupo totalmente independiente del anterior.

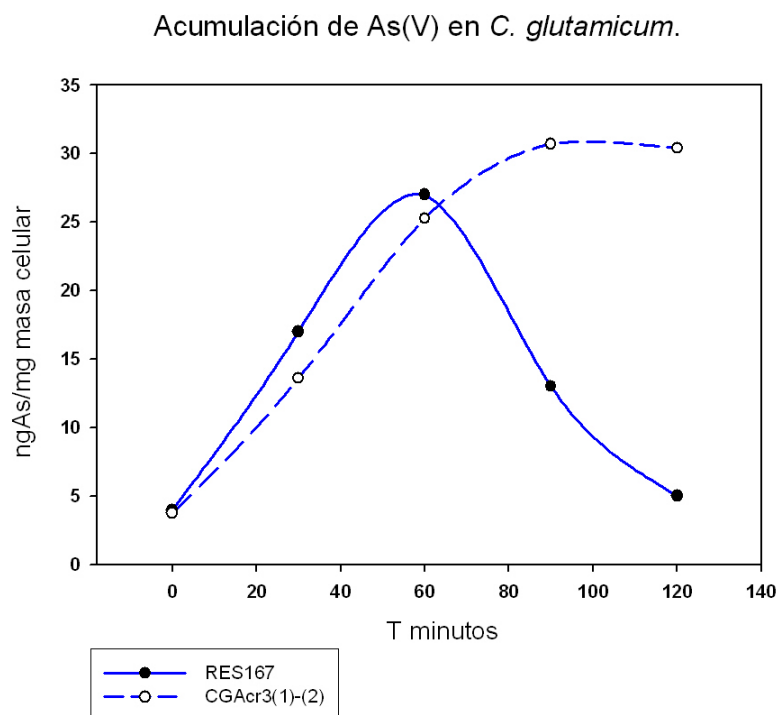
Estas evidencias, sumado a que la expresión heteróloga de las permeasas  $_{CG}Acr3(1)$  y  $_{CG}Acr3(2)$  en *E. coli* (A.F. Villadangos, no publicado) proporciona resistencia a As(III) pero no a Sb(III), permite la asignación de  $_{CG}Acr3(1)$  y  $_{CG}Acr3(2)$  dentro de la superfamilia BART.

#### **4.2.3.2. Las permeasas $_{CG}Acr3(1)$ y $_{CG}Acr3(2)$ participan en la detoxificación de As(III) y As(V), y su interrupción provoca la acumulación de As en *C. glutamicum*.**

Los transportadores  $_{CG}Acr3(1)$  y  $_{CG}Acr3(2)$  son imprescindibles para la resistencia tanto a As(III) como a As(V) en *C. glutamicum*, y cooperan de manera coordinada para alcanzar los niveles de resistencia a As de la cepa silvestre. La permeasa  $_{CG}Acr3(3)$  no es funcional y no parece tener papel alguno en la resistencia a As (Ordóñez et al., 2005).

La sensibilidad a As(V) observada en los análisis de interrupción génica de las  $_{CG}Acr3s$  (Ordóñez et al., 2005) merece un análisis más profundo, ya que podría tener un doble origen: (i) bloqueo de la expresión de las reductasas asociado al efecto polar de la interrupción de  $_{CG}Acr3(1)$  y  $_{CG}Acr3(2)$ ; (ii) acumulación de As(III) por reducción del As(V). En el primer caso la menor conversión de As(V) a As(III) provocaría la acumulación de As(V), pero el patrón de expresión de los operones (Ordóñez et al., 2005) descarta esta hipótesis, ya que los genes para las reductasas poseen promotores propios que aseguran su expresión.

En este sentido la interrupción de *acr3(1)* y *acr3(2)* bloquearía los sistemas de detoxificación y provocaría una acumulación citoplasmática de As(III). Esto se pone de manifiesto en los análisis de acumulación realizados con las células de los mutantes interrumpidos en las permeasas (Ordóñez et al., 2005). A pesar de que en estos ensayos se utilizan células en reposo, la presencia de As(III) en el citoplasma induce la expresión de los operones *ars*. Esta pauta es congruente con una acumulación inicial del metaloide que revierte tras un período de respuesta de las células (establecido en 1 hora) y observado en la cepa silvestre (RES167) (Figura 4.8), en el mutante para  $_{CG}Acr3(1)$  [con el gen *acr3(1)* interrumpido] y en el mutante para  $_{CG}Acr3(2)$  [con el gen *acr3(2)* interrumpido]. En la cepa doble mutante  $_{CG}Acr3(1)-(2)$  [donde los genes *acr3(1)* y *acr3(2)* están interrumpidos] los metaloides se incorporan de una manera análoga a como lo hacen el resto de cepas, pero la ausencia de  $_{CG}Acr3s$  funcionales imposibilita la expulsión del metaloide y no se observa la inflexión en la curva de concentración intracelular de As (Figura 4.8).



**Figura 4.8:** Análisis de acumulación de As en “resting cells”. Los ensayos se realizaron del mismo modo a como se realizan los ensayos de incorporación variando el tiempo de exposición al metaloide. En estas condiciones la cepa doble mutante para las permeasas acumula As(III) procedente del As(V) que ha entrado y se ha reducido en las células. La cepa silvestre al contacto con el metaloide expresa los sistemas de resistencia y al cabo de 60 minutos comienza la expulsión del As(III) acumulado.

En base a lo descrito para estos transportadores por Aaltonen and Silow, (2008)  $CGAcr3(1)$  y  $CGAcr3(2)$  funcionarían teóricamente como uniportadores o como antiportadores catiónicos, pero la hipótesis de un acoplamiento energético a la hidrólisis de ATP no es en absoluto descartable. De hecho, aunque en el cromosoma de *C. glutamicum* no se ha localizado hasta la fecha ningún gen homólogo al de la ATPasa ArsA, en los operones *ars* de bacterias filogenéticamente relacionadas con *C. glutamicum*, como es el caso de *Rhodococcus erythropolis* (Ordóñez et al., 2005) presentan genes que codifican para permeasas homólogas a  $CGAcr3(1)$  y  $CGAcr3(2)$ , así como para ArsA. Este tema de trabajo está siendo actualmente desarrollado en nuestro grupo de investigación en colaboración con el grupo del Dr. Barry P. Rosen (A.F. Villadangos, no publicado).

#### 4.2.4. Las arseniato reductasas de *C. glutamicum* reducen As(V) a través de un mecanismo totalmente nuevo.

Un aspecto fundamental de la resistencia a arsénico es la eliminación de As(V) del citoplasma. Puesto que las células no poseen ningún sistema específico para su expulsión, resulta interesante comprobar como éstas han resuelto este problema y la razón por la que lo han hecho así y no de otro modo.

Las células necesitan incorporar  $\text{PO}_4^{3-}$  para la síntesis de sus bloques estructurales, para la regulación y funcionamiento de su metabolismo y como parte esencial de su sistema de almacenamiento de energía. El oxianión arseniato por su similitud estructural con el  $\text{PO}_4^{3-}$  sustituye a este en todas las reacciones en que el fosfato interviene como sustrato, lo cual genera toxicidad y provoca la muerte celular.

Esta situación ha obligado a las células a desarrollar mecanismos de defensa frente al As(V) que no pasan por la impermeabilización celular impidiendo su entrada si no por la transformación del As(V) en formas más fáciles de eliminar o por la acumulación en formas más inocuas, mecanismos habituales frente al estrés metálico. La acumulación en formas más inocuas se emplea en los organismos superiores que almacenan As(V) intracelular en forma de arsenozúcares o arsenobetaina, moléculas mucho menos tóxicas que compatibilizan de algún modo la presencia de arsénico en el citoplasma con el normal desarrollo de las funciones celulares.

No obstante, la vía de eliminación de As(V) más extendida dentro del mundo procariota es sin duda la reducción de As(V) a As(III) (Gladysheva et al., 1994) (Ji and Silver, 1992) (Ji et al., 1994) (Oden et al., 1994). En un principio la conversión de una especie del metaloide en otra que es diez veces más tóxica puede resultar desconcertante e ilógico, pero este incremento en la toxicidad se compensa por la capacidad de expulsión de As(III) que en la mayoría de los microorganismos es muy elevada. Además hasta la fecha no se han descrito sistemas de expulsión para As(V), razón por la cual la solución de transformar el As(V) en otra especie para la cual existe un sistema de detoxificación eficiente es coherente.

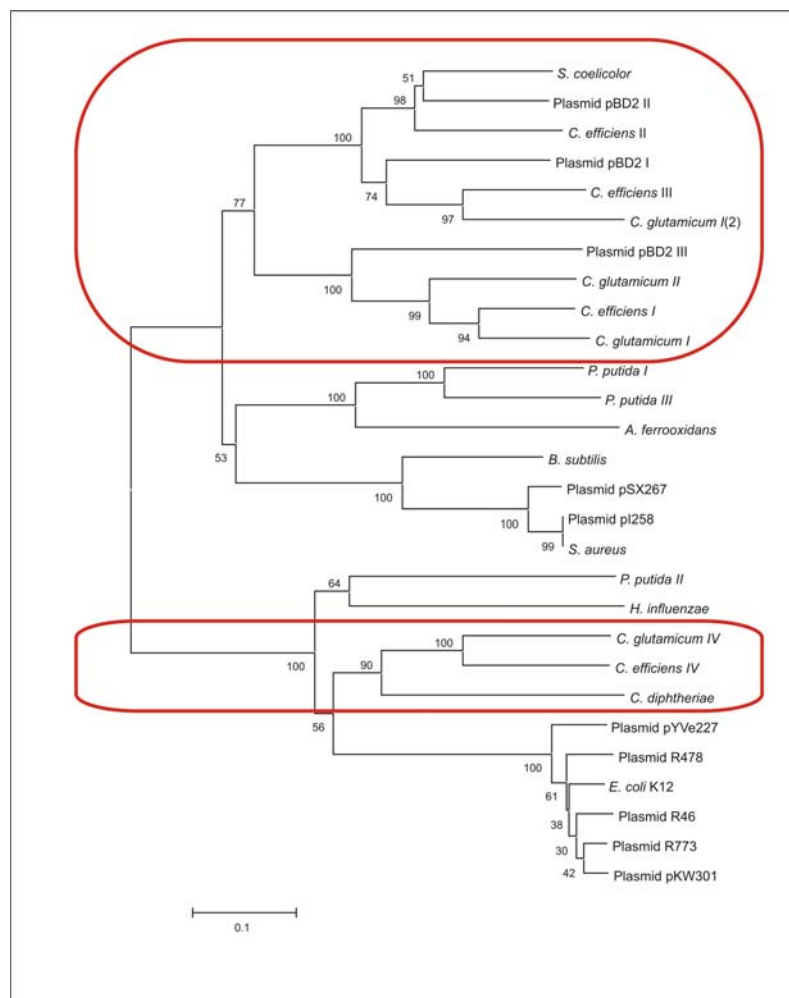
Otra cuestión trascendente es el porque las células no han desarrollado sistemas de expulsión de As(V). En este sentido se puede hipotetizar con que la misma homología estructural que le permite entrar en las células no permite la existencia de sistemas de transporte específicos para el As(V). Si no existen transportadores lo suficientemente específicos para discernir  $\text{AsO}_4^{3-}$  de  $\text{PO}_4^{3-}$ , con la expulsión de arseniato se correría el riesgo de expulsar también fosfato, situación nada ventajosa para la célula. Por lo tanto en los microorganismos la eliminación de As(V) se produce casi exclusivamente reduciéndolo a As(III), proceso catalizado por las enzimas arseniato reductasas (ArsCs).

Las enzimas ArsCs son pequeñas proteínas redox [131 aminoácidos en la ArsC del plásmido pI258 de *S. aureus* ( $_{SA}$ ArsC) y 141 de la correspondiente al plásmido R773 de *E. coli* ( $_{R773}$ ArsC)], monoméricas y citoplasmáticas que reducen As(V) a As(III). Esta reducción es posible gracias a la participación secuencial de tres tiolatos nucleófilos diferentes, que funcionan en cascada con oxidaciones-reducciones sucesivas. (Gladysheva et al., 1994) (Ji and Silver, 1992) (Ji et al., 1994) (Oden et al., 1994).

Las ArsCs de los diferentes microorganismos se diferencian entre si atendiendo a los siguientes aspectos: (i) sus secuencias aminoacídicas primarias; (ii) localización de los residuos

de cisteína catalíticos; (iii) mecanismos de reducción y características estructurales. En base a estos parámetros es posible su agrupamiento en las clases ya analizadas con profundidad en la introducción de esta memoria.

Las arseniato reductasas codificadas en el cromosoma de *C. glutamicum* ( $_{CG}ArsC1$ ,  $_{CG}ArsC2$ ,  $_{CG}ArsC1'$  y  $_{CG}ArsC4$ ) pertenecen a diferentes grupos filogenéticos (Figura 4.9), y se pueden diferenciar hasta tres clases diferentes tomando como base los estudios filogenéticos (Kumar et al., 2004) y los análisis de homología (Durand et al., 1997).



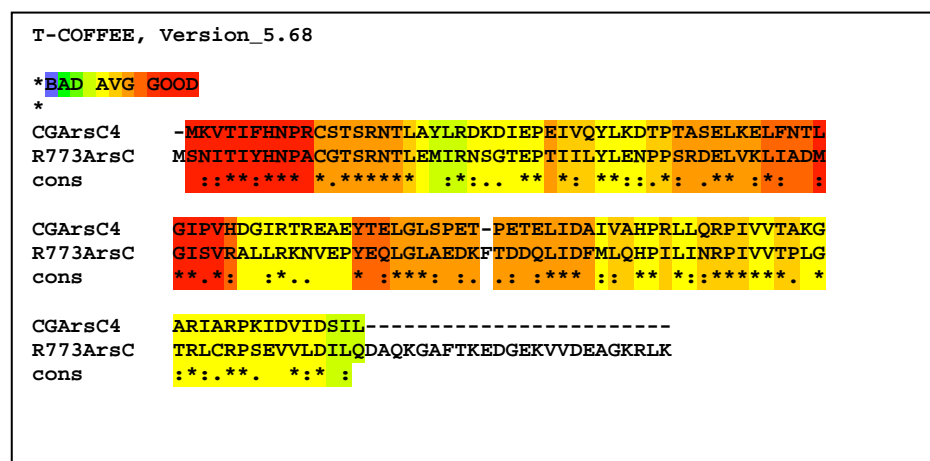
**Figura 4.9:** Analisis filogenético obtenido por el método *neighbour-joining* mostrando las distancias evolutivas existentes entre las diferentes arseniato reductasas (Kumar et al., 2004). Los números representados son porcentajes obtenidos por “bootstrapping” (1000 réplicas). Las ArsCs de los actinomicetos con la salvedad de  $_{CG}ArsC4$  y sus homólogas se engloban en un grupo común (resaltado con un marco rojo) claramente diferenciado del de bacterias Gram positivas de bajo contenido en G+C y del de las Gram negativas, estas ya más alejadas filogenéticamente. Es destacable la relación más estrecha de  $_{CG}ArsC1'$  con las reductasas de bacterias Gram positivas de bajo contenido en G+C.

Las arseniato reductasas codificadas en el cromosoma de *C. glutamicum* ( $_{CG}ArsC1$ ,  $_{CG}ArsC2$ ,  $_{CG}ArsC1'$  y  $_{CG}ArsC4$ ) pertenecen a tres grupos filogenéticos diferentes (Figura 4.9).

Tomando como base los estudios filogenéticos (Kumar et al., 2004) y los análisis de homología (Durand et al., 1997). Estas familias se corresponderían con: (i)  $CGArsC4$ , (ii)  $CGArsC1'$  y (iii)  $CGArsC1/CGArsC2$ . Esta situación podría ser considerada excepcional, aunque también se da en otros representantes de corinebacterias. En *Corynebacterium efficiens* se han localizado los mismos tipos de reductasas pero organizadas de forma diferente: un solo operón de resistencia a arsénico en el que se pueden localizar las reductasas análogas a  $CGArsC1'$  y a  $CGArsC1/CGArsC2$ , y aislada en el cromosoma la homóloga a  $CGArsC4$

#### 4.2.4.1 Las reductasas $CGArsC4$ y $CGArsC1'$ aparentemente no son funcionales en *C. glutamicum*.

$CGArsC4$  es una proteína de codificación cromosomal no incluida en los operones *ars* y relacionada con las ArsCs dependientes de GSH y Grx (idéntica situación se observa en los homologos de  $CGArsC4$  de *C. efficiens* y *C. diphtheriae*).



**Figura 4.10:** Alineamiento de las reductasas  $CGArsC4$  ( $CGArsC4$  en la figura) y  $R773ArsC$  ( $R773ArsC$  en la figura) realizado mediante el programa T-Coffee (Poirot et al., 2003). En este alineamiento comparativo se constata la homología existente entre las dos enzimas, lo que permite agrupar a  $CGArsC4$  dentro de la familia de  $R773ArsC$ .

Analizando detalladamente la secuencia de  $CGArsC4$  y el alineamiento de ésta con la reductasa  $R773ArsC$  de *E. Coli* (Figura 4.10) se comprueba que: (i)  $CGArsC4$  carece de la cisteína C-terminal presente en  $R773ArsC$ , cisteína que por otra parte no interviene en el mecanismo de reducción de  $R773ArsC$ ; (ii) la Cys<sup>11</sup> de  $CGArsC4$  se corresponde con la Cys<sup>12</sup> esencial de  $R773ArsC$ ; (iii) los cinco residuos críticos de  $R773ArsC$  identificados por mutagénesis (His<sup>8</sup>, Ser<sup>15</sup>, Arg<sup>60</sup> y Arg<sup>94</sup>) se conservan en  $CGArsC4$  (Figura 4.10); (iv) los cinco residuos básicos que rodean estéricamente a la Cys<sup>12</sup> de  $R773ArsC$  y que disminuyen el valor de pK<sub>a</sub> del complejo Cys-Sγ a 6,4 (His<sup>8</sup>, Arg<sup>16</sup>, Arg<sup>60</sup>, Arg<sup>94</sup> y Arg<sup>107</sup>) (Gladysheva et al., 1996) (Martin et al., 2001) también se conservan en  $CGArsC4$  (Figura 4.10). Tres de estos residuos (Arg<sup>60</sup>, Arg<sup>94</sup> y Arg<sup>107</sup>) interactúan directamente con el As(V) y los intermediarios del As(III) (Martin et al., 2001).





${}_{SA}ArsC$  se mantienen en  ${}_{CG}ArsC1'$ ; (iii) en el extremo N-terminal de  ${}_{CG}ArsC1'$  existen 78 aminoácidos no compartidos con  ${}_{SA}ArsC$ ; (iv) la reductasa  ${}_{CG}ArsC1'$  tiene una identidad del 16,4% con  ${}_{SA}ArsC$  (25% si se elimina los 78 aminoácidos del extremo N-terminal).

A pesar de que existen genes homólogos funcionales a los que codifican para tioredoxina (Trx) y tioredoxina reductasa (TR) en el cromosoma de *C. glutamicum* (Fanous et al., 2008) (Ordóñez et al., 2009), los datos experimentales no parecen apoyar la funcionalidad de  ${}_{CG}ArsC1'$  (Ordóñez et al., 2009).

#### 4.2.4.2. Las reductasas ${}_{CG}ArsC1$ y ${}_{CG}ArsC2$ son funcionales en *C. glutamicum*.

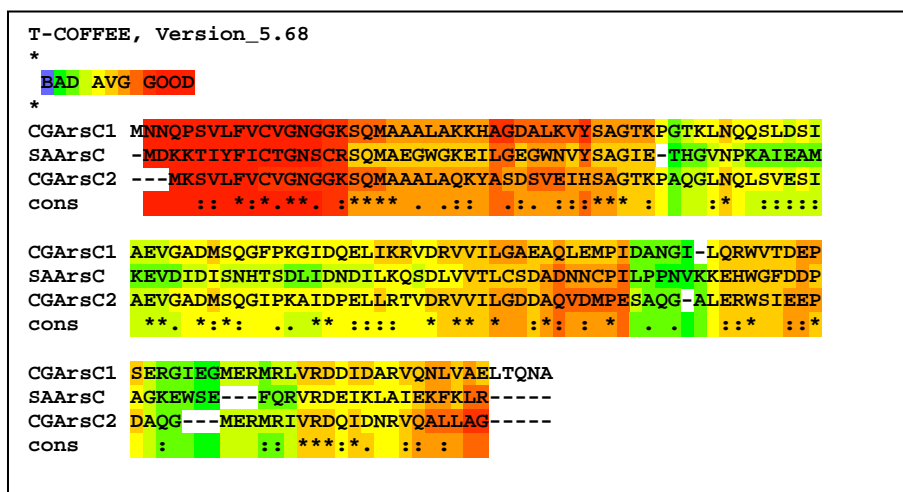
La expresión de  ${}_{CG}ArsC1$  y  ${}_{CG}ArsC2$ , al igual que ocurre con  ${}_{CG}ArsC1'$ , se induce en presencia de As(III) (Ordóñez et al., 2005). Filogenéticamente  ${}_{CG}ArsC1/{}_{CG}ArsC2$  forman un grupo con entidad propia dentro de las ArsCs, al cual pertenecen todas las reductasas de los operones de resistencia a arsénico de los actinomicetos, con la salvedad de  ${}_{CG}ArsC1'$  y las homólogas a  ${}_{CG}ArsC1'$  presentes en los operones *ars* de *C. efficiens* ( ${}_{CE}ArsC1'$ ) y del plásmido lineal pBD2 de *Rhodococcus erythropolis* ( ${}_{RE}ArsC1'$ ) (Figura 4.9). La amplia presencia de este tipo de reductasas en los actinomicetos da una idea de la importancia de las mismas para este grupo de microorganismos, esencialmente teniendo en cuenta que el nicho habitual de estos microorganismos es el suelo, donde existen las mayores concentraciones de arsénico de la biosfera.

Los análisis filogenéticos y la ausencia de GSH/Grx en Gram positivos (Newton et al., 2006) podrían hacer pensar en un mecanismo de reducción idéntico al de  ${}_{SA}ArsC$ , sin embargo los resultados experimentales apoyan la existencia de una nueva clase de reductasas que reducen As(V) a As(III) a través de un nuevo mecanismo de acción hasta ahora no descrito.

${}_{CG}ArsC1$  y  ${}_{CG}ArsC2$  sólo mantienen la cisteína homóloga a la Cys<sup>10</sup> de  ${}_{SA}ArsC$ , (Cys<sup>11</sup> en  ${}_{CG}ArsC1$  y Cys<sup>8</sup> en  ${}_{CG}ArsC2$ ) (Figura 4.12). En estas condiciones  ${}_{CG}ArsC1$  y  ${}_{CG}ArsC2$  sólo serían capaces de realizar el primer paso del ciclo catalítico descrito para  ${}_{SA}ArsC$  (Messens et al., 2002b). En este primer paso, el grupo tiol de la Cys<sup>11/8</sup> (completamente reducido) realizaría un ataque nucleofílico sobre el As(V), liberando un grupo hidroxilo que al protonarse formaría una molécula de agua. El resultado sería la formación del intermediario Cys<sup>11/8</sup>-SAsOH<sub>3</sub>, de tipo covalente. Pero una vez que esto hubiese sucedido no se podría iniciar la cascada redox de recuperación de la enzima por no existir ninguna cisteína adicional.

A pesar de lo indicado se conservan la mayoría de los aminoácidos esenciales para dicho mecanismo de reducción (Figura 4.12): (i) los residuos Asn<sup>14</sup>, Ser<sup>17</sup> de  ${}_{CG}ArsC1$  y Asn<sup>11</sup>, Ser<sup>15</sup> de  ${}_{CG}ArsC2$  llevarían a cabo en *C. glutamicum* la disminución de la pKa del grupo tiol de la Cys<sup>11/8</sup> al igual que lo hacen los residuos Asn<sup>13</sup> y Ser<sup>17</sup> sobre la Cys<sup>12</sup> de  ${}_{SA}ArsC$ ; (ii) Arg<sup>16</sup> de  ${}_{SA}ArsC$ , se sustituye por una lisina (Lys<sup>17</sup> en  ${}_{CG}ArsC1$  y Lys<sup>14</sup> en  ${}_{CG}ArsC2$ ), que a efectos

funcionales es equivalente a la arginina ya que aportan el mismo grupo funcional en la cadena lateral del aminoácido. En cierto modo podemos considerar que  $CGArsC1$  y  $CGArsC2$  presentan un P-loop modificado, pero cuya actividad fosfatasa es inexistente (Ordóñez et al., 2009).



**Figura 4.12:** Alineamiento de  $CGArsC1$  ( $CGArsC1$  en la figura),  $CGArsC2$  ( $CGArsC2$  en la figura) y  $SAArsC$  ( $SAArsC$  en la figura) realizado mediante T-Coffee (Poitot et al., 2003); se pone de manifiesto la existencia de un "P-loop" modificado y la ausencia de las dos cisteínas en posición C-terminal.

Por ensayos de interrupción génica, y complementación homóloga se sabe que  $CGArsC1$  y  $CGArsC2$  son las únicas reductasas funcionales en *C. glutamicum* (Ordóñez et al., 2009) y que la acción de una de las enzimas complementa a la de la otra. La ausencia de las dos reductasas genera un fenotipo hipersensible a As(V) pero no a As(III), lo que confirmaría su papel como reductasas de As(V).

#### 4.2.4.3. Las reductasas $CGArsC1$ y $CGArsC2$ no están ligadas ni a GSH/Grx ni a Trx/TR en su mecanismo de reducción.

Filogenéticamente  $CGArsC1$  y  $CGArsC2$  están relacionadas con las ArsC dependientes de tioredoxina y tioredoxina reductasa (Trx/TR) sistema presente y funcional en *C. glutamicum* (Fanous et al., 2008) y además conservan la mayoría de los aminoácidos críticos en esta catálisis. Por esta razón se decidió analizar la posibilidad de que  $CGArsC1$  y  $CGArsC2$  utilizaran dicho mecanismo de reacción.

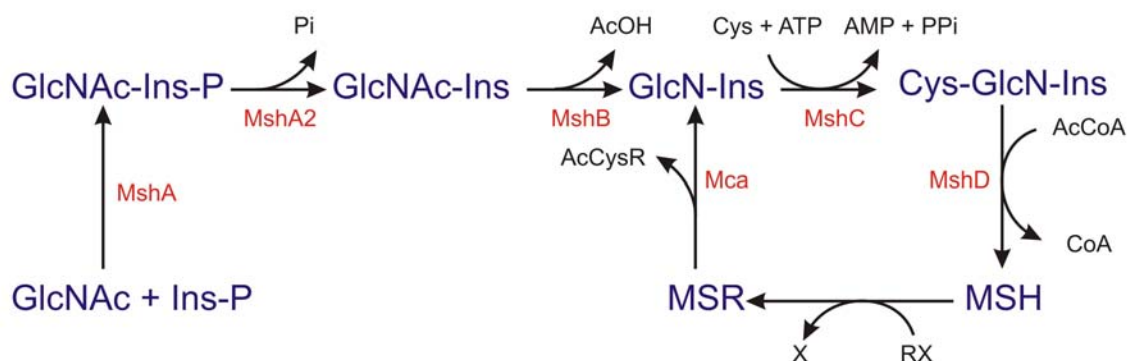
En el modelo establecido por Messens et al., (2002a) la enzima  $SAArsC$  cataliza la reducción del As(V) a As(III), en una reacción en la que el As(V) actúa como aceptor de electrones y donde el par Trx/TR son intermediarios de una cascada de oxidación-reducción, siendo el NADPH el donador inicial de electrones.

La reproducción "in vitro" del modelo establecido por Messens et al., (2002a) sobre  $CGArsC1$  y  $CGArsC2$  nos permitió demostrar la funcionalidad del sistema Trx/TR en *C. glutamicum*.

$c_G$ TR es capaz de reconocer  $c_G$ Trx (oxidada con diamida) y catalizar la reducción del puente disulfuro intramolecular utilizando NADPH como fuente de poder reductor. La sustitución de la enzima  $c_G$ Trx oxidada por la versión reducida, añadiendo a su vez a la mezcla de reacción  $c_G$ ArsC1 o  $c_G$ ArsC2 reducidas y As(V) como aceptor final de electrones, permitió comprobar que las reductasas  $c_G$ ArsC1 y  $c_G$ ArsC2 no se acoplan con el par Trx/TR de *C. glutamicum*. Esta conclusión se reforzó cuando se sustituyeron las reductasas  $c_G$ ArsC1 y  $c_G$ ArsC2 por la reductasa  $s_A$ ArsC dando como resultado la viabilidad de la cascada redox descrita por Messens et al., (2002a).

#### 4.2.4.4. El sistema MSH/Mrx esta presente en actinomicetos y condiciona la resistencia a As(V).

En prácticamente todos los actinomicetos (Sakuda et al., 1994), al igual que ocurre en otros microorganismos Gram positivos, no existe capacidad genética para la síntesis de glutatión (GSH). Alternativamente, este grupo de microorganismos presenta un sistema que sustituye en muchas de las funciones celulares al GSH, el pseudodisacárido micotiol (MSH). El MSH es una molécula de N-acetilcisteína (AcCys) unido por un enlace tipo amida a 1-D-myo-inositol 2-amino-2-deoxy-D-glucopiranosido (GlcN-Ins) (Newton et al., 1995) (Sakuda et al., 1994) (Spies and Steenkamp, 1994).



**Figura 4.13:** Ruta de biosíntesis de MSH en *Mycobacterium smegmatis*. Adaptada de Newton et al., (2006). La síntesis de MSH se produce a partir de 1L-Inositol-1-P y N-acetilglucosamina, para formar una serie de intermediarios que tras reacciones sucesivas catalizadas por las enzimas MshA, MshA2, MshB, MshC y MshD dan lugar a un tiol de pequeño tamaño denominado micotiol (MSH).

Las enzimas relacionadas con el metabolismo y la síntesis del MSH, se han considerado frecuentemente dianas importantes para el diseño de fármacos en la lucha frente a *M. tuberculosis*. La ruta de biosíntesis del MSH comienza con una reacción tipo glicosiltransferasa catalizada por la enzima MshA, donde actúan como sustratos UDP-GlcNAc y 1L-Ins-1-P para formar GlcNAc-( $\alpha$ 1,3)-1L-Ins-1-P, que es posteriormente defosforilado por una fosfatasa no identificada todavía denominada MshA2 para formar GlcNAc-Ins. MshB es una deacetilasa de

GlcNAc-Ins que es la responsable de la formación del pseudodisacarido Glc-Ins necesario para la tercera reacción, catalizada por la enzima MshC, una ligasa de Cys:GlcN-Ins ATP-dependiente que produce Cys-Glc-Ins. El último paso de la ruta de biosíntesis se lleva a cabo por MshD cuya actividad acetiltransferasa produce MSH a partir de CoAS-Ac y el producto de reacción de MshC. (Figura 4.13).

Por los ensayos realizados con estas enzimas se sabe que el MSH es esencial para la viabilidad de *M. tuberculosis*, pero no para *M. smegmatis* o *Streptomyces coelicolor*. Los genes *mshA* y el *mshC* son imprescindibles para la producción de MSH en *M. smegmatis*, e indispensables para la supervivencia de *M. tuberculosis* (Newton et al., 2006). La inactivación de *mshB* y *mshD* reduce pero no elimina la producción de MSH en estas bacterias y por lo tanto no afecta drásticamente a su viabilidad. En base a lo indicado las dianas más prometedoras desde un punto de vista aplicado para el diseño de futuros compuestos antimicrobianos serían MshA y MshC.

Otra enzima clave en el metabolismo del MSH es la proteína Mca (micotiol conjugado amidasa). Su función básica es la de reciclar el MSH conjugado con determinados radicales, liberando el sustrato necesario para la ligasa de Cys:GlcN-Ins catalizada por MshC (Figura 4.13). La proteína Mca es enormemente afin por los conjugados MS-R, e independientemente del radical conjugado al MSH, es capaz de reconocer la molecula de MSH y realizar su catálisis. Mca es prácticamente inactiva con MSH, con MSSM (micotona) o con el intermediario Glc-NAc-Ins, pero tiene una actividad significativa con una amplia variedad de residuos orgánicos entre los que se encuentran los antibióticos.

El MSH se mantiene en estado reducido gracias a una micotona disulfuro reductasa (MTR), esta enzima cataliza la reducción del enlace disulfuro de MSSM obteniendo el poder reductor del NADPH. MTR tiene un papel fisiológico similar al de la glutatión reductasa (GOR) y al de la tripanotona reductasa. La secuencia aminoacídica de MTR guarda un 30% de identidad con otros miembros de esta familia de enzimas, conservando las cisteínas propias del centro redox catalítico, así como el par His-Glu consenso y las regiones de unión a FAD y a NADPH (Patel and Blanchard, 2001).

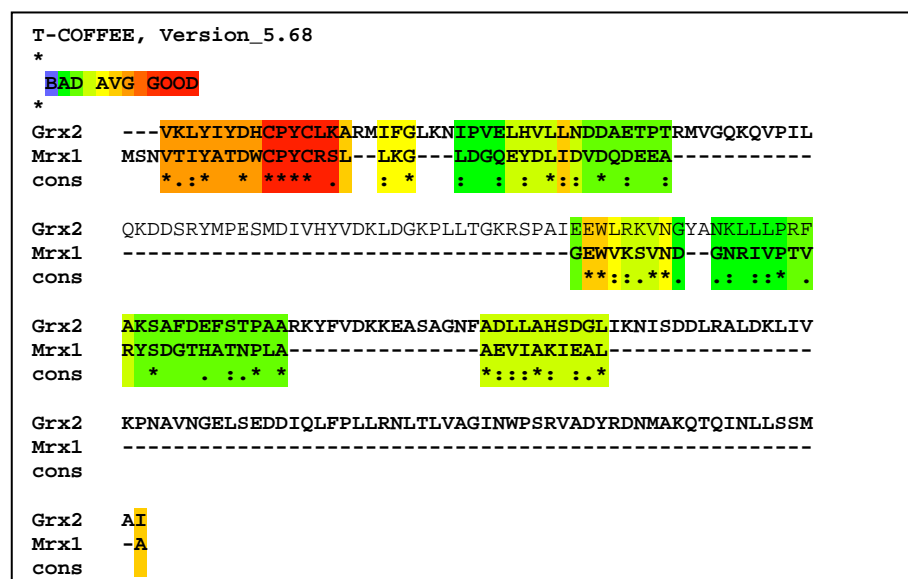
A pesar de que la síntesis de MSH en las especies del género *Mycobacterium* está bien establecida, existen otras especies microbianas con capacidad para sintetizar MSH. Dentro del género *Corynebacterium* se ha comprobado que *C. glutamicum* (Feng et al., 2006) sintetiza micotiol y posee genes ortólogos a los que intervienen en la síntesis de MSH, pero su función no ha sido aun determinada.

Los mutantes de la ruta biosintética del micotiol en *C. glutamicum*: *C. glutamicum*  $\Delta$ MshA, *C. glutamicum*  $\Delta$ MshB, *C. glutamicum*  $\Delta$ MshC, y *C. glutamicum*  $\Delta$ MshD, así como mutantes para la enzima micotiol conjugado amidasa (*C. glutamicum*  $\Delta$ Mca), y la micotona reductasa (*C. glutamicum*  $\Delta$ Mtr) (Feng et al., 2006), evidenciaron una pérdida notable de

resistencia a As(III), pero en ningún modo comparable a la sensibilidad alcanzada para el As(V) (Ordóñez et al., 2009). Los mutantes *C. glutamicum*  $\Delta$ MshA y *C. glutamicum*  $\Delta$ MshC (enzimas que en *Mycobacterium* son esenciales para la síntesis de MSH) manifiestan una sensibilidad para As(V) comparable a la adquirida en el doble mutante *C. glutamicum* ArsC1-C2 y en el doble delecionado *C. glutamicum* 2 $\Delta$ Ars (Ordóñez et al., 2009).

Por lo tanto y asumiendo que el fenotipo de estos mutantes se asemeja más a lo descrito para *Mycobacterium* (Newton et al., 1995) y no tanto a lo descrito para *C. glutamicum* (Feng et al., 2006) se dedujo que el micotiol es esencial y que por lo tanto participaría de algún modo en la reducción de As(V). El fenotipo esperado para el resto de mutantes encaja perfectamente con el nivel de sensibilidad de los mismos a As(V), así *C. glutamicum*  $\Delta$ MshB y *C. glutamicum*  $\Delta$ MshD, mutantes con capacidad residual de síntesis de micotiol reflejan una menor sensibilidad asociada a la síntesis basal de MSH.

El mutante *C. glutamicum*  $\Delta$ Mtr no tiene alterada la capacidad de síntesis de micotiol, pero si su regeneración a partir del poder reductor del NADPH, por lo que el MSH presente en las células tendrá su origen en la síntesis enzimática. Como consecuencia de ello, el MSH disponible en la célula va a ir disminuyendo, y paralelamente lo hará su resistencia a As(V).



**Figura 4.14:** Alineamiento de Mrx1 de *C. glutamicum* (Mrx1 en la figura) y de Grx2 de *E. coli* (Grx2 en la figura) realizado mediante el programa T-Coffee (Poirot et al., 2003), poniendo de manifiesto la existencia de un centro activo común caracterizado por la presencia de dos cisteínas en posición N-terminal. Estas dos cisteínas son responsables tanto en Mrx1 como en Grx2 de la reducción de los puentes disulfuro inter e intracatenarios de las proteínas con las que interactúa.

El mutante *C. glutamicum*  $\Delta$ Mca, presenta niveles de resistencia frente al As(III) y sobre todo frente al As(V) que se acercan en gran medida al de la cepa silvestre. Esto respalda la

hipótesis de que el MSH debe estar participando de las reacciones de reducción celulares y no tanto formando conjugados MSH-As(III) o MSH-As(V).

Haciendo un paralelismo entre el mecanismo de reducción dependiente de GSH/Grx y el del MSH, se rastreó el genoma de *C. glutamicum* en busca de proteínas que pudiesen desempeñar la misma función que Grx pero en este caso de manera específica para el MSH. Como resultado se localizaron tres proteínas denominadas de manera genérica microredoxinas (Mrx) codificadas por los ORFs Ncgl0808 (Mrx1), Ncgl2445 (Mrx2) y Ncgl0401 (Mrx3).

Mrx1 (ver alineamiento en la figura 4.14) conserva una identidad con la Grx2 de *E. coli* de un 11,4%. Pero a pesar de esta escasa identidad, y de la diferencia de tamaño entre ellas (80 aminoácidos de Mrx1 frente a los 216 de Grx2), presenta en su extremo N-terminal el dominio catalítico típico de las glutaredoxinas ("CPYC"), con dos cisteínas catalíticas (Cys<sup>12</sup> y Cys<sup>15</sup>) (Figura 4.14). Como se ha puesto de manifiesto en los ensayos experimentales, estas cisteínas participan en la reducción de los disulfuros intra e intermoleculares (MSH-proteínas), estableciéndose un paralelismo funcional entre las cisteínas de Grx2 y Mrx1 (Ordóñez et al., 2009).

Mrx2 presenta una identidad del 6,3% con Grx2 y al igual que Mrx1 presenta dos cisteínas en el extremo N-terminal. Mrx2 es una proteína homóloga a la proteína NrdH de *C. ammoniagenes* (Stehr and Lindqvist, 2004). Las NrdH redoxinas son una clase de proteínas redox que pertenecen a la superfamilia de la Trx. Este tipo de proteínas se han encontrado en *E. coli* y también en otros microorganismos, principalmente aquellos que no sintetizan GSH. La proteína NrdH forma parte del operon *nrdHIEF* de *E. coli*, y actúa como donador de protones para la ribonucleótido reductasa NrdEF. Las NrdH-redoxinas son proteínas pequeñas (9-10 kDa) con identidades que oscilan entre 34-99% entre si, y homólogas a las Grx. Presentan un plegamiento característico y un sitio activo conservado ("C-V-Q-C" ó "C-M-Q-C") que contiene los residuos de cisteína catalíticos. El patrón de residuos que sirven de unión entre las dos cisteínas catalíticas los diferencia de las Trx y de las Grx ("C-P-G-C" para las thioredoxinas y "C-P-Y-C" para la mayoría de glutaredoxinas). Estructuralmente son similares a las Grx (específicamente reducidas por el GSH), aunque las NrdH redoxinas, al igual que ocurre con las Trx, dependen de la TR para su reducción. La NrdH de *E. coli* forma en su estructura un profundo bolsillo hidrofóbico similar al observado en la Trx. En base a esta estructura y a los estudios empíricos desarrollados por Ordóñez et al., (2009) se sugiere que la unión de la TR con la NrdH se produce de una manera análoga a como lo hace la TR con la Trx (Stehr and Lindqvist, 2004).

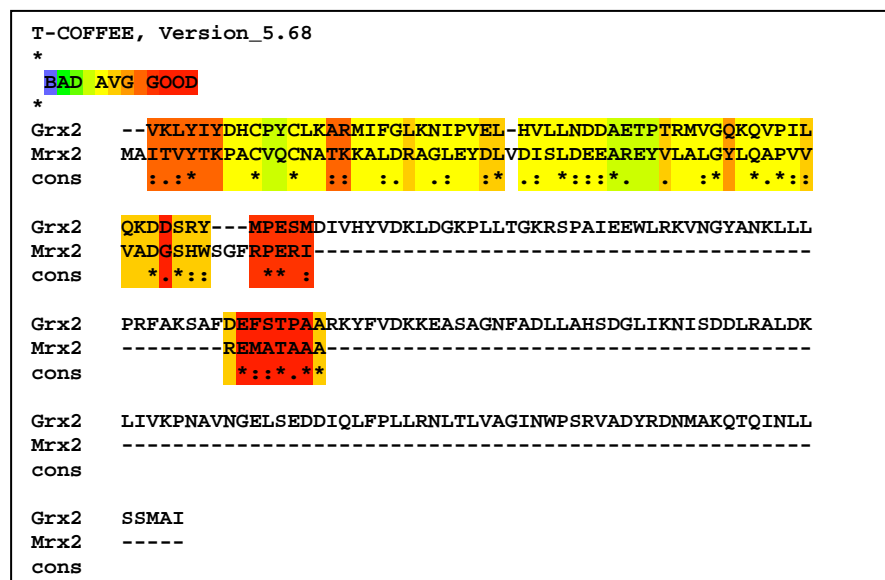
Experimentalmente se ha puesto de manifiesto que Mrx1 y MSH forman parte de la misma ruta de oxidación-reducción, mientras que Mrx2 está ligada a la ruta de oxidorreducción de la Trx y de la TR (Ordóñez et al., 2009). Del mismo modo se ha demostrado que <sub>cG</sub>ArsC1 y <sub>cG</sub>ArsC2 reciben electrones solamente de la ruta Mrx1/MSH, y que la reducción de As(V) es dependiente de la cisteína N-terminal de <sub>cG</sub>ArsC1 y <sub>cG</sub>ArsC2. Por lo tanto para este mecanismo

de reacción sería necesaria la presencia de MSH, la enzima Mrx1 donde su cisteína N-terminal resulta imprescindible, la flavoproteína MTR y el donador de electrones NADPH. Todos estos componentes se acoplan en reacciones de oxidación reducción sucesivas cuyo resultado final es la reducción de As(V) a As(III) y la recuperación total de todas las proteínas que intervienen.

En base a los análisis “in vivo” e “in vitro” se ha propuesto que el mecanismo de reacción es el siguiente: (i) el tiolato activo tanto de  $_{CG}ArsC1$  como de  $_{CG}ArsC2$  cataliza la formación de un intermediario entre al As(V) y el MSH; (ii) Mrx1 reduce la unión As-SH originando As(III) y un puente disulfuro intermolecular entre el MSH y la Mrx1; (iii) una segunda molecula de MSH recicla la Mrx1 y forma micotona (MSSM); (iv) que posteriormente es reducida por la enzima MTR dependiente de NADPH (Ordóñez et al., 2009).

La cinética de las enzimas  $_{CG}ArsC1$  y  $_{CG}ArsC2$  en relación a la enzima de  $_{SA}ArsC$  se puede considerar lenta, posiblemente debido al hecho de que los tres grupos tiol indispensables para el mecanismo de reacción residen en tres moleculas diferentes. Identica situación se repite en la reductasa de *E. coli* (DeMel et al., 2004).

Nuestros resultados ponen de manifiesto la existencia de un tercer grupo de arseniato reductasas ArsCs y han establecido las bases para el estudio de los sistemas redox en *C. glutamicum*. Esto puede ser de gran utilidad en la lucha frente a infecciones causadas por patógenos pertenecientes al grupo de las actinobacterias como *C.diphtheriae* o *M. tuberculosis*.



**Figura 4. 15:** Alineamiento de Mrx2 de *C. glutamicum* (Mrx2 en la figura) y de Grx2 de *E. coli* (Grx2 en la figura) realizado mediante el programa T-Coffee (Poirot et al., 2003). Estas proteínas presentan un centro activo formado por dos cisteínas pero cuyo entorno y estructura varía lo suficiente como para que los mecanismos redox en los que intervienen sean diferentes.





*Conclusions/Conclusions*

---



## **5. CONCLUSIONES.**

---

1. *Corynebacterium glutamicum* es un microorganismo con elevada resistencia a arsenito [As(III)] y a arseniato [As(V)] asociada a la expresión de dos operones cromosomales de resistencia a arsénico (*ars1* y *ars2*) .

2. Los operones *ars1* y *ars2* son inducibles “in vivo” por As(III) y en menor medida por Sb(III). Estos operones contienen genes que codifican para los represores ( $_{CG}ArsR$ ), las arsenito permeasas ( $_{CG}Acr3$ ) y las arseniato reductasas ( $_{CG}ArsC$ ).

3. El oxianión As(V) entra en las células de *C. glutamicum* por los transportadores de fosfato, compitiendo con el oxianión fosfato. La incorporación celular del As(III) se realiza por un mecanismo todavía desconocido, siendo su eficiencia de entrada mucho menor que el correspondiente a As(V).

4. Existen dos genes cromosomales huérfanos que codifican para la arsenito permeasa  $_{CG}Acr3(3)$  y la arseniato reductasa  $_{CG}ArsC4$  que no parecen participar en la resistencia a arsénico en *C. glutamicum*. La expresión de ambos genes es constitutiva pero a un nivel basal.

5. Las proteínas represoras  $_{CG}ArsR1$  y  $_{CG}ArsR2$  presentan residuos de cisteína que son imprescindibles para su función reguladora pero no para su interacción con el DNA. Estas

cisteínas conforman un sitio de unión a metales atípico compuesto por residuos de uno y otro monómero, que posibilita la interacción con As(III) y/o Sb(III), pero no con As(V). Esto provoca cambios conformacionales que desreprimen la expresión de los operones *ars1* y *ars2*.

6. Las arsenito permeasas  $_{CG}Acr3(1)$  y  $_{CG}Acr3(2)$  pertenecen a la superfamilia BART de transportadores de membrana y participan de forma activa en la destoxicación de As(III), pero no de Sb(III). Su mecanismo de transporte es independiente del ATP para la obtención de energía y la interrupción de los genes correspondientes provoca la acumulación de arsénico en el citoplasma celular.

7. Existen 4 arseniato reductasas en *C. glutamicum* que pertenecen a tres familias diferentes. De ellas tan solo  $_{CG}ArsC1$  y  $_{CG}ArsC2$  son funcionales y cooperan en la reducción de As(V) a As(III).

8. Las enzimas  $_{CG}ArsC1$  y  $_{CG}ArsC2$  presentan un mecanismo de reducción de As(V) diferente de los hasta ahora descritos, basado en su acoplamiento con micotiol y microredoxina (MSH/Mrx). En este mecanismo participa también la micotona reductasa (MTR) y el NADPH que son indispensables para completar su ciclo catalítico.

## **CONCLUSIONS.**

1. *Corynebacterium glutamicum* is a microorganism highly resistant to As(III) and As(V). This resistance is mainly associated with the presence of two *ars* resistance operons in the chromosome, *ars1* and *ars2*.

2. The *ars1* and *ars2* resistance operons are induced "in vivo" by As(III) and to a lesser degree by Sb(III). These operons carry genes encoding for the repressor protein ( $_{CG}ArsR$ ), the arsenite permease ( $_{CG}Acr3$ ) and the arsenate reductase ( $_{CG}ArsC$ ).

3. The uptake of the oxyanion As(V) is performed through the phosphate transporter systems, in competition with the oxyanion phosphate. The uptake mechanism for As(III) in *C. glutamicum* is still unknown, and its efficiency is lower when compared to As(V) uptake.

4. The orphan chromosomal genes for arsenite permease  $_{CG}Acr3(3)$  and arsenate reductase  $_{CG}ArsC4$  do not seem to contribute to the As resistance in *C. glutamicum* being expressed constitutively and at a basal level.

5. The  $_{CG}ArsR1$  and  $_{CG}ArsR2$  repressors contain essential cysteins for metalloregulation, but no for the interaction with DNA. These cysteins form an atypical metal binding site involving residues from both monomers that bind As(III) and Sb(III), but no As(V). The binding induces a conformational change in  $_{CG}ArsR$  that releases the repressor from DNA.

6. The arsenite permeases *CGAcr3(1)* and *CGAcr3(2)* belong to the BART superfamily of membrane transporters and are essential for As(III) but not for Sb(III) detoxification. Its transport mechanism is ATP-independent and the disruption of both the *acr3(1)* and *acr3(2)* genes induces the accumulation of arsenic in the cytoplasm of the cell.

7. There are 4 arsenate reductases in *C. glutamicum* which belong to three different protein families. Only the reductases *CGArsC1* and *CGArsC2* are functional and participate in the reduction of As(V) to As(III).

8. The reductases *CGArsC1* and *CGArsC2* present an action mechanism different to those described up to now. This mechanism is based on the coupling to mycothiol and mycoredoxin (MSH/Mrx). This mechanism also involves mycothione reductase (MTR) and NADPH with an essential role in completing the catalytic cycle.



## *Bibliografía*

---





## **6. BIBLIOGRAFÍA.**

---

1. **Aaltonen, E. K. and M. Silow.** 2008. Transmembrane topology of the Acr3 family arsenite transporter from *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**:963-973.
2. **Abe, S., K. Takayama, and S. Kinoshita.** 1967. Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *In: J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 279-301.
3. **Abramson, J., S. Iwata, and H. R. Kaback.** 2004. Lactose permease as a paradigm for membrane transport proteins (Review). *Mol. Membr. Biol.* **21**:227-236.
4. **Achour, A. R., P. Bauda, and P. Billard.** 2007. Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Res. Microbiol.* **158**:128-137.
5. **Afkar, E., J. Lisak, C. Saltikov, P. Basu, R. S. Oremland, and J. F. Stolz.** 2003. The respiratory arsenate reductase from *Bacillus selenitireducens* strain MLS10. *FEMS Microbiol. Lett.* **226**:107-112.
6. **Aguilar, M. V., M. C. Martinez, and T. A. Masoud.** 1987. Arsenic content in some Spanish wines. Influence of the wine-making technique on arsenic content in musts and wines. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **185**:185-187.
7. **Akao, Y., H. Yamada, and Y. Nakagawa.** 2000. Arsenic-induced apoptosis in malignant cells in vitro. *Leuk. Lymphoma* **37**:53-63.

## Bibliografía.

---

8. **Al-Lahham, A., V. Rohde, P. Heim, R. Leuchter, J. Veeck, C. Wunderlich, K. Wolf, and M. Zimmermann.** 1999. Biosynthesis of phytochelatin in the fission yeast. Phytochelatin synthesis: a second role for the glutathione synthetase gene of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **15**:385-396.
9. **Albores, A., J. Koropatnick, M. G. Cherian, and A. J. Zelazowski.** 1992. Arsenic induces and enhances rat hepatic metallothionein production in vivo. *Chem. Biol. Interact.* **85**:127-140.
10. **Alfasi, H., D. Friedberg, and I. Froedberg.** 1979. Phosphate transport in arsenate-resistant mutants of *Micrococcus lysodeikticus*. *J. Bacteriol.* **137**:69-72.
11. **Allan, A. K., G. M. Hawksworth, L. R. Woodhouse, B. Sutherland, J. C. King, and J. H. Beattie.** 2000. Lymphocyte metallothionein mRNA responds to marginal zinc intake in human volunteers. *Br. J. Nutr.* **84**:747-756.
12. **Aposhian, H. V., E. S. Gurzau, X. C. Le, A. Gurzau, S. M. Healy, X. Lu, M. Ma, L. Yip, R. A. Zakharyan, R. M. Maiorino, R. C. Dart, M. G. Tircus, D. Gonzalez-Ramirez, D. L. Morgan, D. Avram, and M. M. Aposhian.** 2000. Occurrence of monomethylarsonous acid in urine of humans exposed to inorganic arsenic. *Chem. Res. Toxicol.* **13**:693-697.
13. **Aslund, F., B. Ehn, A. Miranda-Vizuete, C. Pueyo, and A. Holmgren.** 1994. Two additional glutaredoxins exist in *Escherichia coli*: glutaredoxin 3 is a hydrogen donor for ribonucleotide reductase in a thioredoxin/glutaredoxin 1 double mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:9813-9817.
14. **Banci, L., I. Bertini, F. Cantini, S. Ciofi-Baffoni, J. S. Cavet, C. Dennison, A. I. Graham, D. R. Harvie, and N. J. Robinson.** 2007. NMR structural analysis of cadmium sensing by winged helix repressor CmtR. *J. Biol. Chem.* **282**:30181-30188.
15. **Barbaste, M., B. Medina, and J. P. Perez-Trujillo.** 2003. Analysis of arsenic, lead and cadmium in wines from the Canary Islands, Spain, by ICP/MS. *Food Addit. Contam.* **20**:141-148.
16. **Barksdale, L.** 1970. *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. *Bacteriol. Rev.* **4**:378-422.
17. **Battaglia-Brunet, F., M. C. Dictor, F. Garrido, C. Crouzet, D. Morin, K. Dekeyser, M. Clarens, and P. Baranger.** 2002. An arsenic(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors. *J. Appl. Microbiol.* **93**:656-667.
18. **Bennett, M. S., Z. Guan, M. Laurberg, and X. D. Su.** 2001. *Bacillus subtilis* arsenate reductase is structurally and functionally similar to low molecular weight protein tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:13577-13582.
19. **Bentley, R. and T. G. Chasteen.** 2002. Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:250-271.
20. **Bhattacharjee, H. and B. P. Rosen.** 2007. Microbial arsenic metabolism. *In: How bacteria handle heavy metals*, p. 371-406. Eds. Nies, D.H. and S. Silver. Heidelberg: Springer.
21. **Bhattacharya, P., A. H. Welch, K. G. Stollenwerk, M. J. McLaughlin, J. Bundschuh, and G. Panullah.** 2007. Arsenic in the environment: Biology and Chemistry. *Sci. Total Environ.* **379**:109-120.
22. **Blindauer, C. A., M. D. Harrison, J. A. Parkinson, A. K. Robinson, J. S. Cavet, N. J. Robinson, and P. J. Sadler.** 2001. A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:9593-9598.
23. **Bobrowicz, P., R. Wysocki, G. Owsianik, A. Goffeau, and S. Ulaszewski.** 1997. Isolation of three contiguous genes, *ACR1*, *ACR2* and *ACR3*, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**:819-828.
24. **Bose, M., D. Slick, M. J. Sarto, P. Murphy, D. Roberts, J. Roberts, and R. D. Barber.** 2006. Identification of SmtB/ArsR cis elements and proteins in archaea using the Prokaryotic InterGenic Exploration Database (PIGED). *Archaea.* **2**:39-49.
25. **brahim-Tallaa, L. and M. P. Waalkes.** 2008. Inorganic arsenic and human prostate cancer. *Environ. Health Perspect.* **116**:158-164.

26. **Branco, R., A. P. Chung, and P. V. Morais.** 2008. Sequencing and expression of two arsenic resistance operons with different functions in the highly arsenic-resistant strain *Ochrobactrum tritici* SCII24T. *BMC. Microbiol.* **8**:95.
27. **Bredfeldt, T. G., B. Jagadish, K. E. Eblin, E. A. Mash, and A. J. Gandolfi.** 2006. Monomethylarsonous acid induces transformation of human bladder cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **216**:69-79.
28. **Bridges, C. C. and R. K. Zalups.** 2005. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **204**:274-308.
29. **Bun-ya, M., K. Shikata, S. Nakade, C. Yompakdee, S. Harashima, and Y. Oshima.** 1996. Two new genes, *PHO86* and *PHO87*, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **29**:344-351.
30. **Bushweller, J. H., F. Aslund, K. Wuthrich, and A. Holmgren.** 1992. Structural and functional characterization of the mutant *Escherichia coli* glutaredoxin (C14S) and its mixed disulfide with glutathione. *Biochemistry* **31**:9288-9293.
31. **Butcher, B. G., S. M. Deane, and D. E. Rawlings.** 2000. The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an unusual arrangement and confer increased arsenic and antimony resistance to *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1826-1833.
32. **Butcher, B. G. and D. E. Rawlings.** 2002. The divergent chromosomal *ars* operon of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is regulated by an atypical ArsR protein. *Microbiology* **148**:3983-3992.
33. **Cai, J., K. Salmon, and M. S. DuBow.** 1998. A chromosomal *ars* operon homologue of *Pseudomonas aeruginosa* confers increased resistance to arsenic and antimony in *Escherichia coli*. *Microbiology* **144** :2705-2713.
34. **Canovas, D., I. Cases, and V. de Lorenzo.** 2003. Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. *Environ. Microbiol.* **5**:1242-1256.
35. **Catarecha, P., M. D. Segura, J. M. Franco-Zorrilla, B. Garcia-Ponce, M. Lanza, R. Solano, J. Paz-Ares, and A. Leyva.** 2007. A mutant of the *Arabidopsis* phosphate transporter PHT1;1 displays enhanced arsenic accumulation. *Plant Cell* **19**:1123-1133.
36. **Chen, Y. and B. P. Rosen.** 1997. Metalloregulatory properties of the ArsD repressor. *J. Biol. Chem.* **272**:14257-14262.
37. **Cobbett, C. and P. Goldsbrough.** 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**:159-182.
38. **Cook, W. J., S. R. Kar, K. B. Taylor, and L. M. Hall.** 1998. Crystal structure of the cyanobacterial metallothionein repressor SmtB: a model for metalloregulatory proteins. *J. Mol. Biol.* **275**:337-346.
39. **Costa, J. J., J. L. Michel, R. Rappuoli, and J. R. Murphy.** 1981. Restriction map of corynebacteriophages beta c and beta vir and physical localization of the diphtheria tox operon. *J. Bacteriol.* **148**:124-130.
40. **Csanaky, I. and Z. Gregus.** 2002. Species variations in the biliary and urinary excretion of arsenate, arsenite and their metabolites. *Comp Biochem. Physiol C. Toxicol. Pharmacol.* **131**:355-365.
41. **Culotta, V. C., L. W. Klomp, J. Strain, R. L. Casareno, B. Krems, and J. D. Gitlin.** 1997. The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **272**:23469-23472.
42. **Cure, G. L. and R. M. Keddie.** 1973. Methods for the morphological examination of aerobic coryneform bacteria. *In: Sampling Microbial Monitoring or Environments*, p. 123-135. Eds, Boarf, R. G., Lovelock, D. M. New York: Academic Press.
43. **de Miguel-Martinez, I., F. Fernandez-Fuertes, A. Ramos-Macias, J. M. Bosch-Benitez, and A. M. Martin-Sanchez.** 1996. Sepsis due to multiply resistant *Corynebacterium amycolatum*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**:617-618.
44. **Delnomdedieu, M., M. M. Basti, J. D. Otvos, and D. J. Thomas.** 1994. Reduction and binding of arsenate and dimethylarsinate by glutathione: a magnetic resonance study. *Chem. Biol. Interact.* **90**:139-155.
45. **DeMel, S., J. Shi, P. Martin, B. P. Rosen, and B. F. Edwards.** 2004. Arginine 60 in the ArsC arsenate reductase of *E. coli* plasmid R773 determines the chemical nature of the bound As(III) product. *Protein Sci.* **13**:2330-2340.
46. **Dey, S., D. Dou, and B. P. Rosen.** 1994. ATP-dependent arsenite transport in everted membrane vesicles of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**:25442-25446.

## *Bibliografía.*

---

47. **Dey, S. and B. P. Rosen.** 1995. Dual mode of energy coupling by the oxyanion-translocating ArsB protein. *J. Bacteriol.* **177**:385-389.
48. **Durand, P., L. Canard, and J. P. Mornon.** 1997. Visual BLAST and visual FASTA: graphic workbenches for interactive analysis of full BLAST and FASTA outputs under MICROSOFT WINDOWS 95/NT. *Comput. Appl. Biosci.* **13**:407-413.
49. **Eisler, R.** 2004. Arsenic hazards to humans, plants, and animals from gold mining. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **180**:133-165.
50. **Ellis, P. J., T. Conrads, R. Hille, and P. Kuhn.** 2001. Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure.* **9**:125-132.
51. **Esteban, J., E. Nieto, R. Calvo, R. Fernandez-Robals, P. L. Valero-Guillen, and F. Soriano.** 1999. Microbiological characterization and clinical significance of *Corynebacterium amycolatum* strains. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**:518-521.
52. **Fanous, A., W. Weiss, A. Gorg, F. Jacob, and H. Parlar.** 2008. A proteome analysis of the cadmium and mercury response in *Corynebacterium glutamicum*. *Proteomics.* **8**:4976-4986.
53. **Feng, J., Y. Che, J. Milse, Y. J. Yin, L. Liu, C. Ruckert, X. H. Shen, S. W. Qi, J. Kalinowski, and S. J. Liu.** 2006. The gene *ncg2918* encodes a novel maleylpyruvate isomerase that needs mycothiol as cofactor and links mycothiol biosynthesis and gentisate assimilation in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **281**:10778-10785.
54. **Feo, J. C., E. Ordóñez, M. Letek, M. A. Castro, M. I. Munoz, J. A. Gil, L. M. Mateos, and A. J. Aller.** 2007. Retention of inorganic arsenic by coryneform mutant strains. *Water Res.* **41**:531-542.
55. **Fernandes, A. P., M. Fladvad, C. Berndt, C. Andresen, C. H. Lillig, P. Neubauer, M. Sunnerhagen, A. Holmgren, and A. Vlamis-Gardikas.** 2005. A novel monothiol glutaredoxin (Grx4) from *Escherichia coli* can serve as a substrate for thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* **280**:24544-24552.
56. **Fernandez-Natal, I., J. Guerra, M. Alcoba, F. Cachon, and F. Soriano.** 2001. Bacteremia caused by multiply resistant *Corynebacterium urealyticum*: six case reports and review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**:514-517.
57. **Finney, L. A. and T. V. O'Halloran.** 2003. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* **300**:931-936.
58. **Garrity, M. G., M. Winters, A. W. Kuo, and D. B. Searles.** 2002. Taxonomic outline of the Procaryotes, *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition.*
59. **Ghosh, M., J. Shen, and B. P. Rosen.** 1999. Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:5001-5006.
60. **Gladysheva, T., J. Liu, and B. P. Rosen.** 1996. His-8 lowers the pKa of the essential Cys-12 residue of the ArsC arsenate reductase of plasmid R773. *J. Biol. Chem.* **271**:33256-33260.
61. **Gladysheva, T. B., K. L. Oden, and B. P. Rosen.** 1994. Properties of the arsenate reductase of plasmid R773. *Biochemistry* **33**:7288-7293.
62. **Gold, B., H. Deng, R. Bryk, D. Vargas, D. Eliezer, J. Roberts, X. Jiang, and C. Nathan.** 2008. Identification of a copper-binding metallothionein in pathogenic mycobacteria. *Nat. Chem. Biol.* **4**:609-616
63. **Goodfellow, M.** 1989. Supragenetic classification of actinomycetes. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, p. 2333-2339.* Eds Williams, S.AT., M.E. Sharpe, J.G. Holt. Baltimore: The Williams and Wilkins Company.
64. **Gourbal, B., N. Sonuc, H. Bhattacharjee, D. Legare, S. Sundar, M. Ouellette, B. P. Rosen, and R. Mukhopadhyay.** 2004. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J. Biol. Chem.* **279**:31010-31017.
65. **Greven, M., S. Green, B. Robinson, B. Clothier, I. Vogeler, R. Agnew, S. Neal, and S. Sivakumaran.** 2007. The impact of CCA-treated posts in vineyards on soil and ground water. *Water Sci. Technol.* **56**:161-168.
66. **Grill, E., E. L. Winnacker, and M. H. Zenk.** 1987. Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:439-443.

67. **Grill, E., S. Loffler, E. L. Winnacker, and M. H. Zenk.** 1989. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:6838-6842.
68. **Gross, D. C. and A. K. Vidaver.** 1979. Bacteriocins of phytopathogenic *Corynebacterium* species. *Can. J. Microbiol* **25**:367-374.
69. **Guo, X., Y. Li, K. Peng, Y. Hu, C. Li, B. Xia, and C. Jin.** 2005. Solution structures and backbone dynamics of arsenate reductase from *Bacillus subtilis*: reversible conformational switch associated with arsenate reduction. *J. Biol. Chem.* **280**:39601-39608.
70. **Harris, R. M., D. C. Webb, S. M. Howitt, and G. B. Cox.** 2001. Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:5008-5014.
71. **Hayakawa, T., Y. Kobayashi, X. Cui, and S. Hirano.** 2005. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Arch. Toxicol.* **79**:183-191.
72. **Heck, J. E., Y. Chen, V. R. Grann, V. Slavkovich, F. Parvez, and H. Ahsan.** 2008. Arsenic exposure and anemia in Bangladesh: a population-based study. *J. Occup. Environ. Med.* **50**:80-87.
73. **Honschopp, S., N. Brunken, A. Nehrhorn, and H. J. Breunig.** 1996. Isolation and characterization of a new arsenic methylating bacterium from soil. *Microbiol. Res.* **151**:37-41.
74. **Hopenhayn-Rich, C., A. H. Smith, and H. M. Goeden.** 1993. Human studies do not support the methylation threshold hypothesis for the toxicity of inorganic arsenic. *Environ. Res.* **60**:161-177.
75. **Huang, R. N. and T. C. Lee.** 1996. Cellular uptake of trivalent arsenite and pentavalent arsenate in KB cells cultured in phosphate-free medium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **136**:243-249.
76. **Huang, Z. C., Z. Z. An, T. B. Chen, M. Lei, X. Y. Xiao, and X. Y. Liao.** 2007. Arsenic uptake and transport of *Pteris vittata* L. as influenced by phosphate and inorganic arsenic species under sand culture. *J. Environ. Sci. (China)* **19**:714-718.
77. **Ji, G. and S. Silver.** 1992a. Regulation and expression of the arsenic resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J. Bacteriol.* **174**:3684-3694.
78. **Ji, G. and S. Silver.** 1992b. Reduction of arsenate to arsenite by the ArsC protein of the arsenic resistance operon of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:9474-9478.
79. **Ji, G., E. A. Garber, L. G. Armes, C. M. Chen, J. A. Fuchs, and S. Silver.** 1994. Arsenate reductase of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *Biochemistry* **33**:7294-7299.
80. **Jia, H. and P. Kaur.** 2001. Role of the linker region of the anion-stimulated ATPase ArsA. Effect of deletion and point mutations in the linker region. *J. Biol. Chem.* **276** :29582-29587.
81. **Jiang, Y., H. Bhattacharjee, T. Zhou, B. P. Rosen, S. V. Ambudkar, and Z. E. Sauna.** 2005. Nonequivalence of the nucleotide binding domains of the ArsA ATPase. *J. Biol. Chem.* **280**:9921-9926.
82. **Kagi, J. H.** 1991. Overview of metallothionein. *Methods Enzymol.* **205**:613-626.
83. **Kala, S. V., M. W. Neely, G. Kala, C. I. Prater, D. W. Atwood, J. S. Rice, and M. W. Lieberman.** 2000. The MRP2/cMOAT transporter and arsenic-glutathione complex formation are required for biliary excretion of arsenic. *J. Biol. Chem.* **275**:33404-33408.
84. **Kapaj, S., H. Peterson, K. Liber, and P. Bhattacharya.** 2006. Human health effects from chronic arsenic poisoning--a review. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng* **41**:2399-2428.
85. **Karkaria, C. E., C. M. Chen, and B. P. Rosen.** 1990. Mutagenesis of a nucleotide-binding site of an anion-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **265**:7832-7836.
86. **Katz, S. A. and H. Salem.** 2005. Chemistry and toxicology of building timbers pressure-treated with chromated copper arsenate: a review. *J. Appl. Toxicol.* **25**:1-7.

## *Bibliografia.*

---

87. **Kaur, P. and B. P. Rosen.** 1992. Mutagenesis of the C-terminal nucleotide-binding site of an anion-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**:19272-19277.
88. **Kaur, P.** 1999. The anion-stimulated ATPase ArsA shows unisite and multisite catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **274**:25849-25854.
89. **Khan, B. I., J. Jambeck, H. M. Solo-Gabriele, T. G. Townsend, and Y. Cai.** 2006. Release of arsenic to the environment from CCA-treated wood. 2. Leaching and speciation during disposal. *Environ. Sci. Technol.* **40**:994-999.
90. **Kihlken, M. A., C. Singleton, and N. E. Le Brun.** 2008. Distinct characteristics of Ag<sup>+</sup> and Cd<sup>2+</sup> binding to CopZ from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **13**:1011-1023.
91. **Kintz, P., M. Ginet, N. Marques, and V. Cirimele.** 2007. Arsenic speciation of two specimens of Napoleon's hair. *Forensic Sci. Int.* **170**:204-206.
92. **Kita, K., N. Miura, M. Yoshida, K. Yamazaki, T. Ohkubo, Y. Imai, and A. Naganuma.** 2006. Potential effect on cellular response to cadmium of a single-nucleotide A → G polymorphism in the promoter of the human gene for metallothionein IIA. *Hum. Genet.* **120**:553-560.
93. **Klaassen, C. D., J. Liu, and S. Choudhuri.** 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**:267-294.
94. **Kneer, R., T. M. Kutchan, A. Hochberger, and M. H. Zenk.** 1992. *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. *Arch. Microbiol.* **157**:305-310.
95. **Kostal, J., R. Yang, C. H. Wu, A. Mulchandani, and W. Chen.** 2004. Enhanced arsenic accumulation in engineered bacterial cells expressing ArsR. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4582-4587.
96. **Krafft, T. and J. M. Macy.** 1998. Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *Eur. J. Biochem.* **255**:647-653.
97. **Kreppel, H., J. W. Bauman, J. Liu, J. M. McKim, Jr., and C. D. Klaassen.** 1993. Induction of metallothionein by arsenicals in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* **20**:184-189.
98. **Krogh, A., B. Larsson, H. G. von, and E. L. Sonnhammer.** 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**:567-580.
99. **Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei.** 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* **5**:150-163.
100. **Kuroda, M., S. Dey, O. I. Sanders, and B. P. Rosen.** 1997. Alternate energy coupling of ArsB, the membrane subunit of the Ars anion-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **272**:326-331.
101. **Kwaszewska, A. and E. M. Szewczyk.** 2007. [Production of antibacterial substances by resident corynebacteria isolated from human skin]. *Med. Dosw. Mikrobiol.* **59**:251-257.
102. **Lah, N., J. Lah, I. Zegers, L. Wyns, and J. Messens.** 2003. Specific potassium binding stabilizes pl258 arsenate reductase from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **278**:24673-24679.
103. **Lamarche, M. G., B. L. Wanner, S. Crepin, and J. Harel.** 2008. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:461-473.
104. **Landrigan, P. J., R. J. Costello, and W. T. Stringer.** 1982. Occupational exposure to arsine. An epidemiologic reappraisal of current standards. *Scand. J. Work Environ. Health* **8**:169-177.
105. **Laverman, A. M., J. S. Blum, J. K. Schaefer, E. Phillips, D. R. Lovley, and R. S. Oremland.** 1995. Growth of Strain SES-3 with Arsenate and Other Diverse Electron Acceptors. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3556-3561.
106. **Lehmann, K. B. and R. O. Neumann.** 1907. Atlas und grundriss der bakteriologischen diagnostic. München.
107. **Leslie, E. M., A. Haimeur, and M. P. Waalkes.** 2004. Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J. Biol. Chem.* **279**:32700-32708.

108. **Letek, M., M. Fiuza, E. Ordóñez, A. F. Villadangos, A. Ramos, L. M. Mateos, and J. A. Gil.** 2008. Cell growth and cell division in the rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **94**:99-109.
109. **Li, J., S. Liu, and B. P. Rosen.** 1996. Interaction of ATP binding sites in the ArsA ATPase, the catalytic subunit of the Ars pump. *J. Biol. Chem.* **271**:25247-25252.
110. **Li, R., J. D. Haile, and P. J. Kennelly.** 2003. An arsenate reductase from *Synechocystis sp.* strain PCC 6803 exhibits a novel combination of catalytic characteristics. *J. Bacteriol.* **185**:6780-6789.
111. **Li, X. and L. R. Krumholz.** 2007. Regulation of arsenate resistance in *Desulfovibrio desulfuricans* G20 by an *arsRBCC* operon and an *arsC* gene. *J. Bacteriol.* **189**:3705-3711.
112. **Lin, S., Q. Shi, F. B. Nix, M. Styblo, M. A. Beck, K. M. Herbin-Davis, L. L. Hall, J. B. Simeonsson, and D. J. Thomas.** 2002. A novel S-adenosyl-L-methionine:arsenic(III) methyltransferase from rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.* **277**:10795-10803.
113. **Lin, Y. F., A. R. Walmsley, and B. P. Rosen.** 2006. An arsenic metallochaperone for an arsenic detoxification pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:15617-15622.
114. **Lin, Y. F., J. Yang, and B. P. Rosen.** 2007a. ArsD residues Cys12, Cys13, and Cys18 form an As(III)-binding site required for arsenic metallochaperone activity. *J. Biol. Chem.* **282**:16783-16791.
115. **Lin, Y. F., J. Yang, and B. P. Rosen.** 2007b. ArsD: an As(III) metallochaperone for the ArsAB As(III)-translocating ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **39**:453-458.
116. **Liu, J., T. B. Gladysheva, L. Lee, and B. P. Rosen.** 1995. Identification of an essential cysteinyl residue in the ArsC arsenate reductase of plasmid R773. *Biochemistry* **34**:13472-13476.
117. **Liu, J. and B. P. Rosen.** 1997. Ligand interactions of the ArsC arsenate reductase. *J. Biol. Chem.* **272**:21084-21089.
118. **Liu, J., Y. Liu, R. A. Goyer, W. Achanzar, and M. P. Waalkes.** 2000. Metallothionein-I/II null mice are more sensitive than wild-type mice to the hepatotoxic and nephrotoxic effects of chronic oral or injected inorganic arsenicals. *Toxicol. Sci.* **55**:460-467.
119. **Liu, J., H. Chen, D. S. Miller, J. E. Saavedra, L. K. Keefer, D. R. Johnson, C. D. Klaassen, and M. P. Waalkes.** 2001. Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. *Mol. Pharmacol.* **60**:302-309.
120. **Liu, J., M. L. Cheng, Q. Yang, K. R. Shan, J. Shen, Y. Zhou, X. Zhang, A. L. Dill, and M. P. Waalkes.** 2007. Blood metallothionein transcript as a biomarker for metal sensitivity: low blood metallothionein transcripts in arsenicosis patients from Guizhou, China. *Environ. Health Perspect.* **115**:1101-1106.
121. **Liu, Z., J. Shen, J. M. Carbrey, R. Mukhopadhyay, P. Agre, and B. P. Rosen.** 2002. Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:6053-6058.
122. **Liu, Z., J. M. Carbrey, P. Agre, and B. P. Rosen.** 2004a. Arsenic trioxide uptake by human and rat aquaglyceroporins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**:1178-1185.
123. **Liu, Z., E. Boles, and B. P. Rosen.** 2004b. Arsenic trioxide uptake by hexose permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**:17312-17318.
124. **Lopez-Maury, L., F. J. Florencio, and J. C. Reyes.** 2003. Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **185**:5363-5371.
125. **Lugli, A., I. Zlobec, G. Singer, L. A. Kopp, L. M. Terracciano, and R. M. Genta.** 2007. Napoleon Bonaparte's gastric cancer: a clinicopathologic approach to staging, pathogenesis, and etiology. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **4**:52-57.
126. **Macy, J. M., J. M. Santini, B. V. Pauling, A. H. O'Neill, and L. I. Sly.** 2000. Two new arsenate/sulfate-reducing bacteria: mechanisms of arsenate reduction. *Arch. Microbiol.* **173**:49-57.
127. **Maitani, T., H. Kubota, K. Sato, and T. Yamada.** 1996. The Composition of Metals Bound to Class III Metallothionein (Phytochelatin and Its Desglycyl Peptide) Induced by Various Metals in Root Cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol* **110**:1145-1150.

## *Bibliografia.*

---

128. **Malasarn, D., C. W. Saltikov, K. M. Campbell, J. M. Santini, J. G. Hering, and D. K. Newman.** 2004. *arrA* is a reliable marker for As(V) respiration. *Science* **306**:455.
129. **Malasarn, D., J. R. Keeffe, and D. K. Newman.** 2008. Characterization of the arsenate respiratory reductase from *Shewanella* sp. strain ANA-3. *J. Bacteriol.* **190**:135-142.
130. **Mansour, N. M., M. Sawhney, D. G. Tamang, C. Vogl, and M. H. Saier, Jr.** 2007. The bile/arsenite/riboflavin transporter (BART) superfamily. *FEBS J.* **274**:612-629.
131. **Mantovani, A., F. Maranghi, I. Purificato, and A. Macri.** 2006. Assessment of feed additives and contaminants: an essential component of food safety. *Ann. Ist. Super. Sanita* **42**:427-432.
132. **Martin, J. F.** 1989. Molecular genetics of amino acid-producing corynebacteria. *In: Microbial products: new approaches*, p. 25-59. Eds. Baumberg, S., I. Hunter, M. Rhodes. Cambridge: Cambridge University Press.
133. **Martin, P., S. DeMel, J. Shi, T. Gladysheva, D. L. Gatti, B. P. Rosen, and B. F. Edwards.** 2001. Insights into the structure, solvation, and mechanism of ArsC arsenate reductase, a novel arsenic detoxification enzyme. *Structure.* **9**:1071-1081.
134. **Mass, M. J., A. Tennant, B. C. Roop, W. R. Cullen, M. Styblo, D. J. Thomas, and A. D. Kligerman.** 2001. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem. Res. Toxicol.* **14**:355-361.
135. **McBride, B. C. and R. S. Wolfe.** 1971. Biosynthesis of dimethylarsine by *Methanobacterium*. *Biochemistry* **10**:4312-4317.
136. **Meng, Y. L., Z. Liu, and B. P. Rosen.** 2004. As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**:18334-18341.
137. **Merrifield, M. E., T. Ngu, and M. J. Stillman.** 2004. Arsenic binding to *Fucus vesiculosus* metallothionein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**:127-132.
138. **Messens, J., G. Hayburn, A. Desmyter, G. Laus, and L. Wyns.** 1999. The essential catalytic redox couple in arsenate reductase from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* **38**:16857-16865.
139. **Messens, J., J. C. Martins, E. Brosens, B. K. Van, D. M. Jacobs, R. Willem, and L. Wyns.** 2002a. Kinetics and active site dynamics of *Staphylococcus aureus* arsenate reductase. *J. Biol. Inorg. Chem.* **7**:146-156.
140. **Messens, J., J. C. Martins, B. K. Van, E. Brosens, A. Desmyter, G. M. De, J. M. Wieruszski, R. Willem, L. Wyns, and I. Zegers.** 2002b. All intermediates of the arsenate reductase mechanism, including an intramolecular dynamic disulfide cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:8506-8511.
141. **Messens, J., J. C. Martins, I. Zegers, B. K. Van, E. Brosens, and L. Wyns.** 2003. Purification of an oxidation-sensitive enzyme, p1258 arsenate reductase from *Staphylococcus aureus*. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **790**:217-227.
142. **Messens, J., M. Van, I. P. Vanhaesebrouck, M. Limbourg, B. K. Van, K. Wahni, J. C. Martins, R. Loris, and L. Wyns.** 2004. How thioredoxin can reduce a buried disulphide bond. *J. Mol. Biol.* **339**:527-537.
143. **Messens, J. and S. Silver.** 2006. Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. *J. Mol. Biol.* **362**:1-17.
144. **Meza, M. M., M. J. Kopplin, J. L. Burgess, and A. J. Gandolfi.** 2004. Arsenic drinking water exposure and urinary excretion among adults in the Yaqui Valley, Sonora, Mexico. *Environ. Res.* **96**:119-126.
145. **Mukhopadhyay, R., J. Shi, and B. P. Rosen.** 2000. Purification and characterization of Acr2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. *J. Biol. Chem.* **275**:21149-21157.
146. **Mukhopadhyay, R. and B. P. Rosen.** 2001. The phosphatase C(X)5R motif is required for catalytic activity of the *Saccharomyces cerevisiae* Acr2p arsenate reductase. *J. Biol. Chem.* **276**:34738-34742.
147. **Mukhopadhyay, R., B. P. Rosen, L. T. Phung, and S. Silver.** 2002. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**:311-325.



148. **Mukhopadhyay, R., Y. Zhou, and B. P. Rosen.** 2003. Directed evolution of a yeast arsenate reductase into a protein-tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* **278**:24476-24480.
149. **Muller, D., D. Lievreumont, D. D. Simeonova, J. C. Hubert, and M. C. Lett.** 2003. Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant beta-proteobacterium. *J. Bacteriol.* **185**:135-141.
150. **Mulrooney, S. B., S. K. Ward, and R. P. Hausinger.** 2005. Purification and properties of the *Klebsiella aerogenes* UreE metal-binding domain, a functional metallochaperone of urease. *J. Bacteriol.* **187**:3581-3585.
151. **Murphy, J. N. and C. W. Saltikov .** 2007. The *cymA* gene, encoding a tetraheme c-type cytochrome, is required for arsenate respiration in *Shewanella* species. *J. Bacteriol.* **189**:2283-2290.
152. **Newman, D. K., E. K. Kennedy, J. D. Coates, D. Ahmann, D. J. Ellis, D. R. Lovley, and F. M. Morel.** 1997. Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **168**:380-388.
153. **Newton, G. L., C. A. Bewley, T. J. Dwyer, R. Horn, Y. Aharonowitz, G. Cohen, J. Davies, D. J. Faulkner, and R. C. Fahey.** 1995. The structure of U17 isolated from *Streptomyces clavuligerus* and its properties as an antioxidant thiol. *Eur. J. Biochem.* **230**:821-825.
154. **Newton, G. L., P. Ta, K. P. Bzymek, and R. C. Fahey.** 2006. Biochemistry of the initial steps of mycothiol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **281**:33910-33920.
155. **Neyt, C., M. Iriarte, V. H. Thi, and G. R. Cornelis.** 1997. Virulence and arsenic resistance in *Yersinia* spp. *J. Bacteriol.* **179**:612-619.
156. **Niggemyer, A., S. Spring, E. Stackebrandt, and R. F. Rosenzweig.** 2001. Isolation and characterization of a novel As(V)-reducing bacterium: implications for arsenic mobilization and the genus *Desulfitobacterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5568-5580.
157. **Oden, K. L., T. B. Gladysheva, and B. P. Rosen.** 1994. Arsenate reduction mediated by the plasmid-encoded ArsC protein is coupled to glutathione. *Mol. Microbiol.* **12**:301-306.
158. **Ordóñez, E., M. Letek, N. Valbuena, J. A. Gil, and L. M. Mateos.** 2005. Analysis of genes involved in arsenic resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:6206-6215.
159. **Ordóñez, E., S. Thiyagarajan, J. D. Cook, T. L. Stemmler, J. A. Gil, L. M. Mateos, and B. P. Rosen.** 2008. Evolution of metal(loid) binding sites in transcriptional regulators. *J. Biol. Chem.* **283**:25706-25714.
160. **Ordóñez, E., B. K. Van, G. Roos, G. S. De, M. Letek, J. A. Gil, L. Wyns, L. M. Mateos, and J. Messens.** 2009. Arsenate reductase, mycothiol and mycoredoxin concert thiol/disulfide exchange. *J Biol. Chem.* doi: 10/1074/jbc.M900877200
161. **Oremland, R. S. and J. F. Stolz.** 2003. The ecology of arsenic. *Science* **300**:939-944.
162. **Oremland, R. S. and J. F. Stolz.** 2005. Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends Microbiol.* **13**:45-49.
163. **Osborne, F. H. and H. L. Enrich .** 1976. Oxidation of arsenite by a soil isolate of *Alcaligenes*. *J. Appl. Bacteriol.* **41**:295-305.
164. **Oteo, J., B. Aracil, A. J. Ignacio, and J. Luis Gomez-Garcés.** 2001. [Significant bacteremias by *Corynebacterium amycolatum*: an emergent pathogen]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **19**:103-106.
165. **Otsuka, Y., Y. Kawamura, T. Koyama, H. Iihara, K. Ohkusu, and T. Ezaki.** 2005. *Corynebacterium resistens* sp. nov., a new multidrug-resistant coryneform bacterium isolated from human infections. *J. Clin. Microbiol.* **43**:3713-3717.
166. **Otsuka, Y., K. Ohkusu, Y. Kawamura, S. Baba, T. Ezaki, and S. Kimura.** 2006. Emergence of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. *Diagn. Microbiol Infect. Dis.* **54**:109-114.
167. **Paez-Espino, D., J. Tamames, L. de, V, and D. Canovas.** 2009. Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals* **22**:117-130.

## *Bibliografía.*

---

168. **Park, J. D., Y. Liu, and C. D. Klaassen.** 2001. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals (1). *Toxicology* **163**:93-100.
169. **Patel, M. P. and J. S. Blanchard .** 2001. *Mycobacterium tuberculosis* mycothione reductase: pH dependence of the kinetic parameters and kinetic isotope effects. *Biochemistry* **40**:5119-5126.
170. **Patterson, T. J., M. Ngo, P. A. Aronov, T. V. Reznikova, P. G. Green, and R. H. Rice.** 2003. Biological activity of inorganic arsenic and antimony reflects oxidation state in cultured human keratinocytes. *Chem. Res. Toxicol.* **16**:1624-1631.
171. **Philips, S. E. and M. L. Taylor.** 1976. Oxidation of arsenite to arsenate by *Alcaligenes faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**:392-399.
172. **Pi, J., H. Yamauchi, G. Sun, T. Yoshida, H. Aikawa, W. Fujimoto, H. Iso, R. Cui, M. P. Waalkes, and Y. Kumagai.** 2005. Vascular dysfunction in patients with chronic arsenosis can be reversed by reduction of arsenic exposure. *Environ. Health Perspect.* **113**:339-341.
173. **Pickering, I. J., R. C. Prince, G. N. George, W. E. Rauser, W. A. Wickramasinghe, A. A. Watson, C. T. Dameron, I. G. Dance, D. P. Fairlie, and D. E. Salt.** 1999. X-ray absorption spectroscopy of cadmium phytochelatin and model systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1429**:351-364.
174. **Poirot, O., E. O'Toole, and C. Notredame.** 2003. Tcoffee@igs: A web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments. *Nucleic Acids Res.* **31**:3503-3506.
175. **Prescott, L. M., J. P. Harley, and D. A. Klein.** 1999. Microbiología. In McGraw-Hill Interamericana.
176. **Qin, J., B. P. Rosen, Y. Zhang, G. Wang, S. Franke, and C. Rensing.** 2006. Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:2075-2080.
177. **Qin, J., H. L. Fu, J. Ye, K. Z. Bencze, T. L. Stemmler, D. E. Rawlings, and B. P. Rosen.** 2007. Convergent evolution of a new arsenic binding site in the ArsR/SmtB family of metalloregulators. *J. Biol. Chem.* **282**:34346-34355.
178. **Radabaugh, T. R. and H. V. Aposhian.** 2000. Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: reduction of arsenate to arsenite by human liver arsenate reductase. *Chem. Res. Toxicol.* **13**:26-30.
179. **Rae, T. D., P. J. Schmidt, R. A. Pufahl, V. C. Culotta, and T. V. O'Halloran.** 1999. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284**:805-808.
180. **Ramirez-Solis, A., R. Mukopadhyay, B. P. Rosen, and T. L. Stemmler.** 2004. Experimental and theoretical characterization of arsenite in water: insights into the coordination environment of As-O. *Inorg. Chem.* **43**:2954-2959.
181. **Rao, N. N. and A. Torriani.** 1990. Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **4**:1083-1090.
182. **Rauser, W. E.** 1995. Phytochelatin and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol* **109**:1141-1149.
183. **Rauser, W. E.** 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem. Biophys.* **31**:19-48.
184. **Redman, A. D., D. L. Macalady, and D. Ahmann.** 2002. Natural organic matter affects arsenic speciation and sorption onto hematite. *Environ. Sci. Technol.* **36**:2889-2896.
185. **Renaud, F. N., M. Dutaur, S. Daoud, D. Aubel, P. Riegel, D. Monget, and J. Freney.** 1998. Differentiation of *Corynebacterium amycolatum*, *C. minutissimum*, and *C. striatum* by carbon substrate assimilation tests. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3698-3702.
186. **Renaud, F. N., D. Aubel, P. Riegel, H. Meugnier, and C. Bollet.** 2001. *Corynebacterium freneyi* sp. nov., alpha-glucosidase-positive strains related to *Corynebacterium xerosis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1723-1728.
187. **Robinson, G. R., Jr., P. Larkins, C. J. Boughton, B. W. Reed, and P. L. Sibrell.** 2007. Assessment of contamination from arsenical pesticide use on orchards in the Great Valley region, Virginia and West Virginia, USA. *J. Environ. Qual.* **36**:654-663.

188. **Romero-Isart, N. and M. Vasak.** 2002. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J. Inorg. Biochem.* **88**:388-396.
189. **Roos, G., L. Buts, B. K. Van, E. Brosens, P. Geerlings, R. Loris, L. Wyns, and J. Messens.** 2006. Interplay between ion binding and catalysis in the thioredoxin-coupled arsenate reductase family. *J. Mol. Biol.* **360**:826-838.
190. **Rosen, B. P.** 1999. Families of arsenic transporters. *Trends Microbiol.* **7**:207-212.
191. **Rosen, B. P.** 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.* **529**:86-92.
192. **Rosenberg, H., R. G. Gerdes, and K. Chegwidden.** 1977. Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **131**:505-511.
193. **Rosenstein, R., A. Peschel, B. Wieland, and F. Gotz.** 1992. Expression and regulation of the antimonite, arsenite, and arsenate resistance operon of *Staphylococcus xylosus* plasmid pSX267. *J. Bacteriol.* **174**:3676-3683.
194. **Rosenzweig, A. C.** 2002. Metallochaperones: bind and deliver. *Chem. Biol.* **9**:673-677.
195. **Sakuda, S., Z. Y. Zhou, and Y. Yamada.** 1994. Structure of a novel disulfide of 2-(N-acetylcysteinyl)amido-2-deoxy-alpha-D-glucopyranosyl-myo-inositol produced by *Streptomyces sp.* *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**:1347-1348.
196. **Saltikov, C. W., A. Cifuentes, K. Venkateswaran, and D. K. Newman.** 2003. The *ars* detoxification system is advantageous but not required for As(V) respiration by the genetically tractable *Shewanella* species strain ANA-3. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2800-2809.
197. **Saltikov, C. W. and D. K. Newman.** 2003. Genetic identification of a respiratory arsenate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:10983-10988.
198. **Saltikov, C. W., R. A. Wildman, Jr., and D. K. Newman.** 2005. Expression dynamics of arsenic respiration and detoxification in *Shewanella sp.* strain ANA-3. *J. Bacteriol.* **187**:7390-7396.
199. **San Francisco, M. J., C. L. Hope, J. B. Owolabi, L. S. Tisa, and B. P. Rosen.** 1990. Identification of the metalloreulatory element of the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *Nucleic Acids Res.* **18**:619-624.
200. **Sanders, O. I., C. Rensing, M. Kuroda, B. Mitra, and B. P. Rosen.** 1997. Antimonite is accumulated by the glycerol facilitator GlpF in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:3365-3367.
201. **Santini, J. M. and R. N. vanden Hoven.** 2004. Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. *J. Bacteriol.* **186**:1614-1619.
202. **Sato, T. and Y. Kobayashi.** 1998. The *ars* operon in the skin element of *Bacillus subtilis* confers resistance to arsenate and arsenite. *J. Bacteriol.* **180**:1655-1661.
203. **Satoh, M., Y. Aoki, and C. Tohyama.** 1997. Protective role of metallothionein in renal toxicity of cisplatinum. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **40**:358-362.
204. **Sauge-Merle, S., S. Cuine, P. Carrier, C. Lecomte-Pradines, D. T. Luu, and G. Peltier.** 2003. Enhanced toxic metal accumulation in engineered bacterial cells expressing *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:490-494.
205. **Scheindlin, S.** 2005. The duplicitous nature of inorganic arsenic. *Mol. Interv.* **5**:60-64.
206. **Scott, N., K. M. Hatlelid, N. E. MacKenzie, and D. E. Carter.** 1993. Reactions of arsenic(III) and arsenic(V) species with glutathione. *Chem. Res. Toxicol.* **6**:102-106.
207. **Shi, J., A. Vlamis-Gardikas, F. Aslund, A. Holmgren, and B. P. Rosen.** 1999. Reactivity of glutaredoxins 1, 2, and 3 from *Escherichia coli* shows that glutaredoxin 2 is the primary hydrogen donor to ArsC-catalyzed arsenate reduction. *J. Biol. Chem.* **274**:36039-36042.
208. **Shi, J., R. Mukhopadhyay, and B. P. Rosen.** 2003. Identification of a triad of arginine residues in the active site of the ArsC arsenate reductase of plasmid R773. *FEMS Microbiol. Lett.* **227**:295-301.

## Bibliografia.

---

209. **Shi, W., J. Wu, and B. P. Rosen.** 1994. Identification of a putative metal binding site in a new family of metalloregulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **269**:19826-19829.
210. **Sillevis Smitt, P. A., B. H. van, A. J. Baars, D. Troost, E. S. Louwerse, A. C. Krops-Hermus, F. A. de Wolff, and J. M. de Jong.** 1992. Increased metallothionein in the liver and kidney of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* **49**:721-724.
211. **Silver, S., A. Gupta, K. Matsui, and J. F. Lo.** 1999. Resistance to Ag(I) cations in bacteria: environments, genes and proteins. *Met. Based. Drugs* **6**:315-320.
212. **Silver, S. and I. T. Phung.** 2005a. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**:587-605.
213. **Silver, S. and L. T. Phung.** 2005b. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:599-608.
214. **Singh, S., A. Mulchandani, and W. Chen.** 2008. Highly selective and rapid arsenic removal by metabolically engineered *Escherichia coli* cells expressing *Fucus vesiculosus* metallothionein. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:2924-2927.
215. **Slonczewski, J. L., B. P. Rosen, J. R. Alger, and R. M. Macnab.** 1981. pH homeostasis in *Escherichia coli*: measurement by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance of methylphosphonate and phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **78**:6271-6275.
216. **Solomon, D. H., R. J. Wilkins, D. Meredith, and J. A. Browning.** 2007. Characterization of inorganic phosphate transport in bovine articular chondrocytes. *Cell Physiol Biochem.* **20**:99-108.
217. **Soriano, C., A. Creus, and R. Marcos.** 2007. Gene-mutation induction by arsenic compounds in the mouse lymphoma assay. *Mutat. Res.* **634**:40-50.
218. **Spies, H. S. and D. J. Steenkamp.** 1994. Thiols of intracellular pathogens. Identification of othiol A in *Leishmania donovani* and structural analysis of a novel thiol from *Mycobacterium bovis*. *Eur. J. Biochem.* **224**:203-213.
219. **Stackebrandt, E., F. A. Rainey, and N. L. Ward-Rainy.** 1997. Proposal for a new hierarchic classification system. Actinobacteria, classis nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 479-491.
220. **Stehr, M. and Y. Lindqvist.** 2004. NrdH-redoxin of *Corynebacterium ammoniagenes* forms a domain-swapped dimer. *Proteins* **55**:613-619.
221. **Stolz, J. F. and R. S. Oremland.** 1999. Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**:615-627.
222. **Styblo, M., L. M. Del Razo, L. Vega, D. R. Germolec, E. L. LeCluyse, G. A. Hamilton, W. Reed, C. Wang, W. R. Cullen, and D. J. Thomas.** 2000. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Arch. Toxicol.* **74**:289-299.
223. **Styblo, M., Z. Drobna, I. Jaspers, S. Lin, and D. J. Thomas.** 2002. The role of biomethylation in toxicity and carcinogenicity of arsenic: a research update. *Environ. Health Perspect.* **110 Suppl 5**:767-771.
224. **Tauch, A., O. Kaiser, T. Hain, A. Goesmann, B. Weisshaar, A. Albersmeier, T. Bekel, N. Bischoff, I. Brune, T. Chakraborty, J. Kalinowski, F. Meyer, O. Rupp, S. Schneiker, P. Viehoveer, and A. Puhler.** 2005. Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora. *J. Bacteriol.* **187**:4671-4682.
225. **Thomas, D. J., S. B. Waters, and M. Styblo.** 2004. Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **198**:319-326.
226. **Thorsen, M., Y. Di, C. Tangemo, M. Morillas, D. Ahmadpour, D. C. Van der, A. Wagner, E. Johansson, J. Boman, F. Posas, R. Wysocki, and M. J. Tamas.** 2006. The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. *Mol. Biol. Cell* **17**:4400-4410.
227. **Tisa, L. S. and B. P. Rosen.** 1990. Molecular characterization of an anion pump. The ArsB protein is the membrane anchor for the ArsA protein. *J. Biol. Chem.* **265**:190-194.

228. **Vahidnia, A., d. van, V, and F. A. de Wolff.** 2007. Arsenic neurotoxicity--a review. *Hum. Exp. Toxicol.* **26**:823-832.
229. **van Wezel, G. P., K. Mahr, M. Konig, B. A. Traag, E. F. Pimentel-Schmitt, A. Willimek, and F. Titgemeyer.** 2005. GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **55**:624-636.
230. **Vorontsov, I. I., G. Minasov, J. S. Brunzelle, L. Shuvalova, O. Kiryukhina, F. R. Collart, and W. F. Anderson.** 2007. Crystal structure of an apo form of *Shigella flexneri* ArsH protein with an NADPH-dependent FMN reductase activity. *Protein Sci.* **16**:2483-2490.
231. **Waalkes, M. P., J. Liu, R. A. Goyer, and B. A. Diwan.** 2004. Metallothionein-I/II double knockout mice are hypersensitive to lead-induced kidney carcinogenesis: role of inclusion body formation. *Cancer Res.* **64**:7766-7772.
232. **Waalkes, M. P., J. Liu, K. S. Kasprzak, and B. A. Diwan.** 2006. Hypersusceptibility to cisplatin carcinogenicity in metallothionein-I/II double knockout mice: production of hepatocellular carcinoma at clinically relevant doses. *Int. J. Cancer* **119**:28-32.
233. **Wackett, L. P., A. G. Dodge, and L. B. Ellis.** 2004. Microbial genomics and the periodic table. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:647-655.
234. **Walmsley, A. R., T. Zhou, M. I. Borges-Walmsley, and B. P. Rosen.** 2001. Antimonite regulation of the ATPase activity of ArsA, the catalytic subunit of the arsenical pump. *Biochem. J.* **360**:589-597.
235. **Wang, L., S. Chen, X. Xiao, X. Huang, D. You, X. Zhou, and Z. Deng.** 2006. *arsRBOCT* arsenic resistance system encoded by linear plasmid pHZ227 in *Streptomyces sp.* strain FR-008. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:3738-3742.
236. **Wanner, B. L.** 1993. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J. Cell Biochem.* **51**:47-54.
237. **Wanner, B. L.** 1996. Signal transduction in the control of phosphate-regulated genes of *Escherichia coli*. *Kidney Int.* **49**:964-967.
238. **Waters, S. B., V. Devesa, M. W. Fricke, J. T. Creed, M. Styblo, and D. J. Thomas.** 2004a. Glutathione modulates recombinant rat arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase-catalyzed formation of trimethylarsine oxide and trimethylarsine. *Chem. Res. Toxicol.* **17**:1621-1629.
239. **Waters, S. B., V. Devesa, L. M. Del Razo, M. Styblo, and D. J. Thomas.** 2004b. Endogenous reductants support the catalytic function of recombinant rat *cyt19*, an arsenic methyltransferase. *Chem. Res. Toxicol.* **17**:404-409.
240. **Willsky, G. R. and M. H. Malamy.** 1980. Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **144**:356-365.
241. **Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.
242. **Wood, T. C., O. E. Salavagionne, B. Mukherjee, L. Wang, A. F. Klumpp, B. A. Thomae, B. W. Eckloff, D. J. Schaid, E. D. Wieben, and R. M. Weinshilboum.** 2006. Human arsenic methyltransferase (AS3MT) pharmacogenetics: gene resequencing and functional genomics studies. *J. Biol. Chem.* **281**:7364-7373.
243. **Wu, J., L. S. Tisa, and B. P. Rosen.** 1992. Membrane topology of the ArsB protein, the membrane subunit of an anion-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**:12570-12576.
244. **Wu, J. and B. P. Rosen.** 1993. Metalloregulated expression of the *ars* operon. *J. Biol. Chem.* **268**:52-58.
245. **Wu, M. T., B. Demple, R. A. Bennett, D. C. Christiani, R. Fan, and H. Hu.** 2000. Individual variability in the zinc inducibility of metallothionein-IIA mRNA in human lymphocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A.* **61**:553-567.
246. **Wysocki, R., P. Bobrowicz, and S. Ulaszewski.** 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* *ACR3* gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *J. Biol. Chem.* **272**:30061-30066.
247. **Wysocki, R., C. C. Chery, D. Wawrzycka, H. M. Van, R. Cornelis, J. M. Thevelein, and M. J. Tamas.** 2001. The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **40**:1391-1401.
248. **Xue, J., V. G. Zartarian, H. Ozkaynak, W. Dang, G. Glen, L. Smith, and C. Stallings.** 2006. A probabilistic arsenic exposure assessment for children who contact chromated copper arsenate (CCA)-treated playsets and decks, Part 2: Sensitivity and uncertainty analyses. *Risk Anal.* **26**:533-541.

## *Bibliografija.*

---

249. **Yang, H. C., J. Cheng, T. M. Finan, B. P. Rosen, and H. Bhattacharjee.** 2005. Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **187**:6991-6997.
250. **Ye, J., A. Kandedgedara, P. Martin, and B. P. Rosen.** 2005. Crystal structure of the *Staphylococcus aureus* pl258 CadC Cd(II)/Pb(II)/Zn(II)-responsive repressor. *J. Bacteriol.* **187**:4214-4221.
251. **Ye, J., H. C. Yang, B. P. Rosen, and H. Bhattacharjee.** 2007. Crystal structure of the flavoprotein ArsH from *Sinorhizobium meliloti*. *FEBS Lett.* **581**:3996-4000.
252. **Yoon, K. P., T. K. Misra, and S. Silver.** 1991. Regulation of the cadA cadmium resistance determinant of *Staphylococcus aureus* plasmid pl258. *J. Bacteriol.* **173**:7643-7649.
253. **Yoshida, M., C. Watanabe, M. Satoh, A. Yasutake, M. Sawada, Y. Ohtsuka, Y. Akama, and C. Tohyama.** 2004a. Susceptibility of metallothionein-null mice to the behavioral alterations caused by exposure to mercury vapor at human-relevant concentration. *Toxicol. Sci.* **80**:69-73.
254. **Yoshida, T., H. Yamauchi, and S. G. Fan.** 2004b. Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose-response relationships in review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **198**:243-252.
255. **Yuan, Z. C., R. Zaheer, and T. M. Finan.** 2006. Regulation and properties of PstSCAB, a high-affinity, high-velocity phosphate transport system of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **188**:1089-1102.
256. **Zagury, G., S. Dobran, S. Estrela, and L. Deschenes.** 2008. Inorganic Arsenic Speciation in Soil and Groundwater Near In-service Chromated Copper Arsenate-treated Wood Poles. *Environ. Toxicol. Chem.* **27**:799-807
257. **Zakharyan, R., Y. Wu, G. M. Bogdan, and H. V. Aposhian.** 1995. Enzymatic methylation of arsenic compounds: assay, partial purification, and properties of arsenite methyltransferase and monomethylarsonic acid methyltransferase of rabbit liver. *Chem. Res. Toxicol.* **8**:1029-1038.
258. **Zakharyan, R. A. and H. V. Aposhian.** 1999. Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: the rate-limiting enzyme of rabbit liver arsenic biotransformation is MMA(V) reductase. *Chem. Res. Toxicol.* **12**:1278-1283.
259. **Zakharyan, R. A., F. yala-Fierro, W. R. Cullen, D. M. Carter, and H. V. Aposhian.** 1999. Enzymatic methylation of arsenic compounds. VII. Monomethylarsonous acid (MMAIII) is the substrate for MMA methyltransferase of rabbit liver and human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **158**:9-15.
260. **Zakharyan, R. A., A. Sampayo-Reyes, S. M. Healy, G. Tsapralis, P. G. Board, D. C. Liebler, and H. V. Aposhian.** 2001. Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *Chem. Res. Toxicol.* **14**:1051-1057.
261. **Zegers, I., J. C. Martins, R. Willem, L. Wyns, and J. Messens.** 2001. Arsenate reductase from *S. aureus* plasmid pl258 is a phosphatase drafted for redox duty. *Nat. Struct. Biol.* **8**:843-847.
262. **Zenk, M. H.** 1996. Heavy metal detoxification in higher plants--a review. *Gene* **179**:21-30.
263. **Zhou, T., S. Radaev, B. P. Rosen, and D. L. Gatti.** 2000. Structure of the ArsA ATPase: the catalytic subunit of a heavy metal resistance pump. *EMBO J.* **19**:4838-4845.