



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

"EL FACTOR sigma ES RESPONSABLE DE LA EXPRESION DE LOS GENES FLAGELARES DE CLASE II EN Rhodobacter sphaeroides."

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A :
SEBASTIAN POGGIO GHILARUCCI

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJIA

MEXICO, D.F.
CIUDAD UNIVERSITARIA,
OCTUBRE DE 2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Direccion General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electronico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Sebastian Aguirre

FECHA: 14/01/2002

FIRMA: Sebastian Aguirre

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

NO SE
DEBE
REPRODUCIR

A mi madre, a mis hermanas Caro y Eleo y a Laura

Agradecimientos

Agradezco a Aurora Osorio sin cuya ayuda este trabajo no hubiera sido posible, a Doña Julia su infatigable labor de cada mañana.

Al comité tutorial: Dra. Alicia González, Dra. Carmen Gómez, Dra Imelda López y Dr. Juan Miranda por su paciencia para revisar esta tesis.

A todos los que me aguantaron en el laboratorio e hicieron las incontables horas entre esas cuatro paredes un poco más amenas.

Resumen

El mecanismo de motilidad bacteriana mejor estudiado a todos niveles hasta el momento es el de nado. Este mecanismo depende de la capacidad de la bacteria para ensamblar y mover uno o varios flagelos. La biogénesis del flagelo esta ligada a la regulación de las mas de 40 proteínas requeridas para la formación de esta estructura. La coordinación de la expresión de las proteínas flagelares con el ensamblaje del flagelo tiene como resultado una jerarquización de la expresión de los genes flagelares. Normalmente, la clase I de esta jerarquía esta constituida por proteínas regulatorias encargadas de controlar la expresión del resto de las proteínas pertenecientes a la jerarquía. *Rhodobacter sphaeroides* es una α -proteobacteria monoflagelada. Previamente se han descrito varios genes flagelares de esta bacteria, pero hasta el momento no se ha estudiado la regulación de la expresión de estos, ni si esta acoplada con la biogénesis del flagelo. En este trabajo damos los primeros pasos para la caracterización del sistema genético flagelar en *R. sphaeroides* mediante la localización y estudio de un grupo de promotores flagelares. Los resultados obtenidos nos permiten proponer que los genes flagelares de clase II son expresados a partir de promotores dependientes del factor σ^{54} , mientras que los genes de clase III son expresados a partir de promotores dependientes del factor σ^{28} . En este trabajo, también se muestra evidencia que indica que la expresión a niveles silvestres de los genes de clase III está supeditada a la expresión y al correcto funcionamiento de los genes de clase II. Este último resultado sugiere que como se ha visto en otras bacterias, en *R. sphaeroides* hay una jerarquización de la expresión de los genes flagelares.

Introducción

Estructura General del Flagelo Bacteriano.

Para buscar mejores condiciones de crecimiento o simplemente para dispersar su población, las bacterias han desarrollado en el curso de su evolución varios mecanismos para trasladarse. Hasta el momento se han identificado cuatro tipos diferentes: deslizamiento (gliding), torcimiento (twitching), nado (swimming) y una forma diferenciada de esta última a la que se le llama nado en enjambre (swarming). El papel que dichos mecanismos juegan en el ciclo de vida de cada especie es diverso y su inducción puede estar asociada a señales internas o externas. Como ejemplo clásico del primer caso está *Caulobacter crescentus* donde la síntesis de flagelos y la motilidad se encuentran asociadas al ciclo celular (113); y como ejemplo de inducción externa se encuentran *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, en donde la ausencia de nutrientes en el medio favorece la expresión de los genes flagelares (53) mientras que otros factores ambientales como una alta osmolaridad o alta temperatura inhiben su expresión (91). Finalmente, dicha inducción podría depender de una combinación de señales internas y de las condiciones de crecimiento.

Cada forma de desplazamiento está asociada a un mecanismo físico distinto. El mecanismo más estudiado es el del nado. En este las bacterias producen uno o varios filamentos helicoidales extracelulares (flagelos) constituidos por una sola proteína a la que se le denomina flagelina o por combinaciones de dos o más variantes de la misma (fig. 1). Los filamentos sirven como hélices para impulsar a la bacteria en un medio líquido o semisólido. Los flagelos pueden estar, dependiendo de la especie, en una posición determinada o distribuidos al azar en la superficie celular (fig. 2). En este último caso se

encuentran *Salmonella* y *E. coli*, cuyo número de flagelos puede variar entre tres y doce, dependiendo de la fase y de las condiciones del cultivo (3).

Estructura flagelar

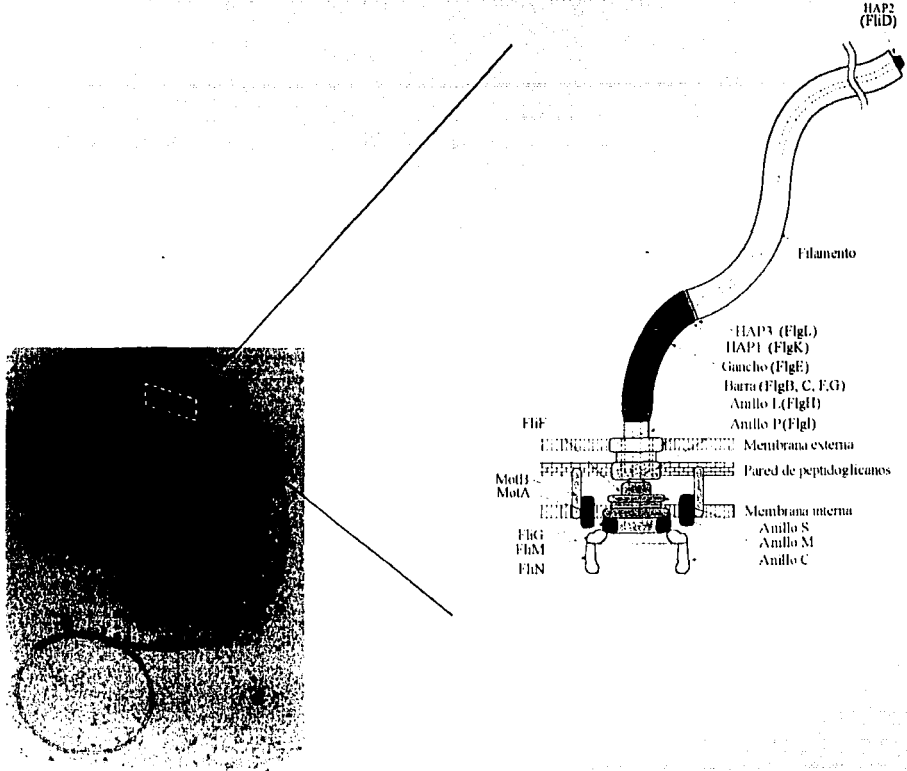


Figura 1. Microscopía de una célula flagelada y diagrama de la estructura flagelar modelo.

Cuando las bacterias de este tipo se desplazan, los filamentos se agrupan formando una trenza en uno de los polos de la célula. Debido a que el torque es generado en un ángulo perpendicular a la superficie de la bacteria y la estructura helicoidal rígida del flagelo no permite modificarlo a un ángulo paralelo que permita la formación de esta trenza, se requiere de otra estructura más flexible que conecte al filamento con la bacteria, a esta estructura se le denomina gancho (fig. 1).

Patrones de distribución de flagelos en bacterias

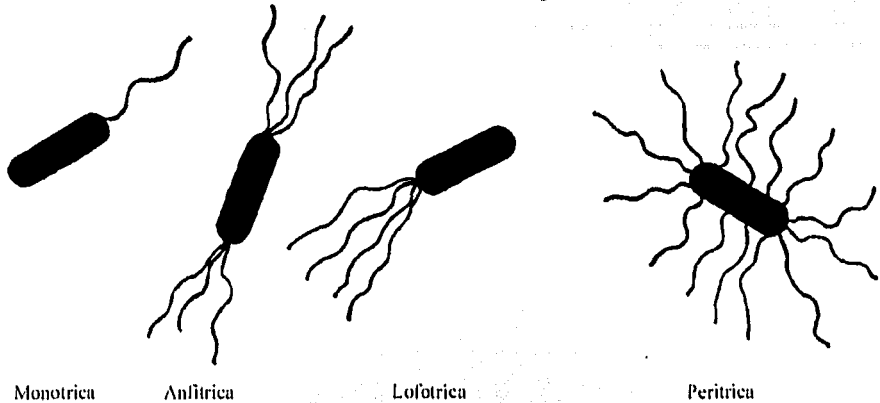


Figura 2. Diferentes distribuciones y número de flagelos presentados por diversas especies bacterianas.

Al igual que el filamento, el gancho está constituido por subunidades idénticas de una sola proteína que se ensamblan en media vuelta de una hélice, por lo que su apariencia al microscopio electrónico es curva (fig. 3) (23). Esta estructura se une a su vez al motor flagelar mediante otro filamento al que se le denomina eje, éste se encuentra constituido por 4 proteínas diferentes cuyo arreglo no ha sido identificado hasta el momento, pero que puede ser dividido por su estabilidad en dos partes, el eje proximal y el distal (46, 72). El eje pasa por un anillo en la membrana externa (anillo L) y otro en la pared de peptidoglicanos (anillo P) cada uno constituido por subunidades de una sola proteína específica de cada estructura (fig. 1) (23), el papel de estos anillos es el de servir como estabilizadores para el giro del eje, además de formar un canal para el paso de éste. Finalmente, el eje se une al anillo MS que está formado por una sola proteína transmembranal y que es la primera estructura flagelar en formarse.

Comparación del gancho de *E. coli* con el de *R. sphaeroides*

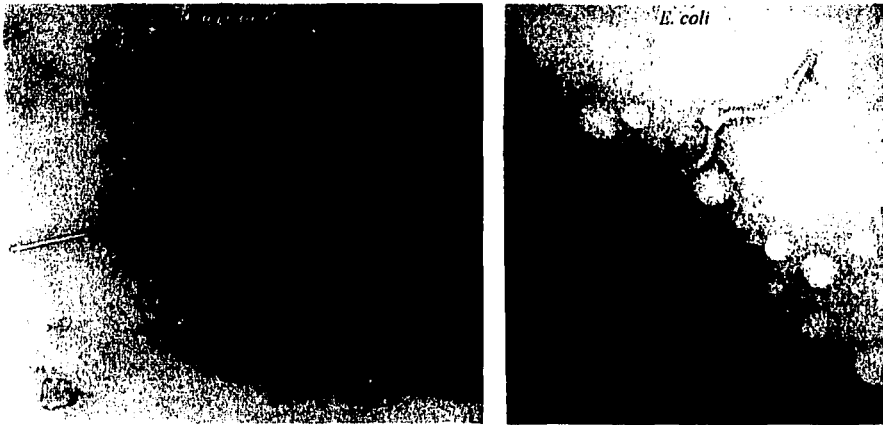


Figura 3. Microscopía electrónica de cepas poligancho de *R. sphaeroides* y de *E. coli*. Hasta el momento *R. sphaeroides* es la única bacteria que presenta un gancho recto.

El motor flagelar al igual que un motor eléctrico consiste de un rotor y un estator. El rotor está conformado por varias proteínas citoplásmicas que conforman el anillo C, localizado en la base del anillo MS y por lo tanto en el lado citoplásmico de la membrana interna (fig. 1). El estator consiste de una proteína transmembranal (MotA) y una periplásmica (MotB). La proteína periplásmica ancla a la proteína membranal a la pared de peptidoglicanos, mientras que la proteína transmembranal, sirve como canal de protones o de iones de Na^+ , que van del periplasma al citoplasma (27) en favor del gradiente electroquímico. Se ha postulado que la interacción de los protones con una proteína del rotor, probablemente FliG, es la base de la generación de la fuerza motriz (49). Con excepción de las proteínas que forman los anillos P y L (37, 45) el resto de las proteínas estructurales extracitoplásmicas son transportadas por un aparato de exportación especializado que se cree está localizado en la base del flagelo, y que se ancla a un parche de membrana localizado en medio del anillo MS (26, 50). Las proteínas flagelares son

exportadas en un estado semidesnaturalizado, a través de un canal interno que atraviesa el eje, el gancho y el flagelo. El ensamblaje del flagelo se produce en la punta de éste y no en su base (25, 40). El flagelo completamente ensamblado se puede dividir en tres secciones que enumeradas en orden por su cercanía al cuerpo celular son, el cuerpo basal (que incluye el motor, el aparato de exportación y el eje), el gancho y el flagelo (fig. 1).

Regulación de la Expresión Genética del Sistema Flagelar.

La expresión de las proteínas involucradas en la formación del flagelo, esta regulada en todas las bacterias donde se ha buscado, en una jerarquía. El caso mejor estudiado es el de *E. coli* y *Salmonella*, donde los genes flagelares se dividen en tres clases (fig. 4). En la primera categoría se encuentra el operón *flhDC* (52), ambos genes codifican para proteínas activadoras de la transcripción de los genes pertenecientes a la clase dos. La transcripción del operón *flhDC* es regulada por señales globales, por ejemplo: AMPc/CRP y HNS (53). En el caso de HNS la regulación positiva es indirecta y debida a la represión mediada por HNS de un represor de la transcripción del operón *flhDC* (51). La regulación del operón *flhDC* es el único punto de control donde se integran señales provenientes de otros sistemas de regulación diferentes al flagelar. Las proteínas reguladoras de clase 1 pueden estar involucradas exclusivamente en la regulación de genes flagelares, como es el caso de FlhC o estar relacionadas con otro tipo de respuestas como la división celular, la cual es inhibida por FlhD mediante un mecanismo aún desconocido (82, 83).

Jerarquía regulatoria flagelar en *E. coli*

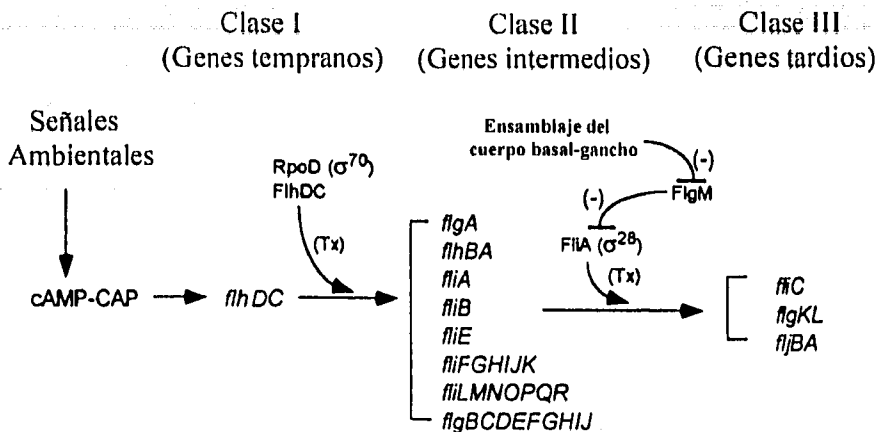


Figura 4. Esquema mostrando las jerarquías de los genes flagelares en *E. coli* y los principales puntos de control. Tx, indica transcripción.

Los genes pertenecientes a la segunda jerarquía son fundamentalmente proteínas estructurales del cuerpo basal del flagelo, proteínas involucradas en el ensamblaje del flagelo y en sensar la formación correcta de esta estructura. El mecanismo molecular de este punto de regulación ya ha sido descrito y consiste en la interacción del factor σ^{28} (codificado por el gene *fliA*) con su antisigma (*FlgM*) (59, 75), ambas proteínas pertenecen a la clase II. En cuanto el cuerpo basal y el aparato de exportación flagelar están completos y funcionales, el antisigma es exportado por el aparato de exportación flagelar (38, 57), liberando de esta forma al factor σ^{28} y permitiendo por consiguiente la transcripción de los genes de clase III (fig. 5). Se cree que debe existir una señal que permita un cambio en la especificidad del aparato de exportación que da inicio a la exportación del antisigma. Esta señal debe estar asociada con la terminación del gancho. En la última categoría se encuentran los genes que codifican para las proteínas que se localizan en la sección distal del flagelo, además de las proteínas que conforman el estator y el sistema de transducción

de señales los cuales modifican el comportamiento de la bacteria en respuesta a los estímulos provenientes del medio.

Regulación del factor σ^{28}

A. Cuerpo basal-gancho parcial



B. Cuerpo basal-gancho completo



C. Flagelo completamente ensamblado

tardios genes

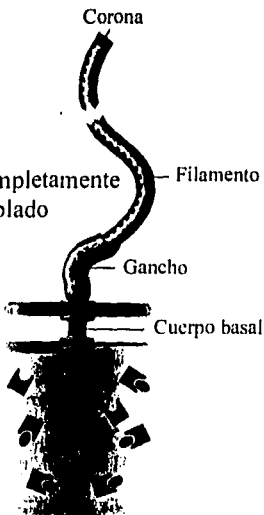


Figura 5. Esquema mostrando el mecanismo de regulación que acopla el ensamblaje del cuerpo basal y el gancho con la expresión de los genes de la clase III.

En todos los esquemas regulatorios flagelares hasta ahora descritos, se ha encontrado una jerarquización de la expresión, en la cual, la expresión de genes pertenecientes a una clase inferior está supeditada a la expresión correcta y al funcionamiento apropiado de todos los genes de la clase inmediata superior (58, 65). En *E. coli* y en *Salmonella* se han identificado dos tipos de resguardo. El primero asegura que los operones de la clase superior sean expresados y consiste en el requerimiento de la

activación de la transcripción de los genes de clase II mediante FlhC y D, y de los de clase III por el factor σ^{28} . El segundo asegura que las proteínas transcritas sean funcionales; este seguro está constituido por el factor σ^{28} y su antisigma. En conjunto ambos mecanismos de control empalman la expresión de los genes flagelares con el grado de avance del ensamblaje del flagelo.

Control de la quimiotaxis

En un medio químico constante, *E. coli* y *Salmonella* se desplazan en trayectorias tridimensionales azarasas. Las células nadan siguiendo recorridos rectilíneos, los cuales son perturbados cada uno o dos segundos, por un abrupto episodio de movimiento descontrolado, al cual se le denomina "bamboleo" (tumble) y que en promedio tiene una duración de 0.2 seg (13). Después de este evento, la bacteria reanuda su recorrido en una nueva dirección elegida al azar (fig. 6). La frecuencia de los eventos de reorientación es la base del control de la quimiotaxis en estas bacterias. Cuando hay un súbito incremento en la concentración de algún atrayente, las bacterias disminuyen la frecuencia de los eventos de reorientación, lo que provoca que se desplacen durante un mayor tiempo en una trayectoria recta. Por lo tanto, si una bacteria se encuentra en un gradiente de atrayente, la frecuencia de paro es disminuida mientras la bacteria nada en la dirección ascendente del gradiente. Igualmente importante que la capacidad de controlar la frecuencia de paros en respuesta a un estímulo es la capacidad de adaptarse a diferentes intensidades del mismo. Debido a esto las células son capaces de permanecer dentro de un área de máxima concentración de

atrayente y no continúan su desplazamiento mas allá de ésta. El comportamiento contrario es observado en el caso de un repelente.

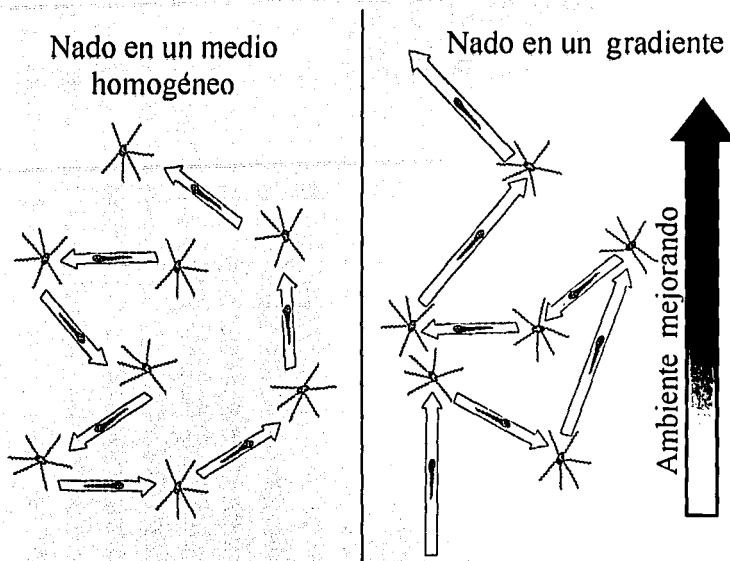


Figura 6. Esquema del comportamiento de nado de *E. coli*. Se observa el arreglo en trenza de los flagelos cuando la bacteria se desplaza y el movimiento descoordinado de los flagelos cuando la bacteria se reorienta. Izquierda nado en un medio homogéneo (las corridas tienen aproximadamente la misma duración), derecha nado en un gradiente (la duración de las corridas se modifica dependiendo de su dirección).

La respuesta quimotáctica involucra un complejo sistema de receptores acoplados a un sistema de transducción de señales perteneciente a la familia de los sistemas de dos componentes. En *E. coli*, los receptores del sistema quimiotático son cinco y se denominan: Tar, Tsr, Trg, Tap y Aer (14, 55, 84). Las cuatro primeras proteínas son homodímeros (69), que poseen un dominio sensorial ubicado en el periplasma, dos segmentos transmembranales y un dominio citoplasmático. En el periplasma, estos receptores pueden unir de forma directa algunos aminoácidos, o pueden actuar como transductores, interactuando con proteínas periplásmicas cuya función es unir o transportar azúcares o dipéptidos. Los atrayentes que son percibidos directamente por los receptores

incluyen a la serina, alanina, glicina (Tsr); al aspartato, glutamato y maltosa (Tar); dipéptidos (Tap); galactosa y ribosa (Tgr). Estas proteínas se conocen también con el nombre genérico de MCPs, el cual representa las siglas: "methyl-accepting chemotactic proteins" (proteínas quimiotácticasceptoras de metilos). Estos receptores han sido estudiados ampliamente pues además de su importancia en la fisiología bacteriana constituyen un modelo de transducción de señales a través de membranas fosfolípicas. A diferencia de los quimiorreceptores anteriores, Aer no tiene un dominio periplásmico. En cambio posee un dominio PAS intracitoplásmico con un grupo FAD asociado (14, 84). La función del grupo FAD no ha sido completamente elucidada, aunque se sabe que es indispensable para el funcionamiento de Aer (85). Se ha postulado que el grupo FAD puede ser oxidado directamente por el oxígeno (14) o que puede detectar el estado redox de la célula interactuando con uno de los componentes de la cadena de transporte de electrones (14, 85).

Asociadas al dominio citoplásmico de todos estos receptores se encuentran dos proteínas del sistema quimiotáctico: CheA y CheW (16, 29, 74).

Se ha postulado que la unión del ligando al receptor induce el movimiento de las hélices transmembranales, este desplazamiento perturba la estructura del dominio citoplásmico lo cual da lugar a la transducción de la señal por las proteínas citoplásmicas que interactúan con este dominio (64).

Las proteínas que participan en la transducción y regulación de la señal quimiotáctica son seis, y son los productos de los genes *che*: *cheA*, *cheB*, *cheR*, *cheW*, *cheY* y *cheZ*. De éstas, las proteínas CheA, CheY y CheB forman parte de los sistemas regulatorios de dos componentes descritos en algunas especies bacterianas. En todos los

casos descritos de estos sistemas, los pares de proteínas comparten la función común de permitir a la célula detectar y responder a un estímulo del medio ambiente. Estos sistemas consisten, en su forma más simple, de una proteína sensora y de una reguladora. El mecanismo por el cual se regulan este par de proteínas es mediado por la fosforilación de las mismas. En este caso, CheA es la cinasa capaz de responder indirectamente a las señales del medio ambiente, y transmitir la información (mediante fosforilación) a las proteínas CheY y CheB, las cuales, regulan respectivamente la frecuencia de paro y el grado de metilación del receptor.

La proteína CheA, es una proteína citoplasmática capaz de autofosforilarse en un residuo de histidina (34, 36, 114). La porción central de CheA (entre los residuos 260-510) posee un dominio de cinasa; este dominio es capaz de configurarse de forma independiente del resto de la proteína, une ATP-Mg y cataliza la fosforilación de residuos de histidina, presentes en el dominio de fosfotransferencia (ver abajo). El dominio cinasa contiene varios motivos de secuencia altamente conservados dentro de la familia de las cinasas de histidina (101), los cuales pueden estar arreglados en la estructura terciaria de la proteína para formar la superficie de unión del nucleótido dentro del sitio activo. Entre los motivos de secuencia presentes en esta región, destacan: una secuencia rica en glicinas (G-box), reminiscente de las secuencias ricas en glicina de muchas cinasas y proteínas que unen nucleótidos (87, 105). El motivo DXG, en el cual se ha propuesto que el aspartato (D) funciona para coordinar Mg(II) mientras el esqueleto amido de la glicina (G) interacciona con el esqueleto carbonilo del aspartato para mantenerlo en una posición fija (105); este motivo se ha encontrado en diversas cinasas de serina, de treonina y de tirosina.

En términos de función, las cinasas de histidina se encuentran estrechamente relacionadas a las cinasas de serina, de treonina y de tirosina. Sin embargo, su estructura y

mecanismo catalítico son diferentes (98). Aunque ambas cinasas tienen secuencias ricas en glicina, en las cinasas de serina, de treonina y de tirosina este motivo está localizado cerca del extremo N-terminal del dominio, mientras en las cinasas de histidina, esta secuencia se ubica cerca del extremo C-terminal. El motivo de secuencia, DXG, compartido entre estas cinasas, en las cinasas de histidina se ubica aproximadamente 20 residuos hacia la región N-terminal a partir de la secuencia rica en glicinas; mientras que en las cinasas de serina, de treonina y de tirosina se ubica hacia la región C-terminal. Además, estas últimas cinasas también difieren de las cinasas de histidina en que su producto es un fosfoéster en lugar de un fosforamidato. Los fosforamidatos tienen grandes energías libres de hidrólisis (111), como se observa para phospho-CheA, la cual tiene un potencial de fosfotransferencia de 1 a 3 kcal por mol mayor que la del ATP-Mg (104, 114). La reacción de fosforilación de las histidinas *in vivo*, es presumiblemente dirigida por una alta proporción ATP/ADP y por la rápida transferencia del grupo fosforilo. En contraste, el potencial de fosfotransferencia de los fosfoésteres de serina o de treonina es de varias kilocalorías por mol menor que la del ATP-Mg; por lo tanto la fosforilación de estos residuos es esencialmente una reacción irreversible (92).

En la región N-terminal de la proteína CheA se ubica el dominio de fosfotransferencia, el cual posee el residuo de histidina (His-48) que es fosforilado por el dominio de cinasa (34). No existe evidencia de que ningún otro residuo pueda ser fosforilado en la proteína. De hecho, la mutagénesis del residuo His-48 provoca que la proteína CheA pierda la capacidad de auto-fosforilarse (34).

En la región central de CheA se localizan también los determinantes de dimerización de la proteína, la cual *in vitro* a concentraciones micromolares se encuentra como homodímero (35). Se ha reportado para varias cinasas que la reacción de auto-

fosforilación ocurre en *trans*; en el caso de CheA, el dominio central de una subunidad cataliza la fosforilación del residuo His-48 de la segunda subunidad. De hecho, se ha observado que deleciones del gene *cheA* que eliminan el residuo His-48 pueden complementar una cepa mutante en *cheA* que tiene alterado el dominio catalítico o central (103).

La región carboxilo de CheA es esencial para la regulación mediada por el receptor (24). Estudios genéticos sugieren que en esta región se encuentran los sitios de interacción con CheW y con el receptor (77). La importancia de esta región quedó demostrada a partir del estudio de variantes de CheA que llevan deleciones en la región C-terminal. La proteína CheA silvestre es de 654 residuos; una proteína que termina en el aminoácido 537 o en cualquier residuo distal a este punto, muestra *in vitro* una actividad de cinasa similar a la versión silvestre de CheA. Sin embargo, cuando estas versiones de *cheA* son introducidas a cepas *cheA*, éstas son incapaces de restaurar la quimiotaxis (17). Además, al utilizar estas proteínas CheA mutadas en el extremo C-terminal en experimentos de reconstitución *in vitro*, no se observó inhibición o activación de la actividad en presencia de una fracción membranal enriquecida de Tar y CheW. Este resultado apoyó la idea de que esta región es importante para acoplar a la proteína CheA con CheW y con el receptor (17).

El último dominio de CheA por mencionar, se denomina P2, o dominio de unión a CheY. Este dominio es indispensable para que CheA pueda fosforilar a CheY y a CheB, los cuales son los reguladores de respuesta del sistema quimiotáctico. El dominio P2 se ubica hacia el extremo C-terminal del dominio de fosfotransferencia y también forma un dominio con capacidad de estructuración independiente del resto de la proteína. La importancia de este dominio quedó demostrada en versiones de CheA que carecen del dominio de fosfotransferencia (el cual también debe interactuar con el regulador de respuesta durante

la reacción de fosforilación) las cuales aún son capaces de unir CheY y CheB de forma similar a la proteína intacta (103). Asimismo, la remoción del dominio catalítico de CheA no afecta la capacidad de unir a CheY o CheB. Por lo tanto, los residuos importantes en la interacción con el regulador de respuesta, se encuentran específicamente localizados en el dominio P2 (fig 7).

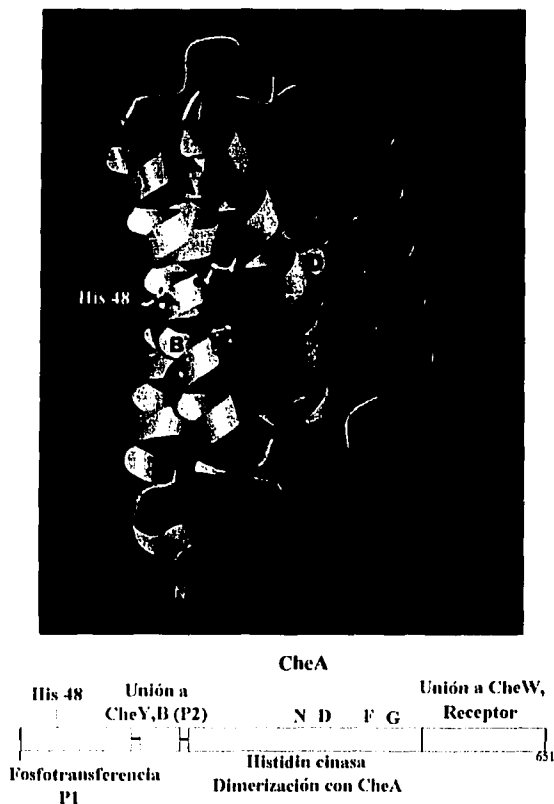


Figura 7 Estructura del cristal del dominio P1 de CheA (arriba), esquema de los diferentes dominios de CheA (abajo).

CheY es una proteína de 14 kDa monomérica (68, 99) de la cual la estructura cristalográfica tanto de la proteína silvestre como de algunas mutantes ha sido determinada

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(108) (fig. 8). Gracias a ello, a la fecha se tiene una idea bastante exacta de la geometría del sitio activo y de las superficies probables de acoplamiento con otras proteínas. CheY consiste de cinco cadenas paralelas de hojas β , rodeadas de cinco α -helices. CheY es fosforilada en el residuo Asp57 (19, 86), el cual se localiza al final del extremo C-terminal de la cadena β -3, yuxtapuesto a dos residuos de aspartato, Asp12 y Asp13, localizados en el extremo C-terminal de la cadena β -1. Estos tres residuos forman el "pocket ácido" que funciona como sitio de unión del ion MgII (12, 61, 63, 73, 100), el cual es indispensable para la reacción de fosforilación. Otro residuo altamente conservado es la Lys109, la cual está localizada en el extremo C-terminal de la cadena β -5 y cuya cadena lateral apunta hacia adentro del pocket ácido. La importancia de este residuo fue revelada dado que versiones de la proteína CheY que llevan una sustitución en dicha posición son incapaces de promover la respuesta quimiotáctica, a pesar de que estas proteínas pueden unir MgII, y ser fosforiladas. De esta forma, este residuo se ha asociado con los eventos subsiguientes al evento de fosforilación (61, 107).

Se ha propuesto que la fosforilación de CheY en el residuo Asp57 provoca un cambio conformacional en la estructura de esta proteína, el cual ha sido observado en estudios de resonancia magnética nuclear (18, 24). Este cambio conformacional explicaría el cambio dramático en la afinidad de CheY con las tres proteínas con las cuales interactúa, a saber: CheA, CheZ, y FliM después de la fosforilación del residuo 57 (112).

La vida media de CheY-P es de pocos segundos (35). Esta reacción de hidrólisis no depende de la presencia de CheA ni de ninguna otra proteína (33, 62), por esta razón se asocia a la proteína CheY la capacidad intrínseca de desfosforilarse. Sin embargo, un incremento dramático en la velocidad de desfosforilación de CheY-P es observado en

presencia de la proteína CheZ (35). *In vivo*, CheZ juega un papel determinante para desfosforilar CheY-P, dado que la velocidad de la reacción de auto-desfosforilación sería demasiado lenta para explicar la velocidad de respuesta de la bacteria a cambios en la concentración de atrayente o repelente. El mecanismo molecular por el cual la proteína CheZ lleva a cabo su función es aún incierto.

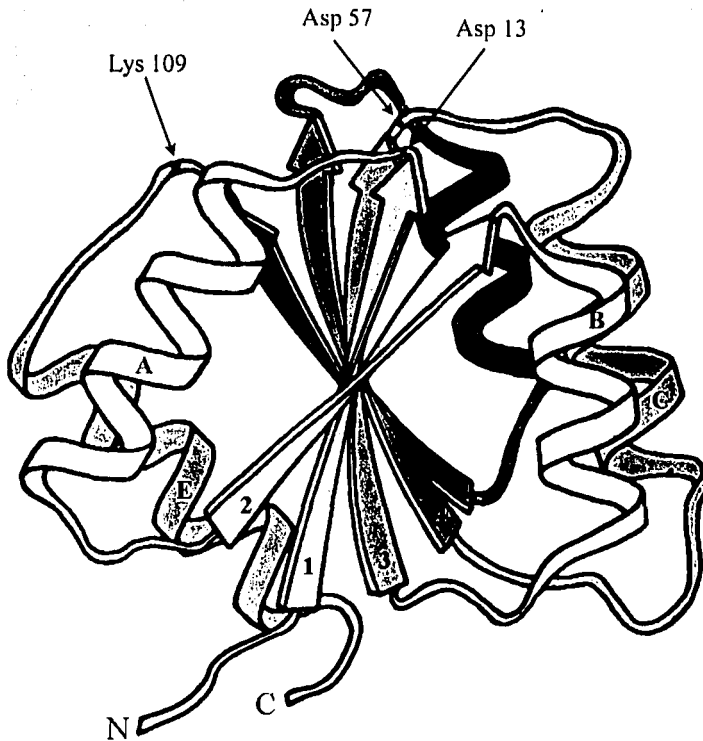


Figura 8. Estructura tridimensional de la proteína CheY. Las letras indican las α -hélices de forma ascendente contando desde el amino terminal. Las hojas- β están indicadas de la misma forma pero con números.

El fenómeno de quimiotaxis requiere de la presencia de un mecanismo de adaptación, capaz de entrar en funcionamiento una vez que el complejo ternario Receptor-CheW-CheA haya sido activado o inhibido en respuesta a un estímulo determinado. Las proteínas CheR y CheB metilan (97) o desmetilan (102) respectivamente, los receptores (MCPs) que han sido alterados por el estímulo. La reacción de metilación provoca la activación de la cinasa CheA, mientras que la reacción de desmetilación la inhibe (15, 74). Esta respuesta permite compensar la respuesta del estímulo anterior y así regresar el sistema a su estado basal, lo cual le permite a la bacteria estar preparada para recibir un nuevo estímulo más intenso que el anterior. Además, se ha propuesto que el estado de metilación del receptor le permite a la bacteria tener un "registro" temporal de las concentraciones de cualquier estímulo detectado inmediatamente antes.

El paso final en la transducción de la señal del sistema quimiotáctico es la regulación de la rotación del motor flagelar. La rotación del motor flagelar se encuentra controlada por la interacción de la proteína CheY con el complejo del "switch" o "interruptor" flagelar (112). Este complejo está formado por las proteínas FliG, FliM y FliN, y se localizan en la base del flagelo formando una estructura en forma de campana denominada anillo C (27, 48). La disposición de estas proteínas en dicha estructura es a la fecha dudosa. Sin embargo, la localización de FliG fue determinada gracias al aislamiento de una mutante espontánea en *fliG* que llevaba una deleción de los primeros siete pares de bases en su extremo 5' y que fusionaba el marco de lectura del gene *fliG* con el del gene ubicado río arriba en el operón *fliF*. La proteína de fusión FliF-FliG permite la formación de flagelos funcionales (57). A partir de este resultado se dedujo que FliG interactúa con el extremo carboxilo de FliF, y que existe una relación estequiométrica de 1:1 entre estas

proteínas. Se considera que las proteínas FliM y FliN se disponen en la periferia de FliG, en un arreglo a la fecha desconocido.

Por otro lado, se determinó que el blanco de la proteína CheY dentro de este complejo es la proteína FliM. Medidas directas de la interacción entre estas proteínas permitieron corroborar el modelo que había sido propuesto principalmente con base en datos genéticos. Se determinó así que la afinidad de CheY por FliM aumenta considerablemente cuando la proteína se encuentra en estado fosforilado (112).

El análisis detallado de la interacción FliM-CheY-P fue llevado a cabo mediante el estudio de deleciones las cuales abarcaban diferentes regiones de *fliM*; de estos estudios se concluyó que los primeros 10 aminoácidos de FliM eran el blanco de unión de la proteína CheY-P (106). De forma adicional, se determinó que un péptido sintético correspondiente a los primeros 19 residuos de FliM era capaz de unir CheY-P *in vitro* con una gran afinidad (20). Además, la especificidad de la interacción fue corroborada cuando a este péptido le fueron introducidas sustituciones específicas en los residuos 6, 7 o 10, los cuales previamente habían sido identificados como relevantes para la interacción FliM-CheY en la proteína completa; estos cambios provocaron una disminución en la afinidad de CheY-P en diferentes grados de magnitud. Se concluyó así, que los primeros 19 aminoácidos de FliM forman un dominio que se estructura en forma independiente al resto de la proteína, y que este dominio es reconocido por CheY-P (20).

El motor flagelar de *E. coli* y *Salmonella* rota de forma bidireccional, esto es, rota en el sentido de las manecillas del reloj (CW) o en el sentido inverso (CCW) (60). En ausencia del gene *cheY*, el motor flagelar rota predominantemente en dirección CCW, y las bacterias nadan constantemente siguiendo una trayectoria lineal sin ser interrumpidas por los eventos de bamboleo (tumble). La unión de CheY-P a FliM promueve la rotación CW

y por lo tanto los eventos de bamboleo, los cuales permiten la reorientación de la bacteria (112).

A la fecha, el modelo global propuesto para la respuesta quimiotáctica postula que la unión de un atrayente al receptor provoca un cambio conformacional que trae por consecuencia la inhibición de la actividad de CheA y por lo tanto, una disminución en la concentración intracelular de CheY-P. Esta disminución provoca que los motores flagelares roten en dirección CCW durante un lapso de tiempo mayor, lo cual se traduce en el desplazamiento de la bacteria en dirección del atrayente. La adaptación a esta nueva concentración de atrayente ocurre por la inhibición de CheA, lo cual disminuye los niveles de CheB-P y de esta forma la velocidad de desmetilación del receptor. En consecuencia el nivel de metilación de los receptores se incrementa, provocando un nuevo cambio conformacional en el dominio citoplásmico del receptor, promoviendo así la actividad de CheA a los niveles previos al estímulo. De este modo, la bacteria está preparada para detectar un nuevo estímulo y en su caso, dirigirse a un medio ambiente más favorable. El incremento en la concentración de CheY-P es contrarrestado por la actividad de CheZ, siendo el equilibrio entre la actividad de CheA y la de CheZ el que determina la concentración basal (sin estímulo) de CheY-P y por lo tanto la tasa intrínseca de paro de una bacteria.

En el caso inverso, esto es, en presencia de un repelente, el cambio conformacional del receptor provoca la activación de la cinasa CheA, lo cual produce el aumento de los niveles intracelulares de CheY-P. De este modo, las células se reorientan con mayor frecuencia, lo cual le proporciona una mayor oportunidad de localizar un medio ambiente favorable. En este caso, la desmetilación del receptor (catalizada por CheB-P) provoca la inhibición de la cinasa y por lo tanto la adaptación. Recientemente se ha demostrado que

los receptores quimiotáticos, así como las proteínas CheW y CheA se encuentran localizadas en uno de los polos del cuerpo celular (66), en lo que se ha llamado la nariz de la bacteria. Esta observación ha llevado a plantear la posibilidad de que la señalización quimiotáctica ocurra a través de multímeros de receptores . Esto es, una señal recibida por un receptor dimérico puede propagarse a los receptores vecinos dentro del agregado y modificar el estado de señalización del conjunto de receptores, amplificando la señal. Esta forma de transducción de la señal, permitiría una mayor sensibilidad del sistema y estaría controlada por el número de receptores que están en el multímero. Alternativamente se ha propuesto que la unión de CheY-P a FliM ocurre con una alta cooperatividad. Varios estudios han sido hechos al respecto, sin embargo los datos siguen siendo contradictorios (2, 88).

Antecedentes Particulares

Rhodobacter sphaeroides es un organismo de vida libre y con una gran variabilidad metabólica, capaz de realizar fotosíntesis si se encuentra en un ambiente anaerobio y luminoso. En ausencia de luz pero todavía en un ambiente anaerobio puede obtener energía por fermentación o respiración anaerobia y en un ambiente con oxígeno puede respirar aeróbicamente. Finalmente, siempre que se encuentre en un ambiente anaerobio y en caso de que lo requiera, puede fijar nitrógeno atmosférico. Esta versatilidad metabólica se ve reflejada en la cantidad de estímulos a los que es capaz de responder para buscar las condiciones de crecimiento más apropiadas, así se han reportado hasta el momento quimiotaxis, fototaxis, aerotaxis y taxis energética (105).

Esta especie bacteriana tiene un solo flagelo de localización subpolar, el cual rota unidireccionalmente en el sentido de las manecillas del reloj (CW). En esta bacteria, las trayectorias de desplazamiento lineal son interrumpidas por breves episodios en los cuales la rotación del flagelo se detiene y el movimiento Browniano reorienta a la célula. Durante los periodos de paro, la hélice que forma el filamento flagelar se relaja y adopta una conformación de corta longitud de onda y larga amplitud, lo que trae por consecuencia que la hélice se retraiga hacia el cuerpo bacteriano (6). Recientemente, fue observado que durante estos periodos de paro el flagelo parece seguir rotando aunque a velocidades muy bajas, por lo tanto fue propuesto que esta lenta rotación podría favorecer la reorientación de la bacteria (7).

La frecuencia de los eventos de paro se encuentra controlada por los estímulos del medio ambiente. En presencia de un atrayente, la frecuencia de estos eventos disminuye, y cuando el atrayente es removido, la frecuencia de los eventos de paro aumenta. Esta conducta es semejante a la respuesta quimiotáctica clásica descrita para las enterobacterias (79). Además de esta respuesta, *R. sphaeroides* muestra una respuesta quimiocinética en la cual, la velocidad de nado de la bacteria aumenta hasta un 25% arriba de su valor promedio en presencia de un estímulo positivo. A la fecha esta respuesta sólo ha sido observada al añadir ácidos orgánicos débiles, que son los atrayentes más fuertes para esta bacteria (76). Las bases moleculares que controlan la quimiocinesis son a la fecha desconocidas, aunque datos preliminares sugieren que este fenómeno es independiente del potencial electroquímico o de la tasa de transporte de electrones (76).

Por otro lado, la respuesta quimiotáctica en este organismo también muestra particularidades interesantes: por ejemplo, a la fecha no se han identificado moléculas repelentes. Además, los atrayentes parecen ser subproductos metabólicos, dado que es

requisito indispensable el transporte y/o el metabolismo de los atrayentes primarios para que estos produzcan una respuesta quimiotáctica (41, 42, 44, 80, 81). Los principales atrayentes son ácidos orgánicos débiles, aunque también han sido observadas respuestas hacia azúcares y aminoácidos pero la intensidad de la respuesta es moderada o muy débil (79). Recientemente, ha sido descrita una respuesta repelente a la luz azul y una posterior respuesta adaptativa caracterizada por la liberación de metanol producido por la supuesta desmetilación de un receptor a la fecha desconocido (54). La respuesta a la luz de *R. sphaeroides* parece estar compuesta de dos rutas diferentes. En una de ellas, a longitudes de onda mayores a 500 nm la producción de metanol sigue el espectro de absorbancia de los pigmentos fotosintéticos, sugiriendo que éstos actúan como sensores en esta respuesta. La respuesta repelente observada ante un incremento abrupto en la luz azul, es independiente de los pigmentos fotosintéticos (esto es, no se observó diferencia en la intensidad de la respuesta en células crecidas a altas o bajas intensidades de luz); por lo tanto la identidad del fotoreceptor que media esta respuesta es desconocida. Se asume que este fotosensor no es una rodopsina, ya que a la fecha no han sido identificadas estas moléculas en ninguna bacteria púrpura (54). Se cree que estas dos respuestas diferentes a la luz le permiten a *R. sphaeroides* modificar su patrón de nado hacia el ambiente más favorable para la fotosíntesis, y al mismo tiempo evitar el daño de la radiación azul (54).

En *R. sphaeroides*, las bases moleculares de las respuestas tácticas (quimiotácticas, fototácticas y la quimiocinesis) mencionadas en los párrafos anteriores son a la fecha desconocidas. Aunque ya se han identificado genes homólogos a los genes *che* de enterobacterias, su papel dentro de la respuesta es aún incierto. En el cromosoma de *R. sphaeroides* existen al menos dos genes *cheA*, tres *cheW*, cinco *cheY*, y dos *cheR* (5). Las copias extras de estos genes son muy similares entre sí pero no idénticas, por ejemplo:

CheY4 es 49%, 49% y 75% idéntica a CheY1, CheY2 y CheY3 respectivamente (90). Lo mismo se observa para el resto de los genes presentes en copias extras. Se asume que estos genes se expresan a partir de cuatro unidades transcripcionales diferentes. Por un lado, el operon I conteniendo los genes: *cheY1 cheA cheW cheR cheY1*; el operon II: *cheY1III cheAII cheWII cheRII cheB tipC*; el operon III: *mcpG cheYIV* ; y un cuarto operón que contiene a *cheYV* (5).

A pesar de que *E. coli* y *Salmonella* poseen solamente una copia de los genes quimiotácticos en sus cromosomas, la redundancia de los mismos no es exclusiva de *R. sphaeroides*. A la fecha, varias copias de los genes *che* han sido reportadas para diversas especies por ejemplo, *Caulobacter crescentus*, *Borrelia burgdorferi* y *Mixococcus xanthus* (5). Sin embargo, el escaso conocimiento de la respuesta quimiotáctica en todas estas especies impide realizar analogía alguna que permita explicar el porqué son necesarias diversas copias de estos genes para controlar esta respuesta fisiológica.

En *R. sphaeroides*, cepas mutantes en el gene *cheA1* e incluso conteniendo la deleción del operón I completo, no muestran fenotipo aparente; se sugirió entonces la presencia de una vía de transducción quimiotáctica alternativa a la del operon I (109). Con esa idea se realizó la mutagénesis de la cepa que lleva la deleción del operón I, y después de nueve ciclos de selección para enriquecer la población de cepas afectadas en fototaxis, se aisló una cepa mutante en el gene *cheA11*. Esta cepa es no quimiotáctica en cajas de swarm. Sin embargo, al analizar los parámetros de nado libre no se observa una diferencia apreciable con respecto a los valores de la cepa silvestre en cuanto a la frecuencia de los eventos de paro o a la velocidad. Ensayos adicionales llevaron a la conclusión que estas células muestran una respuesta quimiotáctica invertida, esto es, en presencia de atrayentes la célula aumenta la probabilidad de paro y al removerlos disminuye. De estos resultados se

sugiere que CheAII es una cinasa involucrada en la señalización de diversos estímulos, entre ellos la luz, los ácidos orgánicos débiles y los azúcares (31). Sin embargo, el porqué en ausencia de estímulo las células mutantes en este operón muestran una conducta de nado indistinguible de la cepa silvestre sigue siendo un enigma. Para explicar este resultado se puede especular que las copias adicionales de *cheA* o la auto-fosforilación de CheY utilizando intermediarios metabólicos como el acetilfosfato podrían compensar, en ausencia de estímulo, la falta de CheAII.

Con respecto a los sensores del sistema quimiotáctico en *R. sphaeroides*, la información es aún escasa. Durante mucho tiempo se sostuvo la idea de que en esta bacteria no existían MCPs dado que, en experimentos tipo Western blot, utilizando anticuerpos anti-Trg y anti-Tar no se observó unión del anticuerpo a ninguna de las proteínas de *R. sphaeroides* (71, 95). Adicionalmente, no se observó la producción de metanol en respuesta a la adición o remoción de serina y succinato. Por lo tanto, se concluyó que en *R. sphaeroides* la quimiotaxis era independiente de MCPs (4, 95). Posteriormente fue identificado el gen *cheA* por medio de hibridación heteróloga utilizando una sonda del gen *cheA* de *S. meliloti*. La clonación y secuenciación de un fragmento *EcoRI* de 5.5 kb que llevaba la secuencia similar a *cheA*, permitió identificar en *R. sphaeroides* genes homologos a *cheR* (metil esterasa de las proteínas MCPs) y sorpresivamente a *tsr* (110). Este último gen se denominó *mcpA* y la similitud con Tsr está restringida a los dominios de metilación y de señalización. La ausencia de regiones hidrofóbicas llevó a postular que se trata de proteínas sensoras citoplasmáticas. Esta propuesta fue reforzada, ya que al realizar un ensayo tipo Western blot utilizando un anticuerpo anti-McpA de *Caulobacter crescentus*, se identificó una fuerte señal en la fracción citoplasmática de *R. sphaeroides*. Además, se observaron otras bandas minoritarias que podrían representar MCPs adicionales (110).

Cuando el gene *mcpA* fue inactivado, se observó que las células fueron incapaces de realizar quimiotaxis en cajas de swarm, siempre y cuando éstas fuesen incubadas en condiciones aeróbicas. En condiciones anaeróbicas las células mostraron una conducta similar a la de la cepa silvestre. Aunque las características de nado de la cepa *mcpA* no fueron analizadas, su conducta en la caja de swarm ha llevado a postular que esta proteína puede estar involucrada en la señalización en condiciones aeróbicas (110).

Finalmente se observó que, al igual que las MCPs de *E. coli* las cuales se encuentran agrupadas en uno de los polos de la bacteria (66), en *R. sphaeroides* las proteínas similares a *McpA* se encuentran agrupadas. En células crecidas aeróbicamente en la obscuridad estas proteínas se localizan tanto en los polos, como agregadas en un solo punto del citoplasma. Sin embargo, cuando las células se crecen en condiciones anaeróbicas en presencia de luz, la cantidad de los agregados totales disminuye considerablemente, fundamentalmente en los polos mientras que el número de partículas en el citoplasma es similar entre ambas condiciones. Por lo tanto, la proporción de agregados en el citoplasma contra agregados en los polos, es mayor. Estos resultados llevaron a postular la idea de que la síntesis de MCPs se encuentra regulada por el estado redox de la célula y/o por la intensidad de la luz o por el grado de expresión de las membranas fotosintéticas (32).

En cuanto al estudio del flagelo en *R. sphaeroides*, en nuestro laboratorio se clonó el gen que codifica para la proteína *fliM*. Este gen fue identificado en un fragmento *Sall* de 4.6 kb. La secuencia nucleotídica de dicho fragmento reveló la presencia de ocho marcos de lectura abiertos, cuya traducción conceptual mostró similitud con las proteínas *FliL*, *FliM*, *FliN*, *FliO*, *FliP*, *FliQ*, *FliR* y *FliB*. Cepas mutantes llevando el alelo *fliM::uidA-uidA* presentan fenotipo Fla^- , esto es, son incapaces de ensamblar el flagelo (28). Esto

puede ser explicado dado que FliM y/o FliN parecen estar involucradas en la estabilización del aparato de exportación flagelar (56).

El análisis de complementación de esta mutante sugirió que la unidad transcripcional a la cual pertenece *fliM*, inicia en algún punto arriba del sitio *Sall* localizado en *fliK* y termina después de *fliN*. Por lo tanto, *fliO*, *fliP*, *fliQ*, *fliR* y *fliB* deberían pertenecer a una unidad transcripcional diferente. Esta hipótesis fue apoyada dado que entre los genes *fliN* y *fliO* se encuentra una región de 130 pb, la cual muestra una secuencia similar al promotor consenso reconocido por el factor σ^{54} (28). Sin embargo, no existe evidencia física que permita suponer que este promotor es funcional.

A la fecha no existe información al respecto de la transcripción de los genes flagelares y quimiotácticos en esta bacteria, esto es, se desconoce cual de las formas de la RNA polimerasa holoenzima es responsable del reconocimiento de sus promotores. Tampoco han sido identificados los posibles reguladores transcripcionales ni se tiene idea de si estos genes son expresados siguiendo un orden jerárquico.

Objetivos

El objetivo del presente trabajo consiste en determinar si la secuencia localizada en la región intercistronica *fliN-fliO* es un promotor funcional dependiente del factor σ^{54} . En caso afirmativo, también nos proponemos estudiar que tan extensiva puede ser la dependencia de σ^{54} para controlar la expresión de otros genes flagelares en *R. sphaeroides*.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y Medios de cultivo. Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo fueron: JM103 [Δ lac-pro), thi, strA, supE, endA, sbcB, hsdR/F' traD36, proAB, lacI^q, lacZ Δ M15]; S17-1 [Pro⁻ Res⁻ recA, RP4-Tc::Mu-Kn::Tn7]. Estas cepas fueron crecidas en medio LB (1% bacto-triptona, 0,5% extracto de levadura y 1% cloruro de sodio). Para cultivos en medio sólido, se añadió 15 g/l de bacto-agar. En caso necesario los siguientes antibióticos fueron añadidos al medio: ampicilina (100 μ g/ml), tetraciclina (10 μ g/ml), espectinomicina (50 μ g/ml), kanamicina (50 μ g/ml).

Las cepas de *Rhodobacter sphaeroides* utilizadas fueron: La cepa silvestre, WS8 (94); NG1 [*fliM::uidA-aadA*] (28) y PG2 [*fliK::TnphoA*] (30). Las cepas fueron crecidas en medio mínimo de succinato (93), el cual contiene: 20 mM KH₂PO₄; 3.78 mM NH₄SO₄; 34 mM ácido succínico; 0,67 mM ácido glutámico; 0,25 mM ácido aspártico; 8,5 mM NaCl; 1,04 mM ácido nitriloacético; 1,2 mM MgSO₄; 0,23 mM CaCl₂; 0,007 mM sulfato ferroso; 0,16 mM molibdato de amonio; 0,1 ml/lit de solución madre de elementos traza [4,7 mM EDTA; 38 mM ZnSO₄; 18 mM sulfato ferroso; 9 mM MnSO₄; 1,5 mM CuSO₄; 1,8 mM ácido bórico]. Se ajusta el pH a 7 con KOH y se esteriliza por autoclave 20 min a 121 °C. Finalmente se agrega 1ml/l de una solución madre de vitaminas [Para 100 ml de solución madre de vitaminas añadir, 1 g. de ácido nicotínico; 0,5 g. de tiamina y 0,01 g de biotina. Esterilizar por filtración]. En caso necesario los siguiente antibióticos fueron añadidos al medio de cultivo: ácido nalidíxico (25 μ g/ml), tetraciclina (1 μ g/ml); espectinomicina (25 μ g/ml), y kanamicina (25 μ g/ml).

Las cepas de *E. coli* fueron crecidas a 37°C, mientras que las cepas de *R. sphaeroides* a 30°C, ya sea heterotróficamente en la obscuridad y con agitación, o fotoheterotróficamente, en viales llenos hasta el tope e iluminados continuamente con luz artificial (300W).

Transformación de *E. coli* (8). Un cultivo de *E. coli* crecido hasta fase exponencial media (D.O._{550nm} 0.5) fue enfriado en hielo por 10 min. antes de que las células fueran cosechadas por centrifugación a 5000 rpm en un rotor tipo SS34 (Sorvall). El paquete celular se resuspendió en la mitad del volumen utilizando una solución fría y estéril de CaCl₂ 100 mM. Las células fueron incubadas en el hielo durante 20 min. Posteriormente, se centrifugó nuevamente y el paquete celular se resuspendió en 1/10 del volumen original con CaCl₂ 100 mM. Las células se incubaron en el hielo por un periodo de 1 a 24 hrs. El DNA que se desea transformar, es mezclado con 200 µl de las células competentes y se incuba en el hielo por 30 min. Pasado este tiempo, las células se incuban a 42 °C durante 2 min. e inmediatamente son puestas en hielo durante 10 min. Se agregan entonces 0.8 ml de LB y se incuba a 37 °C durante 30 min., con el objeto de permitir que los genes de resistencia sean expresados. Posteriormente las células se platan en medio selectivo, y se incuban a 37 °C toda la noche.

Conjugación (22). Las cepas de *E. coli* y *R. sphaeroides* son crecidas hasta fase exponencial media. Las células se lavan con LB, se mezclan en proporción 1:1 y se concentran 10 veces. Dicha mezcla se deposita en una rectángulo de nitrocelulosa colocada sobre una caja de Petri con medio LB. Se incuba por 6 hrs. a 30 °C. Las células se cosechan y se platan en medio selectivo.

Purificación de plásmidos en pequeña escala (8). Las células de un cultivo de 2 ml, crecido durante toda la noche, son cosechadas y resuspendidas en 300 µl de solución STET [8% sacarosa, 5% tritón, 50 mM EDTA pH 8, 50 mM Tris-HCl pH 8]. Se añaden 25 µl de lisozima (10 µg/ml). Se agita en vortex 2 seg. y se incuba en un baño de agua hirviendo durante 45 seg., Se centrifuga a temperatura ambiente durante 20 min. Se recupera el sobrenadante y se mezcla con 230 µl de isopropanol. Se precipita el DNA incubando a -70 °C y se centrifuga durante 15 min. a 4 °C. La pastilla se lava con etanol al 70% y se seca al vacío durante 10 min. La pastilla se resuspende en 40 µl de agua y se utilizan 5 µl para su análisis en gel.

Purificación de plásmidos a gran escala y recuperación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa. Se utilizaron columnas de Qiagen (P-20 o P-100) para la purificación de grandes cantidades de DNA plasmídico. Se siguieron las instrucciones del fabricante en todos los pasos. Para la purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa, se utilizó el kit de quiagen *QIAEXII*.

Extracción de DNA cromosomal. Se siguió el protocolo previamente reportado por Ausubel, F. M. et al., 1989.

Hibridización DNA-DNA tipo Southern blot. El DNA cromosomal total se digirió con las enzimas de restricción apropiadas y las muestras se corrieron en geles de agarosa al 1%, los cuales fueron tratados como se describe en Ausubel F. M. et al. 1989. El DNA fue

entonces transferido a una membrana de nylon (Hybond-N) mediante presión positiva durante 15 min. El DNA se fijó a la membrana mediante la incubación de la misma a 80 °C durante 2 hrs. La sonda fue marcada utilizando biotina-14-dCTP. La membrana fue sometida al procedimiento de pre-hibridación, hibridación y detección siguiendo las indicaciones del fabricante de kit *PhotoGene* de GIBCO-BRL.

Determinación de β -glucuronidasa (GUS) (43). Las células de *R. sphaeroides* provenientes de un cultivo crecido hasta fase exponencial media, fueron cosechadas y resuspendidas en buffer de extracción (50 mM NaH_2PO_4 pH7, 10 mM β -mercaptoetanol, 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100) a 1/7 de su volumen original. Estas muestras fueron entonces sonicadas y centrifugadas brevemente para eliminar los restos celulares. La mezcla de reacción (buffer de ensayo conteniendo 1 mM 4-metil umbeliferil- β -D-glucuronido) fue mezclada con el extracto celular e incubada a 37 °C. A diferentes tiempos, a partir de este momento, fueron tomadas muestras de 100 μl y mezcladas con 0.9 ml de buffer de paro (0.2 M NaCO_3). Las muestras fueron medidas en un fluorómetro a excitación de 360nm y emisión de 446nm. El fluorómetro fue calibrado utilizando concentraciones conocidas de 4-metilumbeliferona. La actividad específica en los extractos celulares fue expresada como μmoles de 4-metilumbeliferona formado por minuto por mg de proteína.

Extracción de RNA e Hibridación tipo Northern blot. El RNA total fue extraído de un cultivo de células crecidas heterotróficamente hasta fase exponencial media. La purificación del RNA fue realizada de acuerdo al protocolo de Aiba H. *et. al.* (1981). 20 μg de RNA fue sometido a electroforesis en geles de agarosa-formaldehído. El RNA fue

transferido entonces a una membrana de nylon. El RNA fue hibridado utilizando una sonda marcada radiactivamente con α - P^{32} -dCTP. Las condiciones de hibridación y los lavados se realizaron de acuerdo a los protocolos previamente descritos (67).

Mapeo del sitio de inicio de la transcripción (8). El RNA total de *R. sphaeroides* (50-100 μ g) fue alineado con el cebador o primer específico a 42°C, en presencia de formamida al 50%. Los oligonucleótidos usados como cebadores para la síntesis de cDNA, fueron marcados en su extremo 5' utilizando T4 polinucleótido quinasa y 20 μ Ci de γ - P^{32} ATP. La reacción de transcripción reversa fue llevada a cabo a 42°C, durante 2 hrs, utilizando 40 U de transcriptasa reversa AMV. Al término de la reacción el cDNA fue extraído con fenol y precipitado con acetato de sodio y etanol. El cDNA fue sometido a electroforesis en un gel de acrilamida al 5%.

Mutagénesis por recombinación homóloga. Las cepas SP1, SP2 y SP3 fueron producidas mediante recombinación homóloga entre un alelo con la mutación deseada y el cromosoma de la cepa receptora. El alelo mutante fue clonado en el plásmido pJQ200, e introducido a la cepa receptora por conjugación. El plásmido pJQ200, es incapaz de replicarse en *R. sphaeroides* pero si tiene un origen de transferencia. La mezcla de conjugación se plateó en cajas de Luria-Sacarosa (5%) con ácido nalidíxico y espectinomycin. Se probó la sensibilidad de las colonias resultantes a gentamicina, que es la resistencia del plásmido suicida. Algunas de las colonias Gm^S fueron elegidas para comprobar si el remplazamiento ocurrió de la forma esperada mediante análisis tipo Southern blot y/o PCR.

σ^{54} Promoters Control Expression of Genes Encoding the Hook and Basal Body Complex in *Rhodobacter sphaeroides*

SEBASTIAN POGGIO,¹ CARLOS AGUILAR,¹ AURORA OSORIO,¹ BERTHA GONZÁLEZ-PEDRAJO,² GEORGES DREYFUS,² AND LAURA CAMARENA^{1*}

Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas,¹ and Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM,² 04510 Mexico City, Mexico

Received 9 June 2000/Accepted 25 July 2000

Gene expression of the flagellar system is tightly controlled by external stimuli or intracellular signals. A general picture of this regulation has been obtained from studies of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. However, these regulatory mechanisms do not apply to all bacterial groups. In this study, we have investigated regulation of the flagellar genetic system in *Rhodobacter sphaeroides*. Deletion analysis, site-directed mutagenesis, and 5'-end mapping were conducted in order to identify the *fljO* promoter. Our results indicate that this promoter is recognized by the factor σ^{54} . Additionally, 5'-end mapping of the *flgB* and *fljK* transcripts suggests that these mRNAs are also transcribed from σ^{54} promoters. Finally, we showed evidence that suggests that *fljC* transcription is not entirely dependent on the presence of a complete basal body-hook structure. Our results are discussed in the context of a possible regulatory hierarchy controlling flagellar gene expression in *R. sphaeroides*.

The flagellum is the structure responsible for the motility of many bacteria. Some of its structural features include the basal body, the hook, and the helical filament. In *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, biosynthesis of the flagellum depends on the expression of more than 40 genes. The products of these genes are required for several flagellar processes, including assembly, export, and transcriptional control (for recent reviews, see references 1 and 16).

The expression of these genes follows a hierarchical pattern that is highly regulated. At the top of the hierarchy is the *flhDC* operon, encoding two proteins which form the heterotetrameric positive transcriptional regulator of the class II genes. Global regulators, such as the cyclic AMP receptor protein, DnaA, and the nucleoid-associated protein H-NS, influence the expression level of this operon and consequently the formation of flagella (18, 21, 23). The expression of class II genes is dependent on the RNA polymerase- σ^{70} holoenzyme (E σ^{70}) and FliH-FliC. Proteins involved in the formation of the hook and the basal body complex (HBB), as well as the regulatory proteins FliG and FliA, belong to this class (11). FliA is a specific sigma factor (σ^{28}) required for the expression of class III genes, while FliG is an anti-sigma factor that inhibits FliA activity. The release of FliA from the inhibitory action of FliG occurs when the HBB structure is completed, allowing FliG export out of the cell. FliA is then free to associate with the RNA polymerase core enzyme in order to transcribe class III genes (10, 15).

The flagellar genetic system of *Rhodobacter sphaeroides* is poorly understood. Detailed analyses of some structural components of the flagellum have been described, but nothing is known about the factors that regulate gene expression. Recently, genetic evidence has suggested the location of functional flagellar promoters in this organism. Complementation studies have indicated the presence of promoters at the *fljN-fljO* intercistronic region (7), upstream of the *flgBCDEF* operon (T. Ballado, L. Camarena, B. González-Pedrajo, E. Silva-

Herzog, and G. Dreyfus, unpublished data) and upstream of *motA* (6). However, no physical evidence supporting these results has been reported.

In this work we show evidence that a σ^{54} promoter is located at the *fljN-fljO* intercistronic region and is responsible for the transcription of the *fljOPQR fljB* operon. In addition, primer extension experiments revealed transcription start sites upstream of *flgB* and *fljK*. In these two cases, a sequence similar to that of the σ^{70} promoter was also identified a few base pairs upstream of the transcription start sites. These results indicate that E σ^{54} is responsible for the expression of genes encoding structural components of the flagellar export apparatus, the motor, the hook, and the basal body proteins. We also determined that mutations in the *fljM*, *fljK*, and *fljR* genes did not affect the expression of other flagellar genes dependent on σ^{54} . In contrast, *fljC* mRNA was reduced in *fljM* or *flgE* strains. These results allow us to propose a regulatory hierarchy controlling the expression of the flagellar genes in *R. sphaeroides*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *R. sphaeroides* cells were grown in Siström's succinate-basal salt medium at 30°C (20). Heterotrophic growth conditions were achieved by growing 10-ml cultures in 250-ml Erlenmeyer flasks with strong shaking (300 rpm) in the dark. Phototrophic conditions were achieved by growing cultures in completely filled screw-cap tubes under continuous illumination. Cultures were harvested at an optical density at 600 nm of 0.5 \pm 0.05 (mean \pm standard deviation). When required, spectinomycin (15 μ g/ml), kanamycin (25 μ g/ml), or tetracycline (1 μ g/ml) was added to the culture medium. *Escherichia coli* strains were grown aerobically at 37°C on Luria-Bertani medium. Antibiotics were added at the following concentrations: ampicillin, 100 μ g/ml; tetracycline, 10 μ g/ml; and kanamycin, 50 μ g/ml.

Recombinant DNA techniques. Routine genetic manipulations were performed as described elsewhere (2). Restriction enzymes, alkaline phosphatase, T4 ligase, and T4 polynucleotide kinase were purchased from GIBCO-BRL. Plasmid DNA was isolated from *E. coli* using Qiagen columns and procedures. Sequencing was carried out using a ThermoSequenase kit (Amersham) on single-stranded DNA.

Conjugal mating. Plasmid DNA was mobilized into *R. sphaeroides* cells by conjugation according to procedures previously reported (5).

Site-directed mutagenesis. Site-directed mutagenesis was performed according to the method of Kunkel (14) with a uracil-containing single-stranded DNA as the template. The oligonucleotides used for mutagenesis were 5'-CTGCAA CATCCGTCGACCGCCGCCCGG-3', 5'-CTGCAACATCCGTCGTCGCCG CCGCGG-3', 5'-GTCCCTCCCGCTACAAACATCCGTCGCGG-3', and 5'-GT CCCCCCTCCGCAACAACATCCGTCGCGG-3'.

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ap. Postal 70-228, 04510 Mexico City, Mexico. Phone: (525) 622 38 24. Fax: (525) 622 38 91. E-mail: rosa@servidor.unam.mx.

TABLE 1. β -Glucuronidase specific activities expressed from chromosomal *uidA* fusions to *flj* promoters

<i>R. sphaeroides</i> strain	Genotype	β -Glucuronidase activity ^a
PG2	<i>fljK::TnpA</i>	0.02 \pm 0.14
NG1	<i>fljM::uidA-aadA</i>	9.8 \pm 2.9
SP1	<i>fljK::TnpA fljM::uidA-aadA</i>	0.09 \pm 0.2
SP2	<i>fljI::uidA-aadA</i>	14.6 \pm 4.5
SP3	<i>fljK::TnpA fljI::uidA-aadA</i>	12.3 \pm 3.9

^a Specific activities are given in micromoles of 4-methylumbelliferone produced per minute per milligram of protein. The means and standard deviations of three independent determinations are shown.

RNA isolation and Northern blot analysis. Total RNA was isolated from heterotrophic cultures as described previously (24). For Northern blotting, 20 μ g of each RNA sample was separated electrophoretically on agarose-formaldehyde gels and transferred by capillary action onto nylon membranes with a pore size of 0.45 μ m. Filter hybridizations were performed as described previously (2). The DNA probe used was a 1.1-kb *Pst*-*Bgl*II fragment from *fljC*, labeled with [α -³²P] dCTP by nick translation.

Primer extension analysis. Reactions were performed as described previously (2). Total RNA (50 μ g for *fljO* and *fljH* reactions and 100 μ g for *fljK* reactions) was annealed with a specific primer at 42°C in the presence of 50% formamide. Oligonucleotides used as primers for cDNA synthesis were 5' end labeled with T4 polynucleotide kinase and 20 μ Ci of [γ -³²P]ATP at 37°C for 30 min. Unincorporated nucleotides were removed by chromatography. The primer elongation reactions were carried out with avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Promega). Unlabeled primers were used to generate a nucleotide sequence ladder.

β -Glucuronidase activity assay. β -Glucuronidase assays employed 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide as a substrate along with sonicated cell extracts as described previously (12). Samples of 100 μ l were taken at three time points between 10 and 40 min and then mixed with 0.9 ml of stop buffer (0.2 M Na₂CO₃). Fluorimetric determinations were made with a Perkin-Elmer LS-5 apparatus (excitation wavelength, 360 nm; emission wavelength, 446 nm). The fluorimeter was calibrated using 4-methylumbelliferone standards. Specific enzyme activity in cell extracts was expressed in micromoles of 4-methylumbelliferone per minute per milligram of protein. Protein content was determined using the Bio-Rad protein assay kit, with bovine serum albumin as a standard.

RESULTS

Transcriptional organization of the flagellar cluster *fljHJK LMNOPQR fljB*. A large flagellar cluster was previously identified which contained 12 flagellar genes from *fljI* to *fljR* and *fljB* (3, 7). The transcriptional organization of this region was inferred from a complementation study on a strain carrying a polar insertion in the *fljM* gene (*fljM::uidA-aadA*). This study indicated the presence of a promoter downstream of *fljN* (7).

To analyze this possibility, transcriptional fusions of the *fljM* and *fljR* genes to the promoterless *uidA* gene were made. These fusions were used to replace either the *fljM*' or the *fljR*' genes from the chromosomes of the wild-type WSS strain and from the PG2 strain, which carries the mutation *fljK::TnpA* (8). Correct replacement in each of these four strains was confirmed by Southern blot analysis (data not shown).

The expression level of β -glucuronidase dependent on flagellar promoters was determined under heterotrophic growth conditions. Strains carrying the *fljM::uidA-aadA* or the *fljR::uidA-aadA* fusion in a wild-type background showed a high level of activity (Table 1). In contrast, when fusions were placed in the *fljK::TnpA* background, only the strain carrying the *fljI::uidA-aadA* allele showed β -glucuronidase activity. This result can be explained in terms of a polar effect exerted by the *TnpA* transposon over genes in the same transcriptional unit. Therefore, *fljK*, *fljL*, and *fljM* appear to belong to the same transcriptional unit, whereas *fljR* belongs to a different operon.

Deletion mapping of a transcriptionally active flagellar region. To identify the promoter controlling transcription of *fljR*,

deletion analysis of a 4.4-kb *Eco*RI fragment carrying the *fljR::uidA-aad* allele was performed. This fragment, which incorporates sequences from the middle of *fljM* to the middle of *fljB*, was cloned into the pRK415 vector in an orientation opposite to that of the pRK415 promoters.

WSS cells carrying this plasmid were grown to mid-log phase and the level of β -glucuronidase was determined in a cell extract. This construct produces high levels of β -glucuronidase (Fig. 1, construct 1). The *uidA* gene was cloned into pRK415 in both orientations with respect to the pRK415 promoters for use as controls (Fig. 1, constructs 6 and 7). β -Glucuronidase activity was detected only when *uidA* was transcribed from the known pRK415 promoters.

Nested deletions of the *Eco*RI fragment were performed using previously identified restriction sites. The first deletion removed the *fljM* coding region, leaving the *Sac*I site in the middle of the *fljN* gene as a 5' boundary (Fig. 1, construct 2). This construct shows a high level of activity. In contrast, deletion of the next 1.1 kb, up to the *Sac*I site located in *fljP*, completely abolished β -glucuronidase activity (Fig. 1, construct 3). Therefore, the sequence from the *Sac*I site to the *Sac*I site spanning from the middle of *fljN* to *fljP* (1.1 kb) contains a functional promoter.

To further define this promoter region, a 600-bp *Sac*II fragment, spanning from the 3' end of *fljN* to the 5' end of *fljO*, was cloned upstream of the *uidA* gene (Fig. 1, construct 4). This region was fully functional for promoting *uidA* transcription. Further deletion of 180 bp from the *fljN* side only modestly affected the transcriptional capability of this fragment (Fig. 1, construct 5).

In summary, these results localize a functional flagellar promoter to a 420-bp region (*Sac*I-*Sac*II fragment) (Fig. 1, construct 5). Previous sequence analysis of this region did not show a good match with the consensus promoter sequence for σ^{70} ; instead, a putative σ^{54} promoter sequence was clearly identified (7).

Site-directed mutagenesis of the σ^{54} consensus region. It is known that the most conserved regions of the promoters recognized by $\text{Er}^{\sigma^{54}}$ are the dinucleotides GG and GC located near positions -24 and -12 upstream from the transcription start site. Changes in these bases interfere with the ability of σ^{54} to promote transcription (4).

Site-directed mutagenesis was carried out on the σ^{54} consensus promoter region present in the *Sac*I-*Sac*II fragment. The putative nucleotides in the -25, -24, and -12 positions were replaced by the nucleotide T. After mutagenesis and sequencing, this region was cloned upstream of the *uidA* gene in pRK415 (Fig. 2).

β -Glucuronidase activity was determined for each construct using cell extracts. All mutational changes negatively affected β -glucuronidase activity (Fig. 2). The control contained a mutation at the -18 position, which is irrelevant for promoter recognition (4). In this case, β -glucuronidase activity was very similar to that of the wild type (Fig. 2). These results provide evidence that promoter activity detected in this region is dependent on the RNA polymerase associated with the σ^{54} factor.

It is known that integration host factor protein (IHF) binds to specific sites placed between the σ^{54} promoters and the activator binding sites, which are usually located upstream of the initiation site at approximately -100 to -150 bp. Therefore, it has been proposed that IHF bends DNA, favoring contact of the activator with $\text{Er}^{\sigma^{54}}$ bound at the promoter. The 420-bp region proposed to carry a flagellar promoter was analyzed using the program Seqscan at www.bmb.psu.edu/nixon/webtools/molbiol.htm in order to identify any potential IHF

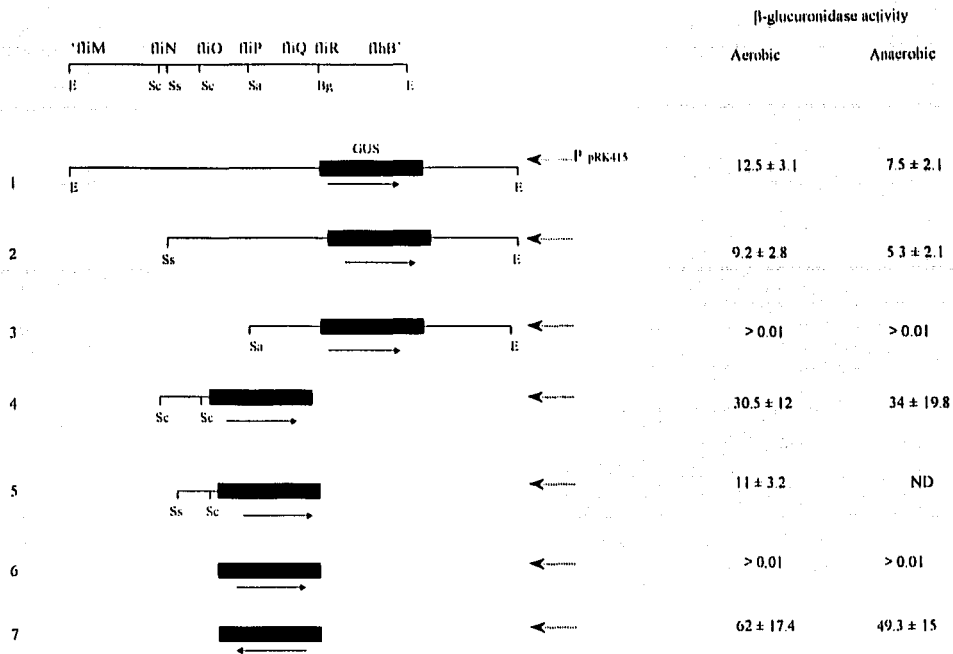


FIG. 1. β-Glucuronidase activity from *flOp-flaI* fusions. The upper part shows some of the relevant restriction sites within the 4.6-kb *EcoRI* fragment. Arrows indicate the direction of the *flaI*-coding region. Broken arrows indicate the direction of the pRR415 promoters. Abbreviations for restriction sites: E, *EcoRI*; Sc, *ScaI*; Ss, *SseI*; Sa, *SalI*; Bg, *BglI*. β-Glucuronidase activities are given as indicated in Table 1. GUS, β-glucuronidase; ND, not determined.

binding site. No matches above the program threshold were found. However, it is still possible that a low-affinity binding site with a poor match with the consensus sequence may exist. Finally, two different palindromic sequences which may represent the activator binding site were located at -145 and -127 bp upstream of the σ^{54} promoter (data not shown).

5' end mapping of the flagellar mRNA dependent on σ^{54} promoters. Putative σ^{54} promoter sequences have been identified upstream of the flagellar genes *flgB*, *flkK*, and *motA* (Gen-

Bank accession number U86454) (6; Ballado et al., unpublished). The nucleotide sequence of each of these regions was aligned with the sequence of the functional σ^{54} promoter in the *flin-flIO* intergenic region. The nucleotide residues GGCA and TTGC are present in all sequences (data not shown). In order to obtain evidence that these sequences correspond to functional flagellar promoters, we examined if specific mRNA transcripts were produced from these putative promoters.

Primer extension assays were performed using total RNA

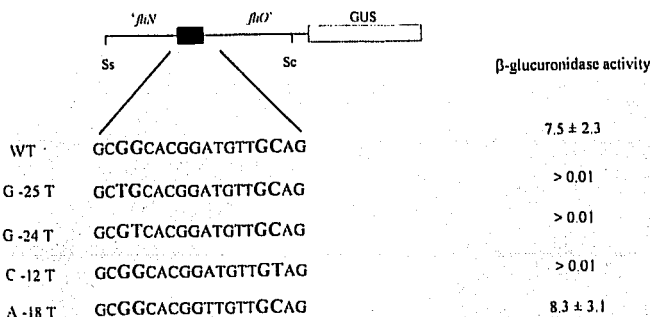


FIG. 2. β-Glucuronidase expression of wild-type and mutated *flIO* promoters. The dark box represents the σ^{54} promoter sequence. The conserved dinucleotides GG and GC are shown in bold. Specific changes made in each construct are shown in the left column. β-Glucuronidase activities are given as indicated in Table 1. GUS, β-glucuronidase; WT, wild type.

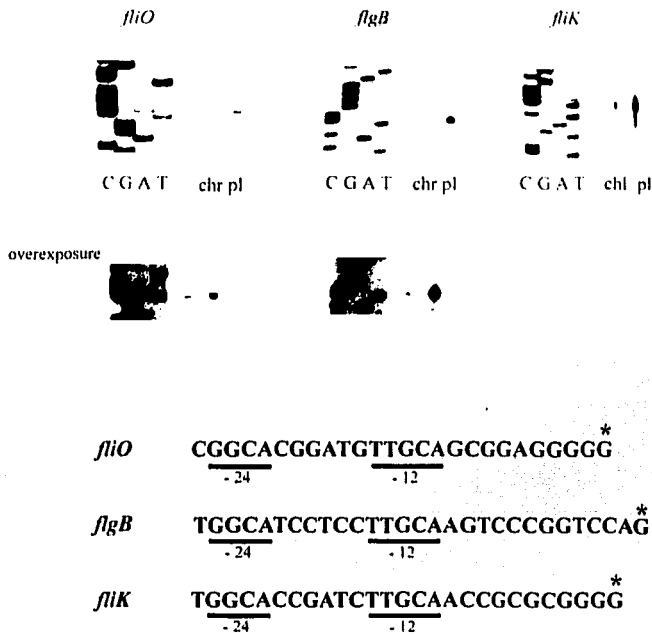


FIG. 3. Determination of the *fliO*, *flgB*, and *fliK* transcriptional start sites by reverse transcriptase-mediated primer extension. Extension analysis carried out with total RNA isolated from WS8 wild-type cells is indicated as "chr." The assay carried out with total RNA from WS8 cells transformed with the pRK415 plasmid containing the putative σ^{54} promoter cloned in opposite orientation to the vector promoters is indicated as "pl." Nucleotide sequences upstream of the observed transcriptional start sites are shown. The asterisk indicates the nucleotide proposed to be the transcriptional start site. The conserved regions including the -24 and -12 positions are underlined.

extracted from wild-type cells. Since flagellar transcripts are scarce, we also included total RNA from WS8 cells overexpressing the region to be analyzed. This was done by cloning the specific region in pRK415 in opposite orientation to the vector promoters. In spite of the low copy number of pRK415, a slight increase (of at least two- or threefold) of the specific transcripts could be expected, facilitating its detection. Primers used in these experiments were designed to be complementary to the regions of the *fliO*, *flgB*, and *fliK* genes predicted to encode the N termini of the gene products.

Each reverse transcription reaction yielded a major band that defines the start site of mRNA transcription (Fig. 3). As expected, this band was stronger from RNA isolated from cells carrying the flagellar promoter sequences in pRK415. In all cases, the cDNA product was of the same size as that from wild-type mRNA.

The transcriptional start site for *fliO* was identified at 24 nucleotides (nt) upstream of the T TG start codon (data not shown) and 11 nt downstream of the dinucleotide GC of the sequence recognized by σ^{54} . Transcription of *flgB* and *fliK* started 35 and 17 nt upstream of the ATG start codon, respectively (data not shown). In all cases, the distance between the σ^{54} promoter sequence and the transcription start site is consistent with the distance reported for functional σ^{54} promoters (4).

The 5' end of the mRNA located upstream of *fliO*, together with other evidence presented here, indicates that the expression of the *fliO* operon depends on $\text{E}\sigma^{54}$. Moreover, a stable 5'-end mRNA was detected upstream of other regions thought

to carry a σ^{54} -dependent promoter. Therefore, these sequences may represent the functional promoters of the *flgBCDEF* and the *fliKLMN* operons in *R. sphaeroides*. Nevertheless, to obtain additional evidence supporting the above conclusions it would be necessary to determine the expression level of these promoters in an *rhoN* background (lacking the *rhoN1* and *rhoN2* genes).

Expression of the flagellar *fliO* promoter is not dependent on growth conditions. It has been shown for several bacterial groups that flagellar synthesis is affected by environmental conditions (9, 13). In the case of *R. sphaeroides*, flagellar control signals might be related to the cell cycle and possibly independent of environmental conditions. To determine if growth conditions affect the expression of *fliOp*, WS8 cells carrying the fusion *fliOp::uidA* in pRK415 were grown heterotrophically or photoheterotrophically. No significant difference in the level of β -glucuronidase activity was observed, suggesting that the expression of some of the components involved in flagellar synthesis is not significantly affected by these growth conditions (Fig. 1). Since our results are focused on only two extreme conditions, i.e., light and oxygen, it remains to be investigated if other environmental conditions modify the expression level of the flagellar promoters.

Is flagellar gene expression in *R. sphaeroides* hierarchical? In enteric bacteria, the best-characterized checkpoint in flagellar assembly is controlled by the protein FlgM (10, 15). To test if this checkpoint exists in *R. sphaeroides*, we investigated whether a functional HBB structure was necessary for flagellin gene expression.

Expression of *fliC* was evaluated by Northern blot analysis



1 2 3

GATTTTGGGAGGGCGCTAAAAGTTTATCCGCGCCGCTGTGAAGGGACA

GAQCCCCGGAGCGGACGCGACCGGAGATCAGGAGGUTCAACCCATG ACG ACC

ATC AAC ACG AAC ATC

Ile Asn Thr Asn Ile

Met Thr Thr

FIG. 4. Northern blot analysis of *fliC* transcripts. Total RNA extracted from WS8 wild-type cells (lane 1), NG1 cells (*fliM::uidA-uidA*) (lane 2), and LCI cells (*fliE::aadA*) (lane 3) was probed with a ³²P-labeled *fliC* fragment as described in Materials and Methods. The nucleotide sequence of the 5' end of the *fliC* gene, including its control region, is shown (accession number AF274346). The sequence resembling the σ^{28} promoter, the putative start codon of *fliC*, and the ribosomal binding site are shown in bold.

using total RNA from wild-type WS8 cells and from cells carrying a mutation in either the *fliM* or *fliE* gene. Transcripts of *fliC* were clearly detected in RNA preparations from wild-type and mutant strains (Fig. 4). However, the mutant strains showed a decrease in the quantity of *fliC* mRNA produced compared to that of WS8 cells. This result may be due to either a reduction in the amount of mRNA synthesized or a reduction in its stability. Despite this, *fliC* expression does not appear to be absolutely dependent on the presence of a functional HBB structure.

The regulatory region of *fliC* does not show any sequence similarity with the σ^{54} consensus promoter. However, in agreement with a previous report, a sequence similar to that of the σ^{28} consensus promoter (GenBank accession number Y14687) is located approximately 51 bp upstream of the putative ATG start codon (Fig. 4).

DISCUSSION

Structural components of the flagellum of *R. sphaeroides* have been recently characterized (3, 6, 7, 8, 19; Ballado et al., unpublished). However, still nothing is known about the factors that regulate the expression of the genes involved in motility. In this work, we identified several promoters responsible for the transcription of the flagellar genes involved in the formation of the basal body, the switch, and the hook.

This work showed that *fliOp* is a functional σ^{54} promoter. Our results support the idea that this promoter is responsible for the expression of *fliO*, *fliP*, *fliQ*, *fliR*, and probably *fliB*. Additional studies are in progress to define whether this operon includes *fliB* and beyond.

A sequence similar to that of the σ^{54} consensus promoter was identified upstream of the *fliK* gene. The functionality of this promoter sequence was supported by the identification of the *fliK* 5'-end mRNA, the start site of which is within the expected range for a functional σ^{54} promoter (Fig. 3). On the other hand, the polar effect exerted by the mutation *fliK::TnpA* over *fliM* expression suggests that *fliK* and *fliM* belong to the same operon (Table 1). Together, these results support the idea that the σ^{54} promoter located upstream of *fliK* is responsible for transcribing the *fliK*, *fliL*, *fliM*, and *fliN* genes as a single transcriptional unit. The inclusion of the *fliN* gene in this operon was previously proposed from a complementation study of a strain carrying the *fliM::uidA-uidA* mutation (7).

A third transcriptional start site defined in this work was located upstream of *fliB*. A sequence similar to that of the

σ^{54} consensus promoter is at a proper distance from the *fliB* mRNA initiation site. Consequently, we suggest that this sequence is the functional σ^{54} promoter responsible for the expression of the *fliB*, *fliC*, *fliD*, *fliE*, and *fliF* genes. The internal organization of this region has been recently elucidated, and genetic evidence supports the idea that these genes form an operon (Ballado et al., unpublished).

The data presented here allow us to propose that in *R. sphaeroides* the expression of the flagellar genes, whose products are involved in the assembly of the basal body, the switch, and the hook structures, is dependent on $E\sigma^{54}$. This is in contrast with the situation found in both *S. enterica* serovar Typhimurium and *E. coli*, where the flagellar genes involved in the synthesis of these structures are dependent on $E\sigma^{70}$ and the FlhD-FlhC activator complex. At a glance, *R. sphaeroides* flagellar gene expression would appear to be similar to that observed in *Caulobacter crescentus*, where the genes involved in the formation of the rod and the hook are dependent on $E\sigma^{54}$ (22). However, several of the genes reported here as being dependent on σ^{54} are dependent on $E\sigma^{70}$ in *C. crescentus*. Moreover, two flagellin genes of *C. crescentus* are dependent on $E\sigma^{54}$ (22), whereas the regulatory region of *fliC* of *R. sphaeroides* shows a sequence resembling that of a σ^{28} promoter, as occurs in enteric bacteria (*E. coli* and *Salmonella*). Therefore, the flagellar genetic system of *R. sphaeroides* seems to combine features from these two systems.

As mentioned before, in *S. enterica* serovar Typhimurium the flagellar genes follow a hierarchical order of expression; therefore, the transcription of the genes placed at a low level of the hierarchy is dependent on the expression of the genes at a higher level. In this regard, in *R. sphaeroides* the activity of *fliOp* and the expression of the *fliM* gene, both of which were tested as the activity of the *uidA* reporter gene, have been shown to be insensitive to the presence of other mutations in flagellar genes, such as *fliR*, *fliM*, and *fliE* (this work and data not shown). Therefore, we suggest that all these genes belong to the same transcriptional class and may be assigned to class II. Interestingly, genetic evidence has suggested that the *motA* gene may be dependent on $E\sigma^{54}$ (6). Therefore, *motA* could be expressed simultaneously with the genes encoding the structural components of the basal body and the hook. Additional studies are required to define whether the *mot* genes, together with the *fli* and the *fliG* genes, can be grouped within the same transcriptional class.

According to current knowledge of the σ^{54} factor (17), the existence of an activator protein must be considered. This protein may represent the flagellar class I in *R. sphaeroides*. Although its identity remains to be elucidated, it could be suggested that this protein would belong to the family of σ^{54} -dependent activator proteins.

Finally, the class III genes could be transcribed by $E\sigma^{28}$, as seems to be the case for the *fliC* gene (Fig. 4). The reduction in the amount of the *fliC* mRNA observed in the *fliE* and *fliM* strains may represent the control that class II genes exert over the expression of σ^{28} -dependent genes. This negative control does not seem to be absolute and allows a certain level of *fliC* expression even in the absence of a functional HBB structure. Supporting the idea that class III genes are expressed from $E\sigma^{28}$ promoters, we have found that *fliD*, which is expected to belong to this class, also shows a σ^{28} consensus promoter a few base pairs upstream of the putative initiation codon (data not shown).

In summary, our results support the idea that in *R. sphaeroides* the expression of the flagellar genes is controlled according to a hierarchical pattern. Class II genes are dependent on $E\sigma^{54}$, whereas class III genes seem to be dependent on $E\sigma^{28}$.

The control that class II genes exert over the expression of class III genes does not seem to be tight, and the molecular bases underlying this weak regulation are under investigation in our laboratory.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Laura Velázquez for her comments and critical review of the manuscript. We thank T. Ballado for technical assistance. We also thank Luis Servín-González and E. Silva-Herzog for helpful discussions.

This work was supported in part by DGAPA grant IN221598 to G.D. and L.C.

REFERENCES

1. Aizawa, S.-I. 1996. Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 19:1-5.
2. Ausubel, F. M., R. E. Kingston, D. B. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Strahl (ed.). 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, New York, N.Y.
3. Ballado, T., A. Campos, L. Camarena, and G. Dreyfus. 1996. Flagellar genes from *Rhodobacter sphaeroides* are homologous to genes of the *fljE* operon of *Salmonella typhimurium* and to the type-III secretion system. *Gene* 170:69-72.
4. Barrios, H., B. Valderrama, and E. Moretti. 1999. Compilation and analysis of σ^{54} -dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 27:4305-4313.
5. Davis, J., T. J. Donohue, and S. Kaplan. 1988. Construction, characterization, and complementation of a *Paf* mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 170:320-329.
6. Berpan, S. H., and R. E. Sockett. 1995. Analysis of the *motA* flagellar motor gene from *Rhodobacter sphaeroides*, a bacterium with a unidirectional, stop-start flagellum. *Mol. Microbiol.* 17:961-969.
7. García, N., A. Campos, A. Osorio, S. Poggio, B. González-Pedraja, L. Camarena, and G. Dreyfus. 1998. The flagellar switch genes *flhM* and *flhN* of *Rhodobacter sphaeroides* are contained in a large flagellar gene cluster. *J. Bacteriol.* 180:3978-3982.
8. González-Pedraja, B., T. Ballado, A. Campos, R. E. Sockett, L. Camarena, and G. Dreyfus. 1997. Structural and genetic analysis of a mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WSS deficient in hook length control. *J. Bacteriol.* 179:6581-6588.
9. Hemmer, K., B. Brand, and J. Hacker. 1999. The expression of the flagellum of *Legionella pneumophila* is modulated by different environmental factors. *FEMS Microbiol. Lett.* 175:69-77.
10. Hughes, K. T., K. L. Gillen, M. J. Semon, and J. E. Kurtzweil. 1993. Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* 262:1277-1280.
11. Ikebe, T., S. Iyoda, and K. Kutsukake. 1999. Promoter analysis of the class 2 flagellar operons of *Salmonella*. *Genes Genet. Syst.* 74:179-183.
12. Jefferson, R. A., S. M. Burgess, and D. Hirsch. 1986. β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8447-8451.
13. Kapur, V., J. W. Olson, J. C. Pepe, and S. A. Minnick. 1996. Temperature-dependent regulation of *Yersinia enterocolitica* class III flagellar genes. *Mol. Microbiol.* 19:1061-1071.
14. Kunkel, T. A. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without plasmid shuffle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492.
15. Kutsukake, K. 1994. Excretion of the anti-sigma factor through a flagellar substructure complex flagellar gene expression with flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* 243:605-612.
16. Maenah, R. M. 1996. Flagella and motility, p. 123-145. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Liu, K. B. Low, H. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umberger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
17. Merrick, M. J. 1993. In a class of its own—the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σ^{24}). *Mol. Microbiol.* 10:903-909.
18. Mizushima, T., R. Koyanagi, T. Katayama, T. Miki, and K. Sekimizu. 1997. Decrease in expression of the master operon of flagellin synthesis in a *dnwA46* mutant of *Escherichia coli*. *Biol. Pharm. Bull.* 20:327-331.
19. Shah, D. S. H., J. P. Armitage, and R. E. Sockett. 1995. *Rhodobacter sphaeroides* W88 expresses a polypeptide that is similar to MotB of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177:2929-2932.
20. Siström, W. R. 1962. The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Gen. Microbiol.* 28:607-616.
21. Soutourina, O., A. Kull, E. Krin, C. Laurent-Winter, S. Rimsky, A. Danchin, and P. Bertin. 1999. Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-N9 protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. *J. Bacteriol.* 181:7500-7508.
22. Wu, J., and A. Newton. 1997. Regulation of the *Caulobacter* flagellar gene hierarchy: not just for motility. *Mol. Microbiol.* 24:239.
23. Yauquithara, S., S. Iyoda, K. Ohnishi, T. Ito, and K. Kutsukake. 1999. Structure and transcriptional control of the flagellar master operon of *Salmonella typhimurium*. *Genes Genet. Syst.* 74:105-111.
24. Zhu, Y. S., and S. Kaplan. 1985. Effects of light, oxygen, and substrates on steady-state levels of mRNA coding for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and light-harvesting and reaction center polypeptides in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* 162:925-932.

Resultados

Organización transcripcional de los genes flagelares *fliK*, *fliL*, *fliM*, *fliN*, *fliO*, *fliP*, *fliQ*, *fliR*, *fliB*.

Como fue mencionado en la introducción, el gene *fliM* se encuentra en un agrupamiento de genes flagelares en el genoma. El orden de los genes en esta región es: *fliF*, *fliG*, *fliH*, *fliI*, *fliJ*, *fliK*, *fliL*, *fliM*, *fliN*, *fliO*, *fliP*, *fliQ*, *fliR*, *fliB* (10, 28).

Durante la caracterización de la cepa NG1 (*fliM::uidA-aadA*), se observó que esta cepa no podía ser complementada por el gene *fliM*⁺ clonado en el vector pRK415 y expresado bajo control de los promotores del plásmido. Sin embargo, se observó complementación al introducir un fragmento de DNA con los genes *fliM*⁺ y *fliN*⁺. Este resultado, sugirió que la inserción del cassette de resistencia provocaba un efecto polar sobre los genes ubicados río abajo del gen *fliM* y que pertenecían a la misma unidad transcripcional. Dado que la cepa NG1 fue complementada al expresar *fliM* y *fliN* a partir del plásmido pRK415 se propuso que *fliN* era el último gene de esta unidad transcripcional (28).

Con objeto de obtener evidencia adicional que apoyara esta idea, se decidió analizar la expresión de los genes *fliM* y *fliR*, mediante el uso del gene reportero *uidA*, el cual codifica para la enzima β -glucuronidasa, y permite el aislamiento de fusiones transcripcionales. El nivel de actividad enzimática de las fusiones *fliM::uidA-aadA* y *fliR::uidA-aadA* fue determinado en un fondo genético silvestre, y en el fondo genético *fliK::TnphoA*. Cabe mencionar, que estudios de complementación de la cepa PG1 (*fliK::TnphoA*) sugieren que el transposón insertado en *fliK*, provoca un efecto polar sobre

los genes ubicados río abajo (30). Por esta razón, esta mutación combinada con las fusiones en *fliM* y *fliR*, nos permitiría determinar si la polaridad de esta inserción ejerce un efecto negativo sobre la expresión de *fliM* y/o *fliR*.

La cepa SP1 (*fliK::TnphoA fliM::uidA-aadA*), y las cepas SP2 (*fliR::uidA-aadA*) y SP3 (*fliK::TnphoA fliR::uidA-aadA*), fueron construidas como se indica en la sección de Material y Métodos.

La actividad de β -glucuronidasa para estas tres cepas fue determinada a partir de cultivos crecidos heterotróficamente hasta fase exponencial media. Como se puede observar en la Tabla 1, en las cepas NG1 (*fliM::uidA-aadA*) y SP2 (*fliR::uidA-aadA*) se detectó un alto nivel de actividad enzimática. Sin embargo, al colocar estas fusiones en fondo genético *fliK::TnphoA*, se observó que solamente la fusión *fliR::uidA-aadA* mantenía elevados niveles de β -glucuronidasa (comparar la actividad de SP1 con la de SP3).

Cepa	Genotipo	actividad de β -glucuronidasa
PG2	<i>fliK::TnphoA</i>	0.02 \pm 0.14
NG1	<i>fliM::uidA-aadA</i>	9.8 \pm 2.9
SP1	<i>fliK::TnphoA fliM::uidA-aadA</i>	0.09 \pm 0.2
SP2	<i>fliR::uidA-aadA</i>	14.6 \pm 4.5
SP3	<i>fliK::TnphoA fliR::uidA-aad</i>	12.3 \pm 3.9

Tabla 1. Actividades específicas de β -glucuronidasa expresada a partir de las fusiones cromosomales de *uidA* en promotores *fli*. Las actividades están expresadas en μ moles de 4-metilumbeliferona formada por minuto por mg de proteína.

Dado que el efecto polar del transposón (*TnphoA*) sólo afectaría a los genes pertenecientes a la misma unidad transcripcional del gene en que este insertado, los resultados anteriores nos sugieren que el gene *fliM* forma parte de la misma unidad transcripcional a la cual pertenece *fliK*, y que *fliR* forma parte de una unidad independiente.

Mapeo por delección de una región flagelar transcripcionalmente activa.

A partir de los resultados anteriores, nos propusimos identificar la región que controla la expresión del gene *fliR* mediante un análisis de delección. Para ello, el cassette de resistencia 'uidA- uadA se insertó en un sitio único *Bgl*II presente en un fragmento *Eco*RI de 4.4 kb, el cual abarca desde la mitad de *fliM*, hasta *fliB* (ver mapa en la fig. 9). La inserción interrumpe la región codificadora de *fliR*. Esta construcción, originalmente hecha en el vector pTZ19R, fue transferida al vector pRK415, en dirección contraria a los promotores de este plásmido (fig. 9, construcción 1). Esta construcción fue entonces transferida de *E. coli* a *R. sphaeroides* WS8 por conjugación. Como se puede apreciar en la Fig. 9, se detectó una alta cantidad de β -glucuronidasa en las células que llevan este fragmento.

La primera delección probada en nuestro análisis, consistió en eliminar la región codificadora de *fliM* y parte de la de *fliN*, hasta el sitio *Sac*I. El fragmento *Sac*I-*Eco*RI, fue transferido entonces al pRK415 siguiendo el esquema de clonación que se describió anteriormente. Como se puede observar en la Fig. 9 (construcción 2), esta construcción también muestra una alta actividad enzimática. En contraste, la remoción de las siguientes 1.1 kb hasta el sitio *Sac*II localizado en *fliP*, eliminó completamente la actividad de β -

glucuronidasa (Fig. 9, construcción 3). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la secuencia comprendida desde el sitio *SacI* al sitio *Sall* (1.1 kb), contiene un promotor funcional. Este fragmento incluye parte de la región codificadora de *fliN*, *fliO*, y parte de *fliP*.

Con el objeto de restringir el tamaño de la región promotora, se clonó un fragmento *SacII* de 600 pb (el cual se extiende desde el extremo 3' de *fliN* hasta el 5' de *fliO*), frente al gen reportero *'uidA* (Fig. 9, construcción 4). Esta región fue capaz de promover la síntesis de un alto nivel de β -glucuronidasa. De hecho, la remoción de 180 pb adicionales, a partir del extremo de *fliN*, aún permite la expresión de una buena cantidad de β -glucuronidasa (Fig. 9, construcción 5). Como control se clonó el cassette de resistencia *'uidA-audA* en el pRK415 en ambas orientaciones con respecto a los promotores del vector. Como se puede observar en la Fig. 9 (construcciones 6 y 7), solamente pudo detectarse actividad enzimática cuando el gen reportero era transcrito a partir de los promotores del vector (construcción 6). Este resultado muestra que los insertos clonados en el pRK415 no se expresan por la transcripción proveniente del vector cuando éstos son clonados en la orientación opuesta a los promotores previamente reportados para este plásmido (47).

En síntesis, nuestros resultados indican que dentro de una región de 420 pb hay un promotor flagelar funcional.

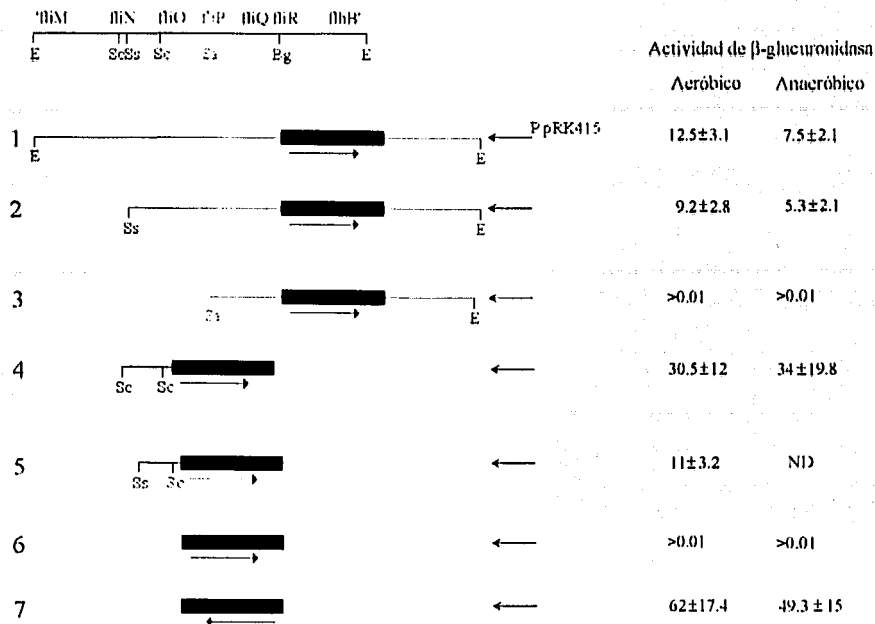


Figura 9. Actividad de β -glucuronidasa de las fusiones de *uidA* con la región promotora rP arriba de *flO*. En la parte superior se muestra un mapa con algunos sitios de restricción relevantes. Las flechas a la derecha muestran la dirección de la transcripción de los promotores del plásmido, mientras que las flechas debajo de las cajas indican la orientación del gen *uidA*. Las actividades específicas están expresadas en μ mol de producto/min/mg de proteína. Bg/II. Bg: *EcoRI*. E: *SacI*, Ss: *Sall*, Sa: *SacII*, Sc.

Al analizar la secuencia del fragmento de 420 pb (fragmento *SacI-SacII*) buscando la secuencia consenso más estricta para los promotores dependientes de σ^{54} , identificamos una secuencia que es similar al promotor consenso reconocido por el factor σ^{54} , esta secuencia se ubica en la región intercistromónica *flIN-flIO*. Es conocido que las regiones más conservadas de los promotores reconocidos por σ^{54} son los dinucleótidos GG y GC localizados alrededor de las posiciones -24 y -12 rP arriba del sitio de inicio de la transcripción. Adicionalmente, se sabe que este factor σ es incapaz de iniciar la transcripción en ausencia de una proteína activadora, la cual usualmente se une aproximadamente 100 pb rP arriba del promotor. En ocasiones estos promotores requieren

de la presencia de la proteína IHF (Integration Host Factor), la cual se une entre el promotor y los sitios de unión del activador; se cree que el papel de IHF es el de favorecer la curvatura del DNA en forma de lazo, con el objeto de promover el contacto entre el activador y σ^{54} unida al promotor.

La secuencia de DNA de la región intercistronica *fliN-fliO*, se analizó buscando posibles sitios de unión de IHF, utilizando el programa seqscan el cual se encuentra en la siguiente página de red: www.bmb.psu.edu/nixon/webtools/molbiol.htm. La matriz utilizada por este programa incluye 37 sitios de unión a IHF confirmados por datos experimentales. Sin embargo, ningún sitio posible para la unión de IHF fue predicho por el programa a pesar de que en la base de datos se incluye un sitio de IHF de *Rhodobacter capsulatus*. La aparente ausencia de sitios IHF sugiere que esta región de DNA debe tener una curvatura intrínseca, de hecho en experimentos preliminares en el laboratorio se ha observado una migración anómala de un fragmento correspondiente a la región intercistronica entre *fliN* y *fliO*. Esta migración anómala es indicativa de una curvatura intrínseca del fragmento analizado.

Análisis de las secuencias regulatorias de otras posibles unidades transcripcionales.

A partir del análisis de delección y del análisis de la secuencia presente en la región intercistronica *fliN-fliO*, se consideró la hipótesis de que el promotor responsable de la transcripción de los genes flagelares sea reconocido por el factor σ^{54} . Se decidió entonces analizar otras regiones flagelares consideradas como posibles regiones promotoras.

La primera región analizada fue la zona intercistronica *fliJ-fliK*. La posibilidad de que esta región fuese una región promotora, proviene del hecho de que una cepa mutante llevando el alelo *fliJ::TnphoA*, fue complementada con un fragmento *EcoRI* de 5.3 kb, el cual contiene la región terminal de *fliH*, los genes *fliI*, *fliJ*, *fliK*, *fliL* y la mitad de la región codificadora de *fliM* (10). Tomando en cuenta que la inserción de este transposón (*TnphoA*) siempre ha generado mutaciones que son polares sobre los genes ubicados río abajo en la unidad transcripcional (resultados obtenidos en el laboratorio), y los resultados obtenidos de la inserción *fliK::TnphoA* (ver tabla 1), se puede sugerir a *fliJ* como el último gene del operón (que incluiría los genes *fliH*, *fliI*, y *fliJ*).

Para analizar en detalle esta posibilidad, se llevaron a cabo dos experimentos diferentes que apoyaron la hipótesis anterior. El primer experimento consistió en complementar la cepa PG2, la cual lleva la mutación *fliK::TnphoA* y cuyo fenotipo es poliganchos (30). Esta cepa, a la fecha solamente había podido ser complementada (evaluado como el restablecimiento de la motilidad) con un cósmido que lleva 25 kb de DNA cromosomal de WS8 (96). Decidimos entonces introducir a dicha cepa, un fragmento *EcoRI* que lleva los genes *fliI*, *fliJ*, *fliK* y *fliL* flanqueados por secuencias truncadas de *fliH* y de *fliM*. Dicho fragmento fue clonado en pRK415, en ambas orientaciones con respecto a los promotores del vector. Las cepas resultantes fueron incapaces de nadar. Sin embargo, se decidió analizar si éstas aun seguían formando la estructura poliganchos detectada en la cepa PG2. En ningún caso se observó la estructura conocida como poliganchos.

De estos resultados podemos concluir:

- (1) Que la mutación *fliK::TnphoA* es complementada por el fragmento *EcoRI* de 5.3 Kb. que lleva los genes *fliI*, *fliJ*, *fliK* y *fliL* y los genes *fliH* y *fliM* truncados. Sin embargo, el fenotipo silvestre no se restablece debido a la

ausencia de los productos de los genes *fliM* y *fliN*, los cuales están ausentes en este fragmento y su expresión a partir del cromosoma está limitada por la presencia del transposón (nótese la reducción en la actividad enzimática en la cepa SPI, Tabla 1).

- (2) El hecho de que este fragmento de DNA haya complementado la lesión en *fliK* de la cepa PG2, en ambas orientaciones, sugiere que este fragmento *EcoRI* contiene un promotor funcional el cual permite la expresión de *fliK*, de forma independiente a los promotores del vector.

El segundo experimento que realizamos consistió en clonar un fragmento *EcoRI-Sall* de 2 kb, el cual lleva la región intercistrica *fliJ-fliK*, delante del gene reportero *uidA*. Esta construcción se realizó en pTZ19R y posteriormente fue transferida a pRK415 en dirección contraria a los promotores del vector. La construcción fue transferida de *E. coli* a *R. sphaeroides* WS8 por conjugación. La actividad de β -glucuronidasa fue determinada a partir de un cultivo crecido hasta fase exponencial media. La actividad enzimática fue alta (16.95 ± 0.15 $\mu\text{mol producto}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) con respecto al control negativo, el cual lleva únicamente al gene *uidA*, clonado en pRK415 en dirección contraria a los promotores del vector y que no tiene actividad.

Los resultados anteriores en conjunto apoyan la hipótesis de que *fliJ* es el último gene de una unidad transcripcional, y que los genes *fliK*, *fliL*, *fliM*, y *fliN*, conforman un operon.

El análisis de la secuencia en la región intercistronica *fliJ-fliK*, también mostró la presencia de una secuencia similar al promotor consenso σ^{54} , aproximadamente a 16 pb río abajo del presunto codon de término de *fliJ*.

Por otro lado, la secuencia localizada río arriba del gene *flgB* (ver mapa fig. 9), también muestra una secuencia similar a este promotor consenso. De hecho, la evidencia genética previamente reportada, sugirió que en esta zona se encuentra el promotor de esta unidad transcripcional (9).

Secuencia consenso de los promotores flagelares dependientes de σ^{54} en *Rhodobacter sphaeroides*

Se identificó la secuencia consenso reconocida por la RNA polimerasa asociada al factor σ^{54} en las regiones:

intercistronica *fliN-fliO*
 río abajo de *fliJ*
 en los 260 pb río arriba de *flgB*

CGGCA CGGATG TTGCAG
 TGGCA CCGATC TTGCAA
 TGGCA TCCTCC TTGCAA

CONSENSO

GGCA (N5) TTGCA



Figura 10. Logo generado a partir de las posibles regiones promotoras identificadas.

Las secuencias nucleotídicas de estas regiones de DNA fueron alineadas con el objeto de determinar con claridad los rasgos absolutamente conservados entre estas tres regiones. Conforme a lo esperado, los dinucleótidos GG y GC están totalmente conservados, así como la distancia entre los mismos (fig. 10). Ligeras variaciones con respecto a la secuencia consenso propuesta para los promotores dependientes del factor σ^{54} fueron observadas en las posiciones adyacentes a estos dinucleótidos. Sin embargo, dado que los rasgos más importantes reportados para los promotores σ^{54} , como son; los dinucleótidos y la distancia entre los mismos se encuentran conservados, consideramos que estas secuencias podrían representar promotores funcionales.

Mapeo del sitio de inicio de la transcripción en las regiones *fliN-fliO*, *fliJ-fliK*, y río arriba de *flgB*.

En caso de que las secuencias propuestas como posibles promotores representasen en verdad promotores funcionales, deberíamos ser capaces de identificar el sitio de inicio del mRNA a la distancia consenso para este tipo de promotores. Bajo este razonamiento, se decidió llevar a cabo experimentos de extensión del cebador (primer extension) para cada una de las regiones mencionadas. Los oligonucleótidos complementarios a la región codificadora de los genes *fliO*, *fliK*, y *flgB* se marcaron en su extremo 5'-terminal con γ -ATP [P^{32}].

El ensayo se llevó a cabo utilizando RNA total de la cepa WS8. Además, tomando en cuenta que estos transcritos deben ser poco abundantes, se decidió extraer RNA a partir de cepas que llevasen la región a ser analizada clonada en pRK415, en la orientación

contraria a los promotores del vector, A pesar del bajo número de copias de este vector, un incremento en la cantidad de los transcritos específicos, quizá del orden de dos o tres veces, podría ser esperado.

El RNA se alineó con el oligonucleótido marcado, y la reacción se llevó a cabo utilizando transcriptasa reversa (AMV). El producto de la reacción se corrió en un gel de acrilamida al 5%, y una reacción de secuencia fue incluida en el gel para usarla como referencia de los tamaños de los cDNAs.

En todos los casos se observó un producto mayoritario, el cual define el sitio de iniciación del mRNA (fig.11); Conforme a lo esperado, este producto fue detectado con mucha mayor claridad a partir del RNA aislado de las células que llevaban las secuencias flagelares respectivas clonadas en pRK415.

A mayores tiempos de exposición, también fue posible detectar los productos de reacción provenientes del RNA aislado de WS8. El hecho de que para cada oligonucleótido, el cDNA fuese del mismo tamaño entre las muestras provenientes de la cepa transformada y la silvestre, sugiere que el haber clonado la región en pRK415 no introdujo artefactos en este experimento.

El sitio de iniciación de la transcripción para *fliOp*, se identificó 24 nt arriba del codon de iniciación de *fliO*, y 11 nt río abajo del dinucleótido GC. Por otro lado, el inicio del mRNA de *flgB* y *fliK* se identificó a 35 y 17 nt. río arriba del codon de iniciación respectivamente y a 13 y 11 nt río abajo del dinucleótido GC. En los tres casos, la distancia que separa la secuencia similar al promotor consenso σ^{54} del sitio de inicio de la transcripción se encuentra dentro del rango reportado para diversos promotores funcionales σ^{54} (11).

Estos resultados nos llevan a concluir que cada una de estas regiones flagelares contienen un promotor funcional reconocido por el factor σ^{54} .

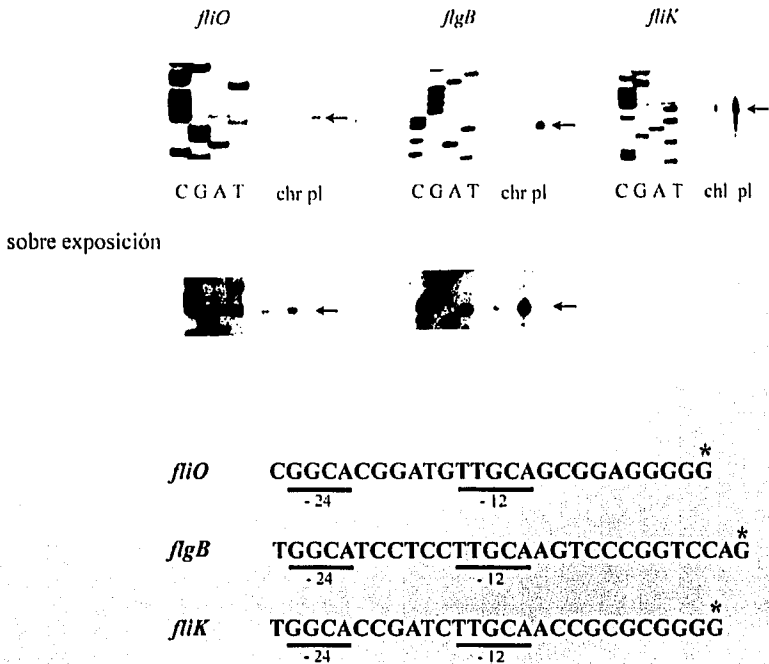


Figura 11. Extensión de cebador para identificar el inicio de la transcripción de los promotores *fliOp*, *flgBp*, *fliKp* (cepa silvestre, chr; cepa transformada, pl).

La expresión del promotor flagelar *fliOp* es independiente de las condiciones de crecimiento.

Para varios grupos de bacterias, ha sido reportado que la expresión de los genes flagelares se ve afectada por las condiciones ambientales.

En el caso de *R. sphaeroides* las señales que controlan la expresión de estos genes podrían estar asociadas con el ciclo celular, y por lo tanto, ser independientes del medio ambiente.

Con el objeto de explorar si la expresión del promotor *fliOp*, se encuentra influenciada por las condiciones ambientales, se determinó la cantidad de β -glucuronidasa producida por la fusión *fliOp-uidA*, cuando las células fueron crecidas heterotróficamente, o fotoheterotróficamente. Como se puede observar en la figura 9, la cantidad de β -glucuronidasa no varía significativamente entre ambas condiciones de crecimiento para ninguna de las construcciones. Este resultado sugiere que la expresión de algunos de los componentes involucrados en la síntesis del flagelo es independiente de las variaciones de luz y oxígeno que estas condiciones de cultivo involucran.

Este resultado es interesante dado que ha sido reportado que en *R. sphaeroides* la expresión de algunos de los receptores del sistema quimiotáctico cambia considerablemente cuando las células son crecidas heterotróficamente o fotoheterotróficamente (32). Por lo tanto se podría hipotetizar, que en *R. sphaeroides* la síntesis de las proteínas flagelares y de los componentes del sistema quimiotáctico podría encontrarse disociada (al menos en algunas condiciones de crecimiento).

La expresión de los genes flagelares en *R. sphaeroides* sigue un patrón jerárquico

Como fue mencionado en la introducción, en *E. coli* y *Salmonella*, el punto de control mejor caracterizado durante la síntesis del flagelo, es aquél que se encuentra regulado por FlgM (ver fig. 4).

Con el objeto de probar si este tipo de control podía ser observado en *R. sphaeroides*, decidimos investigar si la expresión del gene de la flagelina (*fliC*), requería de la presencia de la estructura conocida como gancho-cuerpo basal (HBB), a través de la cual se exportaría el presunto factor anti- σ^{28} (FlgM) para permitir la expresión de los genes flagelares de clase III.

La expresión de la flagelina fue evaluada mediante Northern blot, utilizando RNA total de las cepas WS8 (silvestre), NG1 (*fliM::uidA-audA*), y LC1 (*fliE::audA*). Los transcritos de *fliC* se detectaron claramente en el RNA proveniente de las tres cepas utilizadas (fig.12). Sin embargo, las cepas mutantes muestran una reducción en la cantidad de mensajero al compararlo con la cepa silvestre. Esta reducción puede deberse a una reducción en la cantidad de mRNA sintetizado, o quizá a una reducción en su estabilidad. A pesar de ello, es claro que para que se exprese el gene *fliC* al menos a niveles bajos, no se requiere de la formación de una estructura gancho-cuerpo basal funcional.



Figura 12. Northern blot usando como sonda el gene de flagelina hibridado contra RNA total de las cepas WS8 1, NG1 2, y LC1 3.

Recientemente en el laboratorio se obtuvo la secuencia de la región regulatoria del gene *fliC*, dicha secuencia no muestra ninguna similitud con la secuencia consenso de los promotores dependientes de σ^{54} . Sin embargo, una secuencia similar al promotor consenso σ^{28} fue identificada a 51 pb río arriba del codón de inicio de flagelina (89). Por lo tanto, se llevó a cabo un experimento de extensión del cebador (primer extension), utilizando un oligonucleótido complementario a la región 5'-terminal del gene *fliC*. Como se puede observar en la figura 13, el inicio del mRNA de *fliC*, se ubica a 42 nt río arriba del codón de inicio, y 8 nt río abajo del presunto promotor sigma-28. Ambas distancias son consistentes con las distancias reportadas para otros promotores σ^{28} funcionales (39).

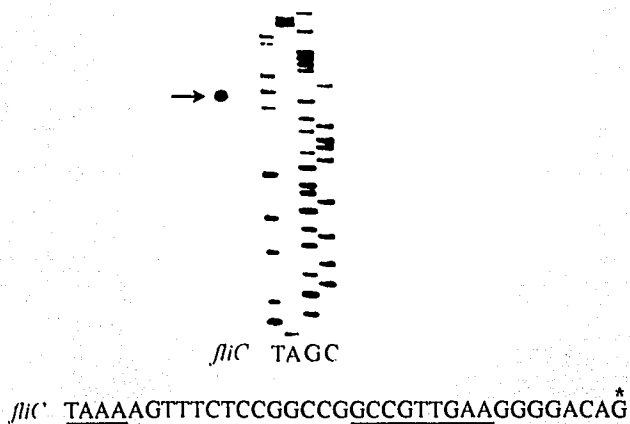


Figura 13. Extensión de cebador para identificar el inicio de la transcripción del promotor de *fliC*.

En resumen, nuestros resultados apoyan la idea de que los genes flagelares en *R. sphaeroides* se expresan utilizando diferentes factores sigma, esto es, los promotores de los genes que codifican para las proteínas del gancho, del cuerpo basal, y del aparato de exportación son reconocidos por el factor σ^{54} , mientras que el promotor del gene de la flagelina parece ser dependiente del factor σ^{28} .

Discusión

A la fecha, algunos componentes del flagelo de *R. sphaeroides* han sido caracterizados. Sin embargo, no existe información al respecto de los factores involucrados en la expresión de estos genes. En este trabajo, se identificaron tres diferentes promotores flagelares, los cuales son dependientes del factor σ^{54} y están involucrados en la expresión de las proteínas que forman parte del cuerpo basal, del gancho, del aparato de exportación y del interruptor flagelar.

Asimismo, nuestros resultados sugieren que la expresión del gene de la flagelina es dependiente de un promotor σ^{28} .

Conforme a los resultados obtenidos en este trabajo, concluimos que *fliOp* es un promotor dependiente del factor σ^{54} , el cual es responsable de la expresión de los genes *fliO*, *fliP*, *fliQ* y *fliR*. No hay evidencia experimental que permita determinar si *fliB* es parte de esta unidad transcripcional, pero el hecho de que el codon de inicio de *fliB* se traslape con el codon de término de *fliR* (78), sugiere que la transcripción proveniente de *fliOp*, incluye al gene *fliB*.

De forma adicional, los experimentos realizados en el laboratorio, demostraron que el cambio de una sola base en los dinucleótidos GG o GC del promotor *fliOp*, abatían completamente la capacidad transcripcional del mismo. Por lo tanto, consideramos que existe una fuerte evidencia experimental que permite concluir que *fliOp* es un promotor dependiente del factor σ^{54} .

Por otro lado, una secuencia similar a este promotor fue identificada río abajo del gene *fliJ*. Una región de DNA conteniendo esta secuencia fue capaz de promover la expresión de un gene reportero. Además, se identificó el inicio del mRNA de *fliK* a 17 pb río abajo de esta secuencia. Estos resultados apoyan la idea de que *fliKp* es un promotor funcional, el cual también es dependiente del factor σ^{54} . Este promotor sería responsable de la expresión de los genes *fliK*, *fliL*, *fliM* y *fliN*, tal y como lo sugieren los estudios de complementación de la cepa NG1 (30), y el estudio de la expresión del gene *fliM*, mostrado en la Tabla 1.

Identificamos un tercer promotor dependiente de este mismo factor sigma, el cual se ubica río arriba de *flgB*. La evidencia que apoya la funcionalidad de este promotor proviene de un estudio de complementación de una cepa mutante en *flgE*, la cual pudo ser complementada con un fragmento que incluye esta zona, de forma independiente de los promotores de pRK415 (9). Los resultados de dicho estudio, aunados a la identificación del extremo 5'-terminal del mRNA de *flgB* (fig. 11), sugieren que *flgBp*, es también un promotor dependiente del factor σ^{54} , el cual permite la expresión de los genes *flgB*, *flgC*, *flgD*, *flgE* y *flgF*. La evidencia experimental de que estos genes conforman una sola unidad transcripcional ha sido reportada previamente (9).

Finalmente, fuimos capaces de identificar el inicio de la transcripción del gene *fliC* (flagelina), el cual se ubicó a 8 pb río abajo de una secuencia similar al promotor consenso reconocido por el factor σ^{28} . Este resultado, aunado al hecho de que no se encontró en esta región ninguna secuencia similar al promotor consenso para σ^{54} , nos lleva a sugerir que el promotor del gene *fliC* puede ser reconocido por el factor σ^{28} .

Como se mencionó en la introducción, en *E. coli* y *Salmonella* los genes involucrados en la expresión del gancho, del cuerpo basal, del aparato de exportación, y del switch, son dependientes de la holoenzima $E\sigma^{70}$ y del activador FlhD/FlhC. De forma general la expresión de los genes flagelares en *R. sphaeroides*, es similar a lo observado en *Caulobacter crescentus*, en donde los genes involucrados en la formación de estas estructuras, son dependientes del factor σ^{54} (113). Sin embargo, varios de los genes reportados en este trabajo como σ^{54} dependientes, en *C. crescentus*, son dependientes de la holoenzima $E\sigma^{73}$ (equivalente a $E\sigma^{70}$ en *E. coli*). Además, dos de los genes que codifican para flagelina en *C. crescentus*, son dependientes también del factor σ^{54} , mientras que en *R. sphaeroides* la evidencia apoya la idea de que este gene es dependiente del factor σ^{28} , tal y como ocurre en *E. coli* y *Salmonella*.

Por lo tanto, el sistema genético flagelar de *R. sphaeroides*, parece combinar rasgos de estos dos sistemas ya que utiliza al factor σ^{54} para la expresión de los genes involucrados en la formación del cuerpo basal, y al factor σ^{28} para la expresión de flagelina.. El modelo generado a partir de los resultados aquí presentados y de otros obtenidos en el laboratorio están condensados en la figura 14.

Se mencionó previamente que en diversos microorganismos, la expresión de los genes flagelares sigue un patrón jerárquico de expresión. Por lo tanto, la transcripción de

los genes ubicados en un nivel bajo de la jerarquía, es dependiente de la expresión de los genes pertenecientes a la jerarquía superior. En este sentido, en *R. sphaeroides*, la actividad del promotor *fliOp*, así como la expresión de *fliM*, ambas probadas como la actividad del gene reportero 'uidA, es insensible a la presencia de mutaciones en *fliR*, *fliK* (Tabla 1) y a la ausencia de *fliM* y *fliN*. Por lo tanto, estos resultados sugieren que todos estos genes podrían pertenecer a la misma clase, dentro de una presunta jerarquía transcripcional, la cual tentativamente hemos asignado como clase II.

Jerarquía regulatoria flagelar en *R. sphaeroides*

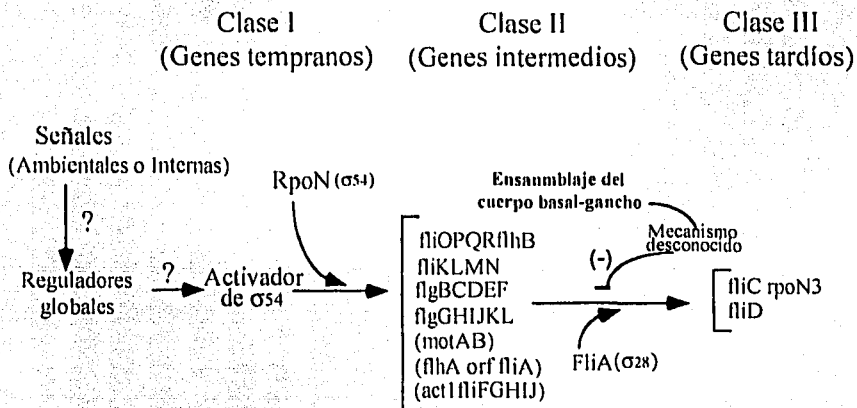


Figura 14. Esquema de la posible organización regulatoria de los genes flagelares en *R. sphaeroides*.

Se sabe que en todos los organismos hasta ahora estudiados, la holoenzima $E\sigma^{54}$ es incapaz de iniciar la transcripción en ausencia de una proteína activadora (70). Por lo tanto, si la expresión de los genes *fli* y *flg* es dependiente de este factor σ , es necesario considerar la presencia de esta proteína activadora. Dicha proteína, podría representar la clase I dentro de la jerarquía de expresión flagelar en *R. sphaeroides*. Aunque a la fecha, este activador no

ha sido identificado, puede ser asumido que esta proteína mostrará los rasgos característicos de las proteínas que conforman la familia de activadores de σ^{54} . Entre las características de las proteínas pertenecientes a esta familia destacan: un dominio de hidrólisis de ATP, un dominio de unión al DNA y un dominio de activación.

Por otro lado, a partir de evidencia genética, se sugirió que el gene *motA* podría ser expresado a partir de un promotor σ^{54} . Por lo tanto, *motA* podría expresarse simultáneamente con los genes que codifican para los componentes estructurales del flagelo (gancho-cuerpo basal). Será muy interesante determinar si el gene *motA*, el cual en *E. coli* pertenece a la clase III, es expresado de forma temprana, esto es, junto con los genes *flg*, y *fli* en *R. sphaeroides*.

Finalmente, nuestros resultados sugieren que la expresión de los genes de clase III, en *R. sphaeroides*, es dependiente del factor σ^{28} , tal y como parece ser el caso de *fliC*.

Evidencia reciente obtenida en el laboratorio, permitió la identificación del gene *fliD*, el cual codifica para la proteína que se ubica en la punta del filamento. La región regulatoria de este gene, mostró una secuencia similar al promotor σ^{28} . Este resultado apoya la idea de que en este organismo, existen varios genes que al igual que en *E. coli* conforman la clase III, la cual sería dependiente del factor σ^{28} .

El hecho de que existan dos diferentes factores sigmas controlando cada uno la expresión de un conjunto de genes flagelares, no demuestra la existencia de una jerarquía de expresión. Sin embargo, su existencia se fundamenta en la reducción que se observó del mRNA de *fliC*, en cepas con lesiones en los genes *fliM* y *flgE*. Aunque no conocemos el mecanismo molecular por el cual ocurre esta reducción, nosotros creemos que éste

representaría el control que los genes de clase II ejercen sobre la expresión de los genes de la clase III.

Es necesario mencionar que este control negativo no parece ser absoluto, y por lo tanto permite un cierto nivel de la expresión de *fliC* aún en ausencia del cuerpo basal y del gancho. Se requiere una profunda investigación para elucidar la explicación de este resultado. De hecho, a la fecha no existe evidencia de la existencia del gene *flgM* (antisigma del factor σ^{28}) en *R. sphaeroides*, que nos permita asumir que el control negativo que observamos está mediado por este mecanismo. Sin embargo, recientemente fue reportado el factor anti σ^{28} en *Helicobacter pylori* (21). Esta proteína muestra escasa relación con el factor anti σ^{28} de *E. coli*, por lo que no se puede descartar este mecanismo en *R. sphaeroides*.

Como fue mencionado en la introducción, en *R. sphaeroides* fue demostrado que la expresión de las MCPs (receptores quimiotáticos) cambia con respecto a las condiciones de luz y oxígeno en las que las células son crecidas (32). Este resultado contrasta con nuestros resultados mostrados en la figura 9, en los cuales se puede observar que la expresión del promotor *fliOp*, no cambia dependiendo de las condiciones de crecimiento.

En este momento, vale la pena hacer referencia al hecho de que en *E. coli* y *Salmonella*, los genes quimiotáticos, incluyendo los genes que codifican para las MCPs, y los genes *che*, forman parte de la clase III de la jerarquía de expresión flagelar; por lo tanto, su expresión ocurre en forma coordinada.

Es posible que en *R. sphaeroides* exista una falta de coordinación en la expresión de los genes flagelares y los genes quimiotáticos. Tal y como ha sido propuesto, es posible que existan diferentes vías para la transducción de la señales quimiotáticas, las cuales

podrían ser expresadas dependiendo de las condiciones de crecimiento. Sin embargo, la estructura flagelar en esta bacteria es un rasgo característico de la especie, esto es, un solo flagelo de localización subpolar, este hecho permite suponer que la síntesis de este único flagelo, no cambiaría dependiendo del medio ambiente. En lugar de ello, puede pensarse que las señales que encienden y apagan su expresión, podrían estar asociadas con el ciclo celular de la bacteria. Sin embargo, a la fecha no existe ningún estudio que permita apoyar la validez de este supuesto. Conviene hacer notar que nos referimos fundamentalmente al nivel de expresión de los genes flagelares que conforman el gancho y el cuerpo basal. Ya que no hay ninguna razón para no pensar que algunos factores ambientales afecten el nivel de flagelina, lo cual se traduciría en flagelos más largos o cortos dependiendo del medio que la bacteria tuviese que enfrentar.

Conclusiones

En este trabajo iniciamos la caracterización del sistema genético flagelar en *R. sphaeroides*. A partir de los resultados obtenidos es posible concluir que varios de los genes que clásicamente forman parte de la clase II en otros sistemas flagelares, se expresan a partir de promotores σ^{54} en *R. sphaeroides*. Mientras que un gen típico de la clase III, en este caso la flagelina, es expresado a partir de un promotor σ^{28} . También se obtuvo evidencia que sugiere que la expresión del gen *fliC* es dependiente de la presencia de un cuerpo basal funcional, por lo que es posible presumir la existencia de una jerarquía regulatoria flagelar en *R. sphaeroides*.

La dependencia del factor σ^{54} para la expresión de un grupo de proteínas flagelares indica la existencia de al menos una proteína activadora de la transcripción perteneciente a la familia de las proteínas activadoras de σ^{54} (Enhancer Binding Proteins) que constituiría la clase I en esta bacteria.

Perspectivas

El reconocimiento de que la expresión de al menos un grupo de genes flagelares en *R. sphaeroides* depende del factor σ^{54} , hace necesaria la identificación y caracterización de la proteína activadora. La identificación de este gen permitiría estudiar con más detalle a que clase de señales responde la síntesis del flagelo en este organismo.

Aunque en este trabajo se presenta evidencia que sugiere la existencia de una jerarquía de expresión de los genes flagelares, resultaría interesante elucidar el mecanismo molecular que permite esta jerarquización.

Referencias

1. Aiba, H., S. Adhya, and B. de Crombrugge. 1981. Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J.Biol.Chem.* **256**:11905-11910.
2. Alon, U., L. Camarena, M. G. Surette, B. Arcas, Y. Liu, S. Leibler, and J. B. Stock. 1998. Response regulator output in bacterial chemotaxis. *EMBO J.* **17**:4238-4248.

3. **Amsler, C. D., M. Cho, and P. Matsumura.** 1993. Multiple factors underlying the maximum motility of *Escherichia coli* as cultures enter post-exponential growth. *J.Bacteriol.* **175**:6238-6244.
4. **Armitage, J. P.** 1992. Behavioral responses in bacteria. *Annu.Rev.Physiol* **54**:683-714.
5. **Armitage, J. P.** 1999. Bacterial tactic responses. *Adv.Microb.Physiol* **41**:229-289.
6. **Armitage, J. P. and R. M. Macnab.** 1987. Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J.Bacteriol.* **169**:514-518.
7. **Armitage, J. P., T. P. Pitta, M. A. Vigeant, H. L. Packer, and R. M. Ford.** 1999. Transformations in flagellar structure of *Rhodobacter sphaeroides* and possible relationship to changes in swimming speed. *J.Bacteriol.* **181**:4825-4833.
8. **Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. .Struhl.** 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons. New York.
9. **Ballado, T., L. Camarena, B. Gonzalez-Pedrajo, E. Silva-Herzog, and G. Dreyfus.** 2001. The hook gene (*flgE*) is expressed from the *flgBCDEF* operon in *Rhodobacter sphaeroides*: study of an *flgE* mutant. *J.Bacteriol.* **183**:1680-1687.

10. **Ballado, T., A. Campos, L. Camarena, and G. Dreyfus.** 1996. Flagellar genes from *Rhodobacter sphaeroides* are homologous to genes of the *fliF* operon of *Salmonella typhimurium* and to the type-III secretion system. *Gene* **170**:69-72.
11. **Barrios, H., Valderrama B., and E. Morett,** 1999. Compilation and analysis of σ^{54} -dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res* **27**:4305-4313.
12. **Bellolell, L., J. Prieto, L. Serrano, and M. Coll.** 1994. Magnesium binding to the bacterial chemotaxis protein CheY results in large conformational changes involving its functional surface. *J.Mol.Biol.* **238**:489-495.
13. **Berg, H. C. and D. A. Brown.** 1972. Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature* **239**:500-504.
14. **Bibikov, S. I., R. Biran, K. E. Rudd, and J. S. Parkinson.** 1997. A signal transducer for aerotaxis in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **179**:4075-4079.
15. **Borkovich, K. A., L. A. Alex, and M. I. Simon.** 1992. Attenuation of sensory receptor signaling by covalent modification. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**:6756-6760.
16. **Borkovich, K. A., N. Kaplan, J. F. Hess, and M. I. Simon.** 1989. Transmembrane signal transduction in bacterial chemotaxis involves ligand-

dependent activation of phosphate group transfer. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A
86:1208-1212.

17. **Bourret, R. B., J. Davagnino, and M. I. Simon.** 1993. The carboxy-terminal portion of the CheA kinase mediates regulation of autophosphorylation by transducer and CheW. J.Bacteriol. **175**:2097-2101.
18. **Bourret, R. B., S. K. Drake, S. A. Chervitz, M. I. Simon, and J. J. Falke.** 1993. Activation of the phosphosignaling protein CheY. II. Analysis of activated mutants by 19F NMR and protein engineering. J.Biol.Chem. **268**:13089-13096.
19. **Bourret, R. B., J. F. Hess, and M. I. Simon.** 1990. Conserved aspartate residues and phosphorylation in signal transduction by the chemotaxis protein CheY. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **87**:41-45.
20. **Bren, A. and M. Eisenbach.** 1998. The N terminus of the flagellar switch protein, FliM, is the binding domain for the chemotactic response regulator, CheY. J.Mol.Biol. **278**:507-514.
21. **Colland, F., J. C. Rain, P. Gounon, A. Labigne, P. Legrain, and H. De Reuse.** 2001. Identification of the *Helicobacter pylori* anti-sigma28 factor. Mol.Microbiol **41**:477-487.

22. **Davies, J., T. J. Donohue, and S. Kaplan.** 1988. Construction, characterization, and complementation of a *Puf* mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J.Bacteriol.* **170**:320-329.
23. **DePamphilis, M. and J. Adler.** 1971. Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **105**:384-395.
24. **Drake, S. K., R. B. Bourret, L. A. Luck, M. I. Simon, and J. J. Falke.** 1993. Activation of the phosphosignaling protein CheY. I. Analysis of the phosphorylated conformation by ¹⁹F NMR and protein engineering. *J.Biol.Chem.* **268**:13081-13088.
25. **Emerson, S. U., K. Tokuyasu, and M. I. Simon.** 1970. Bacterial flagella: polarity of elongation. *Science* **169**:190-192.
26. **Fan, F., K. Ohnishi, N. R. Francis, and R. M. Macnab.** 1997. The FliP and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*, putative components of the type III flagellar export apparatus, are located in the flagellar basal body. *Mol.Microbiol* **26**:1035-1046.
27. **Francis, N. R., G. E. Sosinsky, D. Thomas, and D. J. DeRosier.** 1994. Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J.Mol.Biol.* **235**:1261-1270.

28. Garcia, N., A. Campos, A. Osorio, S. Poggio, B. Gonzalez-Pedrajo, L. Camarena, and G. Dreyfus. 1998. The flagellar switch genes *fliM* and *fliN* of *Rhodobacter sphaeroides* are contained in a large flagellar gene cluster. J Bacteriol. **180**:3978-3982.
29. Gegner, J. A., D. R. Graham, A. F. Roth, and F. W. Dahlquist. 1992. Assembly of an MCP receptor, CheW, and kinase CheA complex in the bacterial chemotaxis signal transduction pathway. Cell **70**:975-982.
30. Gonzalez-Pedrajo, B., T. Ballado, A. Campos, R. E. Sockett, L. Camarena, and G. Dreyfus. 1997. Structural and genetic analysis of a mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 deficient in hook length control. J Bacteriol. **179**:6581-6588.
31. Hamblin, P. A., B. A. Maguire, R. N. Grishanin, and J. P. Armitage. 1997. Evidence for two chemosensory pathways in *Rhodobacter sphaeroides*. Mol.Microbiol **26**:1083-1096.
32. Harrison, D. M., J. Skidmore, J. P. Armitage, and J. R. Maddock. 1999. Localization and environmental regulation of MCP-like proteins in *Rhodobacter sphaeroides*. Mol.Microbiol **31**:885-892.
33. Hess, J. F., R. B. Bourret, K. Oosawa, P. Matsumura, and M. I. Simon. 1988. Protein phosphorylation and bacterial chemotaxis. Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol. **53 Pt 1**:41-48.

34. Hess, J. F., R. B. Bourret, and M. I. Simon. 1988. Histidine phosphorylation and phosphoryl group transfer in bacterial chemotaxis. *Nature* **336**:139-143.
35. Hess, J. F., K. Oosawa, N. Kaplan, and M. I. Simon. 1988. Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. *Cell* **53**:79-87.
36. Hess, J. F., K. Oosawa, P. Matsumura, and M. I. Simon. 1987. Protein phosphorylation is involved in bacterial chemotaxis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**:7609-7613.
37. Homma, M., Y. Komeda, T. Iino, and R. M. Macnab. 1987. The *flaF* gene product of *Salmonella typhimurium* is a flagellar basal body component with a signal peptide for export. *J.Bacteriol.* **169**:1493-1498.
38. Hughes, K. T., K. L. Gillen, M. J. Semon, and J. E. Karlinsey. 1993. Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* **262**:1277-1280.
39. Ide, N., T. Ikebe, and K. Kutsukake. 1999. Reevaluation of the promoter structure of the class 3 flagellar operons of *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Genes Genet.Syst.* **74**:113-116.
40. Iino, T. 1969. Polarity of flagellar growth in *Salmonella*. *J.Gen.Microbiol* **56**:227-239.

41. Ingham, C. J. and J. P. Armitage. 1987. Involvement of transport in *Rhodobacter sphaeroides* chemotaxis. *J. Bacteriol.* **169**:5801-5807.
42. Jacobs, M. H., H. T. van der B. Tolner, A. J. Driessen, and W. N. Konings. 1995. Expression of the *glpP* gene of *Escherichia coli* in a glutamate transport-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides* restores chemotaxis to glutamate. *Mol. Microbiol.* **18**:641-647.
43. Jefferson, R. A., S. M. Burgess, and D. Hirsh. 1986. β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:8447-8451.
44. Jeziore-Sassoon, Y., P. A. Hamblin, C. A. Bootle-Wilbraham, P. S. Poole, and J. P. Armitage. 1998. Metabolism is required for chemotaxis to sugars in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology* **144** (Pt 1):229-239.
45. Jones, C. J., M. Homma, and R. M. Macnab. 1989. L-, P-, and M-ring proteins of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*: gene sequences and deduced protein sequences. *J. Bacteriol.* **171**:3890-3900.
46. Jones, C. J., R. M. Macnab, H. Okino, and S. Aizawa. 1990. Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **212**:377-387.

47. Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* 70:191-197.
48. Khan, I. H., T. S. Reese, and S. Khan. 1992. The cytoplasmic component of the bacterial flagellar motor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:5956-5960.
49. Khan, S. and R. M. Macnab. 1980. Proton chemical potential, proton electrical potential and bacterial motility. *J.Mol.Biol*, 138:599-614.
50. Kihara, M., T. Minamino, S. Yamaguchi, and R. M. Macnab. 2001. Intergenic suppression between the flagellar MS ring protein FliF of *Salmonella* and FlhA, a membrane component of its export apparatus. *J.Bacteriol.* 183:1655-1662.
51. Ko, M. and C. Park. 2000. H-NS-Dependent regulation of flagellar synthesis is mediated by a LysR family protein. *J.Bacteriol.* 182:4670-4672.
52. Komeda, Y. 1982. Fusions of flagellar operons to lactose genes on a mu lac bacteriophage. *J.Bacteriol.* 150:16-26.
53. Komeda, Y., H. Suzuki, J. I. Ishidsu, and T. Iino. 1976. The role of cAMP in flagellation of *Salmonella typhimurium*. *Mol.Gen.Genet.* 142:289-298.

54. **Kort, R., W. Crielaard, J. L. Spudich, and K. J. Hellingwerf.** 2000. Color-sensitive motility and methanol release responses in *Rhodobacter sphaeroides*. *J.Bacteriol.* **182**:3017-3021.
55. **Krikos, A., N. Mutoh, A. Boyd, and M. I. Simon.** 1983. Sensory transducers of *E. coli* are composed of discrete structural and functional domains. *Cell* **33**:615-622.
56. **Kubori, T., S. Yamaguchi, and S. Aizawa.** 1997. Assembly of the switch complex onto the MS ring complex of *Salmonella typhimurium* does not require any other flagellar proteins. *J.Bacteriol.* **179**:813-817.
57. **Kutsukake, K.** 1994. Excretion of the anti-sigma factor through a flagellar substructure couples flagellar gene expression with flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen.Genet.* **243**:605-612.
58. **Kutsukake, K. and T. Iino.** 1994. Role of the FlhA-FlgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* **176**:3598-3605.
59. **Kutsukake, K., S. Iyoda, K. Ohnishi, and T. Iino.** 1994. Genetic and molecular analyses of the interaction between the flagellum-specific sigma and anti-sigma factors in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J.* **13**:4568-4576.

60. **Larsen, S. H., R. W. Reader, E. N. Kort, W. W. Tso, and J. Adler.** 1974. Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in *Escherichia coli*. *Nature* **249**:74-77.
61. **Lukat, G. S., B. H. Lee, J. M. Mottonen, A. M. Stock, and J. B. Stock.** 1991. Roles of the highly conserved aspartate and lysine residues in the response regulator of bacterial chemotaxis. *J.Biol.Chem.* **266**:8348-8354.
62. **Lukat, G. S., W. R. McCleary, A. M. Stock, and J. B. Stock.** 1992. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**:718-722.
63. **Lukat, G. S., A. M. Stock, and J. B. Stock.** 1990. Divalent metal ion binding to the CheY protein and its significance to phosphotransfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry* **29**:5436-5442.
64. **Lynch, B. A. and D. E. Koshland, Jr.** 1991. Disulfide cross-linking studies of the transmembrane regions of the aspartate sensory receptor of *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**:10402-10406.
65. **Macnab, R. M.** 1992. Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu.Rev.Genet.* **26**:131-158.

66. Maddock, J. R. and L. Shapiro. 1993. Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science* **259**:1717-1723.
67. Maniatis T.Sambrook J,Fritsch E.F, 1989. In *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
68. Matsumura, P., J. J. Rydel, R. Linzmeier, and D. Vacante, 1984. Overexpression and sequence of the *Escherichia coli cheY* gene and biochemical activities of the CheY protein. *J.Bacteriol.* **160**:36-41.
69. Milligan, D. L. and D. E. Koshland, Jr. 1988. Site-directed cross-linking. Establishing the dimeric structure of the aspartate receptor of bacterial chemotaxis. *J.Biol.Chem.* **263**:6268-6275.
70. Morett, E. and L. Segovia. 1993. The sigma 54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J.Bacteriol.* **175**:6067-6074.
71. Morgan, D. G., J. W. Baumgartner, and G. L. Hazelbauer. 1993. Proteins antigenically related to methyl-accepting chemotaxis proteins of *Escherichia coli* detected in a wide range of bacterial species. *J.Bacteriol.* **175**:133-140.
72. Muller, V., C. J. Jones, I. Kawagishi, S. Aizawa, and R. M. Macnab. 1992. Characterization of the *JliE* genes of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*

and identification of the FliE protein as a component of the flagellar hook-basal body complex. *J.Bacteriol.* **174**:2298-2304.

73. **Needham, J. V., T. Y. Chen, and J. J. Falke.** 1993. Novel ion specificity of a carboxylate cluster Mg(II) binding site: strong charge selectivity and weak size selectivity. *Biochemistry* **32**:3363-3367.
74. **Ninfa, E. G., A. Stock, S. Mowbray, and J. Stock.** 1991. Reconstitution of the bacterial chemotaxis signal transduction system from purified components. *J.Biol.Chem.* **266**:9764-9770.
75. **Ohnishi, K., K. Kutsukake, H. Suzuki, and T. Lino.** 1992. A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*: an antisigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, sigma F. *Mol.Microbiol* **6**:3149-3157.
76. **Packer, H. L. and J. P. Armitage.** 1994. The chemokinetic and chemotactic behavior of *Rhodobacter sphaeroides*: two independent responses. *J.Bacteriol.* **176**:206-212.
77. **Parkinson, J. S. and E. C. Kofoid.** 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu.Rev.Genet.* **26**:71-112.

78. Poggio, S., C. Aguilar, A. Osorio, B. Gonzalez-Pedrajo, G. Dreyfus, and L. Camarena. 2000. sigma(54) Promoters control expression of genes encoding the hook and basal body complex in *Rhodobacter sphaeroides*. J.Bacteriol. **182**:5787-5792.
79. Poole, P. S. and J. P. Armitage. 1988. Motility response of *Rhodobacter sphaeroides* to chemotactic stimulation, J.Bacteriol. **170**:5673-5679.
80. Poole, P. S. and J. P. Armitage. 1989. Role of metabolism in the chemotactic response of *Rhodobacter sphaeroides* to ammonia, J.Bacteriol. **171**:2900-2902.
81. Poole, P. S., M. J. Smith, and J. P. Armitage. 1993. Chemotactic signalling in *Rhodobacter sphaeroides* requires metabolism of attractants, J.Bacteriol. **175**:291-294.
82. Pruss, B. M., D. Markovic, and P. Matsumura. 1997. The *Escherichia coli* flagellar transcriptional activator *flhD* regulates cell division through induction of the acid response gene *cadA*. J.Bacteriol. **179**:3818-3821.
83. Pruss, B. M. and P. Matsumura. 1996. A regulator of the flagellar regulon of *Escherichia coli*, *flhD*, also affects cell division. J.Bacteriol. **178**:668-674.
84. Rebbapragada, A., M. S. Johnson, G. P. Harding, A. J. Zuccarelli, H. M. Fletcher, I. B. Zhulin, and B. L. Taylor. 1997. The Aer protein and the serine

chemoreceptor Tsr independently sense intracellular energy levels and transduce oxygen, redox, and energy signals for *Escherichia coli* behavior. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **94**:10541-10546.

85. Repik, A., A. Rebbapragada, M. S. Johnson, J. O. Haznedar, I. B. Zhulin, and B. L. Taylor. 2000. PAS domain residues involved in signal transduction by the Aer redox sensor of *Escherichia coli*. Mol.Microbiol **36**:806-816.
86. Sanders, D. A., B. L. Gillece-Castro, A. M. Stock, A. L. Burlingame, and D. E. Koshland, Jr. 1989. Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. J.Biol.Chem. **264**:21770-21778.
87. Saraste, M., P. R. Sibbald, and A. Wittinghofer. 1990. The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. Trends Biochem.Sci. **15**:430-434.
88. Scharf, B. E., K. A. Fahrner, L. Turner, and H. C. Berg. 1998. Control of direction of flagellar rotation in bacterial chemotaxis. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **95**:201-206.
89. Shah, D. S., T. Pechinec, S. M. Stevens, S. I. Aizawa, and R. E. Sockett. 2000. The flagellar filament of *Rhodobacter sphaeroides*: pH-induced polymorphic transitions and analysis of the *fliC* gene. J.Bacteriol. **182**:5218-5224.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

90. **Shah, D. S., S. L. Porter, D. C. Harris, G. H. Wadhams, P. A. Hamblin, and J. P. Armitage.** 2000. Identification of a fourth *cheY* gene in *Rhodobacter sphaeroides* and interspecies interaction within the bacterial chemotaxis signal transduction pathway. *Mol. Microbiol.* **35**:101-112.
91. **Shi, W., C. Li, C. J. Louise, and J. Adler.** 1993. Mechanism of adverse conditions causing lack of flagella in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:2236-2240.
92. **Shizuta, Y., J. A. Beavo, P. J. Bechtel, F. Hofmann, and E. G. Krebs.** 1975. Reversibility of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase reactions. *J. Biol. Chem.* **250**:6891-6896.
93. **Sistrom, W. R.** 1962. The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *J. Gen. Microbiol.* **28**:607-616.
94. **Sistrom, W. R.** 1977. Transfer of chromosomal genes mediated by plasmid r68.45 in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **131**:526-532.
95. **Sockett, R. E., J. P. Armitage, and M. C. Evans.** 1987. Methylation-independent and methylation-dependent chemotaxis in *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **169**:5808-5814.

96. **Sockett, R. E., J. C. A. Foster, and J. P. Armitage.** 1990. Molecular Biology of the *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. FEMS Symp. 53:473-479.
97. **Springer, W. R. and D. E. Koshland, Jr.** 1977. Identification of a protein methyltransferase as the *cheR* gene product in the bacterial sensing system. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 74:533-537.
98. **Stock J.B.and Surette M.G.** 1996. Chemotaxis, p. 1103-1129. In F. C. Neidhart, R. I. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
99. **Stock, A., D. E. Koshland, Jr., and J. Stock.** 1985. Homologies between the *Salmonella typhimurium* CheY protein and proteins involved in the regulation of chemotaxis, membrane protein synthesis, and sporulation. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 82:7989-7993.
100. **Stock, A. M., E. Martinez-Hackert, B. F. Rasmussen, A. H. West, J. B. Stock, D. Ringe, and G. A. Petsko.** 1993. Structure of the Mg(2+)-bound form of CheY and mechanism of phosphoryl transfer in bacterial chemotaxis. Biochemistry 32:13375-13380.

101. **Stock, J. B.** 1995. Two-component signal transduction systems: structure-function relationships and mechanisms of catalysis., p. 25-51. *In* Hoch J.A. and Silhavy T.J. (ed.), Two-Component Signal Transduction. ASM Press, Washington D.C.
102. **Stock, J. B. and D. E. Koshland, Jr.** 1978. A protein methyltransferase involved in bacterial sensing. *Proc.Natl.Acad.Sci,U.S.A* 75:3659-3663.
103. **Swanson, R. V., S. C. Schuster, and M. I. Simon.** 1993. Expression of CheA fragments which define domains encoding kinase, phosphotransfer, and CheY binding activities. *Biochemistry* 32:7623-7629.
104. **Tawa, P. and R. C. Stewart.** 1994. Kinetics of CheA autophosphorylation and dephosphorylation reactions. *Biochemistry* 33:7917-7924.
105. **Taylor, B. L., I. B. Zhulin, and M. S. Johnson.** 1999. Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria. *Annu.Rev.Microbiol* 53:103-128.
106. **Toker, A. S., M. Kihara, and R. M. Macnab.** 1996. Deletion analysis of the FliM flagellar switch protein of *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* 178:7069-7079.
107. **Volz, K.** 1993. Structural conservation in the CheY superfamily. *Biochemistry* 32:11741-11753.

108. **Volz, K. and P. Matsumura.** 1991. Crystal structure of *Escherichia coli* CheY refined at 1.7-A resolution. *J.Biol.Chem.* **266**:15511-15519.
109. **Ward, M. J., A. W. Bell, P. A. Hamblin, H. L. Packer, and J. P. Armitage.** 1995. Identification of a chemotaxis operon with two *cheY* genes in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol.Microbiol* **17**:357-366.
110. **Ward, M. J., D. M. Harrison, M. J. Ebner, and J. P. Armitage.** 1995. Identification of a methyl-accepting chemotaxis protein in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol.Microbiol* **18**:115-121.
111. **Weigel, N., M. A. Kukuruzinska, A. Nakazawa, E. B. Waygood, and S. Roseman.** 1982. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Phosphoryl transfer reactions catalyzed by enzyme I of *Salmonella typhimurium*. *J.Biol.Chem.* **257**:14477-14491.
112. **Welch, M., K. Oosawa, S. Aizawa, and M. Eisenbach.** 1993. Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**:8787-8791.
113. **Wu, J. and A. Newton.** 1997. Regulation of the *Caulobacter* flagellar gene hierarchy; not just for motility. *Mol Microbiol* **24**:239.

114, Wylie, D., A. Stock, C. Y. Wong, and J. Stock. 1988. Sensory transduction in bacterial chemotaxis involves phosphotransfer between Che proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151**:891-896.