

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Caracterización de la Jerarquía flagelar de *Rhodobacter
sphaeroides*

Tesis que para obtener el título de Doctor en Ciencias Biomédicas presenta:

Sebastián Poggio Ghilarducci

Tutor de Tesis: Dra. Laura Camarena Mejía

Comité tutorial:

Dra. Carmen Gómez Eichelmann

Dra. Laura Camarena Mejía

Dr. David Romero Camarena

Jurado:

Presidente: Dra. Alicia Gonzáles Manjarrez

Secretaria: Dra. Laura Camarena Mejía

Vocal: Dra. Gloria Soberón Chávez

Vocal: Dr. Mario Soberón Chávez

Vocal: Dr. Dimitris Georgellis

Mexico D.F. 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos:

Durante el desarrollo de este trabajo se recibió el apoyo técnico de Aurora Osorio, Teresa Ballado y Javier de la Mora.

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la doctora Laura Camarena en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la realización de este trabajo se recibió el apoyo del CONACyT y de la DGAPA.

La realización de este trabajo se recibió el apoyo de una beca otorgada por la DGEP.

Indice

Resumen	1
Introducción	2-37
El flagelo en las eubacterias	2-6
Morfogénesis flagelar	7-10
El sistema de secreción flagelar	11-17
Control de la quimiotaxis	17-20
Regulación de la expresión genética del sistema flagelar	17-26
El factor σ^{54} y sus activadores	27-33
Antecedentes particulares	27-36
Hipótesis y objetivos	37
Resultados	38-55
Identificación las posibles EBPs codificadas en el genoma de <i>R. sphaeroides</i>	38-40
Aislamiento y caracterización de cepas mutantes en <i>fleQ</i> y <i>torf (fleT)</i>	40-43
Actividad transcripcional de los promotores flagelares en las Cepas SP12 (<i>fleQΔ::kan</i>), SP13 (<i>fleTΔ::aadA</i>) y SP15 (<i>fliAΔ::kan</i>).	43-48
Mapeo del sitio de inicio de la transcripción de promotores pertenecientes a las Clases I, II y IV	48-52
Purificación y determinación de la actividad enzimática de las proteínas FleT y FleQ	52-53
Unión de las proteínas FleT y FleQ a la región regulatoria del operón <i>fleT</i>	53-55
Discusión	56-65
Clase I	57-58
ClaseII y Clase III	58-59
Clase IV	60
Regulación de la jerarquía por FleQ y FleT	60-62
Conclusiones	62-63
Perspectivas	63-64
Contribuciones	64-65
Material y Metodos	65-70
Bibliografía	71-86
Anexos	87-130

Anexo I	87-101
Anexo II	102-112
Anexo III	113-123
Anexo IV	124-130

Resumen

En las bacterias la expresión de los genes flagelares sigue un patrón jerárquico. En *Rhodobacter sphaeroides* los genes flagelares que codifican para las proteínas del gancho y del cuerpo basal son expresados a partir de promotores dependientes del factor sigma-54. Este tipo de promotores son regulados por activadores transcripcionales que pertenecen a la familia de las proteínas aumentadoras (EBPs por sus siglas en ingles "enhancer binding proteins"). Se buscaron las posibles EBPs codificadas en el genoma de *Rhodobacter sphaeroides* y se mutagenizaron dos marcos de lectura abiertos (ORFs por sus siglas en ingles "open reading frames"), *fleQ* y *fleT*; los cuales se encuentran en la vecindad de genes flagelares. Las mutantes resultantes fueron no-motiles y solo pudieron ser complementadas por la copia silvestre del gen mutado. Fusiones transcripcionales mostraron que todos los promotores flagelares dependientes de sigma-54, con la excepción del promotor de *fleT*, requirieron de ambos activadores transcripcionales para su expresión. Interesantemente, la transcripción del operón de *fleT* es dependiente únicamente de FleQ, mientras que FleT tiene un efecto negativo sobre la transcripción del operón al que pertenece. Ambos activadores fueron capaces de hidrolizar ATP y de promover la transcripción a bajos niveles de algunos promotores flagelares. Ensayos de Cambio de Movilidad Eletroforetica sugieren que únicamente FleQ interactúa directamente con el DNA. Una jerarquía transcripcional de cuatro niveles y un mecanismo regulatorio basdo en la concentracion intracelular de ambos activadores y en afinidades diferenciales para los distintos aumentadores ("enhancers") son propuestos.

Introducción

El flagelo en las eubacterias

Las bacterias nadan utilizando un flagelo rotatorio constituido por aproximadamente 20 proteínas estructurales; en *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium otras 30 proteínas son indispensables para su ensamblaje y para el control de la expresión de los genes que constituyen el regulón flagelar (4, 96). Tradicionalmente el flagelo ha sido dividido en tres partes: el filamento, el gancho y el cuerpo basal (Fig. 1). El filamento y el gancho son estructuras extracelulares y están constituidas por múltiples subunidades de flagelina (FliC) y por la proteína del gancho FlgE, respectivamente. El filamento tiene aproximadamente 20 nm de ancho y es de forma helicoidal, parecido a un sacacorchos. Las características geométricas (amplitud y frecuencia) de la hélice, varían dependiendo de la densidad del medio y de la velocidad de rotación del flagelo. La longitud del filamento no es regulada estrictamente y comúnmente mide varias veces el largo del cuerpo celular. El filamento funciona como propela impulsando a la bacteria en un medio líquido o semisólido (17, 96). En la punta del filamento se encuentra un pentámero de la proteína de coronamiento FliD, esta proteína permite la integración de nuevas subunidades de flagelina al filamento (64, 97, 192). Proteínas con funciones similares a FliD intervienen en la formación del gancho (83, 124) y de la estructura denominada barra o eje (la cual forma parte del cuerpo basal) (52); en consecuencia, el filamento, el gancho y el eje crecen al incorporar nuevas subunidades al extremo distal de la estructura.

El gancho y el filamento se unen por medio de dos anillos formados por las proteínas FlgK y FlgL (63, 64). Estas proteínas sirven como adaptadoras entre las proteínas del filamento y el gancho. A diferencia del filamento, la longitud del gancho es constante. Aunque se han observado diferencias entre las diversas especies bacterianas, en *E. coli* y *Salmonella* su tamaño es de

aproximadamente 55 +/- 6nm (54). El mecanismo molecular que determina la longitud del gancho es a la fecha desconocido; sin embargo, existe evidencia de que la proteína FliK juega un papel fundamental en dicho proceso (96, 113).

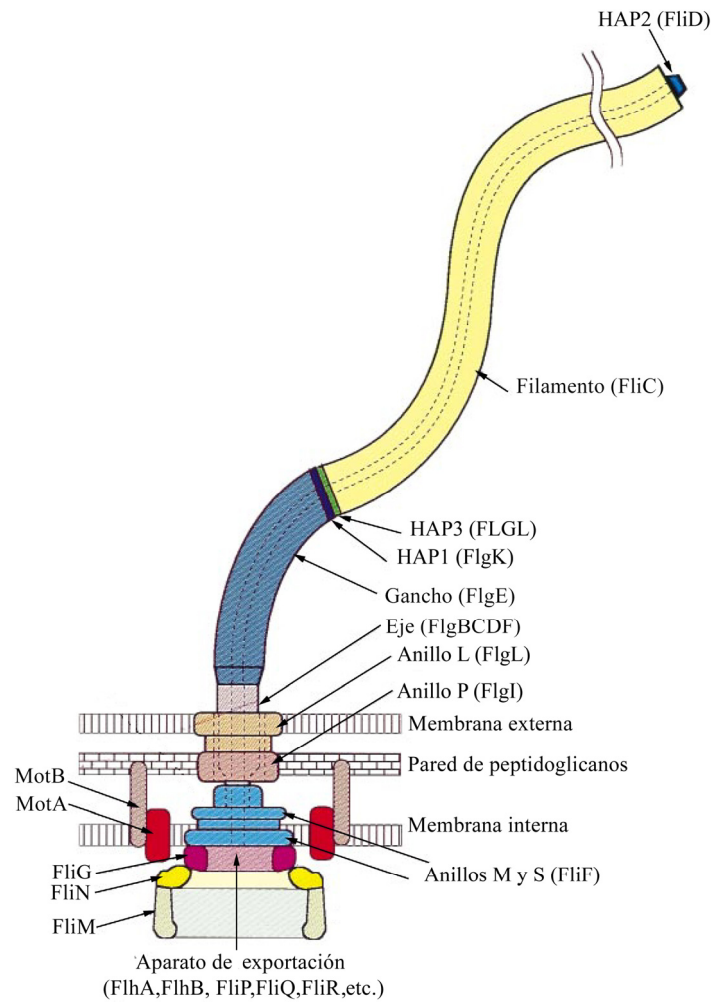


Fig. 1 Esquema del cuerpo basal, gancho y filamento del flagelo de bacterias. Las flechas indican los principales componentes estructurales y el nombre de las proteínas que los forman.

El gancho se une al motor flagelar mediante otro filamento al que se le denomina barra o eje, éste se encuentra constituido por 4 proteínas diferentes cuyo arreglo no ha sido completamente caracterizado hasta el momento, pero que por su estabilidad y posición con

respecto a la membrana interna puede ser dividido en dos partes, el eje proximal y el distal (56, 58, 83, 116, 125). El eje distal está constituido exclusivamente por la proteína FlgG, mientras que el eje proximal se compone por las proteínas FlgB, FlgC y FlgF. La localización de estas proteínas dentro del eje se desconoce con excepción de FlgB la cual aparentemente se ubica al inicio de esta estructura. El eje cruza la membrana externa a través del anillo L, y la pared de péptidoglicanos a través del anillo P; estos anillos están constituido por subunidades de las proteínas FlgI y FlgL, respectivamente. El papel de estos anillos es el de servir como estabilizadores para el giro de la barra, además de formar un canal para el paso de ésta (3, 35, 71). Finalmente, la barra se une al anillo MS, localizado en la membrana interna (55, 178). El anillo MS, está formado por aproximadamente 26 subunidades de la proteína FliF (73). Debido a las diferencias estructurales entre el anillo MS y la barra, se piensa que la proteína FliE forma un anillo sobre la cara periplásmica del anillo MS, el cual permite acoplar el anillo MS de simetría anular, con el eje de simetría helicoidal. Se ha demostrado la interacción de las proteínas FliE con FlgB, indicando que esta última, es la primera proteína del eje proximal (111, 116).

Las proteínas estructurales del flagelo que son transportadas por el sistema de secreción flagelar se les denomina proteínas axiales y éstas incluyen a las proteínas del eje, del gancho, las proteínas adaptadoras FlgK y FlgL, y las proteínas FliD y FliC. Por otro lado, desde el punto de vista estructural, el eje, los anillos L y P y el anillo MS constituyen el cuerpo basal.

Sobre la cara citoplasmática del anillo MS se ensamblan tres proteínas (FliG, FliN y FliM) las cuales forman el anillo C (76, 190). El anillo C, está estrechamente relacionado con la generación y el control del movimiento flagelar, aunque se ha propuesto que este anillo podría estar involucrado también en la exportación de las proteínas flagelares (48, 60).

Rodeando al anillo MS se encuentran complejos de las proteínas transmembranales MotA y MotB (77, 146), en una estequiometría 4:2 respectivamente en cada complejo (80, 148). Estas proteínas representan el estator (parte exenta de rotación) del motor flagelar. La proteína MotA cruza cuatro veces la membrana interna (19, 193), mientras que MotB tiene una sola hélice transmembranal y posee en su extremo carboxilo terminal, un dominio de unión a la pared de peptidoglicanos (29, 159). Estas proteínas forman un canal de protones y acoplan el flujo de los mismos a la rotación. A la fecha se desconoce el mecanismo involucrado en la conversión de la fuerza generada por el flujo de protones en la fuerza mecánica requerida para la rotación del motor. El modelo mas reciente, postula un mecanismo de "power stroke", en el cual se propone que los cambios conformacionales en el estator generados por la asociación/disociación de protones en el residuo Asp32 de MotB, actúan sobre el motor para dirigir la rotación. La evidencia experimental sugiere que los residuos cargados de FliG localizados en la interfase con el estator, contribuyen a la generación del torque (17, 24).

En bacterias peritricas (Fig. 2) como *E. coli* y *Salmonella*, la rotación de los flagelos en el sentido contrario de las manecillas del reloj (CCW), produce que los filamentos se entrelacen en uno de los extremos del cuerpo celular, el movimiento coordinado de los filamentos en dicha trenza impulsa a la bacteria en una trayectoria lineal. De forma estocástica, cierto número de flagelos puede cambiar el sentido de la rotación, lo cual produce la desorganización de la trenza y provoca en la bacteria un tipo de movimiento similar al bamboleo el cual no involucra desplazamiento lineal; después de un fracción de segundo, los flagelos vuelven a rotar en el sentido contrario a las manecillas del reloj (CCW), y la bacteria reinicia su desplazamiento en una nueva dirección elegida al azar (Fig. 3A) (13, 177). Asimismo, se ha considerado que esta forma de movimiento impone una selección sobre el tamaño del gancho, así como en su capacidad

elástica y geometría (la cual muestra cierto grado de curvatura), ya que, gracias a estas propiedades, los flagelos pueden formar la trenza de filamentos. La formación de dicha trenza permite trasladar la fuerza generada por la rotación del flagelo desde el plano perpendicular del cuerpo de la bacteria hacia el eje paralelo (96).

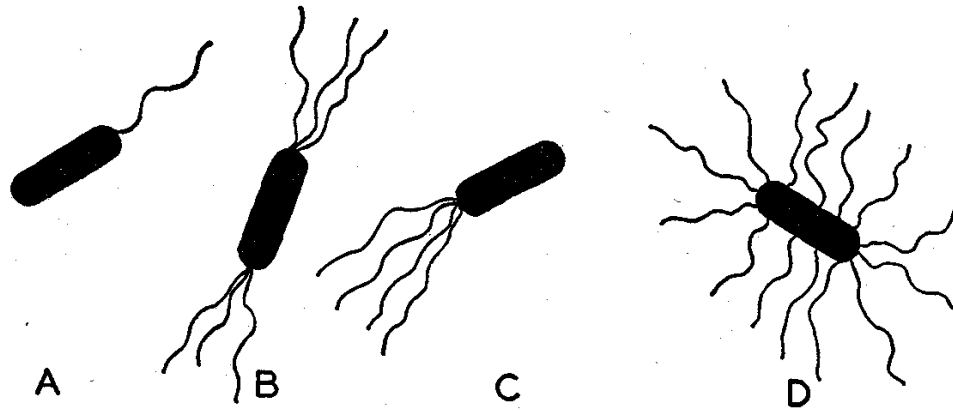


Fig. 2 Patrones de localización de flagelos en bacterias. A, bacteria monotrica; B, bacteria anfitrica; C, bacteria lofotrica; D, bacteria peritrica.

En presencia de un estímulo atrayente, el sistema quimiotáctico influye sobre la duración y frecuencia de los eventos de desplazamiento y reorientación, de este modo, la bacteria puede dirigirse hacia condiciones favorables de crecimiento (Fig. 3B).

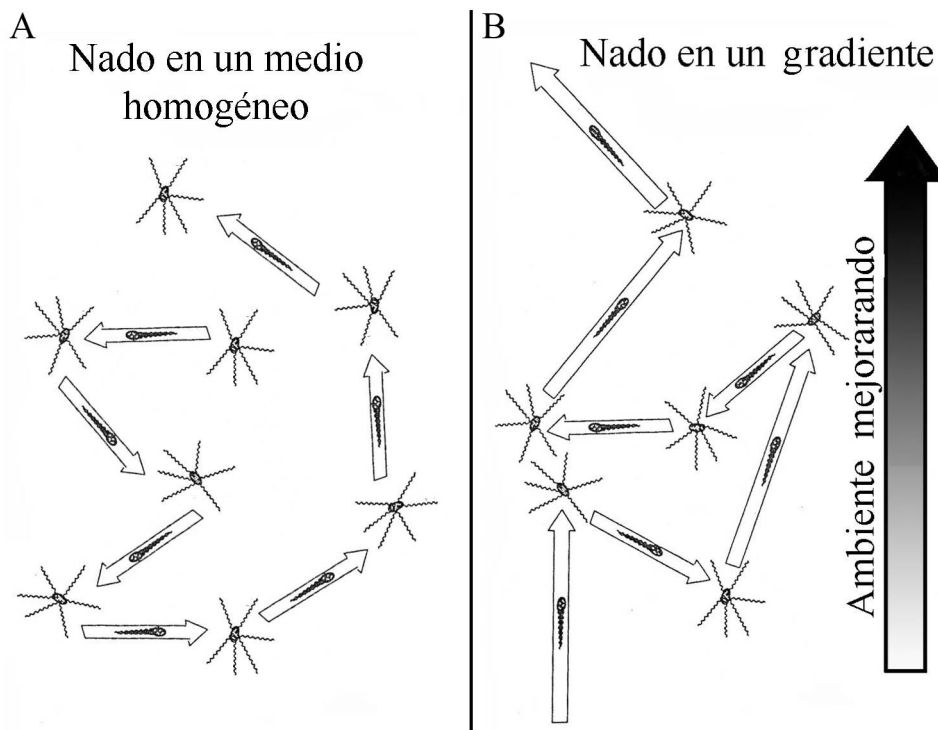


Fig. 3 Patrón de desplazamiento de una bacteria nadando.

Morfogénesis flagelar

La formación del flagelo inicia con la inserción en la membrana de las subunidades de la proteína FliF, lo que da lugar a la formación del anillo MS (Fig. 4)(75). Ha sido postulado que al centro del anillo MS se forma el aparato de exportación, el cual es indispensable para la secreción de las proteínas axiales, así como de otros polipéptidos involucrados en la formación del flagelo (40, 167). Dada la localización del aparato de exportación (con respecto al anillo MS) se ha propuesto que las subunidades del anillo MS se ensamblan alrededor de las proteínas transmembranales del aparato de secreción. Sin embargo, dado que el anillo MS puede formarse en ausencia de cualquier otra proteína flagelar, es posible que las proteínas del aparato de

secreción se inserten directamente en el parche de membrana ubicado en el centro del anillo MS, alternativamente, éstas pueden integrarse a la membrana interna en puntos al azar y ser posteriormente capturadas en los sitios de formación del anillo MS. Estos primeros eventos de la morfogénesis flagelar no han sido estudiados en detalle y la evidencia genética indirecta sugiere una interdependencia en la formación del anillo MS y el aparato de secreción (96). Se piensa que en *E. coli* y *Salmonella* después del anillo MS la siguiente estructura en formarse es el anillo C, dado que mutaciones en los genes que codifican para los componentes del anillo C dan lugar a células sin flagelo. Implicando al anillo C en el proceso de exportación directa o indirectamente (153, 170, 180). La evidencia experimental más reciente sugiere que FliN pudiera ser parte del aparato de exportación; sin embargo, no puede descartarse que el anillo C participe únicamente en la estabilización de dicho aparato.

Dado que FliG interacciona con FliF, la formación del anillo C inicia con la asociación de FliG al anillo MS (167, 172), la asociación de FliM y FliN depende de la presencia de FliG (84).

Una vez que el aparato de exportación es funcional (ver adelante), la primera proteína que se secreta al espacio periplásmico es FliE (53), esta proteína es indispensable para la formación del eje (169). A diferencia de otras proteínas axiales, la exportación de FliE es necesaria para la exportación del resto de los componentes del cuerpo basal (106) (111). Se ha considerado que la interacción de FliE con FliF provoca un cambio estructural en el poro del anillo MS, que permite el paso del resto de los substratos de exportación (111).

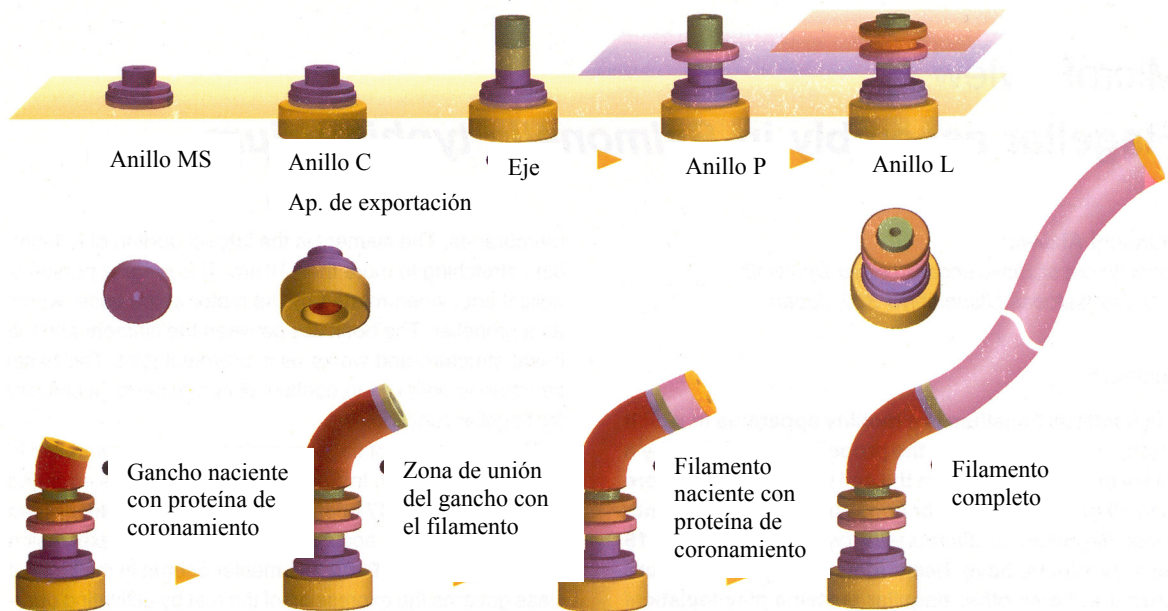


Fig. 4 Morfogénesis flagelar. Se indican los pasos principales de la formación del flagelo.

La formación del eje requiere de la actividad de la proteína FlgJ, la cual se ha demostrado interacciona con las cuatro proteínas que componen dicha estructura. Ha sido propuesto que FlgJ podría ejercer su acción análogamente a la proteína de coronamiento FliD (52). En algunas bacterias, FlgJ además de contribuir a ensamblar las subunidades del eje, tiene un dominio con actividad de muramidasa. Se cree que este dominio es el responsable de degradar la pared de péptidoglicanos para permitir el paso del eje (119). En algunas otras bacterias, los dos dominios de FlgJ están separados en polipéptidos independientes y se desconoce cómo se regula y cómo se localiza la muramidasa en el sitio de crecimiento del eje.

Los anillos L y P sólo se forman en presencia del eje, aparentemente las proteínas que conforman dichas estructuras (i.e. FlgI y FlgH, respectivamente), permanecen monoméricas en sus respectivos sitios de inserción, esto es, FlgI en la pared de peptidoglicanos asociada a su chaperona específica FlgA (118), mientras la lipoproteína FlgH se ubica en la membrana externa.

La presencia del eje además de estimular la formación de los anillos L y P, induce la interacción entre las subunidades de estos anillos, entre las cuales se forman enlaces covalentes. En contraste al resto de las proteínas estructurales del flagelo, las proteínas FlgI y FlgH son exportadas por el sistema general de exportación, dependiente de SecA (57, 59, 71, 72).

El eje se extiende hasta la superficie de la célula, en donde comienza a formarse el gancho. Para la formación del gancho, la proteína de coronamiento del eje (FlgJ) tiene que ser reemplazada por la proteína de coronamiento del gancho, denominada FlgD. Posteriormente, las subunidades del gancho (FlgE) son exportadas por el aparato de secreción flagelar a la luz del eje, donde difunden hasta la punta de la estructura en crecimiento; en este sitio, la proteína FlgD permite el correcto ensamblaje de las subunidades del gancho (124).

El gancho crece hasta su tamaño promedio el cual es determinado por un mecanismo desconocido. Las proteínas FliK y FlhB parecen estar involucradas en este control ya que una mutación en *fliK* produce el fenotipo conocido como poliganchos, el cual consiste en la formación de ganchos varias veces más largos de lo normal sin formar filamentos (151, 168); mutantes puntuales secundarias en *flhB* obtenidas a partir de una cepa mutante en *fliK* pueden ensamblar filamentos sobre los poliganchos (54, 90, 185). A partir de estos resultados se propuso que FliK y FlhB están involucradas en cambiar la especificidad del aparato de exportación. En términos generales, se ha propuesto que las proteínas axiales involucradas en la formación del eje y del gancho pertenecen a la primera clase de secreción, mientras que las proteínas adaptadoras FlgK, FlgL; la proteína FliC (que forma el filamento), y la proteína de coronamiento, FlgD, pertenecen a una segunda clase que sólo puede ser exportada una vez que el gancho es terminado y el aparato de secreción cambia su especificidad (106).

El sistema de secreción flagelar

Como se mencionó en la sección anterior, el sistema de secreción es un complejo de varias proteínas, el cual probablemente se ubica en el centro del anillo MS. Dicho aparato de secreción exporta todas las proteínas flagelares axiales, con excepción de los anillos L y P (los cuales son transportados por el sistema general de secreción que es dependiente de la ATPasa denominada SecA (110).(71)

El aparato de exportación flagelar consta de proteínas solubles o asociadas periféricamente a la membrana, y de proteínas membranales (106). Entre las primeras se encuentran las proteínas FliI, FliH y FliJ. La proteína FliI en su extremo carboxilo terminal muestra cierto grado de similitud con la subunidad β de la FoF1 ATPasa (36, 180). La actividad ATPasa de FliI ha sido demostrada in vitro, y se sabe que cepas que expresan a la proteína FliI con cambios en los residuos involucrados en la hidrólisis de ATP, son incapaces de nadar debido a la ausencia de flagelo (39). Esta evidencia apoya la idea de que FliI proporciona la energía para la translocación de los substratos flagelares. Originalmente FliI fue clasificada como una proteína soluble citoplasmática. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que se asocia a la membrana interna, y que puede ser inducida a formar un complejo hexamérico en respuesta a la presencia de ATP o de vesículas de fosfolípidos. Dado que la formación del hexámero estimula la actividad enzimática, se ha considerado que este estado oligomérico puede ser fisiológicamente relevante, y por lo tanto FliI podría ser considerada como una proteína periférica de membrana interna (11, 30).

El dominio carboxilo de FliI es similar al dominio catalítico de la subunidad β de la F₁-ATPasa, mientras el dominio NH₂-terminal de FliI muestra dos regiones relevantes: aquella comprendida entre los aminoácidos 2-18, los cuales son indispensables para la interacción de esta proteína con la proteína FliH (11, 108), y la región que abarca los residuos 20-91, probablemente involucrados en la interacción con fosfolípidos aniónicos (2, 92); esta última región predice una estructura globular similar al barril β identificado en las subunidades catalíticas de la F₁ ATPasa. Dado que la región que precede al barril β en la subunidad α de la F₁-ATPasa contiene una α -hélice anfipática, la cual interactúa con la subunidad δ , se supone que los aminoácidos 2 al 18 de FliI, forman una hélice con dichas características. FliH muestra una estructura alargada, y es similar a la subunidad b de la F₁-ATPasa. Las características enunciadas anteriormente, han llevado a proponer que la proteína FliH es el estator de FliI (92). In vitro, la asociación de FliH y FliI provoca una reducción en la actividad ATPasa (108); sin embargo, la remoción de los últimos cinco residuos de FliH, provoca un aumento considerable de la actividad catalítica de FliI (47). Cepas mutantes en el gen *fliH* muestran una severa reducción en la capacidad de nado. Sin embargo, la sobreexpresión de FliI, o mutaciones secundarias en los genes *flhA* y *flhB* mejoran la capacidad de nado de la mutante en *fliH*; específicamente, éstas mutaciones supresoras que localizan en la región que codifica para el segmento citoplasmático anterior al primer cruce transmembranal, en FlhA y FlhB. Este hecho sugiere que FliI (o en la cepa silvestre, el complejo FliI-FliH) interacciona con estas proteínas, las cuales forman parte de los componentes membranales del aparato de exportación. Por otro lado, la sobre-expresión de FliI en la cepa mutante *fliH*, también mejora la capacidad de nado de la mutante, indicando que el efecto negativo de FliH sobre la actividad catalítica de FliI no juega un papel fisiológicamente relevante

in vivo. En conjunto estos resultados indican que FliH contribuye a la estabilidad del aparato de exportación, en especial de FliI, probablemente mejorando la interacción de sus componentes (104, 105).

La proteína FliJ es un componente soluble del aparato de exportación cuya función precisa es hasta la fecha desconocida. Mutaciones en el gen *fliJ* provocan un fenotipo Fla- (sin flagelo); sin embargo, la sobreexpresión de FliJ provoca una severa reducción en la capacidad de nado de la cepa silvestre, sugiriendo el posible secuestro de otras proteínas que interactúan con FliJ. La proteína FliJ se requiere para exportar los substratos tipo eje/gancho, así como los substratos que se ensamblan después del gancho (103). El hecho de que la proteína FliJ muestra características similares a las chaperonas (tamaño, punto isoelectrico ácido, y un alto contenido de alfa helices en su estructura secundaria) ha llevado a considerar que FliJ es una chaperona involucrada en la secreción de los substratos flagelares. En concordancia con esta idea, se ha observado que FliJ evita la agregación de las proteínas FliE y FlgG, cuando éstas son sobreexpresadas (103). Recientemente se determinó que las proteínas FliI, FliH y el extremo COOH-terminal de las proteínas FlhB y FlhA, interactúan con FliJ. Este resultado sugiere que FliJ puede asociarse con el aparato de exportación (43, 109).

Las proteínas FlhA, FlhB, FliR, FliO, FliP y FliQ, son los componentes membranales del aparato de exportación. FlhA tiene un peso de 75 kDa y su secuencia predice la existencia de ocho segmentos transmembranales. Se piensa que esta proteína interactúa directamente con el anillo MS, ya que algunas mutaciones puntuales en el gen *fliF*, incapaces de ensamblar flagelo, son suprimidas por mutaciones secundarias en *flhA* (78). Como se mencionó en los párrafos anteriores el extremo C-terminal de FlhA interactúa con los componentes solubles del sistema (109, 194); sin embargo, la función precisa de FlhA es a la fecha desconocida.

La proteína FlhB (42 kDa), participa en el proceso de cambio en la especificidad del aparato de exportación, el cual transloca inicialmente sustratos tipo eje/gancho, y posteriormente sustratos tipo flagelina, que incluye todas las proteínas que se ensamblan después del gancho (96). En este proceso la proteína FliK, la cual controla la longitud del gancho mediante un mecanismo desconocido, transmite a FlhB la señal que indica que el gancho ha alcanzado la longitud apropiada; en este punto, da inicio la secreción de los sustratos tipo flagelina (54, 90, 185). El cambio de la especificidad del aparato de exportación, está aparentemente relacionado con el corte proteolítico de la proteína FlhB, dentro del motivo de secuencia conservado TN!PTH (el símbolo “!” indica el sitio de procesamiento) (44). La expresión de FlhB en levaduras, ha permitido determinar que FlhB cataliza su propio procesamiento (41). La mutación N269A previene el corte de FlhB, y las cepas que expresan esta versión de la proteína presentan fenotipo poligancho, indicando que el aparato de exportación no puede llevar a cabo el cambio de la especificidad para iniciar la secreción de los sustratos tipo flagelina (44, 107). Por otro lado, la coexpresión de los productos de procesamiento de FlhB de forma independiente, permite que las bacterias se desplacen un 50% en relación al desplazamiento de la cepa silvestre (107), este resultado indica que el estado no procesado de FlhB es dispensable para que ocurra el cambio de la especificidad del aparato de exportación.

Finalmente, se desconoce la función del resto de los componentes membranales del aparato de exportación. Aunque se ha demostrado que la fusión de los genes *fliR* y *flhB*, da lugar a una proteína quimérica que permite la formación de flagelo, sugiriendo que dentro del aparato de exportación estos polipéptidos interactúan en una estequiometría 1:1 (179). Por otro lado, se ha demostrado que las proteínas FliP y FliR se asocian con el cuerpo basal (40) y dado que FlhA se asocia al anillo MS así como a FliP y FliQ (78, 100); se ha sugerido que la estructura ubicada

por estudios de microscopia electronica, en el centro del anillo MS, representa los componentes membranales del aparato de exportación (40, 75).

Además de los componentes generales del aparato de exportación, el sistema de secreción flagelar requiere de la presencia de chaperonas específicas, entre las cuales encontramos a las proteínas FliS, FliT y FlgN, las cuales interactúan con las proteínas FliC, FliD y FlgK/FlgL respectivamente (12, 16, 42). Estas chaperonas son citoplasmáticas y comparten las características generales de otras chaperonas (i.e. la mayoría tienen pesos moleculares entre 15 y 10 kDa, tienen un pI ácido, y potencial para formar α -hélices anfipáticas) (15, 42). Se ha sugerido que su función es prevenir la interacción de los monómeros que serán exportados y mantenerlos en un estado competente para la exportación (15, 42, 101). Mutaciones en estos genes provocan la pérdida de la motilidad. Recientemente fueron aislados alelos dominantes del gen *flgN* (chaperona específica para FlgK y FlgL), la expresión de estos alelos inhiben drásticamente la movilidad de la cepa silvestre, cuando son expresados a un nivel similar al del alelo *flgN* cromosomal. Se comprobó que una de las proteínas codificadas por estos alelos (FlgN*) es capaz de unir eficientemente sus sustratos, FlgK y FlgL. Sorpresivamente, FlgN* reduce también la exportación de las proteínas FliC y FliD sugiriendo que esta proteína mutante puede estar bloqueando el conducto de salida del aparato de exportación. De acuerdo con esta posibilidad, se observó que FlgN* se localiza asociada a la membrana, en contraste a la proteína silvestre que se localiza en el citoplasma. Dicha ubicación es dependiente de la presencia de FliI (e independiente de cualquier otra proteína flagelar), sugiriendo que estas chaperonas interactúan directamente con la ATPasa FliI. Los complejos FliI-FlgN*-FlgK, fueron identificados en extractos celulares y son dependientes de la presencia del sustrato de exportación (173).

La chaperona FliS es una proteína de 135 aminoácidos, e inicialmente se detectó que esta proteína facilita la exportación de la flagelina (FliC) (12, 191). Posteriormente, se determinó mediante ensayos de doble híbrido que FliS interactúa con el extremo COOH-terminal de la flagelina (128). FliS inhibe la polimerización de flagelina *in vitro*, apoyando la posibilidad de que FliS actúe impidiendo la polimerización prematura de FliC en el citoplasma (12). Recientemente, la estructura cristalográfica de FliS mostró un arreglo de cuatro α -hélices antiparalelas y una especie de tapa formada por los 16 primeros aminoácidos, dicha estructura es distinta a la de otras chaperonas que participan en los sistemas de secreción tipo III, los cuales incluyen además de los sistemas de secreción flagelar a aquellos asociados a estructuras conocidas como complejos aguja, los cuales están involucrados en la virulencia. Esto indica que la chaperona FliS probablemente no está relacionada evolutivamente con las chaperonas de otros sistemas de secreción. La estructura del cocrystal de FliS asociada al fragmento COOH-terminal de FliC, que se extiende de los aminoácidos 464 a 518, demostró que los residuos 479-518 de FliC se enrollan fuera de FliS en una conformación extendida, similar a una herradura, con estructura secundaria pero no terciaria (38). Dado que los extremos COOH y NH₂ son fundamentales para la polimerización de la flagelina, la interacción de una de estas regiones con FliS, da por resultado la inhibición de la polimerización. Queda por establecer si FliS también participa en la interacción con el aparato de exportación. Finalmente, la formación del complejo FliS-FliC ha sido cuantificada por calorimetría isotérmica de titulación, así como los cambios conformacionales que provoca la unión de FliS a FliC; de estos resultados se concluyó que FliS se une a FliC en una estequiometría 1:1, y que FliS no funciona como un factor que impide la formación de estructura secundaria (unfolding); de hecho, en concordancia con el estudio

cristalográfico, se observó la formación de α -hélice en la proteína FliC al interactuar con FliS (117). Cabe mencionar que el estudio cristalográfico (38) y los estudios de calorimetría (117) permitieron corregir la estequiometría del complejo FliS-FliC, el cual mediante estudios de cromatografía se había considerado previamente como 2:1 (12).

Control de la quimiotaxis

La respuesta quimiotáctica descrita previamente y esquematizada en la figura 5, involucra un complejo sistema de receptores acoplados a un sistema de transducción de señales perteneciente a la familia de dos componentes. En *E. coli*, los receptores del sistema quimiotático son cinco y se denominan: Tar, Tsr, Trg, Tap y Aer (13, 18). Las cuatro primeras proteínas forman homodímeros y poseen un dominio sensorial ubicado en el periplasma, dos segmentos membranales y un dominio citoplásmico. 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), aspartato, glutamato y maltosa (Tar), dipéptidos (Tap); galactosa y ribosa (Tgr). Estas proteínas también se conocen con el nombre genérico de MCPs, el cual representa las siglas: "methyl-accepting chemotactic proteins" (proteínas quimiotáticas aceptoras de metilos), ((13, 150). La metilación de estos receptores en su dominio citoplásmico es fundamental para controlar la respuesta adaptativa a los estímulos quimiotáticos, que es el segundo paso de la respuesta quimiotáctica, y está mediada por las proteínas CheB y CheR (13, 158, 161, 174). A diferencia de

los quimiorreceptores anteriores, Aer no tiene un dominio periplásmico. En cambio, posee un dominio PAS asociado con a un grupo FAD, que puede ser oxidado directamente por el oxígeno o puede detectar el estado redox de la célula interactuando con uno de los componentes de la cadena de transporte de electrones (18, 143). Se ha postulado que la unión del ligando al receptor induce el movimiento de las hélices transmembranales, lo que perturba el dominio citoplásmico, dando lugar a la transducción de la señal (127). Las proteínas que participan en la transducción y regulación de la señal quimiotáctica son seis: CheA, CheB, CheR, CheW, CheY y CheZ. De estas CheA, CheY y CheB forman el sistema de dos componentes involucrado en la regulación de la respuesta quimiotáctica.

Los sistemas de dos componentes, presentes en una gran cantidad de especies bacterianas, tienen 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 sensoria y de una proteína 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, ésta fosforila a las proteínas CheY y CheB, las cuales regulan respectivamente, la frecuencia de reorientación y el grado de metilación del receptor (162, 163).

La proteína CheA interactúa con los receptores quimiotácticos indirectamente, utilizando la proteína acopladora CheW (21, 46, 123). El estado del receptor modula la actividad de la cinasa CheA (idem), y la proteína CheY en su estado fosforilado (CheY-P) es capaz de unirse a la base del motor flagelar, (específicamente a la proteína FliM) y provocar que el flagelo cambie la dirección de rotación, del sentido CCW (contrario a las manecillas del reloj) al CW (sentido de las manecillas del reloj) (25, 175, 183, 186).

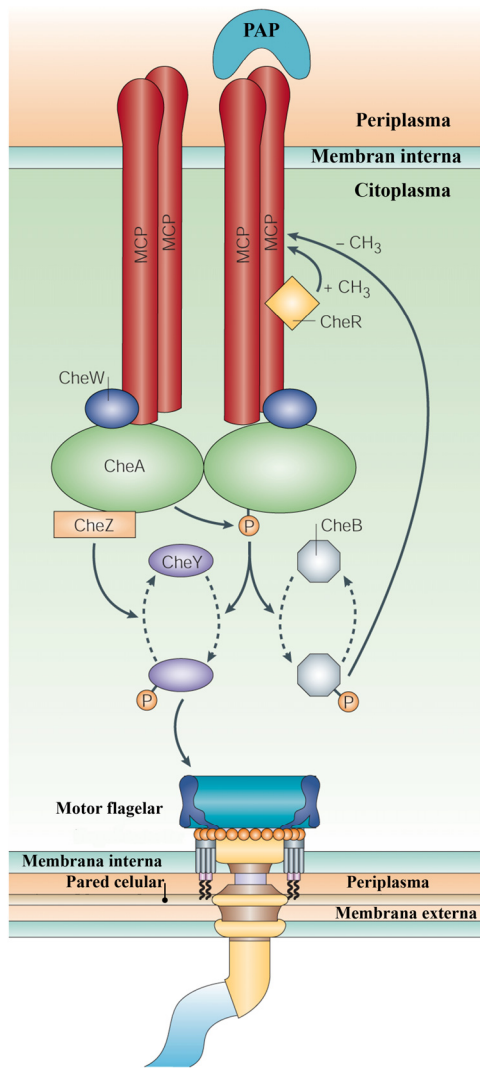


Fig. 5 Representación del sistema quimiotáctico. Se pueden apreciar las dos respuestas a un cambio en el estado del receptor, por un lado un cambio en la concentración de CheY-P y por otro la modificación del estado de metilación del receptor por el cambio en concentración de CheB-P. MCP (methyl accepting protein) PAP (proteína adaptadora periplásmica).

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 reducción provoca que los motores flagelares roten en dirección CCW durante un lapso de tiempo mayor, disminuyendo los eventos de reorientación y prolongando los periodos de movimiento lineal, lo cual se traduce en el desplazamiento de la bacteria en dirección del

atrayerente. La adaptación a esta nueva concentración de atrayerente ocurre por la activación de CheA a los niveles anteriores al estímulo. Dicha activación ocurre inclusive si la concentración del atrayerente no disminuye, por la metilación del receptor catalizada por la proteína CheR (de actividad constante) que rebasa la actividad de la enzima que desmetila el receptor denominada CheB, la cual requiere ser fosforilada por CheA para alcanzar su tasa máxima de desmetilación del receptor. Una vez que la bacteria se adaptó al estímulo, ésta presenta el patrón de nado característico del nado azaroso previo al estímulo y es capaz de responder a un nuevo incremento en la concentración de atrayerente.

En el caso inverso, esto es, en presencia de un incremento en la concentración de un repelente o en la disminución en la concentración de un atrayerente, el cambio conformacional del receptor provoca la activación de CheA, lo cual produce el aumento de los niveles intracelulares de CheY-P. De este modo, las células se reorientan con mayor frecuencia, lo que le proporciona una mayor oportunidad de localizar un medio ambiente favorable. La proteína CheZ es responsable de reducir los niveles de CheY-P a los niveles pre-estímulo. Mientras, la desmetilación del receptor (mediada por CheB-P) provoca la inhibición de la cinasa y por lo tanto la adaptación.

Regulación de la expresión genética del sistema flagelar.

En una gran cantidad de especies bacterianas, la expresión de las proteínas involucradas en la formación del flagelo, está regulada en una jerarquía. El caso mejor estudiado es el de *E. coli* y *Salmonella*, donde los genes flagelares se dividen en tres clases (Fig. 6). En la primera categoría se encuentra el operón *flhDC* (57), estos genes codifican para las proteínas que forman

el activador heterodimerico requerido para la transcripción de los genes pertenecientes a la clase II (95). La transcripción del operón *flhDC* es regulada positivamente por señales globales, por ejemplo: AMPc/CRP y HNS (87). 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* (79). La regulación del operón *flhDC* es el único punto de control donde se integran señales provenientes de otros sistemas de regulación diferentes al flagelar (155). Las proteínas reguladoras de Clase I 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 (138) quizás mediante la participación de la proteína CadA (lisina descarboxilasa) (137).

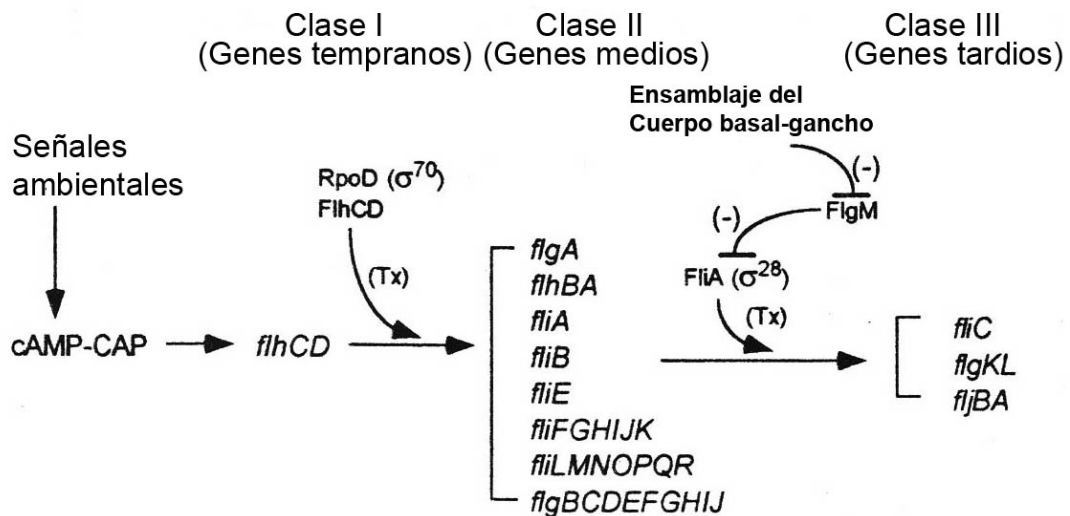


Fig. 6 Jerarquía flagelar de *E. coli*.

Los genes pertenecientes a la clase II codifican fundamentalmente para las proteínas estructurales del gancho, del cuerpo basal flagelar, proteínas involucradas en el ensamblaje del

flagelo (chaperonas y proteínas de andamiaje) y para aquellas involucradas en sensar la correcta formación de esta estructura y que controlan la expresión de los genes de clase III (96).

El mecanismo molecular que permite coordinar la correcta formación de la estructura flagelar compuesta de las proteínas codificadas por los genes pertenecientes a la clase II, con la expresión de los genes flagelares de clase III, está basado en la interacción del factor σ^{28} con su factor antisigma denominado FlgM (88, 89, 89). Ambas proteínas son codificadas por genes pertenecientes a la clase II de la jerarquía transcripcional. Para que ocurra transcripción de los genes de la clase III, es necesario que el factor σ^{28} se libere de su interacción con FlgM, lo cual ocurre una vez que el gancho, el cuerpo basal y el aparato de exportación flagelar están completos y funcionales. En este punto el factor antisigma es exportado por el aparato de exportación flagelar (61, 61, 86, 86), liberando de esta forma al factor σ^{28} y por consiguiente la transcripción de los genes de clase III. Se cree que debe existir una señal que permita un cambio en la especificidad del aparato de exportación que de inicio a la exportación del factor antisigma; sin embargo, a la fecha ésta no ha sido identificada.

En la clase III se encuentran los genes que codifican para las proteínas que se localizan en la sección distal del flagelo, como son *fliC* y *fliD*. En esta clase también se expresan el gen *fliS* que codifica para la chaperona de FliC; los genes que codifican para las proteínas que conforman el estator, *motA* y *motB*; así como los genes que codifican para las proteínas del sistema quimiotáctico (91).

Como se mencionó, en la mayoría de las bacterias estudiadas a la fecha, se ha encontrado que los genes flagelares son expresados siguiendo un patrón jerárquico. Esta forma de expresión garantiza que los genes de un nivel inferior en la jerarquía no serán expresados hasta que los

genes del nivel superior hayan sido transcritos (91, 153). Además de este control, existe un segundo resguardo, el cual asegura que las proteínas transcritas son funcionales, este seguro está constituido por el factor σ^{28} y su antisigma (ya que el factor antisigma no es secretado hasta que el gancho termina de ser ensamblado) (61, 86). En conjunto, ambos mecanismos garantizan un estricto control de la expresión de los genes flagelares.

Recientemente, la jerarquía de expresión de los genes flagelares de *Pseudomonas aeruginosa* fue caracterizada en detalle (33). En este estudio se demostró que en el nivel superior se encuentra el activador maestro fleQ (33). Esta proteína es un activador transcripcional específico del factor sigma-54 (σ^{54}), que se requiere para activar la transcripción dependiente de la RNA polimerasa asociada al factor σ^{54} ($E\sigma^{54}$) (176), de los genes involucrados en la formación del anillo MS, del aparato de exportación, así como de los genes regulatorios fleN, flgM y fleSR (Fig. 7) (33). La proteína FleN se une a FleQ y provoca una disminución en el nivel de expresión de los genes de clase II (32); mientras FleS y FleR son proteínas de la familia de los sistemas de dos componentes (147). La proteína FleS es una cinasa que fosforila FleR, y la forma fosforilada de FleR (FleR-P), junto con $E\sigma^{54}$, llevan a cabo la transcripción los genes de la clase III, cuyos productos están involucrados en la formación del gancho y del cuerpo basal. Una vez formado el gancho, el factor antisigma (FlgM) es secretado al medio de cultivo, y los genes de clase IV son transcritos gracias a la acción del factor σ^{28} (160).

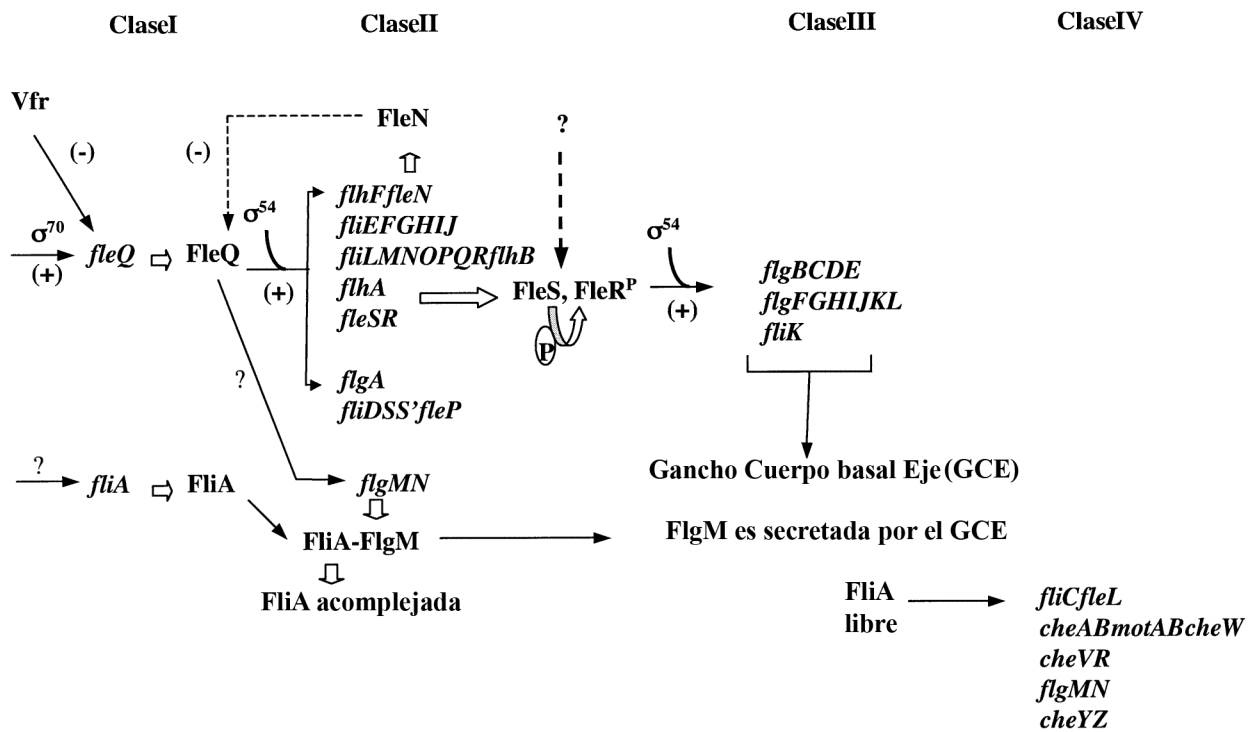


Fig. 7 Jerarquía flagelar de *P. aeruginosa*.

A pesar de que el esquema general que controla la expresión de los genes flagelares en *P. aeruginosa* parece estar elucidado, aún queda por determinar si la expresión *fleQ*, además de ser directamente modulada por Vfr (homólogo de CRP) (31), responde a otras señales globales. Del mismo modo, se desconoce si FleS actúa como cinasa de forma constitutiva, o responde a alguna señal no caracterizada. Finalmente cabe mencionar que en este microorganismo la transcripción de *fliA* (σ^{28}) no está bajo control de la jerarquía flagelar, mientras que la expresión de *flgM* parece ser dependiente de más de un regulador (33).

Aunque con particularidades propias de la especie, se ha observado que σ^{54} y σ^{28} controlan la expresión de los genes tempranos y tardíos, respectivamente, en un buen número de γ -proteobacterias (i.e. *Pseudomonas* y *Vibrio*), así como en *Helicobacter pylori* y *Campylobacter jejuni* (ϵ -proteobacterias) (99).

A excepción de la jerarquía presente en *Caulobacter crescentus*, se sabe poco al respecto de la forma en la que son expresados los genes flagelares en las α -proteobacterias. Por ejemplo en *Sinorhizobium meliloti*, se sabe que dos reguladores transcripcionales pertenecientes a la familia de Lux-R, con dominios típicos de unión a ligando y dominios de unión a DNA, están en lo alto de la jerarquía. Es común que este tipo de activadores transcripcionales actúen junto a la RNA polimerasa asociada al factor sigma-70, por lo tanto, la transcripción de algunos genes flagelares en esta bacteria debe ser dependiente de este factor sigma (154). En contraste, el factor σ^{54} ha sido involucrado en la expresión de los genes flagelares de *Azospirillum brasilense*, ya que cepas mutantes en *rpoN* son incapaces de nadar (102).

Caulobacter crescentus es una de las α -proteobacterias más estudiada a la fecha; esto se debe a la diferenciación morfológica que sufre durante su ciclo de vida. Durante una parte del ciclo celular la bacteria se encuentra unida a un sustrato mediante una prosteca, posteriormente la bacteria comienza a elongarse y sintetiza un flagelo en el polo de la célula hija. La división celular tiene por consecuencia la aparición de una célula nadadora la cual no se divide. Posteriormente, la célula nadadora pierde el flagelo y sintetiza en el mismo polo la prosteca que le permite adherirse al sustrato e iniciar un nuevo ciclo celular (69).

La expresión de los genes flagelares en *C. crescentus* está regulada por una compleja red de mecanismos transcripcionales y postranscripcionales, los cuales tienen como fin sintetizar el flagelo en el momento adecuado del ciclo celular (69, 188).

La jerarquía regulatoria de *C. crescentus* comprende cuatro clases (Fig. 8). El gen *ctrA*, se encuentra en lo alto de la jerarquía y regula la transcripción de los operones de clase II (139), que incluyen a los genes que codifican para el anillo MS, el aparato de exportación y la proteína

FlbD, la transcripción de los genes de esta clase es dependiente de $E\sigma^{70}$. Las proteínas FlbD y $E\sigma^{54}$ son responsables de la transcripción de los genes de la clase III (122, 140, 187); en esta clase se encuentran los genes que codifican para el gancho y el cuerpo basal. Los genes de clase IV denominados *fljK* y *fljL*, codifican para las proteínas que forman el filamento; su expresión es dependiente del factor σ^{54} y de la proteína FlbT la cual degrada el mRNA del gen *fljK* (98). En este microorganismo, la expresión de los genes de las clases III y IV requiere de la correcta formación del anillo MS y del aparato de exportación, este evento activa a la proteína FlbD (114). La incorrecta formación o funcionamiento del anillo MS y del aparato de exportación provoca que la proteína FlbD se asocie con la proteína FliX, evitando así la expresión del resto de los genes de la jerarquía (115). Otro punto de resguardo impide la acumulación de los transcritos de flagelina en ausencia del gancho y del cuerpo basal (producto de la expresión de los genes de la clase III) (5). Aunque no se conoce en detalle el mecanismo molecular que opera en este punto de control, se sabe que la proteína FlbT juega un papel esencial (6, 98).

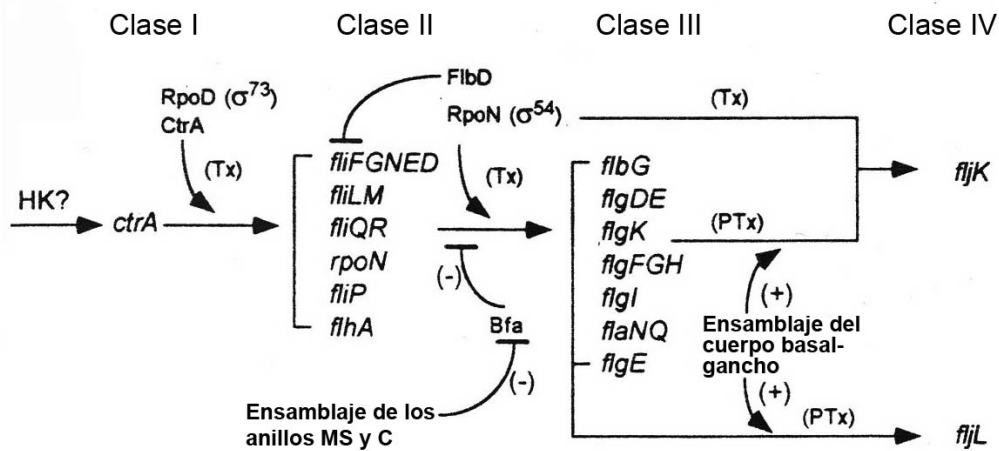


Fig. 8 Jerarquía flagelar de *C. crescentus*.

El factor σ^{54} y sus activadores.

Los factores σ se agrupan en dos familias. Los factores sigma de la familia de σ^{70} que incluyen σ^{70} , σ^S , σ^{32} , σ^{24} , σ^{28} y σ^{fecI} ; mientras la familia de σ^{54} tiene a σ^{54} como único miembro. La división de los factores sigma en dos familias está basada en diferencias en secuencia primaria, lo que implica diferencias funcionales y evolutivas entre los mismos (49).

Una de las mayores diferencias funcionales entre estos factores sigma, es el hecho de que el factor σ^{54} es incapaz de iniciar transcripción por sí mismo. La iniciación de la transcripción mediada por σ^{54} requiere de una proteína activadora que remodela las interacciones DNA-RNAPolimerasa y permite la formación de complejo abierto (26).

A diferencia de los promotores reconocidos por los factores σ^{70} (los cuales muestran cajas conservadas a -35 y -10), los promotores reconocidos por σ^{54} muestran secuencias conservadas en las regiones -24 y -12. La secuencia consenso de los promotores σ^{54} es: TGGCAC N5 TTGCA/T, siendo los nucleótidos GG y GC, así como la distancia entre estos, prácticamente invariantes (14).

El factor σ^{54} fue descrito por primera vez como un factor relacionado con la expresión de los genes involucrados en el metabolismo de compuestos nitrogenados. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que otras categorías funcionales son dependientes de σ^{54} , por ejemplo: la síntesis de flagelo, la expresión de genes involucrados en la degradación de compuestos xenobióticos, la síntesis de fimbrias, la expresión de genes involucrados en el transporte de ácidos dicarboxílicos, etc. (144).

Como fue mencionado previamente, la holoenzima $E\sigma^{54}$ (RNA polimerasa- σ^{54}) es incapaz de iniciar la transcripción. En este caso, la iniciación de la transcripción requiere de una proteína

activadora que remodela las interacciones DNA-RNA polimerasa y permite la formación de complejo abierto (135, 181). Las proteínas activadoras de $E\sigma^{54}$ muestran como característica esencial, un dominio de unión e hidrólisis de ATP, el cual es indispensable para remodelar las interacciones DNA-holoenzima (182, 184). En general estas proteínas activadoras se unen al menos 100 pb río arriba del promotor (145), y desde este sitio contactan al complejo $E\sigma^{54}$ -DNA (complejo cerrado), a través de la formación de un asa en el DNA (166). La interacción de estas proteínas promueve la formación de complejo abierto con la concomitante hidrólisis de ATP (27, 181). Debido a la distancia que guardan el promotor y el sitio de unión de la proteína activadora, a este tipo de activadores se les denomina EBPs, de las siglas en inglés “enhancer binding proteins” (85, 184, 189).

Las proteínas activadoras de σ^{54} son proteínas modulares que consisten en general de tres dominios funcionales. El dominio central, altamente conservado, y que incluye a estas proteínas dentro de la familia de las AAA+-ATPasas; es responsable de la hidrólisis de ATP, oligomerización y a través de sus contactos con el factor σ^{54} presente en la $E\sigma^{54}$, de la activación de la transcripción. El dominio COOH-terminal es responsable de la unión al DNA por medio de un motivo hélice-vuelta-hélice (HTH8) que le confiere especificidad a la EBP para la activación de únicamente los complejos cerrados formados por la $E\sigma^{54}$ en los promotores relacionados con la respuesta con la que esta relacionada cada EBP (184, 189).

Las AAA+-ATPasas forman una familia de proteínas involucradas en una gran variedad de funciones celulares, de ahí el acrónimo AAA+, “ATP-ases associated with various cellular activities”. Las proteínas de esta familia acoplan la energía generada por la hidrólisis de ATP a la remodelación de diferentes substratos, como proteínas, DNA, o complejos de DNA-proteína (37,

120). El dominio central de las EBPs muestran los rasgos de las AAA+-ATPasas, los cuales consisten de varios dominios conservados, entre los cuales destacan la caja Walker A, Walker B, la SRH (“second region of homology”), los así llamados, sensor-I y sensor-II, y un residuo de arginina involucrado en la hidrólisis de ATP (50). Estos rasgos estructurales, así como otros motivos de secuencia conservados entre las diferentes EBPs, se agrupan en siete cajas identificadas por Osuna, et. al. (Fig. 9) (126). De particular importancia es el motivo GAFTGA presente en la caja C3 (Fig. 9). Dicho motivo se encuentra presente únicamente en las EBPs, y se ha identificado como uno de los puntos de interacción con σ^{54} (20).

Al igual que otras AAA+-ATPasas, las EBPs una vez activadas se ensamblan en multímeros; estos oligómeros, generalmente hexámeros, forman anillos cuyo sitio activo se forma en la interfase de cada subunidad. Recientemente, la estructura de NtrC1, mostró que el dominio NH2 controla la actividad de NtrC1 impidiendo la formación de oligómeros (93). La estructura cristalina del dominio AAA+ de la proteína apo-PspF, junto con datos de crio-EM de este dominio unido tanto a σ^{54} , como a un análogo de ATP, reveló rasgos de la interfase entre el dominio AAA+ y σ^{54} , y sugirió un mecanismo para la activación mediado por el motivo GAFTGA (141). Finalmente, las estructuras a alta resolución de PspF unida a ADP, y ATP mostró desplazamiento de motivos específicos del dominio AAA+, dependientes de la identidad del nucleótido (142).

A pesar de la gran cantidad de información que se tiene acerca de las proteínas AAA+-ATPasas, así como de las EBPs, el mecanismo por el cual se acopla la hidrólisis de ATP a la remodelación de sustratos es a la fecha desconocido.

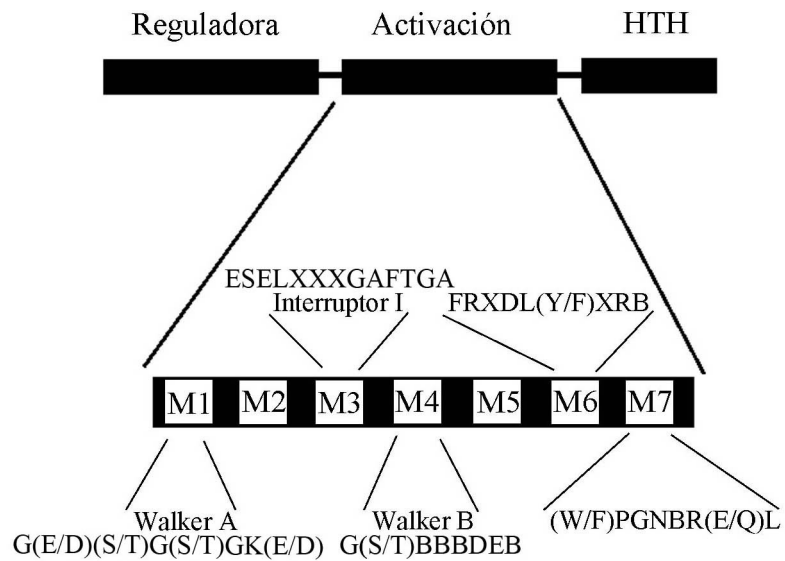


Fig 9. Arquitectura general y motivos conservados de las EBPs. Los motivos consenso se obtuvieron a partir de una alineamiento de 41 EBPs y representan una conservación mínima del 90%. “B” representa aminoácidos hidrofobitos, “X” representa cualquier amino ácido.

Por otro lado, el dominio NH2-terminal de las EBPs es variable, ya que a través de éste se regula la actividad ATPasa en respuesta a señales específicas. Las EBPs se han clasificado en diversos grupos en base a la arquitectura del dominio regulatorio o NH2-terminal (164) (Fig. 10).

A continuación se hace una breve descripción de los grupos de EBPs mejor caracterizados.

EBPs con un dominio RES (Regulador de Respuesta) Este grupo de EBPs está formado en su mayoría por aquellas proteínas que pertenecen a sistemas de dos componentes aunque en algunos casos se desconoce la cinasa cognada. En este tipo de EBPs, el dominio NH2-terminal muestra un dominio homólogo a la proteína CheY (arquetipo de los reguladores de respuesta).

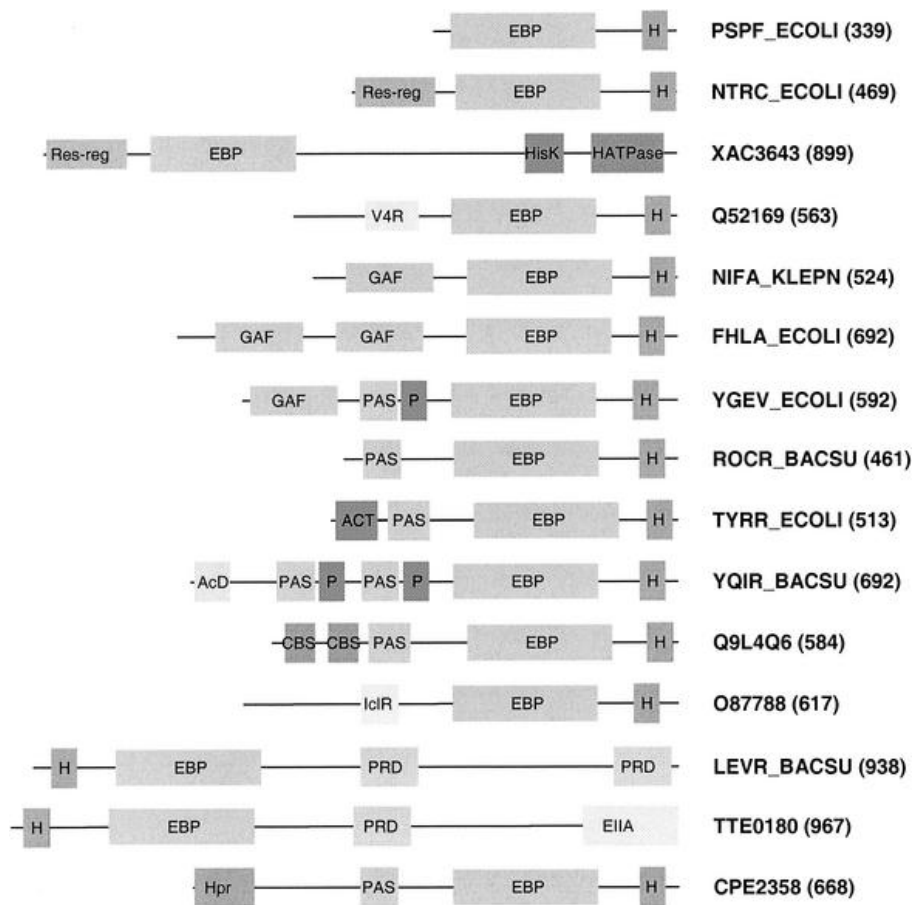


Fig. 10 Composición por dominios de distintas EBPs representativas. Res-reg, dominio regulador de respuesta; HisK, dominio de hidroximetiltransferasa; HATPase, dominio de ATPase; V4R, dominio V4R; GAF, dominio GAF; PAS, dominio PAS; P, dominio PAC; AcD, dominio de acetaldeshidrogenasa; CBS, dominio CBS; IclR, dominio IclR; PRD, dominio PRD; EIIA, dominio IIA de la enzima PTS; Hpr, dominio PTS Hpr.

Las EBPs involucradas en la respuesta celular a la limitación de nitrógeno y en el transporte de ácidos dicarboxílicos, denominadas, NtrC y DctD respectivamente, son activadas por fosforilación de un residuo de aspartato conservado. En el caso de NtrC, la fosforilación favorece la formación de oligómeros, los cuales son ahora capaces de activar la transcripción. En contraste, la fosforilación de DctD elimina un efecto inhibitorio que el dominio NH₂-terminal ejerce sobre el dominio central. En el caso de NtrC, la remoción del dominio NH₂-terminal da

lugar a una proteína inactiva; mientras en el caso de DtcD, la remoción del dominio NH₂-terminal da lugar a una proteína constitutiva.

EBPs con un dominio PTS. En este grupo se encuentran aquellas proteínas que llevan en su extremo NH₂-terminal un dominio de respuesta a los componentes del sistema de fosfotransferasa (PTS). En este caso, componentes fosforilados del sistema PTS fosforilan residuos de histidina que modulan la actividad de la EBP .

Diferentes tipos de EBPs son reguladas por la unión de una molécula efectora al dominio NH₂-terminal. El dominio VR4 (vinil-4-reductasa) el cual une pequeñas moléculas tales como hidrocarburos. Las EBPs XylR y DmpR, unen xileno y 3,4-dimetilfenol respectivamente. El dominio GAF (cGMP-specific and -stimulated phosphodiesterases; adenylate cyclases and FlhA) permite la unión de diferentes moléculas pequeñas y se encuentra en una copia como ocurre en NifA de *Azotobacter vinelandii* donde une oxoglutarato, o en muchos otros casos duplicado, como en FhlA de *E. coli* donde une formato.

El dominio PAS permite la unión de moléculas efectoras del tipo de los grupos hemo o flavín pero a diferencia del dominio GAF con el cual tiene una alta similitud a nivel estructural, no responde al pegado de la molécula efectora, si no a cambios conformacionales de esta provocados por algún estímulo.

En contraste con las EBPs descritas hasta ahora, existen varios activadores de σ^{54} que carecen del dominio NH₂-terminal, que se supone son constitutivos. En este caso, la expresión del gen que codifica para la proteína activadora representaría el punto de control para la activación de sus genes blanco. Alternativamente la EBP puede ser regulada por la unión de otra proteína, como ocurre con la proteína PspF clasificada dentro de este grupo, y que carece de la región NH₂

terminal pero que es regulada por la unión de la proteína PspA, la cual se une directamente al dominio central de PspF inhibiéndola hasta que se presenta un estímulo que no ha sido caracterizado por completo.

Un grupo particular de EBPs lo constituyen aquellas que carecen del dominio COOH-terminal, y a la fecha la proteína FlgR de *Helicobacter pylori*, es la única EBP plenamente caracterizada que pertenece a este grupo (23). La proteína CtcC de *Chlamydia trachomatis*, tampoco muestra un dominio de unión a DNA; sin embargo, a la fecha no se conocen los genes activados por CtcC (81). Se ha propuesto que las EBPs pertenecientes a este grupo, activarían $E\sigma^{54}$ sin hacer contacto con el DNA.

Antecedentes particulares

Rhodobacter sphaeroides es un organismo de vida libre 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 (171).

Esta especie bacteriana tiene un solo flagelo 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 (7). Recientemente, fue observado que durante estos periodos de paro el flagelo parece seguir rotando aunque a velocidades muy bajas, por lo que se propuso que esta lenta rotación podría favorecer la reorientación de la bacteria (8).

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 (132). Además de esta respuesta, se ha observado que en presencia de un atrayente, la velocidad de nado de la bacteria aumenta hasta en un 25%, este fenómeno conocido como quimiocinesis sólo ha sido observado al añadir ácidos orgánicos débiles, los cuales son los más fuertes atrayentes en esta bacteria (129). 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 (51, 129).

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 atractantes primarios para que estos

produzcan una respuesta quimiotáctica (65, 65, 66, 70, 70, 133, 133, 134, 134). 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 (70, 134). 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 (82). La respuesta a la luz de *R. sphaeroides* parece estar compuesta de dos diferentes rutas. 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 abrupto incremento 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 supone que este fotosensor no es una rodopsina, ya que hasta la fecha no han sido identificadas estas moléculas en ninguna bacteria púrpura. Se cree que estas dos diferentes respuestas 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 (82, 82).

En cuanto al estudio del flagelo en *R. sphaeroides*, en el laboratorio y previo a la secuenciación del genoma de esta bacteria, se clonó el gen que codifica para la proteína *fliM*. Este gen fue identificado en un fragmento *SalI* 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 FlhB. Cepas mutantes llevando el alelo *fliM::uidA-aadA* presentan fenotipo Fla⁻, esto es, son incapaces de

ensamblar el flagelo (45). Esto puede ser explicado dado que FliM y/o FliN parecen estar involucradas en la estabilización del aparato de exportación flagelar (84).

El análisis de complementación de esta mutante, sugirió que la unidad transcripcional a la cual pertenece *fliM*, inicia en algún punto río arriba del sitio *SalI* localizado en *fliK*, y termina después de *fliN*. Por lo tanto, *fliO*, *fliP*, *fliQ*, *fliR* y *flhB* 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} (45, 131). Estudios llevados a cabo mediante análisis por delección, mapeo del sitio de inicio de la transcripción, y mutagénesis dirigida, llevaron a la conclusión que la secuencia promotora localizada entre *fliN* y *fliO*, corresponde a un promotor funcional dependiente de $E\sigma^{54}$. Adicionalmente, se determinó que río arriba de los genes *flgB* y *fliK* existen promotores funcionales dependientes de $E\sigma^{54}$. Dado que el promotor ubicado río arriba de *flgB*, es responsable de la expresión de los genes *flgBCDEF*, y el promotor río arriba de *fliK* transcribe los genes *fliKLMN*, se llegó a la conclusión que el factor σ^{54} es responsable de la expresión de los genes involucrados en la formación del gancho y del cuerpo basal en *R. sphaeroides* (131).

Como se mencionó en la sección anterior, $E\sigma^{54}$ requiere de una proteína activadora, o EBP, para llevar a cabo la iniciación de la transcripción. Dado que los genes flagelares involucrados en la formación del gancho y del cuerpo basal son dependientes del factor σ^{54} , nos propusimos como objetivo, el identificar al activador específico para la expresión de estos genes. Asimismo, nos propusimos determinar si estos genes son expresados siguiendo un orden jerárquico.

Hipótesis

Los genes involucrados en la formación del gancho y del cuerpo basal flagelar requieren para su expresión del factor σ^{54} ; por lo tanto, debe existir al menos un factor transcripcional de la familia de las EBPs involucrado en la expresión de los genes flagelares en *R. sphaeroides*.

Objetivos:

1. Identificar el gen que codifica para la proteína activadora de la transcripción de los genes flagelares.
2. Determinar si los genes flagelares de este organismo se expresan siguiendo un orden jerárquico.

Resultados

Identificación las posibles EBPs codificadas en el genoma de *R. sphaeroides*.

Con el objeto de identificar el regulador maestro de los genes flagelares de *R. sphaeroides*, se llevó a cabo una búsqueda por medio de BLAST de aquellos polipéptidos similares a la región central de la proteína NtrC de *E. coli*, utilizando la base de datos de todas las posibles proteínas codificadas en el genoma de *R. sphaeroides*. De esta forma, se identificaron once posibles EBPs, de las cuales diez se encuentran presentes en el cromosoma I y una en el cromosoma II.

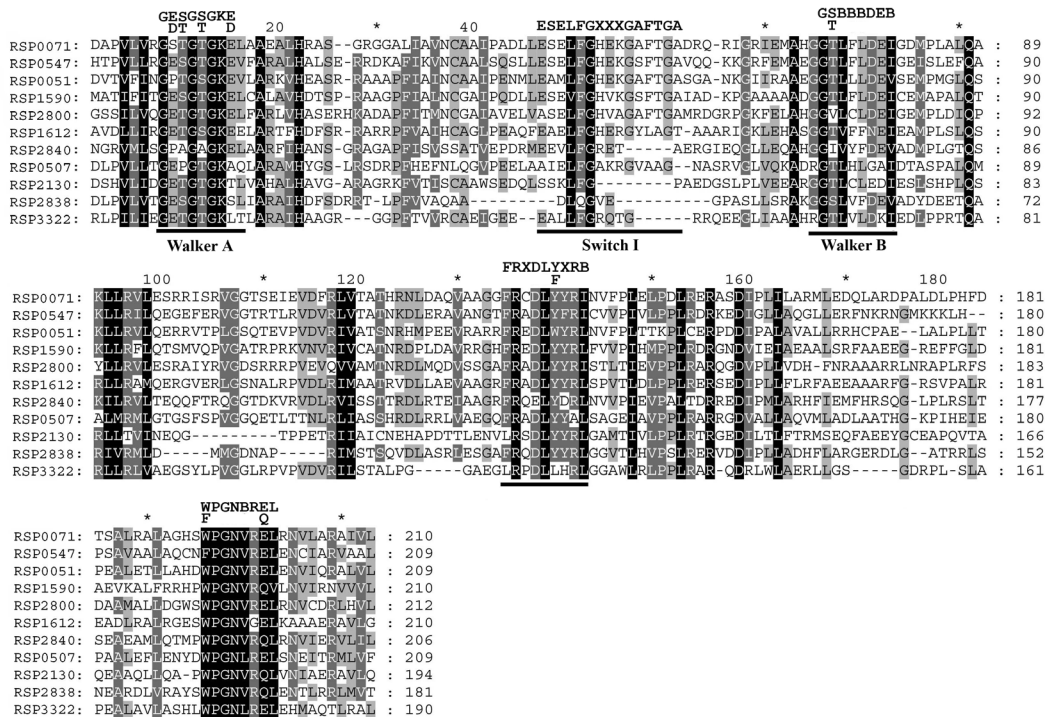


Fig. 11 Alineamiento de la region central de las EBPs de *R. sphaeroides*. Los 5 motivos mejor conservados estan subrayados y se muestra el consenso de cada motivo conservado en la fig. 9.

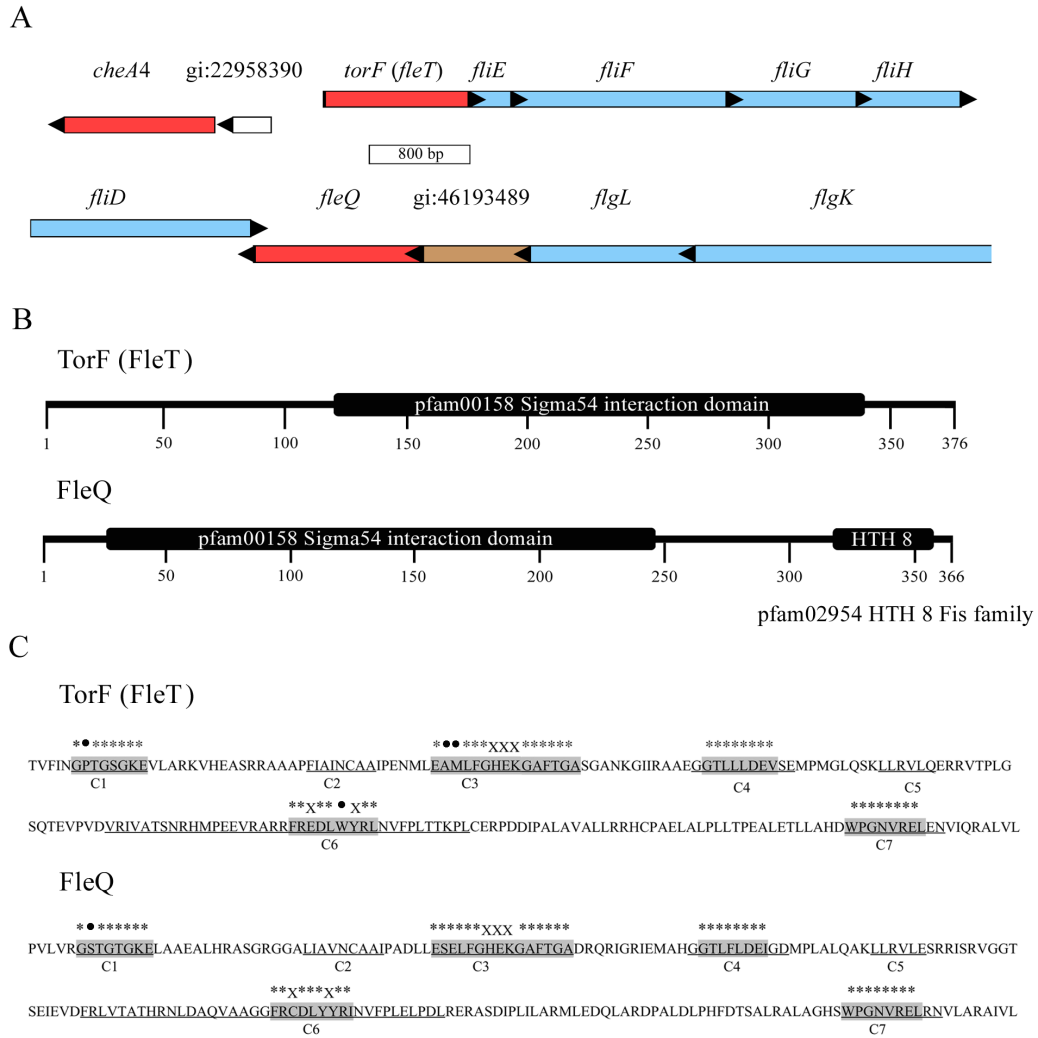


Fig. 12 Contexto genómico, dominios y análisis de la región central de FleQ y FleT. A, Contexto genómico de *fleQ* y *torF (fleT)*. gi:46193489 es la posible muramidasa flagelar. Ambos genes se encuentran dentro de una región cromosomal que contiene a todos los genes flagelares con excepción de *motA* y *motB*. B, Dominios encontrados por CDART a partir de la traducción teórica de *fleQ* y *fleT*. C, Análisis de la región central de FleQ y FleT. Se indican subrayadas las siete cajas conservadas identificadas por Osuna et. al., las cajas grises indican los motivos reportados por Xu y Hoover. Los puntos grises indican los aminoácidos que coinciden con el consenso reportado por Xu y Hoover, los puntos negros señalan los aminoácidos no coincidentes. Las “X” indican las posiciones para las cuales no hay una preferencia en el consenso.

Un alineamiento múltiple de la región central de estas proteínas mostró que seis de ellas no tienen el motivo conservado GAFTGA localizado en la segunda mitad del motivo Switch I, sugiriendo que *R. sphaeroides* solo tiene cinco activadores de σ^{54} funcionales (Fig. 11). Por otro lado, el análisis del contexto genómico de estas cinco EBPs, reveló que dos de ellas están situadas dentro o en la vecindad de operones flagelares (Fig. 12A). En la anotación del genoma, estos marcos de lectura (orfs) fueron denominados *torf* y *fleQ*. El gen *fleQ*, se encuentra localizado río abajo del gen *flgL*, el cual codifica para la proteína adaptadora 1 o HAP1 y de un orf que codifica para una muramidasa putativa (Fig 12A). El gen *torf* parece ser parte del operón *fliEFGHIJ*, ya que el codón de inicio del gen *fliE* se encuentra 13 nucleótidos río abajo del codón de término de *torf*.

El análisis de la estructura primaria tanto de Torf como de FleQ no reveló un dominio regulatorio, y sorprendentemente, no fue posible identificar un dominio HTH en Torf (Fig. 12B). Con respecto al dominio central, FleQ posee bien conservadas las siete cajas descritas para las EBPs, mientras Torf muestra algunas discrepancias, en particular en la caja C3, con dos aminoácidos no canónicos (Fig. 12C).

Aislamiento y caracterización de cepas mutantes en *fleQ* y *torf* (*fleT*).

Con el objeto de evaluar si FleQ y Torf participan en la expresión de los genes flagelares, se procedió a aislar cepas mutantes en cada uno de estos genes, así como la cepa doble mutante. Para ello, se utilizó un fragmento *Sall* de 3773 pb que abarca la mitad del gen *cheA4*, *torf*, *fliE*, y un tercio del gen *fliF*. Dicho fragmento fue clonado directamente del cromosoma de *R.*

sphaeroides, utilizando como sonda un fragmento del gen *fliF*. El plásmido que lleva dicho inserto fue denominado pRS4000 y la secuencia nucleotídica del mismo fue determinada. Posteriormente, un cassette de resistencia a espectinomicina fue clonado en el sitio *PstI*, el cual se ubica dentro de la región codificadora de *torf*. El fragmento fue finalmente transferido a un plásmido conjugable pero incapaz de replicarse en *R. sphaeroides*. El plásmido resultante fue transferido a *R. sphaeroides* por medio de conjugación y los eventos de doble recombinación entre el plásmido y el cromosoma, fueron seleccionados siguiendo el fenotipo Gm^S (resistencia del plásmido) y Spc^R (resistencia del cassette). La cepa con la mutación *torf::aadA*, fue denominada SP13.

Para aislar la cepa mutante en *fleQ*, se clonó un fragmento de PCR de aproximadamente 2 kb que incluye toda la región codificadora de *fleQ* (1230 pb) y parte de las secuencia de los genes *fliD* y RSP0072. Posteriormente, la secuencia codificadora de *fleQ* fue interrumpida con un cassette de resistencia a kanamicina, clonado entre los sitios *PstI*, lo cual elimina aproximadamente 800 pb de la secuencia de *fleQ*. El fragmento una vez clonado en el plásmido suicida pJQ200, fue transferido por conjugación a la cepa silvestre de *R. sphaeroides* y a la cepa mutante en *torf*. Los eventos de doble recombinación fueron seleccionados siguiendo el fenotipo Gm^S Kan^R. La cepa con la mutación *fleQΔ::kan* fue denominada SP12 y la cepa con las mutaciones *fleQΔ::kan torf::aadA*, fue denominada SP14.

La capacidad de nado de las cepas mutantes fue evaluada en cajas de agar semisólido (0.3%) y mediante observación directa en el microscopio óptico, mediante iluminación de campo oscuro. Como se observa en la figura 13, la cepa silvestre (WS8) forma un halo a partir del punto de inoculación, lo cual revela su capacidad de nado; en contraste, las cepas SP12, SP13 y

SP14, aunque muestran crecimiento, éstas no se desplazan del punto de inoculación. La observación en el microscopio demostró que estas cepas son incapaces de nadar. Dado que la mutación en *torf* afecta la capacidad de nado, este gen fue denominado *fleT*.



Fig. 13 Ensayo de motilidad de las cepas mutantes en *fleQ* y *fleT*. 1, Cepa silvestre (WS8); 2, SP13 (*fleT::aadA*); 3, SP12 (*fleQ::kan*); 4 SP13/pRS210; 5, SP13/pRS211; 6, SP12/pRS210; 7, SP12/pRS211; 8, SP14 (*fleT::aadA*, *fleQ::kan*); 9, SP14/pRS210; 10, SP14/pRS211.

Con el propósito de determinar el papel de estas EBPs en la jerarquía flagelar, se llevó a cabo un análisis de complementación utilizando los plásmidos pRS210 y pRS211. Dichos plásmidos permiten la expresión de *fleT* (pRS210) y de *fleQ* (pRS211), a partir del promotor *lac* presente en el vector. En la fig. 13, se muestra la complementación de SP12 y SP13 con los plásmidos pRS211 y pRS210, respectivamente; indicando que en estas cepas el único gen afectado es *fleT* y *fleQ*. Sin embargo, al introducir pRS210 (*fleT*⁺) a la cepa SP12 (*fleQΔ::kan*), o pRS211 (*fleQ*⁺) a la cepa SP13 (*fleTΔ::kan*), no se recuperó la capacidad de nado. Asimismo, la cepa doble mutante SP14 no fue complementada por ninguno de estos plásmidos. En conjunto, estos resultados sugieren que ambos activadores transcripcionales son requeridos para expresar

los genes flagelares; sin embargo, en este punto no es posible descartar si ambos son necesarios para transcribir todos los genes, o si un cierto número de genes requiere de FleT y otro de FleQ.

Actividad Transcripcional de los Promotores Flagelares en las Cepas SP12 (*fleQ* Δ ::kan), SP13 (*fleT* Δ ::*aadA*) y SP15 (*fliA* Δ ::kan).

Con el fin de definir el papel de FleT y FleQ en la jerarquía transcripcional flagelar de *R. sphaeroides*, se evaluó la actividad de varios promotores flagelares utilizando para ello el gen reportero *uidA*, el cual codifica para la enzima β -glucuronidasa.

Inicialmente se identificaron todas las regiones intercistronicas ubicadas río arriba de genes flagelares conocidos. Se identificaron posibles promotores dependientes de σ^{54} (Fig. 14A) para posteriormente amplificar por PCR fragmentos de aproximadamente 600 pb que contienen la secuencia consenso reconocida por σ^{54} , así como al menos 120 pb río arriba y 100 pb río abajo. Los productos de PCR fueron clonados en el plásmido pBBMCS53 (el cual lleva el gen reportero *uidA*), e introducidos por conjugación a las cepas SP12, SP13, SP15 (*fliA*::kan) y SP7 (*rpoN2* Δ ::kan).

Por otro lado, se amplificó la posible región regulatoria de los genes *fliC*, *fliS* ya que río arriba de la región codificadora de estos genes se identificó una secuencia similar a la secuencia promotor reconocida por σ^{28} de *E. coli* (Fig. 14). Adicionalmente se amplificó la región regulatoria de *cheA4*, el cual es el primer gen de un operon quimiotactico localizado dentro de la region cromosomal donde se ubican los genes flagelares. Esto se hizo a pesar de que en la región regulatoria de *cheA4* no fue posible detectar una secuencia promotora consenso ni para σ^{54} ni

para σ^{28} , dado que en *E. coli* los genes quimiotacticos son parte de la jerarquía flagelar. Los productos de PCR fueron clonados en el plásmido pBBMCS53 e introducidos en las cepas de *R. sphaeroides* previamente descritas en este trabajo (Fig 15).

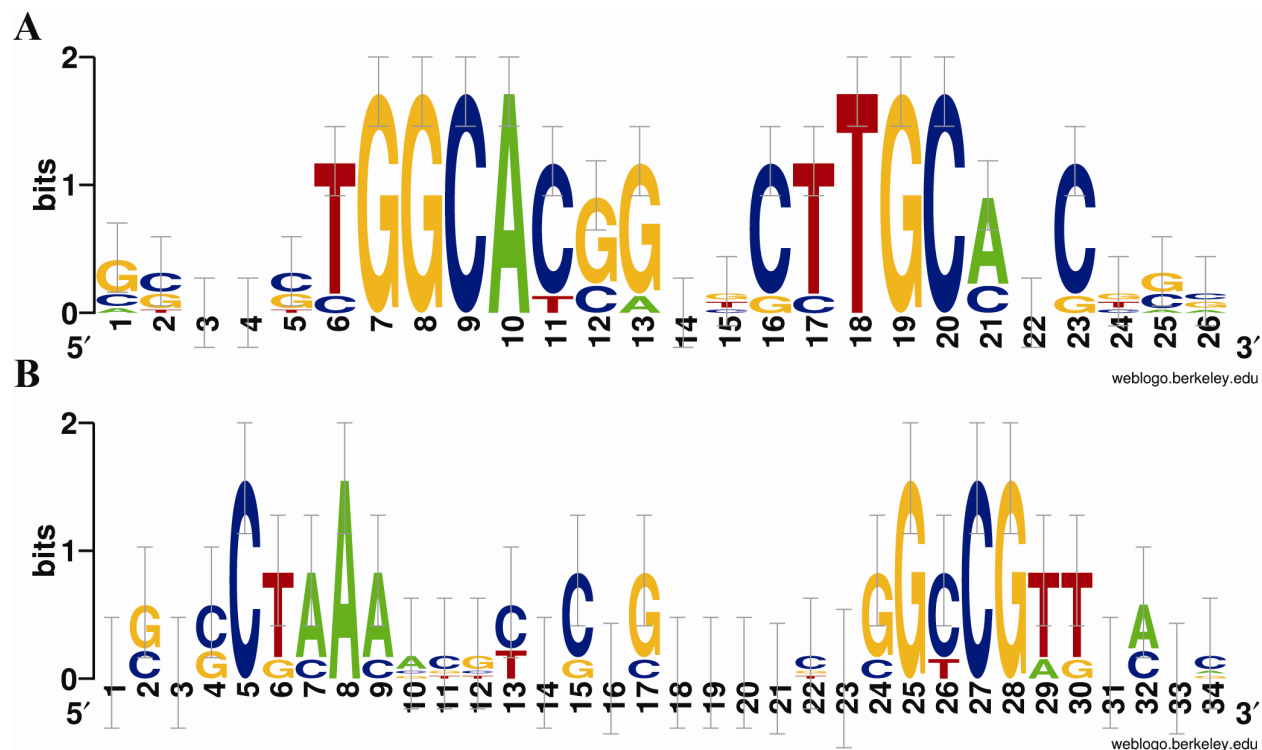
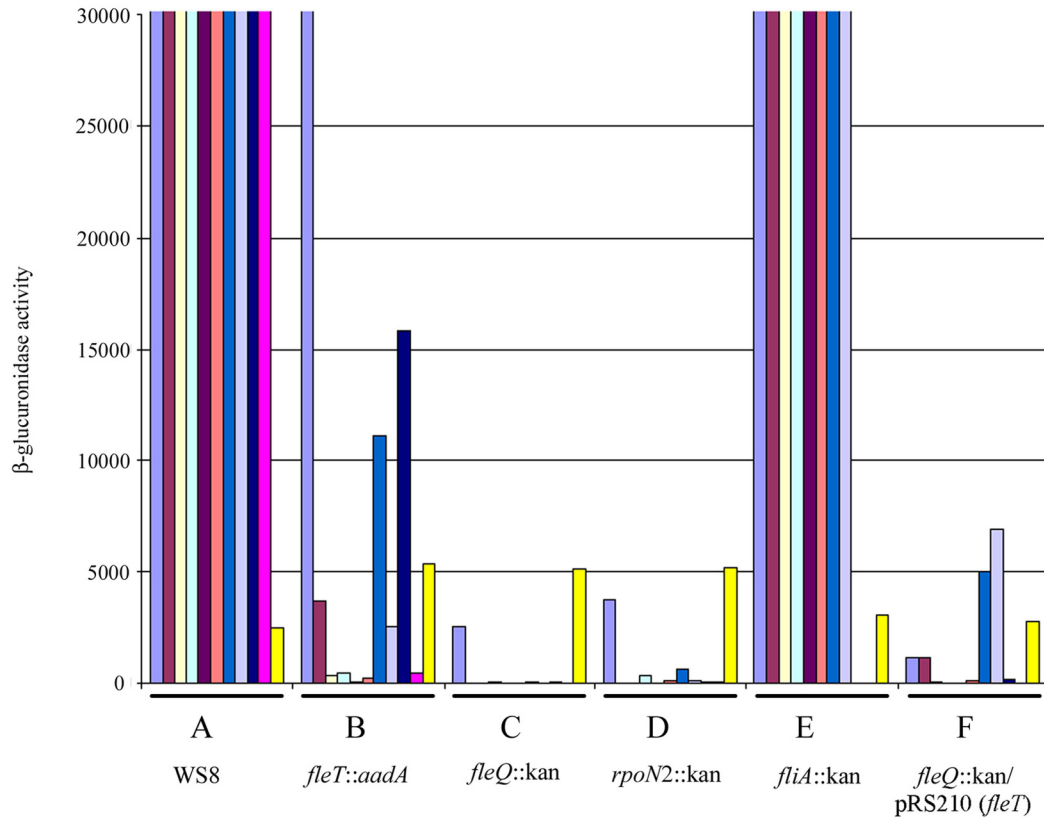


Fig. 14 Secuencias logo de los promotores dependientes de σ^{54} o de σ^{28} identificados. A, Logo de los promotores dependientes de σ^{54} localizados en las regiones intercistronicas rio arriba de los siguientes genes flagelares: *fliK*, *fliO*, *motA*, *flhA*, *flgA*, *flgB*, *flgG* y *fleT*. B, Secuencia logo de posibles promotores dependientes de σ^{28} localizados en las regiones intercistronicas rio arriba de los siguientes genes flagelares: *fliC*, *fliD*, *fliS*, *flgK* y *flgM*.

Como se puede observar en la figura 15A, en la cepa silvestre todas las regiones promotoras clonadas promovieron la actividad de la enzima β -glucuronidasa. Dicha actividad, con excepción de la del promotor *cheA4* (*pcheA4*) y de una pequeña actividad residual del promotor *fleTp*, es dependiente de la presencia de la proteína RpoN2 ya que ninguna de las otras fusiones mostró actividad enzimática en la cepa SP7 (Fig 15D). Estos resultados indican que la expresión de los promotores flagelares es, directa o indirectamente, dependiente de RpoN2 y que

aparentemente los genes quimiotacticos de esta bacteria son regulados por un sistema independiente al flagelar.



	WS8	<i>fleT::aadA</i>	<i>fliA::kan</i>
■ pB <i>fleTp</i>	894·10 ³	6271·10 ³	754·10 ³
■ pB <i>Op</i>	378·10 ³		494·10 ³
□ pB <i>Kp</i>	36·10 ³		78·10 ³
□ pB <i>flhAp</i>	73·10 ³		49·10 ³
■ pB <i>flgAp</i>	38·10 ³		33·10 ³
■ pB <i>flgBp</i>	103·10 ³		391·10 ³
■ pB <i>flgGp</i>	2292·10 ³		2091·10 ³
□ pB <i>motAp</i>	1562·10 ³		2482·10 ³
■ pB <i>fliCp</i>	410·10 ³		
■ pB <i>fliSp</i>	154·10 ³		
■ pB <i>cheA4p</i>			

Fig. 15 Actividad transcripcional de las fusiones de los promotores flagelares al gen reportero *uidA*. La actividad final de las barras que llegan al final de la grafica se dan en el recuadro inferior. Las actividades estan expresadas en nmol de producto/min/mg de proteina.

De acuerdo a su nivel de actividad en la cepa SP12 (*fleT::aadA*) (Fig 15B), los promotores flagelares dependientes de σ^{54} pueden ser divididos en dos grupos: el primer grupo está formado únicamente por el promotor localizado río arriba del operón *fleT*, el cual muestra un alto nivel de actividad enzimática (Fig 15 ver recuadro inferior). En contraste, el resto de los promotores flagelares dependientes de σ^{54} , muestran un nivel muy bajo de actividad en esta cepa.

En ausencia de FleQ, la actividad del segundo grupo de promotores es completamente abolida, mientras el promotor *fleT* muestra actividad residual (Fig. 15C). Estos resultados sugieren que FleQ es el regulador maestro de los genes flagelares. No obstante, la actividad residual promovida por la fusión del promotor *fleT*, en las cepas SP14 y SP7 (Fig 15C y D), sugiere la presencia de un segundo promotor, el cual sería independiente de RpoN2 y FleQ.

En base al nivel de expresión del gen reportero, podemos deducir que la regulación de la expresión del operón *fleT* es compleja, ya que además de la posible existencia de dos promotores, la ausencia de *fleT* provoca un aumento de la actividad enzimática de aproximadamente 10 veces, con respecto al nivel observado en la cepa silvestre (Fig. 15 comparar en el recuadro inferior la actividad del promotor *fleTp* en la cepa WS8 con la de este promotor en la cepa con la mutación *fleT::aadA*); este resultado sugiere que FleT regula negativamente la expresión del operón *fleT*.

Ya que FleQ es requerido para transcribir *fleT*, los resultados anteriores no permiten evaluar si la falta de actividad del segundo tipo de promotores flagelares en la cepa SP13 (*fleQ Δ ::kan*) (Fig. 15C) es debida únicamente a la ausencia de FleQ, o también a la falta de FleT.

Con objeto de clarificar este punto, se procedió a determinar las actividades de β -glucuronidasa promovidas por las fusiones del grupo dos, en la cepa SP13/pRK210 (Fig 15F); dado que el plásmido pRK210 expresa el gen *fleT⁺* a partir del promotor del vector, el nivel de

actividad de los promotores fusionados en el plásmido compatible pBBMCS53, reflejará la dependencia de estos promotores por cada una de las EBPs.

Como se muestra en la figura 15F, en la cepa SP13/pRK210, ninguna de las fusiones mostró el nivel de actividad observado en la cepa silvestre, indicando que la transcripción a niveles normales a partir de estos promotores requiere tanto de FleQ como de FleT.

Se puede observar que el segundo grupo de promotores muestra un nivel de actividad mayor en la cepa SP12 (*fleTΔ::aadA*) que en la cepa SP13/pRK210, sugiriendo que FleQ funciona como el principal activador transcripcional. Aunque este nivel de activación se encuentra muy por debajo del observado en la cepa silvestre, y por lo tanto no es suficiente para promover la formación del flagelo.

Por otro lado, el bajo nivel de actividad enzimática promovida por los promotores *fliOp*, *fliGp* y *motAp*, en la cepa SP13/pRS210 muestra que FleT también puede funcionar por sí misma como activador transcripcional a pesar de no tener un dominio de unión al DNA (Fig. 12B).

Ya que la transcripción del operón *fleT* es dependiente únicamente de FleQ, y la transcripción de los promotores flagelares del grupo dos es dependiente de FleQ y FleT, nosotros concluimos que el operón *fleT* representa la Clase II, mientras el resto de los promotores flagelares dependientes de σ^{54} , representan la Clase III de la jerarquía flagelar en esta bacteria.

Con el fin de obtener evidencia directa que apoye la idea de que los promotores *fliCp* y *fliSp*, representan la Clase IV de la jerarquía flagelar, se determinó la actividad enzimática de todas las fusiones transcripcionales en la cepa SP15 (*fliAΔ::kan*). Como se observa en la figura 15E, los promotores *fliCp* y *fliSp*, son los únicos incapaces de expresar el gen reportero en esta cepa, lo cual sugiere que ambos promotores son reconocidos por el factor σ^{28} (codificado por el

gen *fliA*). Asimismo, la falta de actividad de estos promotores en las cepas SP12 y SP13, indica que su expresión se encuentra controlada indirectamente por los genes de la clase superior de la jerarquía.

Mapeo del Sitio de Inicio de la Transcripción de Promotores Pertenecientes a las Clases I, II y IV.

Previamente, se habían reportado los sitios de inicio de la transcripción de los promotores *fliOp*, *fliKp* y *flgB* (131); ya que estos promotores formarían parte de la Clase III en la jerarquía, se procedió a identificar los sitios de inicio de la transcripción para algunos de los promotores representativos de otras clases.

Como se describió en la sección anterior, los promotores *fliCp* y *fliSp* son incapaces de promover la expresión del gen reportero en la cepa SP15 (*fliAΔ::aadA*), lo que sugiere que ambos promotores son reconocidos por el factor σ^{28} . Para confirmar este resultado se decidió mapear el sitio de inicio de la transcripción de *fliCp* (Fig. 16B). Por otro lado para obtener evidencia experimental de al menos uno de los promotores dependientes de σ^{28} predichos se mapeo el sitio de inicio de la transcripción del promotor *fliDp* (Fig. 16B). En ambos casos el sitio de iniciación se encuentra a la distancia apropiada de una secuencia similar al promotor consenso reconocido por el factor σ^{28} (Fig. 16C). Adicionalmente, no se observó ninguna señal correspondiente a esta población de mensajeros, al utilizar RNA total extraído de la cepa SP15 (*fliAΔ::aadA*) (Fig. 16B comparar carriles a y b). Estos resultados apoyan la idea de que los promotores *fliCp*, *fliSp* y

fliDp, son expresados a partir de promotores dependientes del factor σ^{28} , conformando así la Clase IV de la jerarquía de expresión flagelar en *R. sphaeroides*.

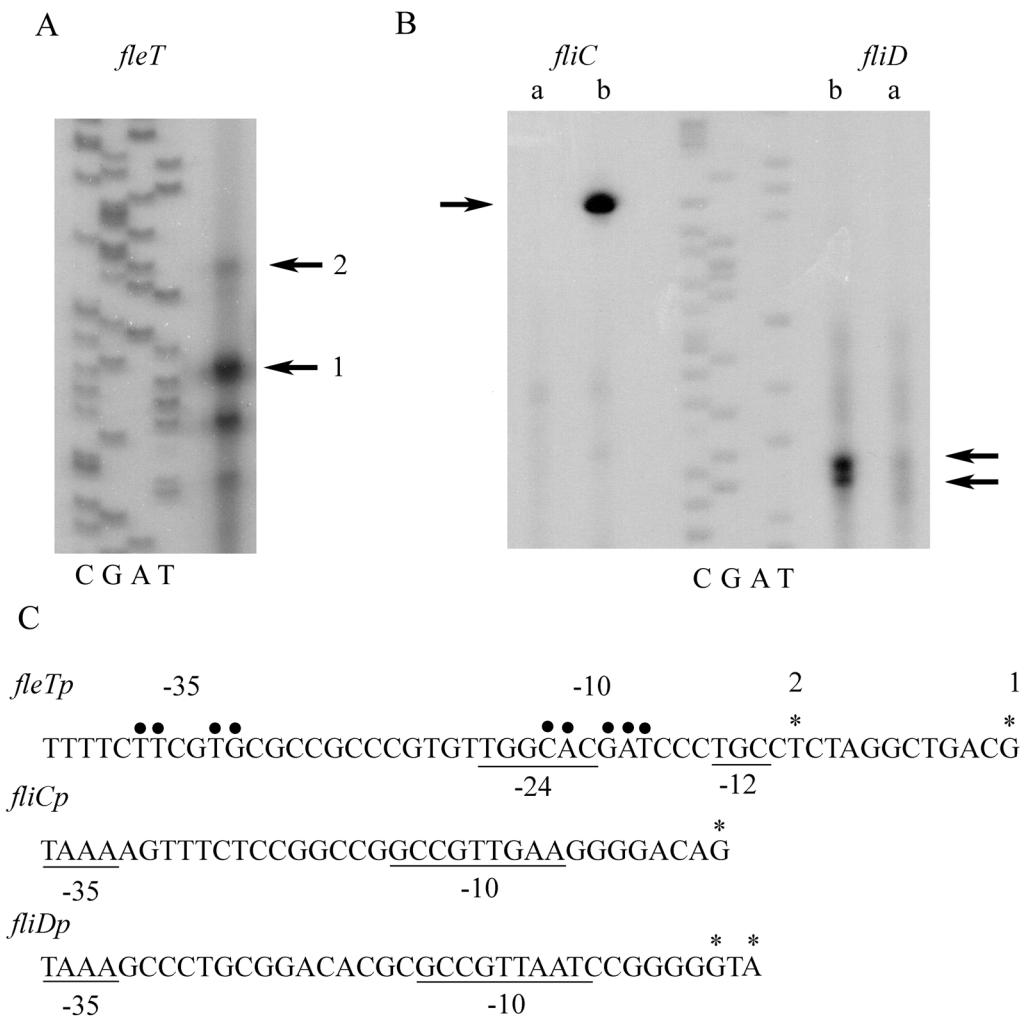


Fig. 16 Sitios de inicio de la transcripción del promotor de Clase II *fleTp* y de los promotores de clase IV *fliCp* y *fliDp*. A, Experimento de extensión del cebador para determinar el inicio de la transcripción del promotor *fleTp*. B, Experimentos de extensión del cebador para determinar el sitio de inicio de la transcripción de los promotores *fliCp* y *fliDp* (“a” el RNA utilizado fue obtenido de la cepa SP15; “b” el RNA utilizado fue obtenido de la cepa silvestre WS8). C, Secuencia de los promotores caracterizados. Las cajas -12 y -24 del promotor dependiente de σ^{54} de *fleTp* así como las cajas -10 y -35 de los promotores dependientes de σ^{28} de *fliC* y *fliD* están subrayadas. El posible promotor dependiente de σ^{70} de *fleT* se indica con puntos negros sobre las bases. Los inicios de la transcripción identificados se indican con asteriscos.

Por otro lado, los resultados obtenidos de la fusión *fleTp-uidA*, sugirieron que en dicha región regulatoria podían existir dos diferentes promotores; uno dependiente de σ^{54} y otro constitutivo, probablemente dependiente de σ^{70} . De acuerdo con esta posibilidad, se observaron dos posibles sitios de inicio de la transcripción para *fleT* (Fig. 16A), uno de ellos se encuentra 13 nt río abajo del dinucleótido GC, presente en la caja -12, de los promotores dependientes de σ^{54} (Fig. 16C asterisco 1). Mientras el otro mensajero, que corresponde a una señal mucho más débil, inicia 10 nt río arriba del transcrito anterior (Fig. 16C asterisco 2). La búsqueda de posibles promotores en esta región, reveló la existencia de una posible secuencia promotora similar a la reportada para otros promotores dependientes de σ^{70} ; así como una secuencia altamente similar al consenso reconocido por el factor σ^{54} .

Finalmente, con el objeto de identificar el promotor responsable de la transcripción del gen *fleQ*, inicialmente aislamos una cepa que en el cromosoma lleva la fusión transcripcional *fleQ::uidA-aadA*, remplazando al alelo silvestre *fleQ*. La introducción de los alelos *rpoN2::kan*, o *fleT Δ ::kan*, no modificaron el nivel de expresión del gen reportero, indicando que la expresión de *fleQ* es independiente de las proteínas RpoN2, FleQ o FleT (datos no mostrados).

La búsqueda de una posible secuencia promotora ubicada río arriba de *fleQ*, no proporcionó resultados significativos; por lo tanto, se llevó a cabo un ensayo de protección a RNAsas, utilizando RNA total aislado de la cepa silvestre, y como sonda, un RNA sintético que se extiende desde el codón de inicio de FleQ, hasta 1200 nt río arriba. A partir de este experimento, se identificaron dos fragmentos resistentes a RNAsas de cadena sencilla (Fig. 17). Uno de los fragmentos correspondería a un mensajero cuyo +1 se ubicaría 150 nt río arriba de la metionina iniciadora de FleQ, mientras el otro iniciaría 300 nt río arriba del ATG. Este resultado

sugiere la presencia de dos promotores, o la existencia de un solo mensajero con una larga región 5' no traducida, la cual sería procesada postranscripcionalmente.

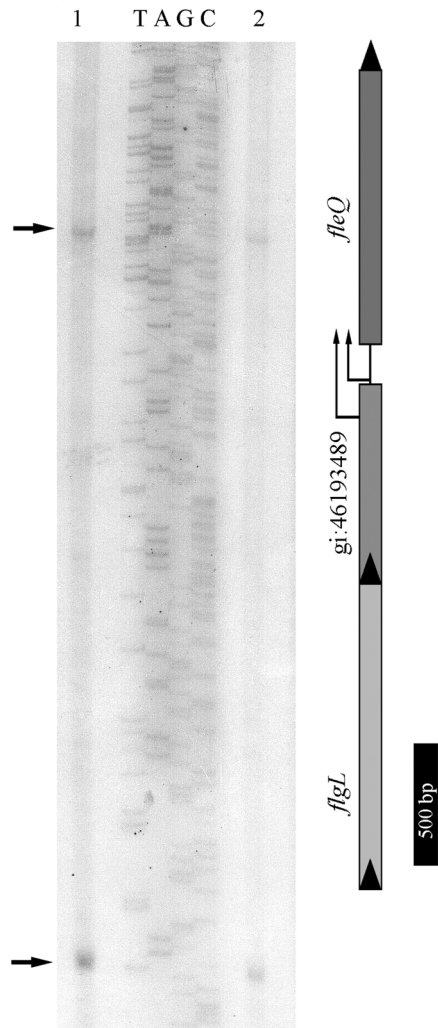


Fig. 17 Mapeo del inicio de la transcripcion de *fleQ* por ensayo de proteccion a RNasas. Los carriles 1 y 2 indican experimentos independientes. El doble de RNA total fue usado en el experimento 1 que en el experimento 2. En el esquema de la izquierda se señala la posición de los posibles inicios de la transcripcion en el contexto genomico de *fleQ*.

Por otro lado, una analisis de complementacion de la cepa SP13 (*fleQ::kan*) con distintos fragmentos que contienen el gen *fleQ* y regiones consecutivamente mas pequeñas a partir de 1200 pb río arriba del codon de inicio de este gen, nos permitió identificar el fragmento mínimo necesario para lograr a complementación de la cepa SP18 (resultados no mostrados). Los resultados obtenidos indican que es necesaria la presencia de 780 pb río arriba del codón de inicio

de *fleQ* para observar complementación. Este resultado sugiere que el promotor del gen *fleQ* puede requerir de una extensa región regulatoria, que podría ser blanco de unión de factores transcripcionales indispensables para la expresión de *fleQ*. Alternativamente, el promotor puede estar ubicado en una región río arriba del punto distal identificado en los experimentos de protección a RNAsas, y promover la síntesis de un mRNA inestable que posteriormente sería procesado a otros productos estables.

Purificación y determinación de la actividad enzimática de las proteínas FleT y FleQ.

Con el propósito de purificar las proteínas FleQ y FleT, la región codificadora de los genes *fleQ* y *fleT* fue clonada en el plásmido pBAD-HisB, tal y como se describe en la sección de Material y Métodos. Los plásmidos resultantes una vez introducidos a la cepa de *E. coli* LMG174, expresan la proteína de interés fusionada a una serie de seis histidinas ubicadas en la región NH₂-terminal.

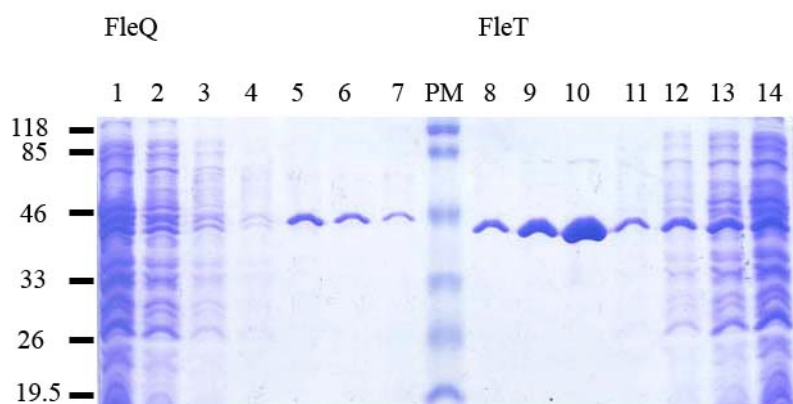


Fig. 18 Purificación de FleQ y FleT. 1 y 14, extracto total (fracción soluble); 2 y 13, primer lavado; 3 y 12, tercer lavado; 4 y 11, quinto lavado; 5 y 10, primera elución; 6 y 9, segunda elución; 7 y 8, tercera elución. PM, marcador de peso.

Las proteínas His-FleT y His-FleQ fueron purificadas por cromatografía de afinidad a partir de la fracción soluble de un extracto celular (fig. 18).

Dado que la hidrólisis de ATP es esencial para el funcionamiento de las EBPs, se procedió a determinar la actividad ATPasa de ambas proteínas. Como se muestra en la figura 19, ambas proteínas son capaces de hidrolizar ATP, y por ende, ambas proteínas podrían llevar a cabo la activación de la transcripción.

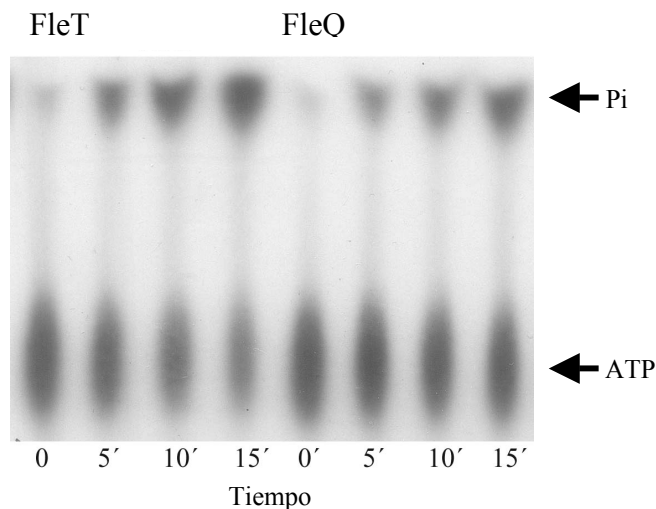


Fig. 19 Actividad de ATPasa de los activadores FleQ y FleT. Cromatografía de placa fina de las reacciones de hidrólisis de ATP de FleQ y FleT. Se estimó una actividad específica de 1.93 y 43.98 pmol de ATP hidrolizado/min/pmol de proteína para FleT y FleQ respectivamente. En el ensayo que se muestra se utilizaron distintas cantidades de FleQ y de FleT.

Unión de las proteínas FleT y FleQ a la región regulatoria del operón *fleT*.

Con el fin de determinar la capacidad de FleT y FleQ de unirse a las regiones regulatorias de los promotores flagelares, se procedió a llevar a cabo experimentos de retardo (EMSA, electrophoretic mobility shift assay), utilizando las regiones regulatorias correspondientes a los promotores *fliOp*, *flgGp* y *fleTp*.

En estos ensayos, FleQ causó un cambio en la movilidad del promotor *fleTp* (fig. 20 líneas xx), pero no afectó la movilidad de *fliOp* ni *flgGp* (datos no mostrados). Dado que los promotores

de la Clase III requieren de la presencia de ambos activadores, se realizaron ensayos mezclando diferentes proporciones de las proteínas FleQ y FleT. Sorpresivamente los fragmentos correspondientes a *fliOp* y *flgGp* no mostraron un cambio en su movilidad electroforética (datos no mostrados). Estos resultados pueden ser causados por una baja afinidad del complejo por el DNA, o a la baja estabilidad del complejo FleQ/FleT. Por otro lado, la proteína FleT sola fue incapaz de unirse a cualquiera de los tres fragmentos probados (datos no mostrados).

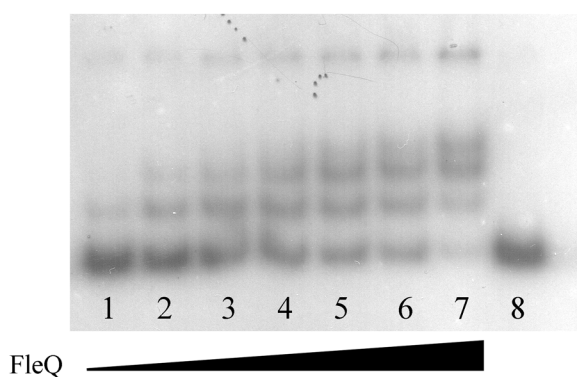


Fig. 20 Experimento de cambio de la movilidad del promotor de *fleT* por la unión de la proteína FleQ. Las siguientes cantidades de proteína fueron utilizadas: línea 1, 0.75 pmol; línea 2, 1.5 pmol; línea 3, 2.25 pmol; línea 4, 3 pmol; línea 5 3.75 pmol; línea 6 4.5 pmol; línea 7, 7.5 pmol; línea 8, sonda libre.

Al utilizar concentraciones crecientes de FleQ, se observó que el fragmento *fleTp* produce tres diferentes complejos (Fig. 20), lo cual puede representar la unión de FleQ a tres diferentes sitios en el DNA, o quizá sea evidencia de la transición a diferentes estados multiméricos de FleQ. Finalmente, se analizó el cambio en la movilidad de *fleTp*, al utilizar una concentración fija de FleQ, y concentraciones crecientes de FleT; como se observa en la (Fig. 21), la presencia de FleT promueve la aparición de nuevos complejos con movilidad reducida. Dado que FleT no es capaz de unirse a *fleTp*, este resultado sugiere que la formación de heteromultímeros desplaza el equilibrio de la reacción y nuevos complejos pueden ser formados. Alternativamente, es posible

considerar que FleT pudiera afectar la conformación del dominio HTH de FleQ y aumentar o modificar así, su afinidad por DNA.

Cabe mencionar que la especificidad de la interacción FleQ-*fleTp* fue probada al incluir en la reacción un exceso de DNA no marcado radioactivamente. La adición de DNA inespecífico no produjo alteración de los complejos detectados, mientras que la adición de *fleTp* no marcado, produjo la desaparición de los complejos retardados (datos no mostrados).

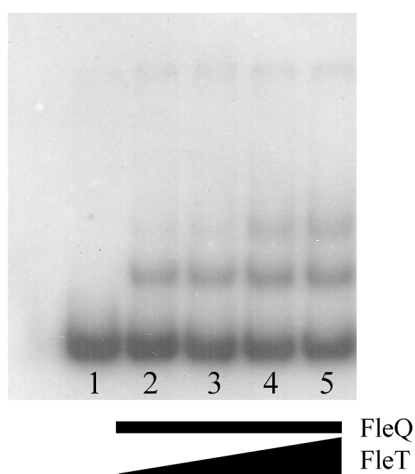


Fig. 21 Cambio de movilidad del promotor *fleTp* por la unión de FleQ y FleT. Las siguientes cantidades de proteína fueron utilizadas: línea 1, sonda libre; líneas de la 2 a la 5, 1.5 pmol FleQ; línea 3 7.5 pmol FleT; línea 4, 15 pmol FleT; línea 5, 22.5 pmol FleT.

Discusión

En este trabajo se investigó la jerarquía flagelar de *R. sphaeroides*. Previamente, fue demostrado que los genes flagelares involucrados en la formación del gancho y del cuerpo basal son expresados a partir de promotores reconocidos por el factor σ^{54} (131) (ver anexo I). Las proteínas necesarias para activar este tipo de promotores muestran una región central altamente conservada (112), esta región ha permitido identificar a las proteínas activadoras de σ^{54} en la secuencia genómica de varios microorganismos (28, 67, 165); así como deducir su posible función en base al análisis de la región NH₂-terminal y del contexto genómico. Utilizando esta aproximación, nosotros buscamos posibles activadores de σ^{54} en el genoma completo de *R. sphaeroides*. En base al contexto genético, se identificaron dos genes que codifican para posibles EBPs involucradas en la expresión de los genes flagelares. Utilizando técnicas de genética reversa, se aislaron mutantes en cada uno de estos genes; dichas cepas fueron incapaces de nadar, por lo tanto dichos genes fueron denominados *fleQ* y *fleT*.

Basados en evidencia obtenida por análisis de complementación, fusiones transcripcionales, y caracterización bioquímica de las proteínas FleQ y FleT, este trabajo postula la organización de la jerarquía transcripcional y los posibles mecanismos regulatorios involucrados en la expresión de los genes flagelares en *R. sphaeroides* (Fig. 22).

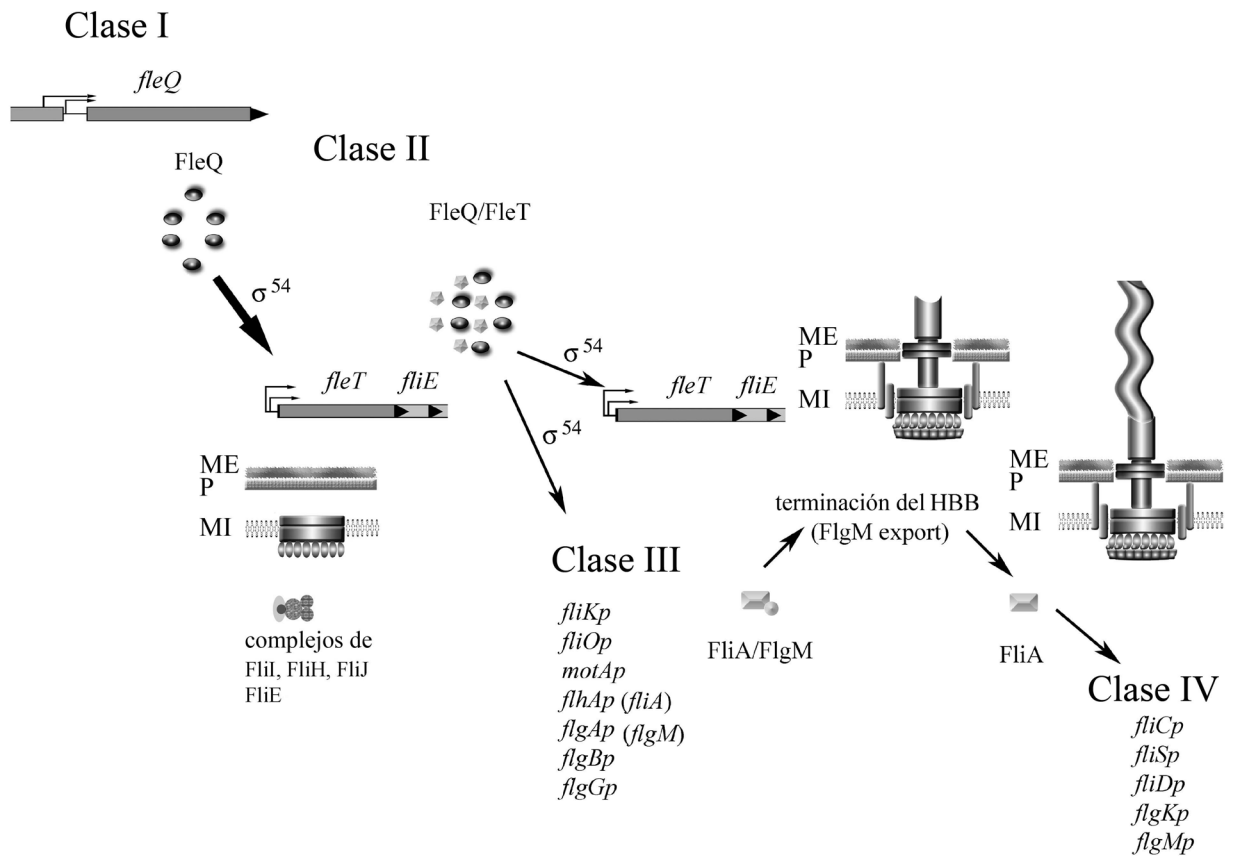


Fig. 22 Modelo propuesto de la jerarquía flagelar en *R. sphaeroides*. ME, membrana externa; P, pared de peptidoglicanos; MI, membrana interna; HBB, hook-basal body (gancho cuerpo basal).

Clase I

El análisis de la dependencia de los promotores flagelares dependientes de σ^{54} por los dos activadores caracterizados en este estudio mostro que para alcanzar un nivel de transcripción similar o mayor al observado en la cepa silvestre, todos son dependientes de la proteína FleQ. Por esta razón se propone que el gen *fleQ*, es el regulador maestro de la jerarquía transcripcional de *R. sphaeroides*.

La secuencia de aminoácidos de FleQ, posee aproximadamente 65 aminoácidos en el extremo NH₂-terminal, antes de iniciar la secuencia representativa de las AAA⁺-ATPasas. Ya

que los aminoácidos de la región NH₂-terminal, no muestran similitud con ningún dominio regulatorio conocido, consideramos que FleQ es activa constitutivamente. Esta posibilidad sugiere que la biogénesis flagelar estaría controlada únicamente por el nivel de expresión de *fleQ*.

La expresión de *fleQ* no fue afectada por la ausencia de RpoN₂, indicando que la transcripción de *fleQ* no requiere de la expresión de ningún otro gen del regulón flagelar.

Experimentos de protección a RNAsas sugirieron que *fleQ* podría expresarse a partir de dos promotores o quizá a partir de un promotor distal que podría ser procesado postranscripcionalmente. En cualquiera de estos casos, el estudio de los mecanismos que controlan la expresión de *fleQ* brindará información relevante sobre la coordinación entre la biogénesis flagelar con otros aspectos de la fisiología bacteriana.

Clase II y Clase III

La expresión de los promotores flagelares dependientes de σ^{54} en la cepa SP12 (*fleT* Δ ::*aadA*) reveló dos patrones de expresión. El promotor del operón *fleT*, mostró una actividad mucho mayor en la mutante SP12 y en la cepa SP14/pRS211 (Fig. 15), que en la cepa silvestre. En contraste, el resto de los promotores flagelares mostraron mucho menos actividad en estas cepas que en la cepa silvestre. Estos resultados indican que FleQ es suficiente para activar la expresión de *fleTp* pero no del resto de los promotores flagelares dependientes de σ^{54} . En consecuencia, el operón *fleT*, el cual incluye los genes *fliEFGHIJ*, sería el primer operón en ser transcrito una vez que FleQ empieza a acumularse en el citoplasma, constituyendo la Clase II.

En los ensayos de retardo se observó una mayor afinidad aparente, con respecto al resto de los promotores flagelares probados, de FleQ por el promotor *fleTp*, ya que a pesar de que FleQ participa en la expresión de todos los promotores flagelares dependientes de σ^{54} , únicamente *fleTp* fue retardado por la proteína FleQ.

Es interesante que el primer operón transcrito en la jerarquía contenga los genes que codifican para las proteínas FliI, FliH y FliJ, y FliE. Como se mencionó en la sección de Introducción, FliI es la ATPasa específica del aparato de exportación flagelar y FliH es un componente regulatorio de la actividad de hidrólisis. La proteína FliJ se ha propuesto como chaperona general y FliE es el primer sustrato de exportación del aparato de exportación flagelar. Se ha demostrado que FliI, FliH y FliE interactúan y que FliJ previene la agregación de FliE. Por ello, es factible suponer que cuando el operón de Clase II es expresado, estas cuatro proteínas forman un complejo en el citoplasma hasta que el resto de las proteínas del aparato de exportación son expresadas. Por otro lado, en este primer estadio, la proteína FliF podría dar lugar a la formación del anillo MS y FliG se asociaría a esta estructura (Fig. 22).

En la Clase III de la jerarquía se encuentran el resto de los operones dependientes del factor σ^{54} y de las proteínas FleQ y FleT. Los genes involucrados en la formación del cuerpo basal, aquellos involucrados en la formación del aparato de exportación así como el factor σ^{28} y su factor antisigma FlgM pertenecen a esta clase. En contraste a la jerarquía flagelar de otras bacterias, en donde los genes *motA* y *motB* son expresados junto con el gen *fliC* (flagelina) en la última clase de la jerarquía (33, 91, 99), en *R. sphaeroides* los genes *mot* son expresados junto con los genes del cuerpo basal, como ocurre en *H. pylori* (121, 156).

Clase IV

En una gran cantidad de bacterias los últimos genes requeridos para la síntesis del flagelo, son dependientes del factor σ^{28} . En este trabajo nosotros aislamos una mutante en el gen *fliA* para verificar que los posibles promotores que pertenecen a la Clase IV, sean dependientes de este factor sigma. Nuestros resultados indican que *fliCp*, *FliSp* y *FliDp* son promotores dependientes del factor σ^{28} . El mapeo del sitio de inicio de la transcripción correspondiente a los promotores *fliCp* y *fliDp* mostró una secuencia altamente similar al consenso reportado para los promotores reconocidos por σ^{28} (130); dicha secuencia se ubica a una distancia apropiada de la posición +1 identificada en nuestros ensayos. Estos resultados en conjunto nos llevan a concluir que los genes *fliC*, *fliS* y *fliD* representan la Clase IV de la jerarquía. De acuerdo a nuestros resultados, previamente había sido observado que la expresión del gen *fliC*, requiere de la correcta expresión de los genes de la Clase III (131), sugiriendo que FlgM requiere ser exportado para dar lugar a la expresión de los promotores dependientes del factor σ^{28} , tal y como ocurre en *S. enterica*. Los genes ubicados río abajo de los otros dos promotores dependientes de σ^{28} identificados (*flgKp* y *flgMp*, ver Figs. 14 y 22), son transcritos como parte de la Clase III así como de la Clase IV.

Regulación de la jerarquía por FleQ y FleT

Usualmente la actividad de las EBPs se encuentra regulada por diferentes estímulos, los cuales son detectados a través del dominio NH₂-terminal, o por otras proteínas que se unen a la EBP. La actividad de los activadores de σ^{54} generalmente ocurre controlando el estado de

oligomerización, cambiando de dímeros inactivos a oligómeros activos (136). Las dos EBPs flagelares de *R. sphaeroides* carecen de un dominio NH₂-terminal, sugiriendo que ambas son constitutivamente activas. El hecho de que los promotores de Clase III requieren de ambas proteínas sugiere que éstos son activados por heterooligómeros compuestos por FleQ y FleT. Nuestros resultados muestran que FleT posee actividad ATPasa y es capaz de promover un bajo nivel de expresión de los promotores flagelares, implicando que FleT es una EBP funcional. Dado que FleT carece del dominio HTH sería lógico suponer que FleT llevaría a cabo la activación de la transcripción al asociarse con FleQ. Evidencia de la posible interacción de FleT y FleQ se infiere a partir del cambio en la movilidad del complejo FleQ-DNA, al añadir concentraciones crecientes de la proteína FleT.

A la fecha, el único caso previamente reportado de EBPs capaces de formar heterooligómeros corresponde a las proteínas HrpS y HrpR de *Pseudomonas syringae*. La evidencia experimental sugiere que la completa activación de los promotores del sistema de exportación tipo III denominado *hrp* requiere de ambas proteínas (62). Sin embargo, aún no ha sido posible establecer la razón por la cual se requieren heterooligómeros para llevar a cabo la activación, más aún cuando ambas proteínas cuentan con un dominio de unión a DNA. Al igual que las EBPs flagelares de *R. sphaeroides*, HrpS y HrpR no cuentan con un dominio regulatorio, aunque ha sido propuesto que la proteína HrpV regula negativamente al heterooligómero (62). En la jerarquía transcripcional de *P. aeruginosa*, la actividad de FleQ es controlada negativamente por la proteína FleN (32). Nosotros consideramos que en *R. sphaeroides* la regulación de los genes flagelares se lleva a cabo manteniendo un bajo nivel de expresión de FleQ, el cual sería suficiente para llevar a cabo la activación del promotor *fleTp*, el cual posee una alta afinidad por FleQ. El incremento de FleT trae por consecuencia el aumento de oligómeros funcionales, lo que permite

la transcripción del resto de los promotores flagelares. La razón por la cual FleT regula negativamente la expresión de *fleTp*, puede explicarse invocando la presencia de sitios de baja afinidad en la región “enhancer”; estos sitios podrían unir el heterooligómero e interferir con la activación mediada por FleQ. Cabe mencionar que en el promotor *glnAp2* de *E. coli*, la presencia de sitios de baja afinidad afecta negativamente la activación mediada a través de los sitios de alta afinidad (9). Alternativamente, la formación del heterooligómero FleQ/FleT tendría por consecuencia la disminución de la concentración efectiva de FleQ, lo cual afectaría negativamente la expresión de *fleTp*.

Finalmente vale la pena subrayar que FlgR, la única EBP sin HTH caracterizada hasta el momento, se requiere para la activación de los promotores flagelares de *H. pylori*, que son los únicos promotores dependientes de σ^{54} en esta bacteria (23). En contraste, en *R. sphaeroides* se ha determinado que tanto los promotores flagelares como los promotores involucrados en la fijación de nitrógeno son reconocidos por el factor σ^{54} , lo cual hace de FleT una EBP particular; en este sentido, será interesante establecer los determinantes moleculares por los cuales esta EBP no interfiere con la activación mediada por NifA, o alguna otra EBP presente en *R. sphaeroides*.

Conclusiones:

1. La jerarquía transcripcional de *R. sphaeroides* consta de cuatro niveles.
2. El gen *fleQ* es el operón maestro de la jerarquía.
3. El operón *fleTEFGHIJ* representa la Clase II.
4. La expresión de los operones de la Clase III requiere de FleQ y FleT.

Discusión

En este trabajo se investigó la jerarquía flagelar de *R. sphaeroides*. Previamente, fue demostrado que los genes flagelares involucrados en la formación del gancho y del cuerpo basal son expresados a partir de promotores reconocidos por el factor σ^{54} (131) (ver anexo I). Las proteínas necesarias para activar este tipo de promotores muestran una región central altamente conservada (112), esta región ha permitido identificar a las proteínas activadoras de σ^{54} en la secuencia genómica de varios microorganismos (28, 67, 165); así como deducir su posible función en base al análisis de la región NH₂-terminal y del contexto genómico. Utilizando esta aproximación, nosotros buscamos posibles activadores de σ^{54} en el genoma completo de *R. sphaeroides*. En base al contexto genético, se identificaron dos genes que codifican para posibles EBPs involucradas en la expresión de los genes flagelares. Utilizando técnicas de genética reversa, se aislaron mutantes en cada uno de estos genes; dichas cepas fueron incapaces de nadar, por lo tanto dichos genes fueron denominados *fleQ* y *fleT*.

Basados en evidencia obtenida por análisis de complementación, fusiones transcripcionales, y caracterización bioquímica de las proteínas FleQ y FleT, este trabajo postula la organización de la jerarquía transcripcional y los posibles mecanismos regulatorios involucrados en la expresión de los genes flagelares en *R. sphaeroides* (Fig. 22).

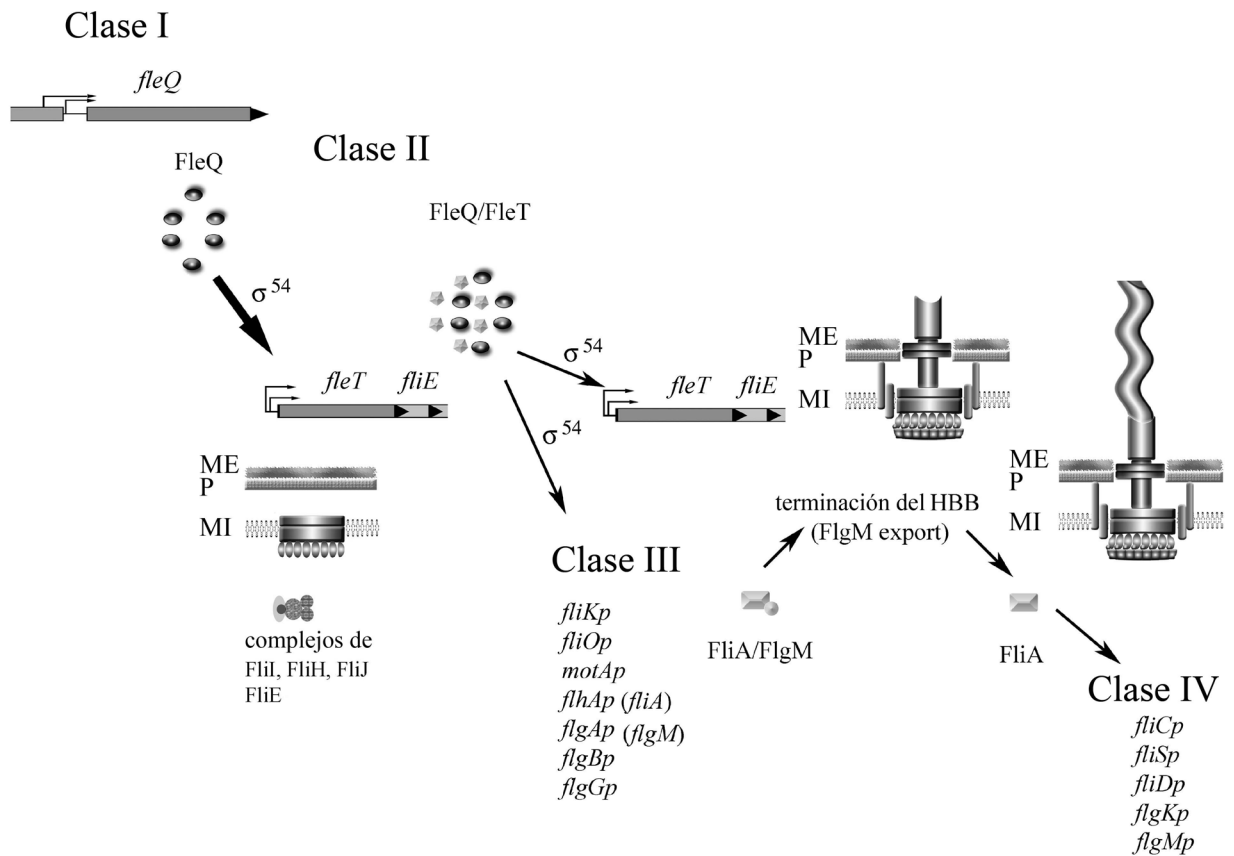


Fig. 22 Modelo propuesto de la jerarquía flagelar en *R. sphaeroides*. ME, membrana externa; P, pared de peptidoglicanos; MI, membrana interna; HBB, hook-basal body (gancho cuerpo basal).

Clase I

El análisis de la dependencia de los promotores flagelares dependientes de σ^{54} por los dos activadores caracterizados en este estudio mostro que para alcanzar un nivel de transcripción similar o mayor al observado en la cepa silvestre, todos son dependientes de la proteína FleQ. Por esta razón se propone que el gen *fleQ*, es el regulador maestro de la jerarquía transcripcional de *R. sphaeroides*.

La secuencia de aminoácidos de FleQ, posee aproximadamente 65 aminoácidos en el extremo NH₂-terminal, antes de iniciar la secuencia representativa de las AAA⁺-ATPasas. Ya

que los aminoácidos de la región NH₂-terminal, no muestran similitud con ningún dominio regulatorio conocido, consideramos que FleQ es activa constitutivamente. Esta posibilidad sugiere que la biogénesis flagelar estaría controlada únicamente por el nivel de expresión de *fleQ*.

La expresión de *fleQ* no fue afectada por la ausencia de RpoN₂, indicando que la transcripción de *fleQ* no requiere de la expresión de ningún otro gen del regulón flagelar.

Experimentos de protección a RNAsas sugirieron que *fleQ* podría expresarse a partir de dos promotores o quizá a partir de un promotor distal que podría ser procesado postranscripcionalmente. En cualquiera de estos casos, el estudio de los mecanismos que controlan la expresión de *fleQ* brindará información relevante sobre la coordinación entre la biogénesis flagelar con otros aspectos de la fisiología bacteriana.

Clase II y Clase III

La expresión de los promotores flagelares dependientes de σ^{54} en la cepa SP12 (*fleT* Δ ::*aadA*) reveló dos patrones de expresión. El promotor del operón *fleT*, mostró una actividad mucho mayor en la mutante SP12 y en la cepa SP14/pRS211 (Fig. 15), que en la cepa silvestre. En contraste, el resto de los promotores flagelares mostraron mucho menos actividad en estas cepas que en la cepa silvestre. Estos resultados indican que FleQ es suficiente para activar la expresión de *fleTp* pero no del resto de los promotores flagelares dependientes de σ^{54} . En consecuencia, el operón *fleT*, el cual incluye los genes *fliEFGHIJ*, sería el primer operón en ser transcrito una vez que FleQ empieza a acumularse en el citoplasma, constituyendo la Clase II.

En los ensayos de retardo se observó una mayor afinidad aparente, con respecto al resto de los promotores flagelares probados, de FleQ por el promotor *fleTp*, ya que a pesar de que FleQ participa en la expresión de todos los promotores flagelares dependientes de σ^{54} , únicamente *fleTp* fue retardado por la proteína FleQ.

Es interesante que el primer operón transcrito en la jerarquía contenga los genes que codifican para las proteínas FliI, FliH y FliJ, y FliE. Como se mencionó en la sección de Introducción, FliI es la ATPasa específica del aparato de exportación flagelar y FliH es un componente regulatorio de la actividad de hidrólisis. La proteína FliJ se ha propuesto como chaperona general y FliE es el primer sustrato de exportación del aparato de exportación flagelar. Se ha demostrado que FliI, FliH y FliE interactúan y que FliJ previene la agregación de FliE. Por ello, es factible suponer que cuando el operón de Clase II es expresado, estas cuatro proteínas forman un complejo en el citoplasma hasta que el resto de las proteínas del aparato de exportación son expresadas. Por otro lado, en este primer estadio, la proteína FliF podría dar lugar a la formación del anillo MS y FliG se asociaría a esta estructura (Fig. 22).

En la Clase III de la jerarquía se encuentran el resto de los operones dependientes del factor σ^{54} y de las proteínas FleQ y FleT. Los genes involucrados en la formación del cuerpo basal, aquellos involucrados en la formación del aparato de exportación así como el factor σ^{28} y su factor antisigma FlgM pertenecen a esta clase. En contraste a la jerarquía flagelar de otras bacterias, en donde los genes *motA* y *motB* son expresados junto con el gen *fliC* (flagelina) en la última clase de la jerarquía (33, 91, 99), en *R. sphaeroides* los genes *mot* son expresados junto con los genes del cuerpo basal, como ocurre en *H. pylori* (121, 156).

Clase IV

En una gran cantidad de bacterias los últimos genes requeridos para la síntesis del flagelo, son dependientes del factor σ^{28} . En este trabajo nosotros aislamos una mutante en el gen *fliA* para verificar que los posibles promotores que pertenecen a la Clase IV, sean dependientes de este factor sigma. Nuestros resultados indican que *fliCp*, *FliSp* y *FliDp* son promotores dependientes del factor σ^{28} . El mapeo del sitio de inicio de la transcripción correspondiente a los promotores *fliCp* y *fliDp* mostró una secuencia altamente similar al consenso reportado para los promotores reconocidos por σ^{28} (130); dicha secuencia se ubica a una distancia apropiada de la posición +1 identificada en nuestros ensayos. Estos resultados en conjunto nos llevan a concluir que los genes *fliC*, *fliS* y *fliD* representan la Clase IV de la jerarquía. De acuerdo a nuestros resultados, previamente había sido observado que la expresión del gen *fliC*, requiere de la correcta expresión de los genes de la Clase III (131), sugiriendo que FlgM requiere ser exportado para dar lugar a la expresión de los promotores dependientes del factor σ^{28} , tal y como ocurre en *S. enterica*. Los genes ubicados río abajo de los otros dos promotores dependientes de σ^{28} identificados (*flgKp* y *flgMp*, ver Figs. 14 y 22), son transcritos como parte de la Clase III así como de la Clase IV.

Regulación de la jerarquía por FleQ y FleT

Usualmente la actividad de las EBPs se encuentra regulada por diferentes estímulos, los cuales son detectados a través del dominio NH₂-terminal, o por otras proteínas que se unen a la EBP. La actividad de los activadores de σ^{54} generalmente ocurre controlando el estado de

oligomerización, cambiando de dímeros inactivos a oligómeros activos (136). Las dos EBPs flagelares de *R. sphaeroides* carecen de un dominio NH₂-terminal, sugiriendo que ambas son constitutivamente activas. El hecho de que los promotores de Clase III requieren de ambas proteínas sugiere que éstos son activados por heterooligómeros compuestos por FleQ y FleT. Nuestros resultados muestran que FleT posee actividad ATPasa y es capaz de promover un bajo nivel de expresión de los promotores flagelares, implicando que FleT es una EBP funcional. Dado que FleT carece del dominio HTH sería lógico suponer que FleT llevaría a cabo la activación de la transcripción al asociarse con FleQ. Evidencia de la posible interacción de FleT y FleQ se infiere a partir del cambio en la movilidad del complejo FleQ-DNA, al añadir concentraciones crecientes de la proteína FleT.

A la fecha, el único caso previamente reportado de EBPs capaces de formar heterooligómeros corresponde a las proteínas HrpS y HrpR de *Pseudomonas syringae*. La evidencia experimental sugiere que la completa activación de los promotores del sistema de exportación tipo III denominado *hrp* requiere de ambas proteínas (62). Sin embargo, aún no ha sido posible establecer la razón por la cual se requieren heterooligómeros para llevar a cabo la activación, más aún cuando ambas proteínas cuentan con un dominio de unión a DNA. Al igual que las EBPs flagelares de *R. sphaeroides*, HrpS y HrpR no cuentan con un dominio regulatorio, aunque ha sido propuesto que la proteína HrpV regula negativamente al heterooligómero (62). En la jerarquía transcripcional de *P. aeruginosa*, la actividad de FleQ es controlada negativamente por la proteína FleN (32). Nosotros consideramos que en *R. sphaeroides* la regulación de los genes flagelares se lleva a cabo manteniendo un bajo nivel de expresión de FleQ, el cual sería suficiente para llevar a cabo la activación del promotor *fleTp*, el cual posee una alta afinidad por FleQ. El incremento de FleT trae por consecuencia el aumento de oligómeros funcionales, lo que permite

la transcripción del resto de los promotores flagelares. La razón por la cual FleT regula negativamente la expresión de *fleTp*, puede explicarse invocando la presencia de sitios de baja afinidad en la región “enhancer”; estos sitios podrían unir el heterooligómero e interferir con la activación mediada por FleQ. Cabe mencionar que en el promotor *glnAp2* de *E. coli*, la presencia de sitios de baja afinidad afecta negativamente la activación mediada a través de los sitios de alta afinidad (9). Alternativamente, la formación del heterooligómero FleQ/FleT tendría por consecuencia la disminución de la concentración efectiva de FleQ, lo cual afectaría negativamente la expresión de *fleTp*.

Finalmente vale la pena subrayar que FlgR, la única EBP sin HTH caracterizada hasta el momento, se requiere para la activación de los promotores flagelares de *H. pylori*, que son los únicos promotores dependientes de σ^{54} en esta bacteria (23). En contraste, en *R. sphaeroides* se ha determinado que tanto los promotores flagelares como los promotores involucrados en la fijación de nitrógeno son reconocidos por el factor σ^{54} , lo cual hace de FleT una EBP particular; en este sentido, será interesante establecer los determinantes moleculares por los cuales esta EBP no interfiere con la activación mediada por NifA, o alguna otra EBP presente en *R. sphaeroides*.

Conclusiones:

1. La jerarquía transcripcional de *R. sphaeroides* consta de cuatro niveles.
2. El gen *fleQ* es el operón maestro de la jerarquía.
3. El operón *fleTEFGHIJ* representa la Clase II.
4. La expresión de los operones de la Clase III requiere de FleQ y FleT.

la transcripción del resto de los promotores flagelares. La razón por la cual FleT regula negativamente la expresión de *fleTp*, puede explicarse invocando la presencia de sitios de baja afinidad en la región “enhancer”; estos sitios podrían unir el heterooligómero e interferir con la activación mediada por FleQ. Cabe mencionar que en el promotor *glnAp2* de *E. coli*, la presencia de sitios de baja afinidad afecta negativamente la activación mediada a través de los sitios de alta afinidad (9). Alternativamente, la formación del heterooligómero FleQ/FleT tendría por consecuencia la disminución de la concentración efectiva de FleQ, lo cual afectaría negativamente la expresión de *fleTp*.

Finalmente vale la pena subrayar que FlgR, la única EBP sin HTH caracterizada hasta el momento, se requiere para la activación de los promotores flagelares de *H. pylori*, que son los únicos promotores dependientes de σ^{54} en esta bacteria (23). En contraste, en *R. sphaeroides* se ha determinado que tanto los promotores flagelares como los promotores involucrados en la fijación de nitrógeno son reconocidos por el factor σ^{54} , lo cual hace de FleT una EBP particular; en este sentido, será interesante establecer los determinantes moleculares por los cuales esta EBP no interfiere con la activación mediada por NifA, o alguna otra EBP presente en *R. sphaeroides*.

Conclusiones:

1. La jerarquía transcripcional de *R. sphaeroides* consta de cuatro niveles.
2. El gen *fleQ* es el operón maestro de la jerarquía.
3. El operón *fleTEFGHIJ* representa la Clase II.
4. La expresión de los operones de la Clase III requiere de FleQ y FleT.

5. Los genes *fliA* y *FlgM* son expresados como parte de la Clase III, así como la mayoría de los genes involucrados en la formación del gancho y del cuerpo basal.
6. Los genes *fliC*, *fliS*, *fliD*, *flgKL* y *flgMRSP6087* representan la Clase IV de la jerarquía y son expresados del factor σ^{28} .

Perspectivas:

En cuanto a los aspectos relacionados con la caracterización detallada de FleQ y FleT, será necesario:

1. Caracterizar bioquímicamente los complejos formados por FleQ, por FleT y por FleQ/FleT. Determinar la cinética de hidrólisis de ATP para cada una de estas proteínas, el grado de oligomerización, y si estas propiedades son alteradas por la presencia de DNA.
2. Identificar a nivel molecular las regiones de FleT y FleQ involucradas en su asociación específica.
3. Identificar en la region regulatoria de los promotores flagelares, los sitios de unión a FleQ y a FleQ/FleT.
4. Probablemente en relación al punto anterior, será interesante investigar la razón por la cual FleT regula negativamente la expresión de su propio operón.

En cuanto a los aspectos relacionados a la jerarquía flagelar será interesante determinar:

1. Sí la transcripción de *fleQ* se encuentra sujeta a algún tipo de control, o sí existen controles postranscripcionales que limiten la acumulación de la proteína.
2. Dado que la bacteria cuenta con un solo flagelo, será interesante investigar si la acumulación de FleQ coincide con algún evento relacionado con el ciclo celular.
3. Corroborar la dependencia de los promotores *flgKp* y *flgMp* por σ^{28} .

Contribuciones:

- Mediante experimentos de mutagénesis dirigida de las secuencias promotoras *fliOp*, *flgBp* y *fliKp*; y por experimentos de mapeo del sitio de inicio de la transcripción, se determinó que los genes involucrados en la formación del gancho y del cuerpo basal flagelar en *R. sphaeroides* eran transcritos por el factor $E\sigma^{54}$ (131).
- Posteriormente, se determinó que en esta bacteria existían cuatro diferentes factores σ^{54} , los cuales no eran funcionalmente intercambiables. La evidencia experimental indicó que el factor σ^{54-2} (RpoN2) es el único responsable de la expresión de los genes flagelares (Anexo II).
- Se publicaron los datos correspondientes al presente trabajo de Tesis (Anexo I).
- Finalmente, nuestros resultados nos permitieron postular un modelo para explicar la especificidad de los factores σ^{54} en esta bacteria. Esta propuesta postula la existencia de dos mecanismos independientes que determinan la especificidad transcripcional de estos

- factores σ . Uno de ellos, implica un reconocimiento diferencial de la secuencia promotora, y el otro, la interacción específica de las EBPs con un factor sigma particular (Anexo III).
- De forma colateral, se llevaron a cabo estudios relacionados con el control de la rotación del flagelo de *R. sphaeroides*. Se determinó que los primeros 20 aminoácidos de la proteína FliM son esenciales para llevar a cabo la rotación del flagelo, probablemente por su interacción con la proteína CheY (Anexo IV).

Material y Metodos

Cepas bacterianas y Medios de cultivo. Los plásmidos y las cepas de *Escherichia coli* y *R. sphaeroides* utilizadas en este estudio se encuentran enlistadas en la Tabla X. Las cepas de *E. coli* fueron crecidas en medio LB (1% bactotripton, 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 µg/ml), tetraciclina (10 µg/ml), espectinomicina (50 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml).

Las cepas de *Rhodobacter sphaeroides* fueron crecidas en medio mínimo de succinato (152), 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/l 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 µg/ml), tetraciclina (1µg/ml); espectinomicina (25 µg/ml), y kanamicina (25 µg/ml).

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

Transformación de *E. coli* (10). 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 $CaCl_2$ 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 $CaCl_2$ 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 μ l de las células competentes y se incuban 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 incuban 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(34). 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 incuban por 6 hrs. a 30 °C. Las células se cosechan y se platan en medio selectivo.

Purificación de plásmidos en pequeña escala (10). Las células de un cultivo de 2 ml, crecido durante toda la noche, son cosechadas y resuspendidas en 300 μ l de solución STET [8% sacarosa, 5% tritón, 50 mM EDTA pH 8, 50 mM Tris-HCl pH 8]. Se añaden 25 μ l de lisozima (10 μ g/ml). Se agita en vortex 2 seg. y se incuban 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 μ l 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 μ l de agua y se utilizan 5 μ l 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*.

Determinación de β -glucuronidasa (GUS) (68). 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% Tritón 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-metilumbeliferil- 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 μ l 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 pmoles de 4-metilumbeliferona formado por minuto por mg de proteína.

Ensayo de Protección a Ribonucleasas. EL RNA total de *R. sphaeroides* fue extraído mediante lisis de las células en presencia de 0.5% SDS y fenol caliente (65°C), el lisado se extrajo tres veces más y posteriormente fue precipitado con acetato de sodio 0.3 M y etanol (1). La integridad del RNA se verificó en un gel de agarosa al 1.5%. El ensayo de protección fue llevado a cabo usando el estuche de reactivos RPAIII (Ambion) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La sonda de RNA se obtuvo utilizando la RNA polimerasa del bacteriófago SP6 y las condiciones de reacción incluidas con los reactivos del estuche MAXIscript (Ambion).

Mapeo del sitio de inicio de la transcripción mediante la técnica de extensión del cebador (10). El RNA total de *R. sphaeroides* (50-100 µg) 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 polinucleotido quinasa y 20 µCi de γ -P³²ATP. 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%.

Purificación de Proteína. Las cepas LMG174/pBAD-HisBFleT o LMG174/pBAD-HisBFleQ fueron crecidas en 30 ml de LB hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0.5. El cultivo fue adicionado con arabinosa al 0.02% e incubado durante 2 hr. a 37 C con agitación moderada (200 rpm). Las células fueron colectadas por centrifugación y resuspendidas en 500 µl de buffer TGED [Tris-HCl 10 mM pH 8, glicerol 30%, EDTA

0.1 mM, DTT 1mM]. Posterior a la adición de lisozima (100 µg/ml), las células fueron sonicadas utilizando cuatro pulsos de 5 sec con intervalos de 1 min. a 4 C. El lisado fue centrifugado a 14,000 rpm 5 min. y el sobrenadante recuperado en un tubo limpio. Con el fin de eliminar cualquier resto de material insoluble, este último paso fue repetido en dos ocasiones. Se añadió al sobrenadante 200 µl de agarosa acoplada a níquel (Qiagen) y se permitió la unión de la proteína durante 1 hr a 4 C, con agitación ocasional. La proteína acoplada a la resina fue lavada y recuperada de acuerdo a las instrucciones del proveedor de la resina. La proteína fue dializada contra buffer TGED pH 7, para eliminar el imidazol utilizado para eluir la proteína. La concentración de la misma fue determinada mediante el ensayo de Bradford (22).

Ensayo de Dicroísmo circular. Previo al ensayo, las proteínas purificadas fueron dializadas en buffer de fosfatos 1 mM pH7, NaCl 10 mM y glicerol 30%. Se utilizó un volumen 100 veces mayor al volumen de la muestra y se realizaron cuatro cambios. La integridad estructural de las proteínas His-FleT y His-FleQ fue analizada obteniendo los valores del espectro de CD y utilizando el programa CDPro (<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/main.html>).

Determinación de la actividad de hidrólisis de ATP. Los ensayos de ATPasa se realizaron en base a los protocolos reportados previamente (74, 94, 149). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl a 30 °C en un buffer conteniendo: 25 mM HEPES pH 7, 20 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 2 mM DTT, 0.6 mM ATP y 2 µM [γ -P³²] ATP (3000 Ci/mmol). Las proteínas fueron añadidas a una concentración final de 200 µM y las reacciones fueron iniciadas con la adición del ATP. A diferentes tiempos se tomaron alícuotas de 2 µl que fueron colocadas en una placa de cromatografía de capa

fina (PEI-celulosa). Las placas fueron lavadas con metanol y desarrolladas con 0.4 M K_2HPO_4 y 0.7 M ácido bórico. Finalmente las placas fueron cuantificadas en un equipo de visualización de radioactividad (Phosphorimager).

Ensayo de retardo de la movilidad electroforetica. Las reacciones de unión entre el DNA marcado y la proteína se llevaron a cabo en buffer STA (27) a pH 7.0 y 30 °C, en un volumen total de 15 μ l. Las reacciones incluyeron 0.5 μ g de poli dI-dC, la sonda de DNA marcada en su extremo con P^{32} , y las concentraciones de proteína indicadas en el texto. Después de una incubación de 20 min. las muestras se cargaron en un gel nativo de poliacrilamida al 4.5%, el cual fue corrido a 10 mA en buffer MENP (20 mM MOPS, 8 mM CH_3COONa , 1 mM EDTA pH 7 a 4 °C. Posterior a la electroforesis las bandas radioactivas fueron visualizadas por autoradiografía.

Bibliografia

1. **Aiba, H., S. Adhya, and B. de Crombrughe.** 1981. Evidence for two functional gal promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J.Biol.Chem.* **256**:11905-11910.
2. **Akeda, Y. and J. E. Galan.** 2004. Genetic analysis of the *Salmonella enterica* type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains. *J.Bacteriol.* **186**:2402-2412.
3. **Akiba, T., H. Yoshimura, and K. Namba.** 1991. Monolayer crystallization of flagellar L-P rings by sequential addition and depletion of lipid. *Science* **252**:1544-1546.
4. **Aldridge, P. and K. T. Hughes.** 2002. Regulation of flagellar assembly. *Curr.Opin.Microbiol.* **5**:160-165.
5. **Anderson, D. K. and A. Newton.** 1997. Posttranscriptional regulation of *Caulobacter* flagellin genes by a late flagellum assembly checkpoint. *J.Bacteriol.* **179**:2281-2288.
6. **Anderson, P. E. and J. W. Gober.** 2000. FlbT, the post-transcriptional regulator of flagellin synthesis in *Caulobacter crescentus*, interacts with the 5' untranslated region of flagellin mRNA. *Mol.Microbiol.* **38**:41-52.
7. **Armitage, J. P. and R. M. Macnab.** 1987. Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J.Bacteriol.* **169**:514-518.
8. **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.
9. **Atkinson, M. R., N. Pattaramanon, and A. J. Ninfa.** 2002. Governor of the glnAp2 promoter of *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* **46**:1247-1257.
10. **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*.
11. **Auvray, F., A. J. Ozin, L. Claret, and C. Hughes.** 2002. Intrinsic membrane targeting of the flagellar export ATPase FliI: interaction with acidic phospholipids and FliH. *J.Mol.Biol.* **318**:941-950.
12. **Auvray, F., J. Thomas, G. M. Fraser, and C. Hughes.** 2001. Flagellin polymerisation control by a cytosolic export chaperone. *J.Mol.Biol.* **308**:221-229.
13. **Baker, M. D., P. M. Wolanin, and J. B. Stock.** 2006. Signal transduction in bacterial chemotaxis. *Bioessays* **28**:9-22.

14. **Barrios, H., B. Valderrama, and E. Morett.** 1999. Compilation and analysis of sigma(54)-dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **27**:4305-4313.
15. **Bennett, J. C. and C. Hughes.** 2000. From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperones. *Trends Microbiol.* **8**:202-204.
16. **Bennett, J. C., J. Thomas, G. M. Fraser, and C. Hughes.** 2001. Substrate complexes and domain organization of the *Salmonella* flagellar export chaperones FlgN and FliT. *Mol.Microbiol.* **39**:781-791.
17. **Berg, H. C.** 2003. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu.Rev.Biochem.* **72**:19-54.
18. **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.
19. **Blair, D. F. and H. C. Berg.** 1990. The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor. *Cell* **60**:439-449.
20. **Bordes, P., S. R. Wigneshweraraj, J. Schumacher, X. Zhang, M. Chaney, and M. Buck.** 2003. The ATP hydrolyzing transcription activator phage shock protein F of *Escherichia coli*: identifying a surface that binds sigma 54. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**:2278-2283.
21. **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.
22. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**:248-254.
23. **Brahmachary, P., M. G. Dashti, J. W. Olson, and T. R. Hoover.** 2004. *Helicobacter pylori* FlgR is an enhancer-independent activator of sigma54-RNA polymerase holoenzyme. *J.Bacteriol.* **186**:4535-4542.
24. **Braun, T. F., S. Poulson, J. B. Gully, J. C. Empey, S. Van Way, A. Putnam, and D. F. Blair.** 1999. Function of proline residues of MotA in torque generation by the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **181**:3542-3551.
25. **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.
26. **Buck, M., M. T. Gallegos, D. J. Studholme, Y. Guo, and J. D. Gralla.** 2000. The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. *J.Bacteriol.* **182**:4129-4136.

27. **Cannon, W. V., M. T. Gallegos, and M. Buck.** 2000. Isomerization of a binary sigma-promoter DNA complex by transcription activators. *Nat.Struct.Biol.* **7**:594-601.
28. **Cases, I., D. W. Ussery, and L. de, V.** 2003. The sigma54 regulon (sigmulon) of *Pseudomonas putida*. *Environ.Microbiol.* **5**:1281-1293.
29. **Chun, S. Y. and J. S. Parkinson.** 1988. Bacterial motility: membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein. *Science* **239**:276-278.
30. **Claret, L., S. R. Calder, M. Higgins, and C. Hughes.** 2003. Oligomerization and activation of the FliI ATPase central to bacterial flagellum assembly. *Mol.Microbiol.* **48**:1349-1355.
31. **Dasgupta, N., E. P. Ferrell, K. J. Kanack, S. E. West, and R. Ramphal.** 2002. *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is sigma70 dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J.Bacteriol.* **184**:5240-5250.
32. **Dasgupta, N. and R. Ramphal.** 2001. Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.* **183**:6636-6644.
33. **Dasgupta, N., M. C. Wolfgang, A. L. Goodman, S. K. Arora, J. Jyot, S. Lory, and R. Ramphal.** 2003. A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol.Microbiol.* **50**:809-824.
34. **Davis, J., T. J. Donohue, and S. Kaplan.** 1988. Construction, characterization, and complementation of a Puf- mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J.Bacteriol.* **170**:320-329.
35. **DePamphilis, M. L. and J. Adler.** 1971. Attachment of flagellar basal bodies to the cell envelope: specific attachment to the outer, lipopolysaccharide membrane and the cytoplasmic membrane. *J.Bacteriol.* **105**:396-407.
36. **Dreyfus, G., A. W. Williams, I. Kawagishi, and R. M. Macnab.** 1993. Genetic and biochemical analysis of *Salmonella typhimurium* FliI, a flagellar protein related to the catalytic subunit of the F₀F₁ ATPase and to virulence proteins of mammalian and plant pathogens. *J.Bacteriol.* **175**:3131-3138.
37. **Erdmann, R., F. F. Wiebel, A. Flessau, J. Rytka, A. Beyer, K. U. Frohlich, and W. H. Kunau.** 1991. PAS1, a yeast gene required for peroxisome biogenesis, encodes a member of a novel family of putative ATPases. *Cell* **64**:499-510.
38. **Evdokimov, A. G., J. Phan, J. E. Tropea, K. M. Routzahn, H. K. Peters, M. Pokross, and D. S. Waugh.** 2003. Similar modes of polypeptide recognition by export chaperones in flagellar biosynthesis and type III secretion. *Nat.Struct.Biol.* **10**:789-793.

39. **Fan, F. and R. M. Macnab.** 1996. Enzymatic characterization of FliI. An ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J.Biol.Chem.* **271**:31981-31988.
40. **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.
41. **Ferris, H. U., Y. Furukawa, T. Minamino, M. B. Kroetz, M. Kihara, K. Namba, and R. M. Macnab.** 2005. FlhB regulates ordered export of flagellar components via autocleavage mechanism. *J.Biol.Chem.* **280**:41236-41242.
42. **Fraser, G. M., J. C. Bennett, and C. Hughes.** 1999. Substrate-specific binding of hook-associated proteins by FlgN and FliT, putative chaperones for flagellum assembly. *Mol.Microbiol.* **32**:569-580.
43. **Fraser, G. M., B. Gonzalez-Pedrajo, J. R. Tame, and R. M. Macnab.** 2003. Interactions of FliJ with the Salmonella type III flagellar export apparatus. *J.Bacteriol.* **185**:5546-5554.
44. **Fraser, G. M., T. Hirano, H. U. Ferris, L. L. Devgan, M. Kihara, and R. M. Macnab.** 2003. Substrate specificity of type III flagellar protein export in *Salmonella* is controlled by subdomain interactions in FlhB. *Mol.Microbiol.* **48**:1043-1057.
45. **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.
46. **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.
47. **Gonzalez-Pedrajo, B., G. M. Fraser, T. Minamino, and R. M. Macnab.** 2002. Molecular dissection of Salmonella FliH, a regulator of the ATPase FliI and the type III flagellar protein export pathway. *Mol.Microbiol.* **45**:967-982.
48. **Gonzalez-Pedrajo, B., T. Minamino, M. Kihara, and K. Namba.** 2006. Interactions between C ring proteins and export apparatus components: a possible mechanism for facilitating type III protein export. *Mol.Microbiol.* **60**:984-998.
49. **Gruber, T. M. and C. A. Gross.** 2003. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu.Rev.Microbiol.* **57**:441-466.
50. **Hanson, P. I. and S. W. Whiteheart.** 2005. AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **6**:519-529.

51. **Harrison, D. M., H. L. Packer, and J. P. Armitage.** 1994. Swimming speed and chemokinetic response of *Rhodobacter sphaeroides* investigated by natural manipulation of the membrane potential. *FEBS Lett.* **348**:37-40.
52. **Hirano, T., T. Minamino, and R. M. Macnab.** 2001. The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase. *J.Mol.Biol.* **312**:359-369.
53. **Hirano, T., T. Minamino, K. Namba, and R. M. Macnab.** 2003. Substrate specificity classes and the recognition signal for *Salmonella* type III flagellar export. *J.Bacteriol.* **185**:2485-2492.
54. **Hirano, T., S. Yamaguchi, K. Oosawa, and S. Aizawa.** 1994. Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* **176**:5439-5449.
55. **Homma, M., S. Aizawa, G. E. Dean, and R. M. Macnab.** 1987. Identification of the M-ring protein of the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**:7483-7487.
56. **Homma, M., D. J. DeRosier, and R. M. Macnab.** 1990. Flagellar hook and hook-associated proteins of *Salmonella typhimurium* and their relationship to other axial components of the flagellum. *J.Mol.Biol.* **213**:819-832.
57. **Homma, M., Y. Komeda, T. Iino, and R. M. Macnab.** 1987. The *flaFIX* gene product of *Salmonella typhimurium* is a flagellar basal body component with a signal peptide for export. *J.Bacteriol.* **169**:1493-1498.
58. **Homma, M., K. Kutsukake, M. Hasebe, T. Iino, and R. M. Macnab.** 1990. FlgB, FlgC, FlgF and FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J.Mol.Biol.* **211**:465-477.
59. **Homma, M., K. Ohnishi, T. Iino, and R. M. Macnab.** 1987. Identification of flagellar hook and basal body gene products (FlaFV, FlaFVI, FlaFVII and FlaFVIII) in *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* **169**:3617-3624.
60. **Hueck, C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**:379-433.
61. **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.
62. **Hutcheson, S. W., J. Bretz, T. Sussan, S. Jin, and K. Pak.** 2001. Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate hrp-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. *J.Bacteriol.* **183**:5589-5598.

63. **Ikeda, T., S. Asakura, and R. Kamiya.** 1989. Total reconstitution of *Salmonella* flagellar filaments from hook and purified flagellin and hook-associated proteins in vitro. *J.Mol.Biol.* **209**:109-114.
64. **Ikeda, T., M. Homma, T. Iino, S. Asakura, and R. Kamiya.** 1987. Localization and stoichiometry of hook-associated proteins within *Salmonella typhimurium* flagella. *J.Bacteriol.* **169**:1168-1173.
65. **Ingham, C. J. and J. P. Armitage.** 1987. Involvement of transport in *Rhodobacter sphaeroides* chemotaxis. *J.Bacteriol.* **169**:5801-5807.
66. **Jacobs, M. H., H. T. van der, B. Tolner, A. J. Driessen, and W. N. Konings.** 1995. Expression of the *gltP* gene of *Escherichia coli* in a glutamate transport-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides* restores chemotaxis to glutamate. *Mol.Microbiol.* **18**:641-647.
67. **Jakobsen, J. S., L. Jelsbak, L. Jelsbak, R. D. Welch, C. Cummings, B. Goldman, E. Stark, S. Slater, and D. Kaiser.** 2004. Sigma54 enhancer binding proteins and *Myxococcus xanthus* fruiting body development. *J.Bacteriol.* **186**:4361-4368.
68. **Jefferson, R. A., S. M. Burgess, and D. Hirsh.** 1986. beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**:8447-8451.
69. **Jenal, U.** 2000. Signal transduction mechanisms in *Caulobacter crescentus* development and cell cycle control. *FEMS Microbiol.Rev.* **24**:177-191.
70. **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.
71. **Jones, C. J., M. Homma, and R. M. Macnab.** 1987. Identification of proteins of the outer (L and P) rings of the flagellar basal body of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **169**:1489-1492.
72. **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.
73. **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.
74. **Jovanovic, G., J. Rakonjac, and P. Model.** 1999. In vivo and in vitro activities of the *Escherichia coli* sigma54 transcription activator, PspF, and its DNA-binding mutant, PspFDeltaHTH. *J.Mol.Biol.* **285**:469-483.

75. **Katayama, E., T. Shiraishi, K. Oosawa, N. Baba, and S. Aizawa.** 1996. Geometry of the flagellar motor in the cytoplasmic membrane of *Salmonella typhimurium* as determined by stereo-photogrammetry of quick-freeze deep-etch replica images. *J.Mol.Biol.* **255**:458-475.
76. **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.
77. **Khan, S., M. Dapice, and T. S. Reese.** 1988. Effects of mot gene expression on the structure of the flagellar motor. *J.Mol.Biol.* **202**:575-584.
78. **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.
79. **Ko, M. and C. Park.** 2000. Two novel flagellar components and H-NS are involved in the motor function of *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* **303**:371-382.
80. **Kojima, S. and D. F. Blair.** 2004. Solubilization and purification of the MotA/MotB complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **43**:26-34.
81. **Koo, I. C. and R. S. Stephens.** 2003. A developmentally regulated two-component signal transduction system in *Chlamydia*. *J.Biol.Chem.* **278**:17314-17319.
82. **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.
83. **Kubori, T., N. Shimamoto, S. Yamaguchi, K. Namba, and S. Aizawa.** 1992. Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J.Mol.Biol.* **226**:433-446.
84. **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.
85. **Kustu, S., A. K. North, and D. S. Weiss.** 1991. Prokaryotic transcriptional enhancers and enhancer-binding proteins. *Trends Biochem.Sci.* **16**:397-402.
86. **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.
87. **Kutsukake, K.** 1997. Autogenous and global control of the flagellar master operon, *flhD*, in *Salmonella typhimurium*. *Mol.Gen.Genet.* **254**:440-448.

88. **Kutsukake, K. and T. Iino.** 1994. Role of the FliA-FlgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* **176**:3598-3605.
89. **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.
90. **Kutsukake, K., T. Minamino, and T. Yokoseki.** 1994. Isolation and characterization of FliK-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* **176**:7625-7629.
91. **Kutsukake, K., Y. Ohya, and T. Iino.** 1990. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* **172**:741-747.
92. **Lane, M. C., P. W. O'Toole, and S. A. Moore.** 2006. Molecular basis of the interaction between the flagellar export proteins FliI and FliH from *Helicobacter pylori*. *J.Biol.Chem.* **281**:508-517.
93. **Lee, S. Y., T. A. De La, D. Yan, S. Kustu, B. T. Nixon, and D. E. Wemmer.** 2003. Regulation of the transcriptional activator NtrC1: structural studies of the regulatory and AAA+ ATPase domains. *Genes Dev.* **17**:2552-2563.
94. **Lill, R., W. Dowhan, and W. Wickner.** 1990. The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell* **60**:271-280.
95. **Liu, X. and P. Matsumura.** 1994. The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J.Bacteriol.* **176**:7345-7351.
96. **Macnab, R. M.** 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu.Rev.Microbiol.* **57**:77-100.
97. **Maki, S., F. Vonderviszt, Y. Furukawa, K. Imada, and K. Namba.** 1998. Plugging interactions of HAP2 pentamer into the distal end of flagellar filament revealed by electron microscopy. *J.Mol.Biol.* **277**:771-777.
98. **Mangan, E. K., J. Malakooti, A. Caballero, P. Anderson, B. Ely, and J. W. Gober.** 1999. FlbT couples flagellum assembly to gene expression in *Caulobacter crescentus*. *J.Bacteriol.* **181**:6160-6170.
99. **McCarter, L. L.** 2006. Regulation of flagella. *Curr.Opin.Microbiol.* **9**:180-186.
100. **McMurry, J. L., J. S. Van Arnem, M. Kihara, and R. M. Macnab.** 2004. Analysis of the cytoplasmic domains of *Salmonella* FlhA and interactions with components of the flagellar export machinery. *J.Bacteriol.* **186**:7586-7592.

101. **Menard, R., P. Sansonetti, C. Parsot, and T. Vasselon.** 1994. Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell* **79**:515-525.
102. **Milcamps, A., A. Van Dommelen, J. Stigter, J. Vanderleyden, and F. J. de Bruijn.** 1996. The *Azospirillum brasilense rpoN* gene is involved in nitrogen fixation, nitrate assimilation, ammonium uptake, and flagellar biosynthesis. *Can.J.Microbiol.* **42**:467-478.
103. **Minamino, T., R. Chu, S. Yamaguchi, and R. M. Macnab.** 2000. Role of FliJ in flagellar protein export in *Salmonella*. *J.Bacteriol.* **182**:4207-4215.
104. **Minamino, T., B. Gonzalez-Pedrajo, M. Kihara, K. Namba, and R. M. Macnab.** 2003. The ATPase FliI can interact with the type III flagellar protein export apparatus in the absence of its regulator, FliH. *J.Bacteriol.* **185**:3983-3988.
105. **Minamino, T., B. Gonzalez-Pedrajo, K. Oosawa, K. Namba, and R. M. Macnab.** 2002. Structural properties of FliH, an ATPase regulatory component of the *Salmonella* type III flagellar export apparatus. *J.Mol.Biol.* **322**:281-290.
106. **Minamino, T. and R. M. Macnab.** 1999. Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J.Bacteriol.* **181**:1388-1394.
107. **Minamino, T. and R. M. Macnab.** 2000. Domain structure of *Salmonella* FlhB, a flagellar export component responsible for substrate specificity switching. *J.Bacteriol.* **182**:4906-4914.
108. **Minamino, T. and R. M. Macnab.** 2000. FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. *Mol.Microbiol.* **37**:1494-1503.
109. **Minamino, T. and R. M. Macnab.** 2000. Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Mol.Microbiol.* **35**:1052-1064.
110. **Minamino, T. and K. Namba.** 2004. Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.* **7**:5-17.
111. **Minamino, T., S. Yamaguchi, and R. M. Macnab.** 2000. Interaction between FliE and FlgB, a proximal rod component of the flagellar basal body of *Salmonella*. *J.Bacteriol.* **182**:3029-3036.
112. **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.

113. **Moriya, N., T. Minamino, K. T. Hughes, R. M. Macnab, and K. Namba.** 2006. The type III flagellar export specificity switch is dependent on FliK ruler and a molecular clock. *J.Mol.Biol.* **359**:466-477.
114. **Muir, R. E. and J. W. Gober.** 2002. Mutations in FlbD that relieve the dependency on flagellum assembly alter the temporal and spatial pattern of developmental transcription in *Caulobacter crescentus*. *Mol.Microbiol.* **43**:597-615.
115. **Muir, R. E. and J. W. Gober.** 2004. Regulation of FlbD activity by flagellum assembly is accomplished through direct interaction with the trans-acting factor, FliX. *Mol.Microbiol.* **54**:715-730.
116. **Muller, V., C. J. Jones, I. Kawagishi, S. Aizawa, and R. M. Macnab.** 1992. Characterization of the *fliE* 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.
117. **Muskotal, A., R. Kiraly, A. Sebestyen, Z. Gugolya, B. M. Vegh, and F. Vonderviszt.** 2006. Interaction of FliS flagellar chaperone with flagellin. *FEBS Lett.* **580**:3916-3920.
118. **Nambu, T. and K. Kutsukake.** 2000. The Salmonella FlgA protein, a putativeve periplasmic chaperone essential for flagellar P ring formation. *Microbiology* **146 (Pt 5)**:1171-1178.
119. **Nambu, T., T. Minamino, R. M. Macnab, and K. Kutsukake.** 1999. Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* **181**:1555-1561.
120. **Neuwald, A. F., L. Aravind, J. L. Spouge, and E. V. Koonin.** 1999. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* **9**:27-43.
121. **Niehus, E., H. Gressmann, F. Ye, R. Schlapbach, M. Dehio, C. Dehio, A. Stack, T. F. Meyer, S. Suerbaum, and C. Josenhans.** 2004. Genome-wide analysis of transcriptional hierarchy and feedback regulation in the flagellar system of *Helicobacter pylori*. *Mol.Microbiol.* **52**:947-961.
122. **Ninfa, A. J., D. A. Mullin, G. Ramakrishnan, and A. Newton.** 1989. Escherichia coli sigma 54 RNA polymerase recognizes *Caulobacter crescentus flbG* and *flaN* flagellar gene promoters in vitro. *J.Bacteriol.* **171**:383-391.
123. **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.

124. **Ohnishi, K., Y. Ohto, S. Aizawa, R. M. Macnab, and T. Iino.** 1994. FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* **176**:2272-2281.
125. **Okino, H., M. Isomura, S. Yamaguchi, Y. Magariyama, S. Kudo, and S. I. Aizawa.** 1989. Release of flagellar filament-hook-rod complex by a *Salmonella typhimurium* mutant defective in the M ring of the basal body. *J.Bacteriol.* **171**:2075-2082.
126. **Osuna, J., X. Soberon, and E. Morett.** 1997. A proposed architecture for the central domain of the bacterial enhancer-binding proteins based on secondary structure prediction and fold recognition. *Protein Sci.* **6**:543-555.
127. **Ottemann, K. M., W. Xiao, Y. K. Shin, and D. E. Koshland, Jr.** 1999. A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor. *Science* **285**:1751-1754.
128. **Ozin, A. J., L. Claret, F. Auvray, and C. Hughes.** 2003. The FliS chaperone selectively binds the disordered flagellin C-terminal D0 domain central to polymerisation. *FEMS Microbiol.Lett.* **219**:219-224.
129. **Packer, H. L. and J. P. Armitage.** 1994. The chemokinetic and chemotactic behavior of *Rhodobacter sphaeroides*: two independent responses. *J.Bacteriol.* **176**:206-212.
130. **Park, K., S. Choi, M. Ko, and C. Park.** 2001. Novel sigmaF-dependent genes of *Escherichia coli* found using a specified promoter consensus. *FEMS Microbiol.Lett.* **202**:243-250.
131. **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.
132. **Poole, P. S. and J. P. Armitage.** 1988. Motility response of *Rhodobacter sphaeroides* to chemotactic stimulation. *J.Bacteriol.* **170**:5673-5679.
133. **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.
134. **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.
135. **Popham, D. L., D. Szeto, J. Keener, and S. Kustu.** 1989. Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. *Science* **243**:629-635.
136. **Porter, S. C., A. K. North, A. B. Wedel, and S. Kustu.** 1993. Oligomerization of NTRC at the *glnA* enhancer is required for transcriptional activation. *Genes Dev.* **7**:2258-2273.

137. **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.
138. **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.
139. **Quon, K. C., G. T. Marczyński, and L. Shapiro.** 1996. Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* **84**:83-93.
140. **Ramakrishnan, G. and A. Newton.** 1990. FlbD of *Caulobacter crescentus* is a homologue of the NtrC (NRI) protein and activates sigma 54-dependent flagellar gene promoters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**:2369-2373.
141. **Rappas, M., J. Schumacher, F. Beuron, H. Niwa, P. Bordes, S. Wigneshweraraj, C. A. Keetch, C. V. Robinson, M. Buck, and X. Zhang.** 2005. Structural insights into the activity of enhancer-binding proteins. *Science* **307**:1972-1975.
142. **Rappas, M., J. Schumacher, H. Niwa, M. Buck, and X. Zhang.** 2006. Structural basis of the nucleotide driven conformational changes in the AAA+ domain of transcription activator PspF. *J.Mol.Biol.* **357**:481-492.
143. **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.
144. **Reitzer, L.** 2003. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annu.Rev.Microbiol.* **57**:155-176.
145. **Reitzer, L. J. and B. Magasanik.** 1986. Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. *Cell* **45**:785-792.
146. **Ridgway, H. G., M. Silverman, and M. I. Simon.** 1977. Localization of proteins controlling motility and chemotaxis in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **132**:657-665.
147. **Ritchings, B. W., E. C. Almira, S. Lory, and R. Ramphal.** 1995. Cloning and phenotypic characterization of *fleS* and *fleR*, new response regulators of *Pseudomonas aeruginosa* which regulate motility and adhesion to mucin. *Infect.Immun.* **63**:4868-4876.
148. **Sato, K. and M. Homma.** 2000. Functional reconstitution of the Na(+)-driven polar flagellar motor component of *Vibrio alginolyticus*. *J.Biol.Chem.* **275**:5718-5722.
149. **Shirasu, K., Z. Koukolikova-Nicola, B. Hohn, and C. I. Kado.** 1994. An inner-membrane-associated virulence protein essential for T-DNA transfer from *Agrobacterium*

- tumefaciens* to plants exhibits ATPase activity and similarities to conjugative transfer genes. Mol.Microbiol. **11**:581-588.
150. **Silverman, M. and M. Simon.** 1977. Chemotaxis in *Escherichia coli*: methylation of che gene products. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **74**:3317-3321.
 151. **Silverman, M. R. and M. I. Simon.** 1972. Flagellar assembly mutants in *Escherichia coli*. J.Bacteriol. **112**:986-993.
 152. **Sistrom, W. R.** 1962. The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. J.Gen.Microbiol. **28**:607-616.
 153. **Sockett, H., S. Yamaguchi, M. Kihara, V. M. Irikura, and R. M. Macnab.** 1992. Molecular analysis of the flagellar switch protein FliM of *Salmonella typhimurium*. J.Bacteriol. **174**:793-806.
 154. **Sourjik, V., P. Muschler, B. Scharf, and R. Schmitt.** 2000. VisN and VisR are global regulators of chemotaxis, flagellar, and motility genes in *Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti*. J.Bacteriol. **182**:782-788.
 155. **Soutourina, O. A. and P. N. Bertin.** 2003. Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol.Rev. **27**:505-523.
 156. **Spohn, G. and V. Scarlato.** 1999. Motility of *Helicobacter pylori* is coordinately regulated by the transcriptional activator FlgR, an NtrC homolog. J.Bacteriol. **181**:593-599.
 157. **Springer, M. S., M. F. Goy, and J. Adler.** 1979. Protein methylation in behavioural control mechanisms and in signal transduction. Nature **280**:279-284.
 158. **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.
 159. **Stader, J., P. Matsumura, D. Vacante, G. E. Dean, and R. M. Macnab.** 1986. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli motB* gene and site-limited incorporation of its product into the cytoplasmic membrane. J.Bacteriol. **166**:244-252.
 160. **Starnbach, M. N. and S. Lory.** 1992. The *fliA (rpoF)* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an alternative sigma factor required for flagellin synthesis. Mol.Microbiol. **6**:459-469.
 161. **Stock, J. B. and D. E. Koshland, Jr.** 1978. A protein methylesterase involved in bacterial sensing. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **75**:3659-3663.

162. **Stock, J. B., A. J. Ninfa, and A. M. Stock.** 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol.Rev.* **53**:450-490.
163. **Stock, J. B., A. M. Stock, and J. M. Mottonen.** 1990. Signal transduction in bacteria. *Nature* **344**:395-400.
164. **Studholme, D. J. and R. Dixon.** 2003. Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. *J.Bacteriol.* **185**:1757-1767.
165. **Studholme, D. J. and R. Dixon.** 2004. In silico analysis of the sigma54-dependent enhancer-binding proteins in *Pirellula* species strain 1. *FEMS Microbiol.Lett.* **230**:215-225.
166. **Su, W., S. Porter, S. Kustu, and H. Echols.** 1990. DNA-looping and enhancer activity: association between DNA-bound NtrC activator and RNA polymerase at the bacterial *glnA* promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**:5504-5508.
167. **Suzuki, H., K. Yonekura, K. Murata, T. Hirai, K. Oosawa, and K. Namba.** 1998. A structural feature in the central channel of the bacterial flagellar FliF ring complex is implicated in type III protein export. *J.Struct.Biol.* **124**:104-114.
168. **Suzuki, T. and T. Iino.** 1981. Role of the *flaR* gene in flagellar hook formation in *Salmonella spp.* *J.Bacteriol.* **148**:973-979.
169. **Suzuki, T., T. Iino, T. Horiguchi, and S. Yamaguchi.** 1978. Incomplete flagellar structures in nonflagellate mutants of *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* **133**:904-915.
170. **Tang, H., S. Billings, X. Wang, L. Sharp, and D. F. Blair.** 1995. Regulated underexpression and overexpression of the FliN protein of *Escherichia coli* and evidence for an interaction between FliN and FliM in the flagellar motor. *J.Bacteriol.* **177**:3496-3503.
171. **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.
172. **Thomas, D., D. G. Morgan, and D. J. DeRosier.** 2001. Structures of bacterial flagellar motors from two FliF-FliG gene fusion mutants. *J.Bacteriol.* **183**:6404-6412.
173. **Thomas, J., G. P. Stafford, and C. Hughes.** 2004. Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**:3945-3950.
174. **Toews, M. L., M. F. Goy, M. S. Springer, and J. Adler.** 1979. Attractants and repellents control demethylation of methylated chemotaxis proteins in *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**:5544-5548.

175. **Toker, A. S. and R. M. Macnab.** 1997. Distinct regions of bacterial flagellar switch protein FliM interact with FliG, FliN and CheY. *J.Mol.Biol.* **273**:623-634.
176. **Totten, P. A., J. C. Lara, and S. Lory.** 1990. The *rpoN* gene product of *Pseudomonas aeruginosa* is required for expression of diverse genes, including the flagellin gene. *J.Bacteriol.* **172**:389-396.
177. **Turner, L., W. S. Ryu, and H. C. Berg.** 2000. Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments. *J.Bacteriol.* **182**:2793-2801.
178. **Ueno, T., K. Oosawa, and S. Aizawa.** 1992. M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF. *J.Mol.Biol.* **227**:672-677.
179. **Van Arnam, J. S., J. L. McMurry, M. Kihara, and R. M. Macnab.** 2004. Analysis of an engineered *Salmonella flagellar* fusion protein, FliR-FlhB. *J.Bacteriol.* **186**:2495-2498.
180. **Vogler, A. P., M. Homma, V. M. Irikura, and R. M. Macnab.** 1991. *Salmonella typhimurium* mutants defective in flagellar filament regrowth and sequence similarity of FliI to F0F1, vacuolar, and archaebacterial ATPase subunits. *J.Bacteriol.* **173**:3564-3572.
181. **Wedel, A. and S. Kustu.** 1995. The bacterial enhancer-binding protein NTRC is a molecular machine: ATP hydrolysis is coupled to transcriptional activation. *Genes Dev.* **9**:2042-2052.
182. **Weiss, D. S., J. Batut, K. E. Klose, J. Keener, and S. Kustu.** 1991. The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. *Cell* **67**:155-167.
183. **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.
184. **Wigneshweraraj, S. R., P. C. Burrows, P. Bordes, J. Schumacher, M. Rappas, R. D. Finn, W. V. Cannon, X. Zhang, and M. Buck.** 2005. The second paradigm for activation of transcription. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* **79**:339-369.
185. **Williams, A. W., S. Yamaguchi, F. Togashi, S. I. Aizawa, I. Kawagishi, and R. M. Macnab.** 1996. Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* **178**:2960-2970.
186. **Wolfe, A. J., M. P. Conley, T. J. Kramer, and H. C. Berg.** 1987. Reconstitution of signaling in bacterial chemotaxis. *J.Bacteriol.* **169**:1878-1885.

187. **Wu, J., A. K. Benson, and A. Newton.** 1995. Global regulation of a sigma 54-dependent flagellar gene family in *Caulobacter crescentus* by the transcriptional activator FlbD. *J.Bacteriol.* **177**:3241-3250.
188. **Wu, J. and A. Newton.** 1997. Regulation of the *Caulobacter* flagellar gene hierarchy; not just for motility. *Mol.Microbiol.* **24**:233-239.
189. **Xu, H. and T. R. Hoover.** 2001. Transcriptional regulation at a distance in bacteria. *Curr.Opin.Microbiol.* **4**:138-144.
190. **Yamaguchi, S., S. Aizawa, M. Kihara, M. Isomura, C. J. Jones, and R. M. Macnab.** 1986. Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* **168**:1172-1179.
191. **Yokoseki, T., K. Kutsukake, K. Ohnishi, and T. Iino.** 1995. Functional analysis of the flagellar genes in the *fliD* operon of *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* **141 (Pt 7)**:1715-1722.
192. **Yonekura, K., S. Maki, D. G. Morgan, D. J. DeRosier, F. Vonderviszt, K. Imada, and K. Namba.** 2000. The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science* **290**:2148-2152.
193. **Zhou, J., R. T. Fazio, and D. F. Blair.** 1995. Membrane topology of the MotA protein of *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* **251**:237-242.
194. **Zhu, K., B. Gonzalez-Pedrajo, and R. M. Macnab.** 2002. Interactions among membrane and soluble components of the flagellar export apparatus of *Salmonella*. *Biochemistry* **41**:9516-9524.