



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

El papel de FliA y FlgM en la regulación del número de
flagelos en *Rhodobacter sphaeroides*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

ANDRÉS DE SANDOZEQUI MIJARES



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA
2014



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

Quiero agradecerle a Laura por la oportunidad de realizar este trabajo, y por el todo el apoyo a lo largo de mi estancia en el laboratorio.

A mis papás y a mi hermano, que me enseñaron tantas cosas.

A mis amigos, con quienes se que siempre podré contar.

A todos en el laboratorio, que siempre me brindaron ayuda, en especial al Dr. Sebastián Poggio.

A los miembros del jurado, al Dr. Bernardo Pérez; al Dr. Luis Servín; a la Dra. Berta González; al Dr. Georges Dreyfus; y a la Dra. Laura Camarena por el tiempo dedicado a la revisión de esta Tesis y sus valiosos comentarios y sugerencias.

Este trabajo contó con el apoyo técnico de Aurora Osorio y Celia Domenzain.

EL proyecto fue parcialmente financiado por los donativos IN204614 (PAPIIT-UNAM) y SEP-CONACYT 106081.

Índice

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1. Generalidades de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	2
2.2. Flagelo bacteriano.....	4
2.3. Jerarquía de ensamblaje flagelar.....	7
2.4. Factor sigma FliA y su anti-sigma FlgM.....	10
3. Objetivos.....	19
4. Material y método.....	20
5. Resultados.....	28
5.1. Obtención del anticuerpo anti-FlgE1 y su validación por inmunodetección.....	28
5.2. Obtención de la cepa mutante flgM.....	31
5.3. Detección de la estructura del gancho-cuerpo basal (HBB) mediante inmunofluorescencia en diferentes cepas mutantes.....	36
5.4. Cuantificación del número de HBBs por célula.....	39
6. Discusión.....	41
7. Conclusiones.....	45
8. Bibliografía.....	46

1. Resumen

En el modelo flagelar de *Rhodobacter sphaeroides*, una alfa-proteobacteria con un solo flagelo que gira unidireccionalmente, se ha descrito una jerarquía de expresión y ensamblaje flagelar, en la cual el regulador maestro FleQ y el factor ²⁸FliA y su anti-sigma FlgM son los responsables de que la biosíntesis del flagelo se lleve a cabo adecuadamente. Asimismo, se reportó que en *R. sphaeroides*, FliA tenía otro papel, que era el de regular negativamente los genes tempranos, por lo tanto una mutante en este gen, presentaría un fenotipo con más de un flagelo, así que se decidió poner a prueba esta hipótesis. Por medio de inmunodetección de la proteína del gancho, FlgE, y microscopía de fluorescencia se logró cuantificar los cuerpos basales (HBB) por célula en cepas mutantes de FliA y FlgM. Particularmente, en la cepa *fliA*, se observó que una parte de la población presentaba más de un HBB por célula, lo anterior se demostró con una prueba estadística que mostró que la cantidad de células con dos o más HBB era significativamente mayor a la cepa silvestre. En este trabajo, además observamos que la aparición de un mayor número de HBBs es dependiente de la presencia del dominio de unión a DNA de FliA. A partir de estos resultados, hemos formulado dos hipótesis que podrían explicar el porqué en ausencia de FliA, las células sintetizan más flagelos. La primera, al tener una mayor afinidad por la RNA polimerasa, FliA podría competir con ⁵⁴para inducir la transcripción de los genes tempranos; la segunda, involucraría que FliA es responsable de la transcripción de un gen desconocido cuyo producto es responsable de controlar el número de flagelos. Estas dos hipótesis no son necesariamente excluyentes.

2. Introducción

2.1 Generalidades de *Rhodobacter sphaeroides*:

Rhodobacter sphaeroides es una alfa-3-proteobacteria púrpura no sulfurosa, Gram-negativa, y fotosintética con un solo flagelo en posición subpolar que gira unidireccionalmente (1). Esta bacteria tiene uno de los metabolismos más variados, ya que puede realizar respiración aeróbica y anaeróbica, fotosíntesis o fermentación, y fija nitrógeno utilizando N_2 .

Además de llevar a cabo esta gran variedad de procesos, *R. sphaeroides* cuenta con un complejo sistema de motilidad y quimiotaxis, que le permite desplazarse a velocidades aproximadas a los 60 $\mu\text{m}/\text{seg}$ y percibir una gran cantidad de estímulos ambientales. Por lo anterior, dicho organismo ha sido utilizado como sistema modelo para llevar a cabo estudios relacionados a los diversos aspectos del sistema quimiotáctico y del flagelo; entre ellos destacan, los procesos de control de la biogénesis flagelar, el control de la expresión de los genes flagelares, el control de la rotación flagelar mediada por el sistema quimiotáctico, y otros más (2).

Por otro lado, las especies de *Rhodobacter* juegan un papel muy importante en la formación de biopelículas, al ser las pioneras en colonizar superficies costeras sumergidas, modifican las propiedades fisicoquímicas de la superficie y a través de la producción de exopolímeros, hacen a la superficie más apropiada para el reclutamiento de otros colonizadores (3). Dicho microorganismo también ha sido ampliamente estudiado gracias a su capacidad para realizar fotosíntesis, y en aplicaciones como en la bioremediación (4, 5).

Su nicho ecológico está definido por la capacidad de asimilar moléculas orgánicas de bajo peso molecular en presencia de luz o en condiciones de oxígeno limitado o anaerobiosis; aunque puede hallarse en condiciones de alta concentración de oxígeno, se ha visto que está mejor preparada para condiciones microaerofílicas, permitiendo una fácil transición entre crecimiento quimiotrófico y fotótrofo (5). *R. sphaeroides* tiene dos cromosomas (3.0 y 0.9 Mpb) y cinco plásmidos endógenos, se ha demostrado que los plásmidos endógenos y el cromosoma II (0.9Mpb) se originaron por eventos de duplicación (6).

R. sphaeroides tiene 2 conjuntos de genes flagelares. El conjunto que normalmente está activo, Fla1, proviene de una transferencia horizontal, siendo una gamma proteobacteria la posible donadora. Asimismo, los análisis filogenéticos, indicaron que el conjunto de genes flagelares Fla2, es el que contiene los genes nativos de la especie, los cuales se encuentran inactivos transcripcionalmente (7).

2.2 El flagelo bacteriano

El flagelo es una estructura proteica muy compleja (Figura 1), que se ha dividido en dos secciones para su estudio; el cuerpo basal que está formado por el motor, el estator, la maquinaria de exportación y el gancho (esto forma el cuerpo basal o HBB por sus siglas en inglés ‘hook-basal body’) y el filamento externo (2, 8). Debido a lo complejo de esta estructura y a que su formación requiere de la expresión de más de 50 genes, que incluyen aquellos que codifican para las subunidades estructurales, las proteínas regulatorias, la maquinaria de quimiotaxis, etc., el ensamblaje y la expresión de los genes flagelares son altamente regulados y siguen una jerarquía estricta (Figura 2 y 3) (4, 8).

En *Escherichia coli* y *Salmonella*, la transcripción de los genes flagelares se encuentra regulada por una jerarquía con tres niveles de control. En lo alto de la jerarquía, la clase 1 contiene sólo al operón maestro *flhDC*, que es activado por el complejo cAMP-CAP y otros reguladores globales (9). Los productos de este operón son indispensables para activar la transcripción de los genes de clase 2 (8, 9). Entre los genes de la clase 2 se hallan la mayoría de los genes estructurales de los componentes iniciales del ensamblaje del flagelo (el cuerpo basal, el aparato de exportación y el gancho), y un factor sigma FliA, específico del flagelo denominado sigma-28 (σ^{28}) y su factor anti-sigma, FlgM. La expresión de los operones de clase 3 es dependiente del factor σ^{28} , el cual se mantiene inactivo por FlgM. En el momento en que termina la formación del HBB y la maquinaria de exportación es funcional, el factor anti-sigma FlgM, se expulsa fuera del citoplasma por la maquinaria de exportación flagelar, este tipo de regulación post-transcripcional es

inusual, pero efectivo para asegurar que la maquinaria de exportación y por lo tanto, todo el HBB están completos y correctamente ensamblados (8, 10, 11). La exportación de FlgM permite que FliA se asocie a la RNA polimerasa para llevar a cabo la transcripción de los genes de clase III, que codifican para la flagelina (FliC), la proteína de coronamiento (FliD), las proteínas MotA y MotB, así como las proteínas del sistema de quimiotaxis (CheA, CheB, CheR, CheW, CheY y CheZ) (Figura 2).

En muchas especies bacterianas existe un punto de control (check-point) responsable de percibir la adecuada formación del HBB, y este es usualmente controlado por las proteínas FliA/FlgM.

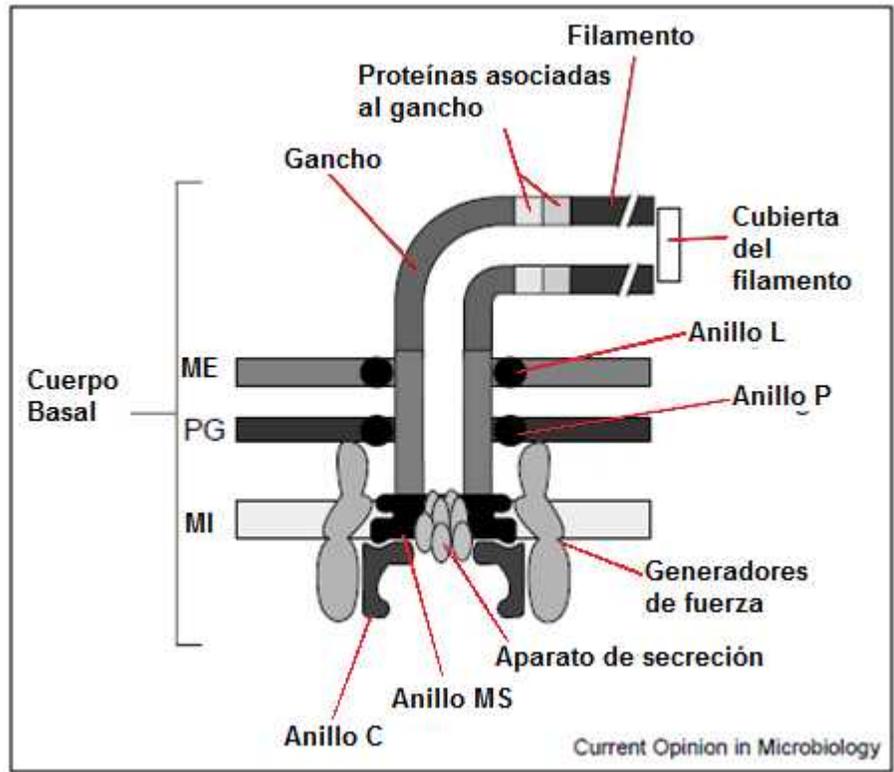


Figura 1. Estructura del flagelo. El flagelo utiliza la fuerza protón motriz para generar cambios conformacionales que traducen esta fuerza a movimiento rotatorio. ME, membrana externa. PG, pared de peptidoglicanos. MI, membrana interna (8).

2.3 Jerarquía del ensamblaje flagelar

En *R. sphaeroides* la jerarquía de expresión de los genes flagelares (Figura 3), al contrario de otros modelos flagelares como *E. coli* o *Salmonella typhimurium* que tienen tres niveles de expresión, comprende cuatro etapas de expresión de los genes flagelares, similar al sistema jerárquico descrito para *Pseudomonas aeruginosa* (12). En *R. sphaeroides*, la clase I consiste del gen regulador maestro *fleQ* que está activo constitutivamente, y probablemente la biogénesis flagelar es controlada por el nivel de expresión de este (2).

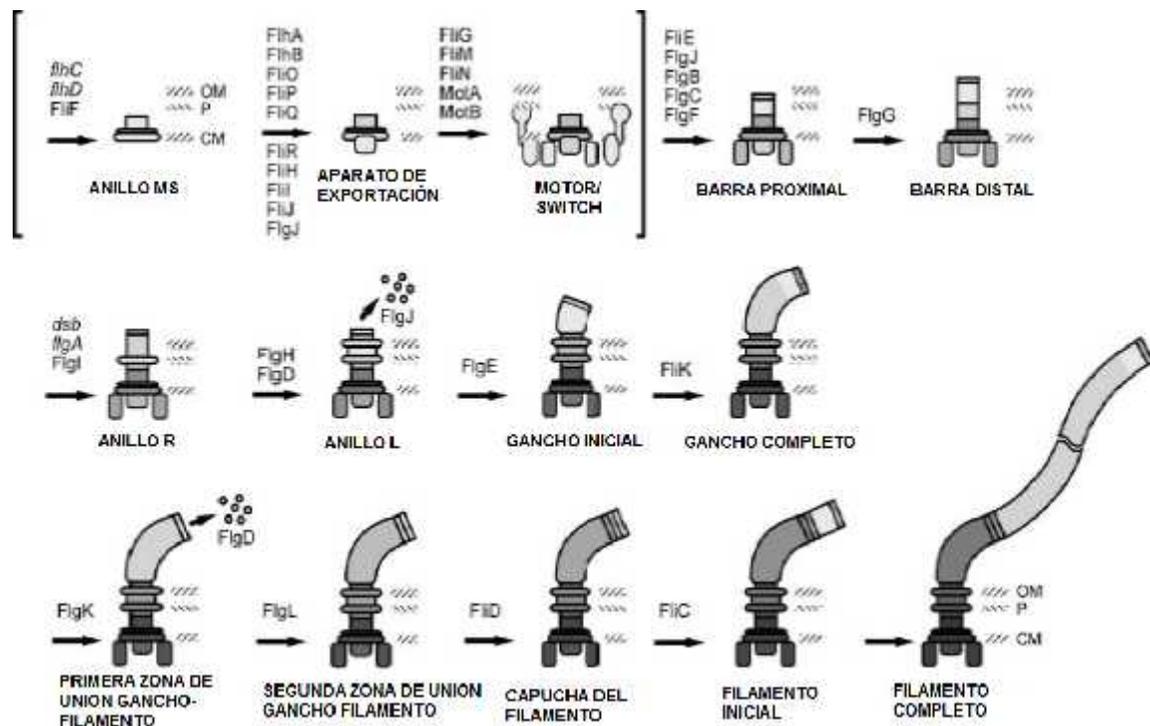


Figura 2. Vía morfológica del ensamblaje del flagelo de *Salmonella*, cuando se completa el gancho, en la mayoría de los modelos flagelares, existe un “checkpoint” para comprobar su correcto ensamblaje. OM, membrana externa. P, pared de peptidoglicanos. CM, membrana interna (Modificado de 13).

FleQ es un activador del factor sigma 54, el cual es necesario para la expresión de los genes de la Clase II (14), entre los cuales están *fleT*, que es el primer gen del operón, además de *fliG*, *fliF*, *fliE*, *fliH*, *fliI* y *fliJ*, el producto de estos últimos cuatro forman un complejo en el citoplasma hasta que el aparato de exportación es completado. La proteína transmembranal FliF y la proteína del anillo C, FliG, forman el primer complejo sobre el cual se asocian el resto de los componentes flagelares (2, 15).

El producto del gen *fleT*, también es un activador del factor sigma-54, y se piensa que FleQ y FleT forman un heterodímero necesario para la expresión de los genes de la clase III. Entre los genes de clase III se encuentran la mayoría de los genes necesarios para la formación del cuerpo basal, los genes *mot* y el factor sigma específico FliA (²⁸) y su factor anti-sigma FlgM.

Al igual que ocurre en *E. coli*, la proteína FliA es el factor ²⁸ del cual depende la transcripción de los genes de Clase IV, y su factor anti-sigma, FlgM, secuestra a FliA hasta el término de la formación del HBB; en este momento, FlgM se exporta fuera del citoplasma, lo que deja libre a FliA para inducir la expresión de los genes de Clase IV, *fliC*, *fliD* y *fliS*, cuyos productos son necesarios para finalizarla formación del flagelo (2).

Por otro lado, *R. sphaeroides* tiene dos operones que codifican para componentes involucrados en la respuesta quimiotáctica de este organismo, *cheOp2* y *cheOp3*, que están regulados independientemente por ²⁸ y ⁵⁴ respectivamente, esta diferencia en la regulación de los operones quimiotácticos puede reflejar la necesidad de balancear la respuesta en diferentes condiciones ambientales (16).

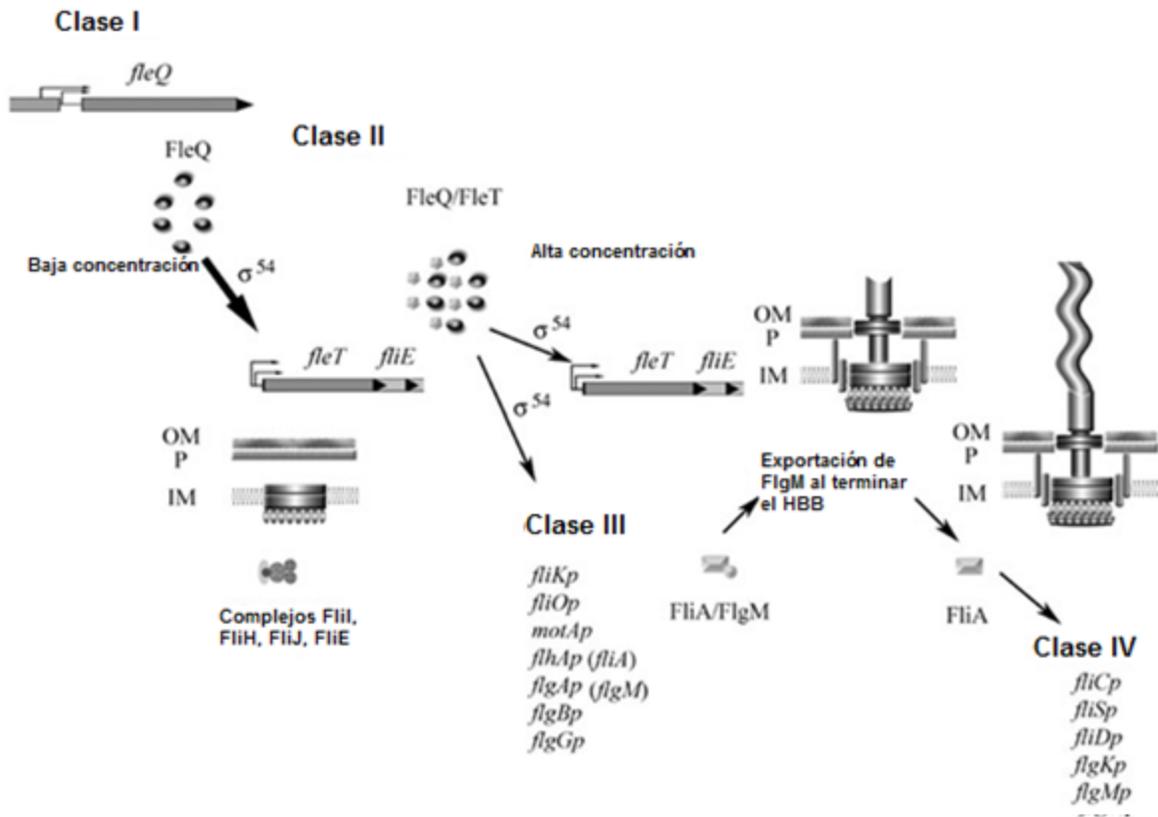


Figura 3. Jerarquía del ensamblaje flagelar en *R. sphaeroides*. El controlador maestro FleQ junto con FleT regulan la expresión de los genes tempranos (Clase II y Clase III) y al término del ensamblaje del cuerpo basal y la posterior exportación de FlgM, el factor ²⁸, FliA, induce la expresión de los genes tardíos (Clase IV) (Tomado de 2).

2.4 Factor sigma FliA y su anti-sigma FlgM

En las bacterias los factores sigma regulan la iniciación de la transcripción, la subunidad sigma recluta a la RNA polimerasa al promotor al unirse a una secuencia específica llamada promotor, el cual posee dos cajas o regiones altamente conservadas, ubicadas usualmente a -35 y -10 pares de bases río arriba del inicio de la transcripción, lo que conduce a la formación del complejo abierto de la transcripción, esto solo lo realiza en el contexto de la holoenzima, que está formada por dos subunidades alfa, dos subunidades beta, y la subunidad sigma (σ^{70}) (17).

En términos de su homología, hay dos familias de factores σ , la que comprende casi todos los factores σ , la familia σ^{70} , en la que se encuentra σ^{28} ; y la familia σ^{54} . La primera, tiene un alto grado de conservación entre sus cuatro dominios, $\sigma^{1.1}$, σ^{2} , σ^{3} , y σ^{4} , conteniendo las regiones conservadas 1.1, 1.2-2.4, 3.0-3.1, y 4.1-4.2, respectivamente (Figura 4) (17, 18).

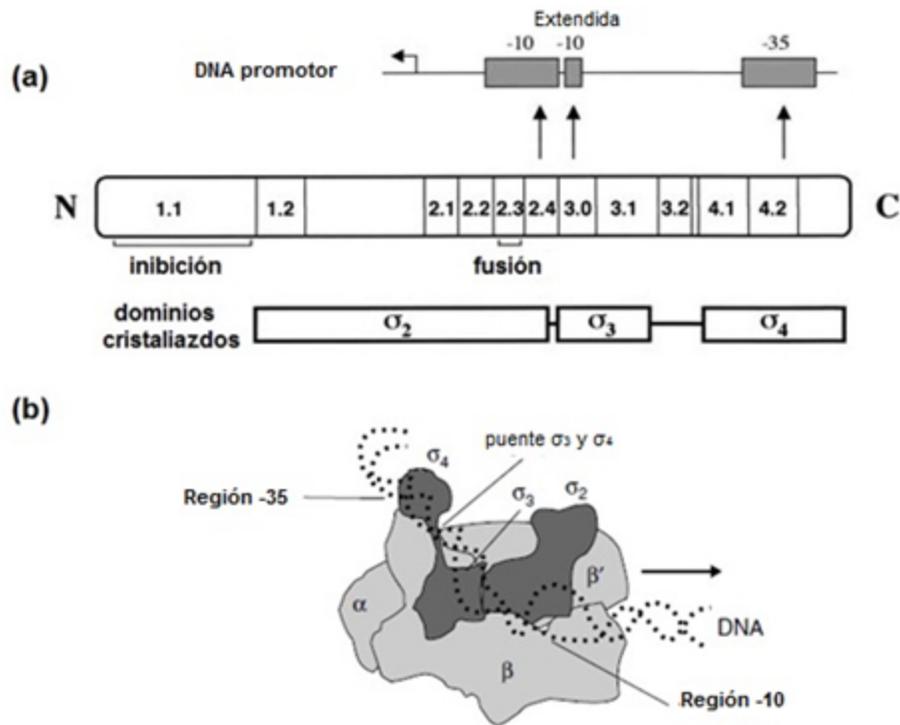


Figura 4. Estructura y funcionamiento de σ^{70} de *E. coli*. (a), esquema de las regiones conservadas. La secuencia de la proteína se ha dividido en cuatro regiones. Los residuos en la parte carboxilo-terminal de la región 4 (subregión 4,2) forman una hélice-vuelta-hélice que hace contacto con el elemento -35 del promotor, los residuos de regiones conservadas 2 y 3 cooperan para mediar en el reconocimiento de la región -10 y de fusión del ADN. Un residuo en la parte amino-terminal de la región 3 (3.0) hace contacto con el motivo conservado TG en el elemento extendido de la caja -10 de ciertos promotores que no requieren una región -35. Los residuos de una hélice en la región 2 que corresponden a las subregiones conservadas 2,3 y 2,4 interactúan íntimamente con la caja -10. También se cree que la subregión 2.3 interactúa principalmente con el ADN de cadena sencilla en el complejo abierto (flecha discontinua). Los tres dominios del factor observado por cristalografía de rayos X (σ_2 , σ_3 y σ_4) se indican debajo de la estructura lineal. Es importante observar que los dominios de la proteína se corresponden estrechamente (aunque no exactamente) con las regiones asignadas por comparación de secuencias. (b) Un modelo para la interacción de holoenzima RNA polimerasa (que contiene las subunidades α , α' , dos β , y una subunidad β' , además del factor σ) con la región promotora del DNA. Los principales dominios funcionales del factor σ se muestran en gris oscuro. La flecha negra indica la dirección de transcripción. Aunque la cadena molde en la burbuja de transcripción

pasa por debajo de la subunidad σ y el dominio σ_2 , el camino de la cadena de DNA se esquematiza como va (Adaptado de 19, 20).

La segunda, que únicamente comprende a σ^{54} , y que a diferencia de los factores de σ^{70} , reconoce el promotor a través de las cajas conservadas ubicadas en -24 y -12, con respecto al sitio de inicio de la transcripción. En general, el gen que codifica para el factor σ^{54} , no se encuentra en más de una copia en un organismo, con excepción de *Bradyrhizobium japonicum* y *Rhizobium etli*, que cada uno tiene dos copias del gen *rpoN* que codifica para dos proteínas σ^{54} (21), y *R. sphaeroides*, que tiene cuatro copias, las cuales no son funcionalmente intercambiables. En consecuencia, si el gen *rpoN2*, que es el responsable de la expresión de los genes flagelares, o el gen *rpoN1*, que se ha visto que es importante para la fijación de nitrógeno, presentaran una mutación, las otras copias de este gen no son capaces de complementar la función (22).

Los factores sigma son esenciales para casi todas las funciones celulares y las respuestas ambientales como la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno, metabolismo energético, modificación del RNA, quimiotaxis, desarrollo, transporte de electrones, respuesta a choque térmico y de fagos, la expresión de otros factores sigma, la formación del flagelo, etc. (21).

La familia de σ^{70} es muy extensa, aunque, el funcionamiento es muy parecido entre sus integrantes. Cuando el factor σ se encuentra unido a la RNA polimerasa, cambia su conformación para convertirse a una forma activa, en la que los dominios de unión al DNA, σ_2 y σ_4 , quedan expuestos y se encuentren correctamente espaciados para reconocer los residuos universalmente conservados en las cajas -10 y -35 respectivamente, la región

3 reconoce los residuos importantes en la porción extendida de la caja -10, lo que añade especificidad a cada subunidad sigma (17, 18, 23, 24).

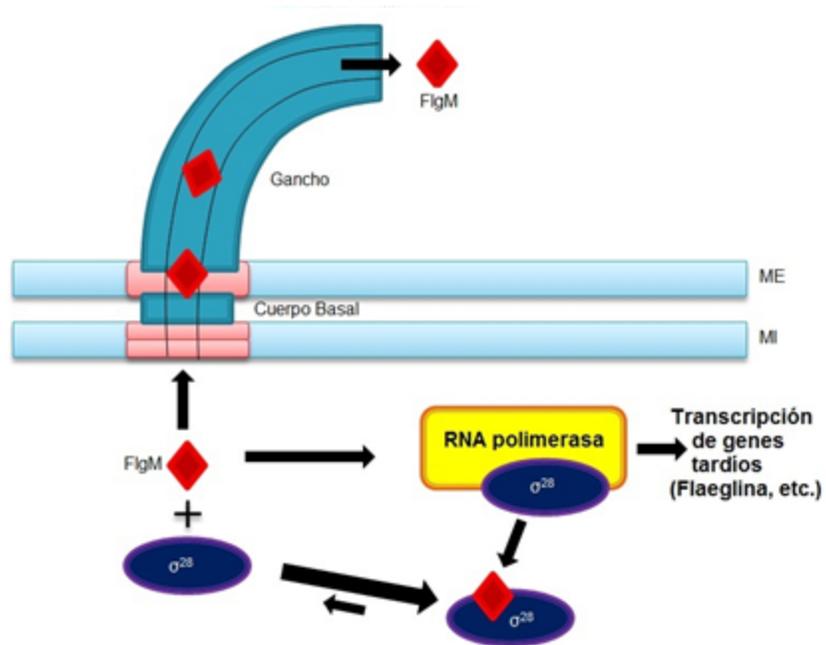


Figura 5. Regulación de los genes flagelares tardíos por σ^{28} y su anti-sigma FlgM. FlgM (rombo) inhibe a FliA, ya sea, secuestrando a FliA libre o induciendo la disociación de la holoenzima. FlgM se exporta a través de la maquinaria de exportación y pasa por el canal interno del HBB. Una vez que comienza la transcripción de los genes tardíos, la flagelina compite por la maquinaria de exportación y los niveles de FlgM intracelular se elevan nuevamente. ME, membrana externa; MI, membrana interna (Modificado de 25).

²⁸ está presente en una gran cantidad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y está muy conservado, aunque carece de la región ₁, comparado con la familia ⁷⁰, no obstante, cuando se encuentra formando la holoenzima RNA polimerasa su funcionamiento es prácticamente idéntico (26, 27).

Cuando su factor anti-sigma, FlgM (Figura 5), está presente, desestabiliza a la holoenzima (² '), secuestrando a ²⁸ envolviéndolo de tal forma que los sitios de unión al DNA quedan dentro de la estructura (Figura 6), y una vez que el cuerpo basal (HBB) está completado, FlgM se exporta por el aparato de secreción tipo III flagelar, dejando libre a ²⁸ para inducir la expresión de sus genes blanco(17, 28).

Se ha observado que FlgM disocia activamente a la holoenzima RNA polimerasa y secuestra a ²⁸ en *S. typhimurium* (29, 30).

La presencia de genes flagelares que están controlados por promotores dependientes del factor ²⁸ no está limitada a *Rhodobacter*. Asimismo, FlgM se ha descrito como regulador de la expresión de los genes tardíos en varios modelos flagelares como en *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis* y en la mayoría de las especies de *Vibrio* (11, 31–33).

En *Salmonella*, FlgM es necesario para modular los niveles de expresión de varios genes, y en consecuencia tiene efectos en la virulencia de las cepas (10, 28). En enterobacterias y probablemente en *V. cholerae*, no es posible realizar la transición de las clases II a III y II a IV, respectivamente, sin la necesaria exportación de FlgM al completarse el HBB (32, 33).

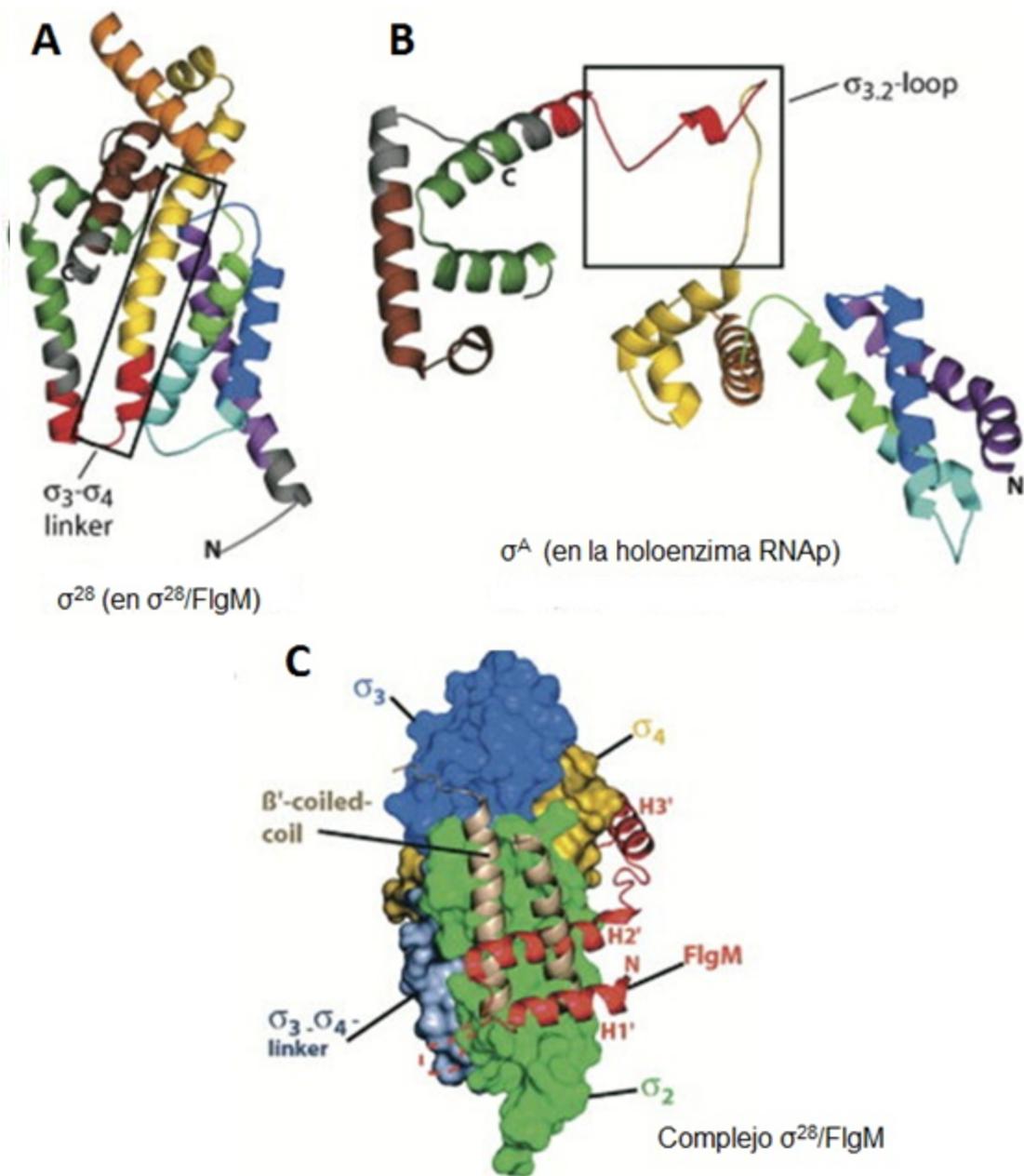


Figura 6. La interacción de σ^{28} y FlgM. (A) La conformación de σ^{28} de *Aquifex aeolicus* cuando está interactuando con FlgM. (B) La conformación de σ^{28} cuando forma la holoenzima RNA polimerasa. (C) Se muestra la interacción de σ^{28} y FlgM cuando están formando un complejo, FlgM envuelve a σ^{28} y los sitios con los que interactúa con el DNA (σ_2 y σ_4) y con la RNA polimerasa (σ_3 y σ_4) quedan embebidos en la estructura (Modificado de 17) .

En *V. cholerae* se ha reportado que los factores de transcripción flagelares controlan la expresión de los factores de virulencia, y que la motilidad es inversamente proporcional a la virulencia, dado que, en cepas con mutaciones en los factores de regulación de la jerarquía flagelar (*rpoN*, *fliA*, etc.) se observó que los genes con relevancia en la virulencia (por ejemplo, la hemolisina y los genes del aparato de secreción tipo IV) eran regulados positivamente, y por lo tanto presentaban altos niveles de hemólisis en eritrocitos humanos (34).

En *E. coli* enterohemorrágica se ha descrito un mecanismo en el que los reguladores de ‘quórum sensing’ B y C (QseBC) junto con FliA (gen de la clase II) regulan la transcripción del regulador maestro del flagelo, FlhDC, lo que produce un circuito de retroalimentación de los genes de clase I y II (9).

Se ha demostrado que FlgM abate la transcripción del gen *fliC* en *S. typhimurium* (35), y de acuerdo a lo anterior, se ha observado que la delección de *flgM* produce una alta actividad en el promotor de *fliC* en *P. aeruginosa*. y *Yersinia pseudotuberculosis* (36, 37).

En *P. aeruginosa* se ha reportado que la represión de FliA mediada por FlgM, tiene un efecto de dosis, y al sobreexpresar *flgM* no solo regula negativamente la actividad del promotor de *fliC*, también reduce la síntesis de flagelina (36). Se ha considerado que al regular negativamente la transcripción de los genes tardíos de la biosíntesis flagelar, FlgM, regula la longitud del flagelo, de tal modo, que al elongarse la estructura del flagelo se hace cada vez más difícil a las subunidades estructurales del flagelo y a FlgM de recorrer la estructura, y por lo tanto, se aumentan los niveles de FlgM intracelular, lo que resulta en la inhibición de la expresión de los genes tardíos. Asimismo, se piensa que si por alguna

razón el flagelo se rompe, la acumulación de FlgM intracelular se exportaría a través de los HBB presentes, dejando libre a FliA para realizar la transcripción de los genes tardíos y completar el flagelo quebrado (38); no obstante, esta última suposición no ha sido apoyada por la evidencia experimental publicada recientemente (39).

Por otro lado, se demostró que FlgM interactúa no solo con FliA sino también con la proteína flagelar FliS (40, 41); esta última es esencial para la exportación de las subunidades de flagelina, ya que actúa como chaperona, y previene la polimerización prematura de la flagelina (30, 42). La transcripción de *fliS* es dependiente de FliA y una mutante en *fliS* exporta FlgM de forma constitutiva, lo que produce un incremento en la expresión de los genes de clase III (40). Dado que FliS puede unirse a FlgM puede considerarse que su efecto anti-anti-sigma controlará también el nivel citoplásmico de FliA y FlgM, en respuesta a la cantidad de sustratos de exportación.

La idea de que el circuito FliA/FlgM participa en el control de la flagelación en *Salmonella* y otras bacterias peritricas, fue propuesta tiempo atrás por varios grupos de investigación (43, 44). Sin embargo, en bacterias con flagelos polares, usualmente monotricas, existe evidencia de que las proteínas FlhG y FlhF controlan el número y la posición de los flagelos (45). *R. spheroides* carece del gen *flhG* pero cuenta en su genoma con el gen *flhF*, sin embargo éste no está bien conservado y evidencia obtenida en el laboratorio sugiere que su ausencia no afecta la flagelación (datos no publicados).

En un estudio reciente realizado en *R. sphaeroides*, se presentó la hipótesis de que FliA y FlgM tienen otra función aparte de la regulación de la expresión de los genes de clase IV, que es regular la expresión de los genes flagelares de clase II y III; se observó

una mayor expresión de los genes tempranos (clase III) en una cepa mutante en el gen *fliA*, mientras que en la ausencia de *flgM* la expresión de dichos genes disminuye. En consecuencia, una cepa que sobreexpresó FlgM sintetizó un mayor número de flagelos (al no tener una señal de término de la biosíntesis flagelar), mientras que una cepa que sobreexpresó FliA fue incapaz de sintetizarlos (46). Es necesario mencionar que en este estudio se determinó el número de flagelos mediante la observación del filamento flagelar en el microscopio electrónico, y dado que la manipulación de las células provoca usualmente la ruptura del filamento, la cuantificación puede ser imprecisa.

En este trabajo se decidió evaluar si la ausencia de FliA, o de FlgM a niveles fisiológicos, es suficiente para alterar el número de HBBs (gancho-cuerpos basales) en la célula. Para ello se decidió utilizar anticuerpos marcados fluorescentemente que reconocen a la proteína del gancho FlgE1; se consideró que este enfoque nos daría una idea más certera del número de cuerpos basales formados por célula.

3. Objetivo

Comprobar si FliA y FlgM tienen un papel en la regulación del número de HBBs en *Rhodobacter sphaeroides*.

Objetivos particulares

Generar un anticuerpo en contra de FlgE1 de *R. sphaeroides*.

Realizar la mutante *flgM*.

Hacer la construcción del plásmido pIND4 con el gen *flgM* de *R. sphaeroides*.

Cuantificar por medio de inmunofluorescencia la cantidad de HBBs por célula utilizando las cepas WS8, SP15(*UfliA::kan*), AS1(*UflgM::aadA*) y SP15/pRK_ *fliA* r4.

4. Material y métodos

4.1 Medios de cultivo

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) (47), se cultivaron aeróbicamente en agitación constante (200 rpm) a 37°C. Las cepas de *R. sphaeroides* se cultivaron en medio mínimo Sistrof con succinato (48) se cultivaron aeróbicamente en oscuridad y agitación constante (200 rpm) a 30°C. Las concentraciones de antibiótico que se utilizaron dado el caso fueron: para *E. coli*, ampicilina a 100 µg/mL, kanamicina a 50 µg/mL, tetraciclina a 10 µg/mL y espectinomicina a 50 µg/mL. Para *R. sphaeroides*, kanamicina a 25 µg/mL, tetraciclina a 1 µg/mL y espectinomicina a 50 µg/mL. Para cepas que contienen el plásmido de sobreexpresión pIND4 se agregó al medio IPTG estéril a 5 µM y 50 µM para inducir la expresión del inserto.

4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50 µl de los cuales se utilizó 1 µL de DNA Polimerasa Taq PrimeStar HS (Takara), ~1-10 ng de DNA cromosomal de WS8, Buffer PrimeStarHS 2x (Takara), 6 µL de dNTPs (2 mM), 5 µl de dimetil-sulfóxido (DMSO), 1 µL de cada oligonucleótido a 100 pM/µL y 12 µL de H₂O. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1% a 100 V y se purificaron usando los reactivos del estuche QIAquick Gel Extraction Kit de QIAGEN (se siguieron las instrucciones del fabricante en todos los pasos). El anexo 1 muestra los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

4.3 Clonación en el vector pCR 2.1 TOPO

Para la adición de adeninas terminales (A-Overhands) se añaden 7 µl del producto de PCR, 1 µl de Buffer 10x, 0.5 µl de dNTPs y 0.5 µl de DNA polimerasa Taq recombinante (Invitrogen) y se incuban a 72°C durante 13 minutos. Para la reacción de clonación se toman 4 µl de la reacción anterior 1 µl de solución salina incluida en los reactivos del estuche de clonación y 0.7 µl del vector pCR 2.1 TOPO. Se incuba a temperatura ambiente durante 9 minutos, se dializa en una membrana de nitrocelulosa por 15 minutos, se electropora en células competentes de la cepa de *E. coli* TOP10, y se platea en medio LB-Kanamicina con X-Gal se incuba a 37°C toda la noche.

4.4 Purificación de plásmidos mediante mini preparaciones hervidas

En 3 ml de medio selectivo se inoculan las colonias elegidas durante toda la noche. Al día siguiente, se toman 1.5 ml y se centrifugan a 14000 rpm durante 2.5 minutos, se descarta el sobrenadante y se resuspende. Se agregan 300 µl de solución amortiguadora STET (La solución 1X contiene, 10 mM de Tris(hidroximetil)aminometano (Tris), 1 mM de ácido etildiaminotetraacético (EDTA), 100 mM de NaCl, y 5% de Triton™), 30 µl de lisozima y se hierve durante 60 segundos. Al terminar se centrifuga 15 minutos a temperatura ambiente y a 14000 rpm. El sobrenadante se transfiere a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, se agregan 300 µl de isopropanol y se centrifuga en frío (4°C) a 14000 rpm durante 20 minutos. Se descarta el sobrenadante, se lava lentamente por inversión con etanol al 70% y se seca a 70°C durante 5 minutos. Se resuspende el DNA en 35 µl de H₂O(49).

4.5 Purificación de plásmidos

Para la purificación de plásmidos se utilizaron los reactivos de QIAprep Spin Miniprep Kit de QIAGEN. Se siguieron las instrucciones del fabricante en todos los pasos.

4.6 Preparación y transformación de células competentes de *E. coli* usando cloruro de calcio

Un cultivo de 10 ml de la cepa de interés se crece hasta fase exponencial (D.O. 600 nm ~0.5). Después se incuba 10 minutos en hielo y se centrifuga a 4°C por 5 minutos a 5000rpm. Se descarta el sobrenadante y se resuspende, se agregan 5 ml de CaCl₂ 100 mM y se incuba en hielo por 15 minutos. Se centrifuga con las mismas condiciones anteriores y se resuspende en 700 µl de CaCl₂ y se incuba en hielo 1 hora. Se toman 200 µl, se transfiere a un tubo de microcentrífuga, se agregan 50 ng de DNA y se mezcla lentamente. Se incuba en hielo por 30 minutos y se le da un choque térmico a 42°C durante 2 minutos. Se coloca en hielo por otros 2 minutos, se agregan 800 µl de medio LB, se recupera a 37°C por 45 minutos, se colectan las células y se platea en medio selectivo (50).

4.7 Purificación de FlgE1 para la generación de anticuerpos específicos y su validación mediante inmunodetección.

El plásmido pBAD HisC permite la transcripción del gen de interés a partir del promotor inducible P_{BAD}. Además, la clonación apropiada del gen posibilita la adición de una etiqueta de 6 histidinas en el extremo NH₂ terminal de la proteína que será sobre-expresada, haciendo posible su purificación por medio de cromatografía de afinidad. En este caso, la resina utilizada fue Ni-NTA agarosa (QIAexpress Ni-NTA Protein Purification Kit, QIAGEN). En dicha resina, el ácido nitrilotriacético actúa como agente

quelante de los iones níquel que finalmente unen a los residuos de histidina presentes en la etiqueta de la proteína.

Para la purificación de la proteína His6X-FlgE1, se siguió el siguiente protocolo: A partir de un cultivo de 3 ml ON se inocularon 50 ml de medio selectivo (LB-ampicilina) con 300 µl del cultivo ON. Se creció hasta fase exponencial (D.O. 600~0.5) y se agregó L-Arabinosa al 0.2% y se incubó 2 horas a 37°C en agitación. Se centrifugó en frío a 7000 rpm por 5 minutos y se resuspendió en 500 ml de PBS 1x, se añadieron 100 µl de lisozima (10mg/mL), y se sonicó a 4°C, utilizando cuatro pulsos de 5 segundos con intervalos de 1 minuto, Posteriormente, la muestra se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos; se tomó el sobrenadante y se volvió a centrifugar. Finalmente, al sobrenadante se le añadieron 200 µl de Ni-NTA y se incubó 1 hora a 4°C con agitación ocasional. Pasado este tiempo, se transfirió a una columna de plástico desechable de 1 ml, se lavó cuatro veces con 4 ml de amortiguador de lavado (Solución salina amortiguada con fosfato (PBS) con 15 mM imidazol) y se eluyó con 500 µl de amortiguador de elución (PBS con 250 mM imidazol) tres veces, cada elución se colectó en tubos diferentes.

La obtención del anticuerpo se realizó de acuerdo a los protocolos estandarizados en la literatura(51). Para ello, se utilizaron 6 ratones hembras BALB/C de cuatro a seis semanas de edad. Se inocularon vía intraperitoneal con 20 µg de proteína pura por ratón y 15 días después se aplicó un refuerzo. Quince días después se colectó la sangre y el suero se mezcló con glicerol para ser almacenado a -70 °C.

Para probar el suero que contiene el anticuerpo anti-FlgE1, se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12%, los extractos totales de diferentes

cultivos bacterianos. Al final de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, utilizando una cámara de transferencia húmeda. Posteriormente, la membrana se incubó toda la noche con leche descremada al 1% en solución salina amortiguada con Tris y TweenTM (TBS-T). Después de lavar tres veces por 10 min con TBS-T, la membrana se incubó 1 hora con el anticuerpo anti-FlgE1 diluido 1:50000. Pasado este tiempo, la membrana se lavó con TBS-T 3 veces por 10 minutos, y posteriormente se incubó durante 1 h con un anticuerpo secundario cuyo blanco de reconocimiento son las IgG de ratón. Se lavó nuevamente 3 veces por 10 minutos con TBS-T, y otras 2 veces por 2 minutos con el amortiguador de lavado final. Al terminar se agregaron 1.2 ml de CDPstar y 60 µl de NitroBlock y se incubó por 5 minutos. Se expuso la membrana a una placa de rayos x durante 5 segundos y se reveló.

4.8 Conjugación

Se crecieron 10 ml de cultivos en agitación constante de WS8 (cepa silvestre de *R. sphaeroides*) y de *E. coli* cepa S17 pJQ *flgM::aad* hasta fase exponencial en 30 °C y 37°C respectivamente, se tomaron 1.5 ml de cada cultivo y se transfirieron a tubos de microcentrífuga, se centrifugaron 2 minutos a máxima velocidad, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 1 ml de medio LB, este procedimiento se repitió tres veces para quitar todo rastro de antibiótico. Después de estos lavados, ambos paquetes celulares se mezclaron con medio LB en un volumen total de 1 ml. Se centrifugó y se eliminó todo el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 50 µl de medio LB y se colocaron en un soporte de nitrocelulosa estéril sobre medio LB y se incubaron a 30°C durante 6 horas. Pasado este tiempo se transfirió la nitrocelulosa a un tubo de microcentrífuga conteniendo 400 µl de LB. Después de resuspender las células, se

platearon 100 µl en 4 cajas con agar en medio LB con ácido nalxídico, sacarosa y espectinomicina. En el caso de las conjugaciones triparentales, para transferir los plásmidos pIND_flgM y pRK_flgM, se utilizó la cepa TOP10 con el plásmido de interés, la cepa mutante de *R. sphaeroides*, y la cepa JM103/pRK2013 que lleva el plásmido con las funciones de transferencia (52).

4.9 Ensayo de Inmunofluorescencia

Se tomaron 0.5 ml de un cultivo en fase exponencial (D.O. 600 nm ~0.5) y se añadieron 50 µl de paraformaldehído al 30% y se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó con 1 ml de PBS 1x. Se volvió a centrifugar y se resuspendió en una solución de PBS, BSA al 1% y anti-FlgE1 1:1000, y se incubó a 4°C por 3 horas. Se centrifugó a 3000 rpm, se repitió el lavado 3 veces con 1 ml de PBS. Se resuspendió en una solución de PBS, suero bovino con albúmina (BSA) al 1% y el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con 'AlexaFluor' 488 y se diluyó 1:200. Se incubó por 45 minutos a 4°C y se lavó dos veces con PBS. Se montó en una cama de agar al 1.2% en un portaobjetos y se observó una muestra de las células al microscopio.

Tabla 1. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia	Inserciones
FlgICOBAD	5'-CAGATCTCACCTCGATCAACACCGCCCTC-3'	Sitio de corte BglII
FlgINHBAD	5'-GAAGCTTCCTCAGCTGCGGATGTTTCATGATC-3'	Sitio de corte HindIII
6086A	5'-GGAATTCGACCGAGATCCTCGAGATC-3'	Sitio de corte EcoRI
6088B	5'-GGAATTCGTTCAACCTCGCGCTCCTT-3'	Sitio de corte EcoRI
FlgMrev1	5'-CGGGATCCACGACGGATTTCGACCATGTG-3'	Sitio de corte BamHI
FlgMrev2	5'-CGGGATCCGTCGACCTCGAACGCATCAC-3'	Sitio de corte BamHI
FlgMIND1	5'-GCCCATGGAGGAGGGTTCACATGGTCG-3'	Sitio de corte NcoI
FlgMIND2	5'-GCAAGCTTCGAGGTCTCAGAGCTTCAG-3'	Sitio de corte HindIII
FlgMRK1	5'-GCAAGCTTCATGTGGAGGCGCTGAACGGCA-3'	Sitio de corte HindIII
fw6088	5'-GCGGATCCGCCATGTTTCGGCCTCGCG-3'	Sitio de corte BamHI
fliAfw	5'-CGAAGCTTCTGCCTCACGCGCACCGATCTC-3'	Sitio de corte HindIII
fliADr4	5'-CGGAATTCTCACATCTGGCTGGCCTGCAGACG-3'	Sitio de corte EcoRI y codón de paro "TGA"

Tabla 2. Plásmidos y Cepas

Nombre	Características relevantes	Fuente o Referencia
Plásmidos		
pCR 2.1 TOPO	Vector de subclonación de productos de PCR	Life Tech.
pBAD HisC	Vector de expresión de proteínas recombinantes 6x His	Invitrogen
pPIRL	Vector que codifica para tRNAs para codones poco abundantes	Bao and Cohen, 2001
pTZ19R	Vector de clonación, amp ^r , modificado sin el sitio de restricción BamHI	Pharmacia
pRK2013	Vector de movilización.	(52)
pJQ200mp18	Vector suicida mobilizable	Quandt and Hynes, 1993
pIND4	Vector de expresión de proteínas inducible por IPTG	Ind <i>et al.</i> , 2009
pRK415	Vector de expresión, derivado del pRK404	Keen <i>et al.</i> , 1988
pBAD_ <i>flgE1</i>	Derivado de pBAD HisC, expresa el gen <i>flgE1</i>	Este estudio
pTZ_ <i>flgM::aadA</i>	Derivado de pTZ19R-BamHI, expresa el gen <i>flgM::aadA</i>	Este estudio

pJQ_ <i>flgM::aadA</i>	Derivado de pJQ200mp18, expresa el gen <i>flgM::aadA</i>	Este estudio
pIND4_ <i>flgM</i>	Derivado de pIND4, expresa el gen <i>flgM::aadA</i>	Este estudio
pRK_ <i>flgM</i>	Derivado de pRK415, expresa el gen <i>flgM</i>	Este estudio
pRK_ <i>fliA r4</i>	Derivado de pRK415, expresa el gen <i>fliA r4</i>	Este estudio

Cepas

E. coli

TOP10	Cepa de clonación, F- <i>mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> Φ80 <i>lacZΔM15ΔlacX74 recA1 araD139Δ(araA-leu)7697</i> <i>galUgalKtpsLendA1nupG</i>	Invitrogen
LMG194	Cepa de expresión de proteínas, F- <i>ΔlacX74 galE thi</i> <i>rpsL (Str^r)ΔphoA (Pvu II)Δara714leu::Tn10</i>	Invitrogen

R. sphaeroides

WS8	Cepa silvestre, nal ^r	Sockett et al 1990
SP15	Derivada de WS8/ <i>fliA ::aadA</i>	Poggio et al. 2005
AS1	Derivada de WS8/ <i>flgM ::aadA</i> . Fenotipo: nado irregular	Este estudio
AS2	Derivada de WS8/ <i>flgM ::aadA</i> . Fenotipo: sin nado	Este estudio
SP12	Derivada de WS8/ <i>fleQ ::kan</i>	Poggio et al. 2005
LC1	Derivada de WS8/ <i>flgE1::aadA</i>	Ballado <i>et al.</i> , 2001
TE1	Derivada de WS8/ <i>flgE1::Tn5</i>	Ballado <i>et al.</i> , 2001

5. Resultados

5.1 Obtención de anticuerpos anti-FlgE1 y su validación por inmunodetección.

La proteína FlgE1 se obtuvo mediante la clonación del gen *flgE1* en un plásmido de expresión de *Escherichia coli*. Para ello, se amplificó el gen *flgE1* mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés) usando los oligonucleótidos FlgICOBAD y FlgINHBAD (ver anexo 1) y DNA cromosomal de la cepa silvestre de *R. sphaeroides* WS8. El producto de amplificación fue purificado y digerido con las enzimas de restricción apropiadas para su clonación en el plásmido pBAD HisC que promueve la transcripción del gen clonado a partir del promotor inducible p_{BAD} y además, añade una etiqueta de histidinas en el extremo amino-terminal de la proteína que será expresada.

Una vez clonada la región codificadora del gen *flgE1* en el plásmido pBAD HisC, este se introdujo a la cepa de *E. coli* LMG194, que lleva el plásmido compatible, denominado pPIRL. Este último plásmido se utiliza de forma rutinaria en el laboratorio para favorecer la expresión de las proteínas que provienen de organismos heterólogos; este plásmido codifica los tRNAs correspondientes a los codones AGG, AGA, CGG (arginina), CCC (prolina), CUA (leucina) y ATA (isoleucina).

La cepa resultante que lleva los plásmidos pPIRL y pBAD-FlgE1, se creció en medio LB con cloranfenicol y ampicilina. Cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial de crecimiento, se tomaron dos alícuotas de 9 ml y a una de ellas se le agregó 0.2% de arabinosa para inducir la expresión del gen *flgE1*. Se realizó una cinética de expresión para determinar el punto máximo de expresión en el tiempo, a la vez que se clarificaba si la

proteína era soluble o insoluble. Se decidió inducir la expresión por 4 horas, ya que se observó una importante acumulación de proteína y se determinó que la proteína era soluble. Se prosiguió a purificar la proteína siguiendo el protocolo descrito en la sección de material y métodos. La proteína pura se cuantificó y se determinó un total de 105 µg a una concentración de 0.21 µg/µl. El grado de pureza de FlgE1 fue evaluado en un gel de poliacrilamida y como se puede observar en la Figura 7a, la mayor cantidad de proteína corresponde a un polipéptido de aproximadamente 50 kDa, el cual coincide con el peso esperado para FlgE1.

Se inmunizaron seis ratones con la proteína purificada y se les extrajo sangre y se separó el suero que contiene anticuerpos anti-FlgE1, con estese realizó un Western Blot utilizando un extracto total de células de la cepa WS8, así como de tres cepas mutantes, para comprobar la unión y especificidad de los anticuerpos anti-FlgE1, como se puede observar en la Figura 7b, los anticuerpos reconocen prácticamente una sola proteína en el extracto de la cepa silvestre, cuyo peso molecular corresponde con el de la proteína FlgE1, en tanto que esta misma banda está ausente en la cepa TE1, la cual lleva la inserción del transposón Tn5 en *flgE1*. Sorpresivamente una banda de diferente peso molecular fue detectada con el anticuerpo al utilizar un extracto de la cepa LC1, la cual lleva la mutación *flgE1::aadA(57)*. Esta banda quizá se observa porque *flgE1* está interrumpido con un casete de resistencia a espectinomicina no polar, por lo tanto, puede que los anticuerpos aún reconozcan cierta región de la proteína.

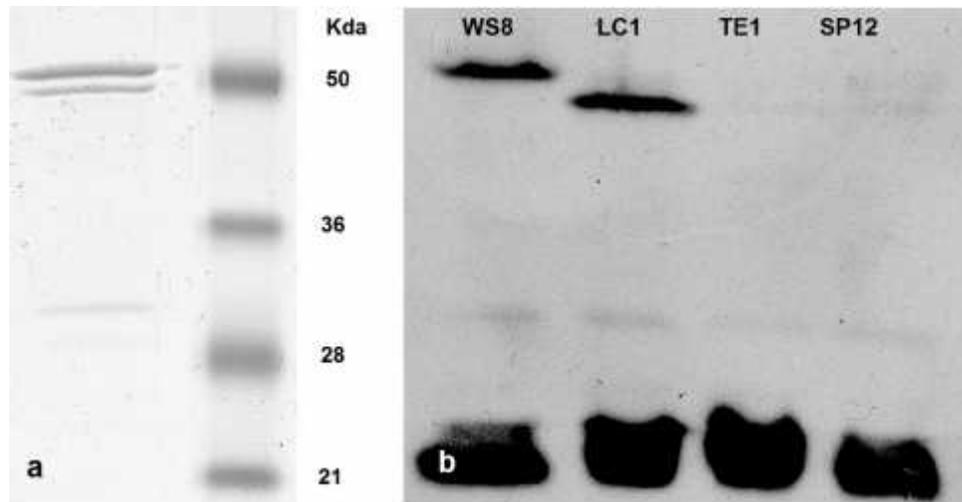


Figura 7. (a) Las bandas de ~50 kDa son la proteína purificada FlgE1 con Ni-NTA; (b). Inmuno-detección de FlgE1 con el anticuerpo Anti-FlgE1 en una dilución de 1:50000 y con el anticuerpo secundario anti-IgG ratón (Sigma) en una dilución de 1:5000, con extractos totales de células de las cepas WS8 (silvestre), LC1 (*flgE1::aadA*), TE1 (*flgE1::Tn5*), y el control negativo SP12 (*fleQ::kan*) donde no se expresan los genes flagelares.

5.2 Obtención de la cepa mutante en el gen *UflgM* y las cepas complementadas

UflgM/pIND4-flgM y *UflgM/pRK-flgM*

Para amplificar el gen *flgM*, se utilizaron los oligonucleótidos 6086A y 6088B (anexo 1) en una reacción de PCR con DNA cromosomal de la cepa WS8. El producto generado de ~2 Kb se clonó en una variante del vector pTZ19R, el cual carece del sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BamHI. El plásmido resultante (pTZ/*flgM*) se transformó en la cepa TOP10 de *E. coli*. Posteriormente, se purificó el plásmido para hacer un PCR que nos permitiera eliminar una buena parte de la región codificadora de *flgM*. Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos FlgMRev1 y FlgMRev2 que llevan en sus extremos el sitio de reconocimiento para la enzima BamHI, este sitio se utilizó posteriormente para interrumpir el gen de *flgM* con el casete *aadA*, el cual confiere resistencia a espectinomicina y no contiene terminadores transcripcionales (figura 8).

El alelo *UflgM::aadA* se subclonó en el vector suicida pJQ200mp18 (Gm^R) y se transfirió a la cepa WS8 por medio de una conjugación triparental, se seleccionaron las colonias derivadas de la doble recombinación homóloga resistentes a espectinomicina y sensibles a gentamicina, se parcharon y se escogieron parches al azar para corroborar su genotipo (figura 9a y 9b) y observar el fenotipo resultante. Se observaron dos fenotipos diferentes, uno que tiene nado irregular y otro que no presentaba nado (figura 10a). Se seleccionó a la cepa AS1 ($\Delta flgM1$), dado que se reportó previamente en Wilkinson *et al.*, 2011 que la cepa mutante en *flgM* tenía un nado relativo al de la cepa silvestre de ~60%, lo que sugiere que la cepa AS2 ($\Delta flgM2$) tiene alguna otra mutación puntual que no le permite nadar.

Con el fin de determinar si las cepas AS1 y AS2 llevan la mutación deseada, se procedió a realizar un PCR de *flgM* utilizando el DNA cromosomal de las cepas WS8, AS1 (*flgM1*), y AS2 (*flgM1*). En la figura 9a se observa un producto de amplificación de 2007 pb para las cepas AS1 y AS2, lo que concuerda con el tamaño esperado para el alelo *UflgM::aadA*; mientras que en la cepa silvestre (WS8), el producto de amplificación corresponde al gen *flgM* silvestre con un tamaño de 318 pb. El hecho de que ambas cepas lleven el alelo *UflgM::aadA*, apoya la idea de que en la cepa AS2 pudiera llevar una mutación adicional que le impide desplazarse.

Por otro lado, para llevar a cabo una prueba de complementación de las cepas AS1 y AS2, se decidió utilizar el plásmido de sobreexpresión pIND4 que se induce con IPTG(55). Cabe mencionar que este plásmido fue el utilizado para sobreexpresar *flgM* y obtener un fenotipo que presentaba más de un flagelo por célula en el trabajo de Wilkinson *et al.*(2011).

Para obtener el gen *flgM* silvestre, se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos FlgMIND1 y FlgMIND2. El producto resultante incluye 10 pb río arriba del codón de inicio y 6pb río abajo del codón de término del gen, e inserta un sitio de restricción NcoI al inicio y un sitio HindIII al final del fragmento. El plásmido resultante se nombró pIND_ *flgM* y se transfirió a la cepa AS1 (*flgM1*) por medio de una conjugación triparental. Se probaron dos colonias resultantes de la conjugación en cajas de nado con 5 μ M IPTG para observar si se recuperaba el nado (figura 10b). No se observaron diferencias en el nado entre la cepa AS1 y las cepas AS1/pIND_ *flgM* 1 y 2, lo que puede indicar que la cantidad de IPTG no es suficiente para recuperar la producción normal de FlgM. Se realizó nuevamente el ensayo utilizando una mayor concentración de IPTG

(50 μ M), sin embargo, tampoco se observó una clara diferencia en el nado de la cepa AS1/pIND_flgM y la cepa AS1 (figura 10c). Lo que sugieren estos resultados es que algo en la construcción del plásmido tiene algún error, ya sea el plásmido en sí mismo o el inserto, por lo que el gen no se expresa correctamente. Otra posibilidad podría ser que la sobreexpresión de FlgM ejerce un efecto negativo sobre la formación y/o funcionamiento del flagelo, y que este nivel inhibitorio se alcanza aún en ausencia de IPTG, a partir de la transcripción de escape del promotor *plac*.

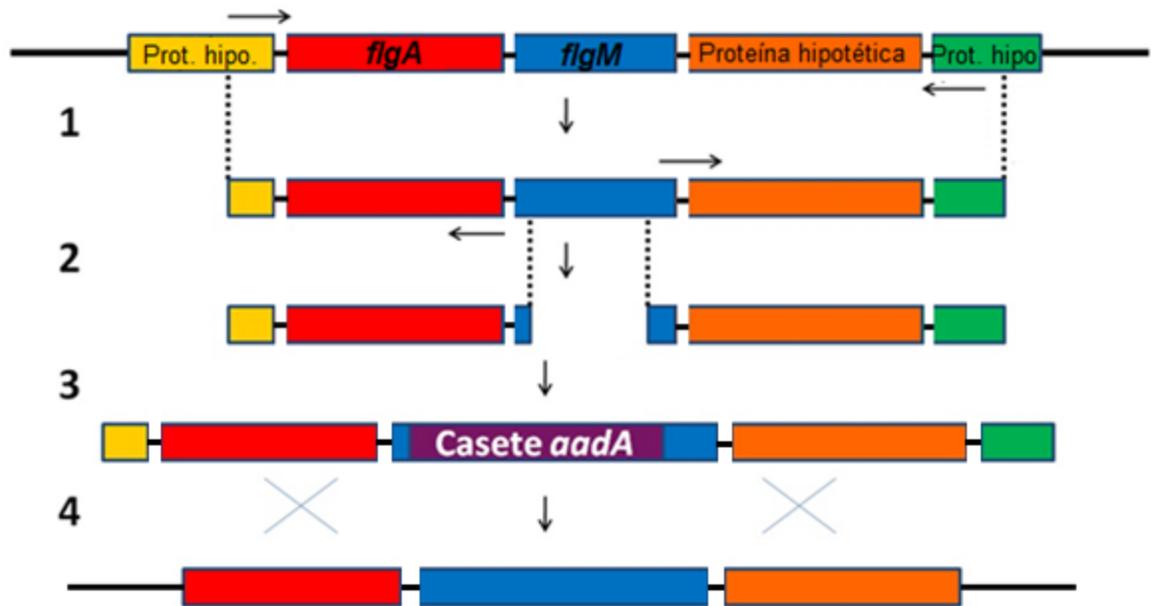


Figura 8. Esquema del diseño experimental para la obtención de la cepa mutante en el gen *flgM*. (1) se amplificó por medio de PCR, utilizando DNA cromosomal de la cepa silvestre WS8, un producto de alrededor de 2000 pb que contiene al gen *flgM* y las regiones adyacentes a este. Además, cada uno de estos oligonucleótidos incluye la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI en el extremo 5'. (2) A partir del producto del PCR anterior, se realizó un PCR inverso para eliminar buena parte de la región codificadora de *flgM* e insertar el sitio de restricción BamHI en *flgM*. (3) Posteriormente, en el sitio BamHI se insertó el casete *aadA* que confiere resistencia a espectinomicina. (4) Se reemplazó el alelo silvestre por el alelo mutante *flgM::aadA* por un evento de doble recombinación homóloga.

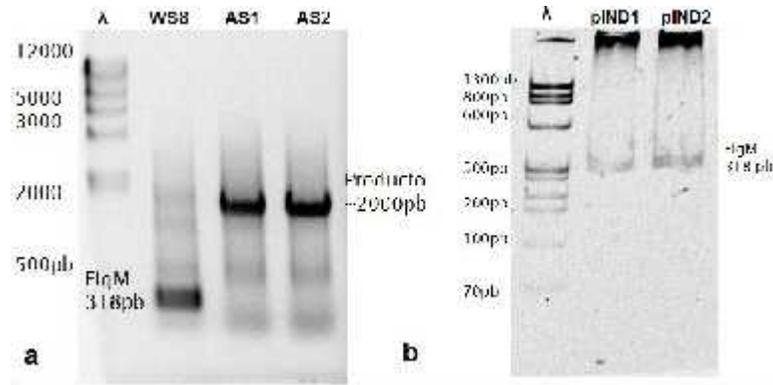


Figura 9. Análisis del genotipo de las cepas AS1 y AS2. (a) PCR del gen *flgM* utilizando DNA cromosomal de las cepas WS8, AS1 y AS2. (b) Digestión de los plásmidos pIND_*flgM*1 (pINDM1) y pIND_*flgM*2 (pINDM2), para corroborar la correcta clonación del gen.

Con el propósito de obtener un plásmido que sí pudiera complementar el fenotipo de la cepa AS1, se procedió a amplificar nuevamente el gen *flgM* e insertarlo en el plásmido pRK415, que es un plásmido de bajo número de copias y por ende la cantidad de proteína sintetizada a partir del promotor del vector, normalmente no alcanza niveles tóxicos (58). Se realizó una conjugación triparental para transferir el plásmido a la cepa AS1, y se tomaron dos colonias resultantes para observar si se recuperaba el nado. Se observó que se recupera parcialmente el nado en las dos cepas seleccionadas (figura 10c), se escogió a la cepa AS1/pRK_*flgM*1 para continuar con el estudio y observarla por inmunofluorescencia.

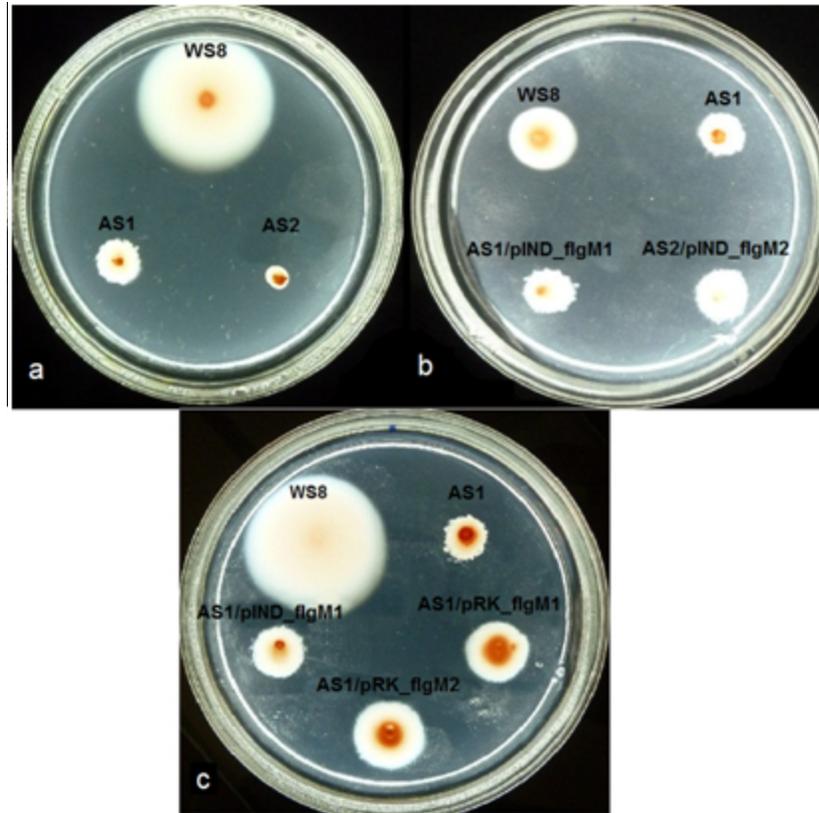


Figura 10. Análisis del fenotipo de las cepas AS1 y AS2. (a) caja de nado en donde se muestran los dos fenotipos obtenidos de las mutantes en *flgM*, se escogió la cepa AS1 para continuar con el proyecto; (b) caja de nado con 5 μ M de IPTG de la cepa transconjugante que lleva el plásmido pIND-*flgM* en la mutante AS1 (dos colonias diferentes escogidas al azar); (c) caja de nado con 50 μ M de IPTG, cepa WS8, AS1, AS1/pIND-*flgM* y AS1/pRK-*flgM* (dos colonias diferentes escogidas al azar).

5.3 Detección de la estructura del gancho-cuerpo basal (HBB) mediante inmunofluorescencia en diferentes cepas mutantes.

Para comprobar la hipótesis sobre la función de la regulación del número de flagelos por FliA y FlgM se decidió observar el número de HBBs usando localización por inmunofluorescencia de la proteína del gancho FlgE1. Para detectar esta proteína se usó el anticuerpo generado en este trabajo. Se utilizó microscopía de campo oscuro para observar y enfocar las células, y para observar la fluorescencia se utilizó un filtro apropiado para excitar el fluorocromo y detectar la emisión del mismo.

Con el programa ImageJ se analizaron las imágenes y se empalmaron para reconocer qué puntos de fluorescencia pertenecían a cada célula. En la cepa silvestre, WS8 (Figura 11a), se observa que cada célula presenta solo un punto de fluorescencia, concordando con lo que se esperaba. Se utilizó como control negativo a la cepa mutante SP13 que tiene un casete de resistencia insertado en el gen *fleQ*, en la cual no hay formación de flagelo (Figura 11b) (Poggio, et al. 2005). En esta cepa no se observa fluorescencia, indicando que los genes flagelares no se están expresando. En la cepa con una mutación en el gen de *flgM* (figura 11c) no se aprecia ningún punto de fluorescencia, esto se puede atribuir a que sin la presencia de FlgM, algún mecanismo de represión de los genes tempranos de la jerarquía flagelar está evitando la formación de la estructura gancho-cuerpo basal (HBB). En las cepas mutantes en *flgM* con el plásmido pIND4_ *flgM* (figuras 11d y 11e; sin y con inducción por IPTG respectivamente) no se lograron observar puntos de fluorescencia, con excepción de algunas acumulaciones del anticuerpo sin colocalización en las células, lo que apoyaría la sugerencia de que el plásmido pIND_ *flgM* contiene algún error que lo hace no funcional. Al complementar la mutante con el

plásmido pRK_ *flgM* (figura 11g) se observó que en algunas células se recuperaba el fenotipo, observándose un foco de fluorescencia.

Por el contrario, en la cepa mutante SP15(*UfliA::kan*) se observó que había células con dos o tres puntos de fluorescencia (figura 11f), por lo que se decidió hacer un conteo de puntos de fluorescencia en las cepas WS8 y SP15 (*fliA::kan*), para compararlas con una prueba de χ^2 y con la hipótesis nula de que la diferencia en la cantidad de células con más de un punto de fluorescencia no era significativa. Los resultados de esta cuantificación se encuentran en la sección 5.4.

Al observar que la cepa SP15 mostraba varios puntos de fluorescencia por célula, se decidió hacer una construcción del gen de *fliA* utilizando los oligonucleótidos *fliA_{fw}* y *fliA Δ r4*, que dejan a la proteína sin la región Δ_4 , que es la responsable de la unión a la región -35 del promotor, permitiéndole a σ^{28} formar la holoenzima RNA polimerasa pero no transcribir ningún gen(19). Esta construcción se clonó en el plásmido pRK y se transformó en la mutante SP15. Se determinó la cantidad de HBBs en esta cepa (Figura 11h) y se procedió a su cuantificación y análisis estadístico (sección 4.4).

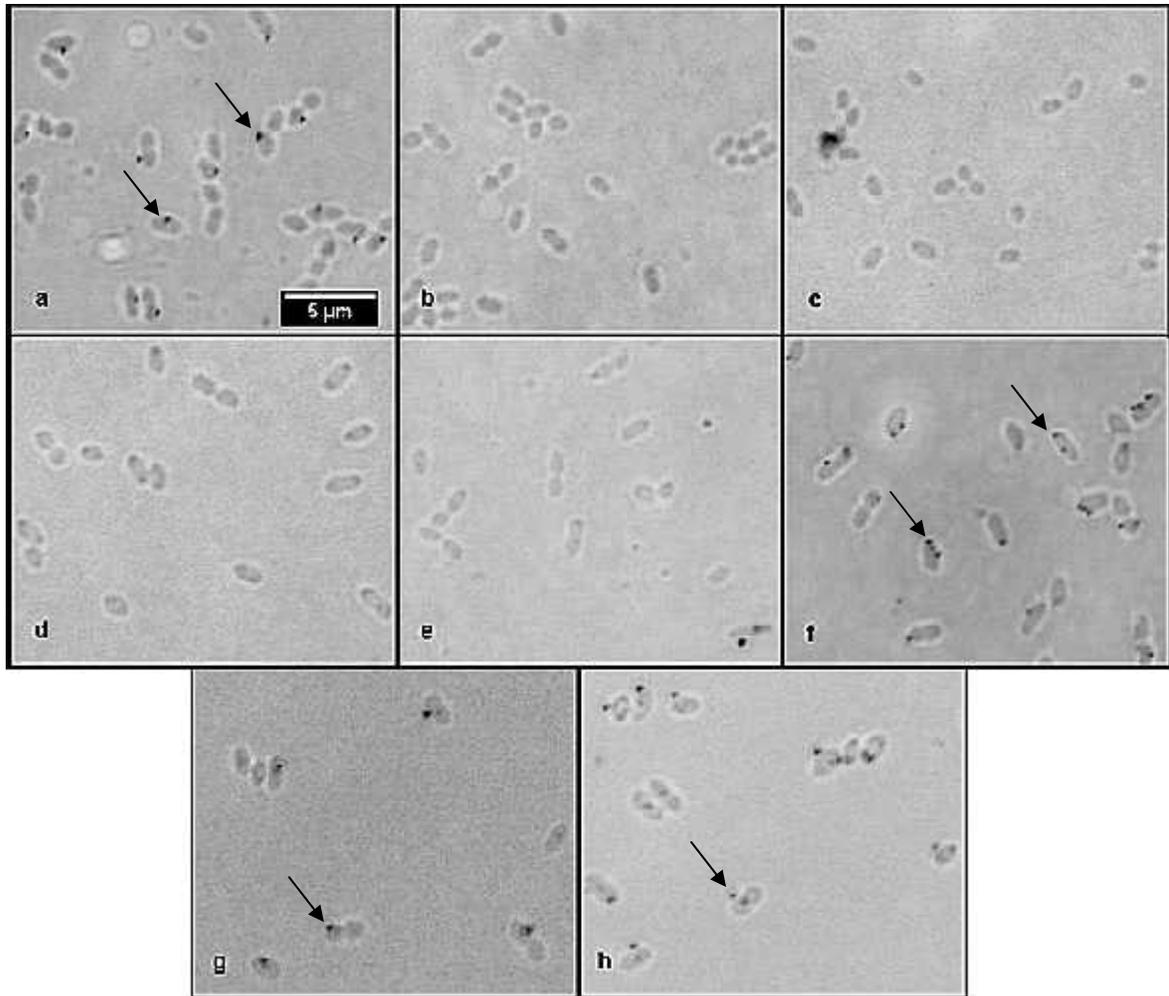


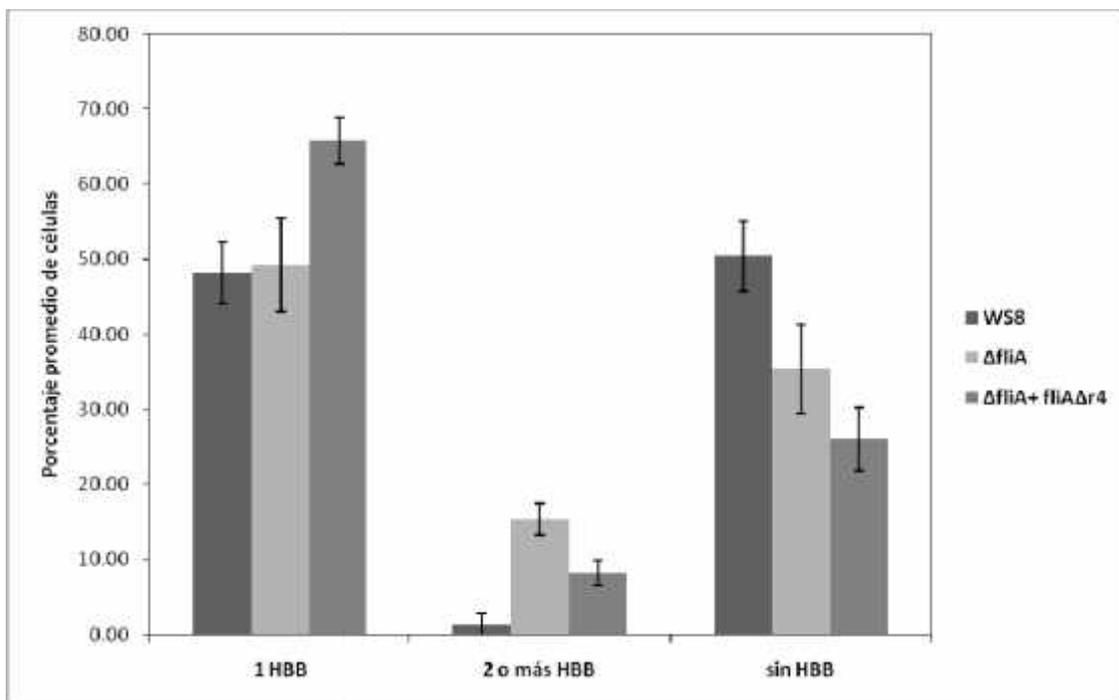
Figura 11. Detección del gancho flagelar por medio de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-FlgE1 y anti- mouse (Invitrogen) como anticuerpo secundario. Las flechas indican focos de fluorescencia, y cada foco representa un HBB. (a), WS8 (silvestre); (b), SP12 (*fleQ::kan*) (control negativo); (c), AS1 (*flgM::aadA*); (d), AS1/pIND4_ *flgM* sin inducción por IPTG; (e), AS1/pIND4_ *flgM* con 100 μ M de IPTG; (f), SP15(*fliA::kan*); (g), AS1/pRK_ *flgM*; (h), SP15/pRK_ *fliA* Δ r4.

5.4 Cuantificación de HBBs por célula.

Se tomaron 5 campos visuales al azar y se cuantificaron todas las células (Tabla 1) en las que claramente se podía distinguir que el o los puntos de fluorescencia pertenecían a una sola célula; asimismo, para diferenciar células en división se supuso que eran dos células si claramente se les podía distinguir el sitio de división, y si presentaban dos puntos se tomó como que cada punto pertenecía a una célula. El tamaño poblacional fue de: para WS8 se contaron en 10 fotos, 481 células; para SP15 se contaron en 10 fotos, 523 células; y para SP15/pRK_ *fliA* *r4* se contaron en 10 fotos, 530 células. Al tener los datos (Tabla 3 y Gráfica 1), se realizaron pruebas de χ^2 en donde se tuvo como hipótesis nula que las dos poblaciones no eran diferentes y por lo tanto la ausencia de FliA no tendría repercusiones en el número de flagelos y como hipótesis alternativa, si la diferencia era significativa (siendo el valor de p menor a 0.05 como un resultado significativo), se concluiría que la ausencia de FliA provoca la aparición de un mayor número de cuerpos basales. Se obtuvo que la probabilidad, con dos grados de libertad, de que la hipótesis nula sea cierta, es de 1.4×10^{-7} . Asimismo, al obtener la cepa SP15/pRK_ *fliA* *r4* se prosiguió a cuantificar los puntos por célula de la población. Se observó que se redujo a la mitad el porcentaje de células que presentaban más de un foco de fluorescencia con respecto a la cepa parental (Tabla 3), y haciendo una prueba de χ^2 la probabilidad con dos grados de libertad, de que haya diferencia en las poblaciones de WS8 y SP15/pRK_ *fliA* *r4* de 2.5×10^{-4} ; y en las poblaciones de SP15 y SP15/pRK_ *fliA* *r4* de 0.028. En conclusión las tres poblaciones son significativamente diferentes entre sí.

Tabla 3. Porcentaje promedio (± 1 D.E.) de HBBs por célula en la cepa silvestre WS8, la cepa SP15, y la cepa SP15 complementada con pRK_ *fliA* r4.

Cepa	1 HBB (% ± 1 DE)	2 o más HBB (% ± 1 DE)	Sin HBB (% ± 1 DE)
WS8	48.24 \pm 4.09	1.38 \pm 1.54	50.38 \pm 4.7
SP15	49.21 \pm 6.24	15.42 \pm 2.1	35.37 \pm 5.93
SP15 + <i>fliA</i> r4	66.96 \pm 3.13	8.21 \pm 1.97	24.83 \pm 4.66



Grafica 1. Se muestran los porcentajes promedio de la cantidad de puntos de fluorescencia por célula de la cepa silvestre WS8, la cepa mutante SP15, y la cepa SP15 complementada con pRK/ *fliA* r4.

6. Discusión

En *R. sphaeroides* se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en mantener solo un flagelo por célula. Los resultados publicados por Wilkinson et al (2011) sugirieron que el circuito FliA/FlgM podría ser responsable de dicho control. En dicho trabajo se sugirió que FliA podría reprimir directa o indirectamente la expresión de los genes de clase III, y de este modo reducir el número de flagelos. En este trabajo, utilizando una aproximación experimental que directamente nos permitió determinar el número de HBBs observamos que en ausencia del factor σ^{28} (FliA) el 15% de las células mostraban más de un HBB por célula. Este resultado confirma los datos publicados, y apoya la idea de que FliA inhibe la formación de flagelos. Previamente, en el laboratorio se había confirmado también que la ausencia de FliA provoca un aumento en la expresión de los genes de la clase III, lo cual debe proveer la cantidad de proteína suficiente para la síntesis de un mayor número de HBBs. Vale la pena mencionar que en nuestro caso, observamos que el 15% de las células tienen más de un HBB, mientras que en el estudio de Wilkinson et al. (2011), no fue posible determinar el número de flagelos en ausencia de FliA, ya que esta proteína se requiere para sintetizar el filamento. El símil de esta condición, de acuerdo a los autores, es sobre-expresar a la proteína FlgM para reducir la actividad de FliA. En este caso observaron que el 23% de las células poseían más de un flagelo y el 62% mostraron solo un flagelo (consideramos que en esta condición, la flagelina necesaria para formar dichos flagelos debió ser sintetizada por el estado de equilibrio que se pudo haber alcanzado entre la exportación de FlgM y la cantidad de FliA libre intracelular). La diferencia entre el número de células con más de un flagelo determinada entre ambos estudios no puede ser fácilmente explicada, ya que por la metodología empleada se hubiese

esperado que en el artículo de Wilkinson, et al (2011) se hubiese subestimado el número de filamentos debido a la ruptura de los mismos por la manipulación de la muestra. Además, se ha observado que bajo circunstancias que comprometen la secreción de los substratos, las células pueden formar el doble de HBBs con respecto al número de flagelos completos (59). No obstante, independientemente de la discrepancia en la proporción de células con más de un flagelo, es evidente que ambos estudios favorecen la idea de que el circuito FliA/FlgM está de alguna forma involucrado en el control de este proceso. Dado que la mayoría de las células aún cuentan con un solo flagelo o HBB, es lógico asumir que deben existir mecanismos adicionales que aún pueden mantener bajo control el número de flagelos por célula, a pesar de la ausencia de FliA.

Desafortunadamente, la cepa mutante en el gen *flgM* fue incapaz de complementarse, y será necesario llevar a cabo estudios adicionales para determinar si la incapacidad de complementación obedece a un defecto en la expresión de la proteína a partir de los plásmidos utilizados o a un defecto en la cepa mutante. El estudio de FlgM resulta relevante dado que en *S. typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *B. subtilis* y *P. aeruginosa* la ausencia de FlgM provoca que la célula sintetice un mayor número de flagelos, mientras que en *R. sphaeroides* ocurre lo contrario, hipotéticamente causado por el efecto inhibitorio de FliA. Sin embargo, los resultados demuestran que este efecto es parcial, de ahí que el aislamiento de una mutante que suprimiera el defecto causado por la ausencia de FlgM podría brindar algún indicio de la existencia de mecanismos adicionales que pudieran estar involucrados en este fenómeno.

Entre las diferentes hipótesis que podrían explicar el mecanismo mediante el cual FliA reduciría el número de flagelos podríamos sugerir que en ausencia de FliA, la

competencia por el núcleo catalítico de la RNA polimerasa sería menor y de ahí que el factor σ^{54} podría asociarse a éste de forma más frecuente y transcribir los genes de clase II y clase III a una tasa más elevada. Una hipótesis alternativa contempla el hecho de que en el transcurso de este trabajo, detectamos una secuencia similar al promotor consenso reconocido por E^{28} en la cadena opuesta en la cual se encuentran los promotores del operón *fleT*, de representar una secuencia funcional, la unión de E^{28} a esta región podría disminuir la expresión de *FleT* y en consecuencia la expresión de los genes de clase III. Sin embargo, también es factible suponer que exista una proteína reguladora adicional cuya expresión sea dependiente de *FliA* y una de sus funciones sea reducir el número de flagelos. Esta última propuesta incluye a la proteína *FliS*, cuya expresión es dependiente de *FliA* y su función como regulador de *FlgM* se encuentra incipientemente caracterizada. En ausencia de *FliA* no hay *FliS*, y por ende *FlgM* se exporta a una tasa mayor, el aumento en la secreción de *FlgM* podría traducirse en la necesidad de ensamblar un mayor número de flagelos.

Para recabar información adicional acerca del efecto inhibitorio de *FliA* y sus posibles causas, en este trabajo se aisló una versión mutante de *FliA*, la cual carece de la región σ^4 . Con base en la información publicada al respecto de los factores sigma de la familia de σ^{70} (19, 20), suponemos que esta versión de *FliA* continúa siendo capaz de unirse al núcleo catalítico de la RNA polimerasa, pero sería incapaz de unirse al DNA específicamente y promover la transcripción. Con respecto a la interacción de esta versión mutante de *FliA* con *FlgM* consideramos que esta pudo haberse afectado negativamente, aunque no de manera total, ya que *FlgM* hace contactos con prácticamente todas las regiones de *FliA* (17).

Los resultados observados con la versión FliA Δ r4, muestran una reducción de aproximadamente el 50% de la población con dos o más HBBs con respecto a los observados en la cepa SP15; lo cual sugiere que parte de los determinantes necesarios para disminuir el número de HBBs se encuentran aún presente en la molécula FliA Δ r4. Por lo tanto, es factible suponer que la competencia por el núcleo catalítico de la RNA polimerasa, y/o la capacidad para unir FlgM y controlar su exportación o vida media, sean parte de los mecanismos que controlan el número de flagelos en esta bacteria.

7. Conclusiones:

Este estudio demuestra que a niveles fisiológicos las proteínas FliA/FlgM, se encuentran involucradas en controlar el número de flagelos, en particular se determinó que:

- 1) Existe un aumento en el número de HBBs, en la cepa mutante en *fliA*.
- 2) La ausencia de FlgM provoca que la célula sea incapaz de sintetizar HBBs.
- 3) La mutante FliA Δ r4 incapaz de unirse al DNA (promotor), es aún capaz de reprimir parcialmente la formación de HBBs.

Bibliografía

1. **Armitage JP, Macnab RM.** 1987. Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **169**:514–8.
2. **Poggio S, Osorio A, Dreyfus G, Camarena L.** 2005. The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins. *Mol. Microbiol.* **58**:969–83.
3. **Dang H, Lovell CR.** 2002. Numerical Dominance and Phylotype Diversity of Marine *Rhodobacter* Species during Early Colonization of Submerged Surfaces in Coastal Marine Waters as Determined by 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis and Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** :496–504.
4. **Porter SL, Wadhams GH, Armitage JP.** 2011. Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**:153–65.
5. **Mackenzie C, Eraso JM, Choudhary M, Roh JH, Zeng X, Bruscella P, Puskás A, Kaplan S.** 2007. Postgenomic adventures with *Rhodobacter sphaeroides*. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**:283–307.
6. **Choudhary M, Mackenzie C, Nereng KS, Sodergren E, Weinstock GM, Kaplan S.** 1994. Multiple chromosomes in bacteria : structure and function of chromosome II of *Rhodobacter* Multiple Chromosomes in Bacteria : Structure and Function of Chromosome.
7. **Poggio S, Abreu-Goodger C, Fabela S, Osorio A, Dreyfus G, Vinuesa P, Camarena L.** 2007. A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **189**:3208–16.
8. **Aldridge P, Hughes KT.** 2002. Regulation of flagellar assembly. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:160–5.
9. **Clarke MB, Sperandio V.** 2005. Transcriptional regulation of flhDC by QseBC and sigma (FliA) in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **57**:1734–49.
10. **Soutourina O a, Bertin PN.** 2003. Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:505–523.
11. **McCarter LL.** 2006. Regulation of flagella. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:180–6.

12. **Frisk A, Jyot J, Arora SK, Ramphal R.** 2002. Identification and Functional Characterization of flgM, a Gene Encoding the Anti-Sigma 28 Factor in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **184** :1514–1521.
13. **Macnab RM.** 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**:77–100.
14. **Poggio S, Aguilar C, Osorio A, Dreyfus G, Camarena L, González-pedrajo B.** 2000. 54 Promoters Control Expression of Genes Encoding the Hook and Basal Body Complex in *Rhodobacter sphaeroides* 54 Promoters Control Expression of Genes Encoding the Hook and Basal Body Complex in *Rhodobacter sphaeroides*.
15. **Peña-Sánchez J, Poggio S, Flores-Pérez U, Osorio a, Domenzain C, Dreyfus G, Camarena L.** 2009. Identification of the binding site of the {sigma}54 hetero-oligomeric FleQ/FleT activator in the flagellar promoters of *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology* **155**:1669–79.
16. **Martin AC, Gould M, Byles E, Roberts M a J, Armitage JP.** 2006. Two chemosensory operons of *Rhodobacter sphaeroides* are regulated independently by sigma 28 and sigma 54. *J. Bacteriol.* **188**:7932–40.
17. **Sorenson MK, Ray SS, Darst S a.** 2004. Crystal structure of the flagellar sigma/anti-sigma complex sigma(28)/FlgM reveals an intact sigma factor in an inactive conformation. *Mol. Cell* **14**:127–38.
18. **Campbell E a, Muzzin O, Chlenov M, Sun JL, Olson CA, Weinman O, Trester-Zedlitz ML, Darst S a.** 2002. Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol. Cell* **9**:527–39.
19. **Paget MSB, Helmann JD.** 2003. Protein family review The 70 family of sigma factors 1–6.
20. **Young BA, Gruber TM, Gross CA, Francisco S.** 2002. Minireview **109**:417–420.
21. **Buck M, Gallegos M, Studholme DJ, Guo Y, Gralla JD, Gallegos A, Gralla JAYD.** 2000. Transcription Factor MINIREVIEW **54**.
22. **Poggio S, Osorio A, Dreyfus G, Camarena L.** 2002. The four different sigma(54) factors of *Rhodobacter sphaeroides* are not functionally interchangeable. *Mol. Microbiol.* **46**:75–85.
23. **Murakami KS, Darst S a.** 2003. Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**:31–39.
24. **Murakami KS, Masuda S, Darst S a.** 2002. Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science* **296**:1280–4.

25. **Helmann JD.** 1999. Anti-sigma factors. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:135–41.
26. **Lonetto M, Gribskov M, Gross CA.** 1992. and evolutionary relationships . The C . 70 Family : Sequence Conservation and Evolutionary Relationships **174**.
27. **Studholme DJ, Buck M.** 2000. The alternative sigma factor sigma(28) of the extreme thermophile *Aquifex aeolicus* restores motility to an *Escherichia coli* *fliA* mutant. *FEMS Microbiol. Lett.* **191**:103–7.
28. **Chadsey MS, Hughes KT.** 2001. A multipartite interaction between *Salmonella* transcription factor sigma28 and its anti-sigma factor FlgM: implications for sigma28 holoenzyme destabilization through stepwise binding. *J. Mol. Biol.* **306**:915–29.
29. **Chadsey MS, Karlinsey JE, Hughes KT.** 1998. The flagellar anti-sigma factor FlgM actively dissociates *Salmonella typhimurium* sigma 28 RNA polymerase holoenzyme. *Genes Dev.* **12**:3123–3136.
30. **Auvray F, Thomas J, Fraser GM, Hughes C.** 2001. Flagellin polymerisation control by a cytosolic export chaperone. *J. Mol. Biol.* **308**:221–9.
31. **Schmitt CK, Darnell SC, Tesh VL, Stocker B a, O'Brien a D.** 1994. Mutation of *flgM* attenuates virulence of *Salmonella typhimurium*, and mutation of *fliA* represses the attenuated phenotype. *J. Bacteriol.* **176**:368–77.
32. **Prouty MG, Correa NE, Klose KE.** 2001. The novel sigma54- and sigma28-dependent flagellar gene transcription hierarchy of *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **39**:1595–609.
33. **Correa NE, Barker JR, Klose KE.** 2004. The *Vibrio cholerae* FlgM Homologue Is an Anti- 28 Factor That Is Secreted through the Sheathed Polar Flagellum **186**:4613–4619.
34. **Syed KA, Beyhan S, Correa N, Queen J, Liu J, Peng F, Satchell KJF, Yildiz F, Klose KE.** 2009. The *Vibrio cholerae* flagellar regulatory hierarchy controls expression of virulence factors. *J. Bacteriol.* **191**:6555–70.
35. **Ohnishi K, Kutsukake K, Suzuki H.** 1992. A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium* : an anti- sigma factor inhibits the activity of the flagellum- specific Sigma factor , *cr* ^ **6**:3149–3157.
36. **Frisk A, Jyot J, Arora SK, Ramphal R.** 2002. Identification and Functional Characterization of *flgM* , a Gene Encoding the Anti-Sigma 28 Factor in *Pseudomonas aeruginosa* Identification and Functional Characterization of *flgM* , a Gene Encoding the Anti-Sigma 28 Factor in *Pseudomonas aeruginosa*.

37. **Ding L, Wang Y, Hu Y, Atkinson S, Williams P, Chen S.** 2009. Functional characterization of FlgM in the regulation of flagellar synthesis and motility in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiology* **155**:1890–900.
38. **Hughes KT, Gillen KL, Semon MJ, Karlinsey JE.** 1993. Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* **262**:1277–80.
39. **Rosu V, Hughes KT.** 2006. sigma28-dependent transcription in *Salmonella enterica* is independent of flagellar shearing. *J. Bacteriol.* **188**:5196–203.
40. **Xu S, Peng Z, Cui B, Wang T, Song Y, Zhang L, Wei G, Wang Y, Shen X.** 2014. FliS modulates FlgM activity by acting as a non-canonical chaperone to control late flagellar gene expression, motility and biofilm formation in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Environ. Microbiol.* **16**:1090–104.
41. **Galeva A, Moroz N, Yoon Y-H, Hughes KT, Samatey F a, Kostyukova AS.** 2014. Bacterial flagellin-specific chaperone FliS interacts with anti-sigma factor FlgM. *J. Bacteriol.* **196**:1215–21.
42. **Muskotál A, Király R, Sebestyén A, Gugolya Z, Végh BM, Vonderviszt F.** 2006. Interaction of FliS flagellar chaperone with flagellin. *FEBS Lett.* **580**:3916–20.
43. **Brown JD, Saini S, Aldridge C, Herbert J, Rao C V, Aldridge PD.** 2008. The rate of protein secretion dictates the temporal dynamics of flagellar gene expression. *Mol. Microbiol.* **70**:924–37.
44. **Saini S, Floess E, Aldridge C, Brown J, Aldridge PD, Rao C V.** 2011. Continuous control of flagellar gene expression by the 28-FlgM regulatory circuit in *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **79**:264–78.
45. **Kazmierczak BI, Hendrixson DR.** 2013. Spatial and numerical regulation of flagellar biosynthesis in polarly flagellated bacteria. *Mol. Microbiol.* **88**:655–63.
46. **Wilkinson D a, Chacko SJ, Vénien-Bryan C, Wadhams GH, Armitage JP.** 2011. Regulation of flagellum number by FliA and FlgM and role in biofilm formation by *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **193**:4010–4.
47. **Bertani G.** 1951. STUDIES ON LYSOGENESIS I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli* *J. Bacteriol.* **62** :293–300.
48. **SISTROM WR.** 1962. The Kinetics of the Synthesis of Photopigments in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J. Gen. Microbiol.* **28** :607–616.
49. **Holmes DS, Quigley M.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**:193–197.

50. **Cohen S.** 1974. Transformation of *Escherichia coli* by Recombinant Plasmid Replicons Constructed in Vitro, p. 155–165. *In* Grell, R (ed.), *Mechanisms in Recombination* SE - 15. Springer US.
51. **Greenfield EA.** 2013. *Antibodies: A Laboratory Manual* Second Edi. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
52. **Figurski DH, Helinski DR.** 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76** :1648–1652.
53. **Bao K, Cohen SN.** 2001. Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces* 1518–1527.
54. **Quandt J, Hynes MF.** 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**:15–21.
55. **Ind AC, Porter SL, Brown MT, Byles ED, de Beyer J a, Godfrey S a, Armitage JP.** 2009. Inducible-expression plasmid for *Rhodobacter sphaeroides* and *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:6613–5.
56. **Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Troilinger D.** 1988. Short Communications Improved brood-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria **70**:191–197.
57. **Ballado T, Camarena L, González-pedrajo B, Silva-herzog E, Dreyfus G, Gonza B.** 2001. The Hook Gene (flgE) Is Expressed from the flgBCDEF Operon in *Rhodobacter sphaeroides* : Study of an flgE Mutant The Hook Gene (flgE) Is Expressed from the flgBCDEF Operon in *Rhodobacter sphaeroides* : Study of an flgE Mutant.
58. **Zhang Y, Feng X-H, Wu R-Y, Derynck R.** 1996. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-[beta] response. *Nature* **383**:168–172.
59. **Konishi M, Kanbe M, McMurry JL, Aizawa S-I.** 2009. Flagellar formation in C-ring-defective mutants by overproduction of FliI, the ATPase specific for flagellar type III secretion. *J. Bacteriol.* **191**:6186–91.