



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Mapeo del promotor del gen *fleQ* en *Rhodobacter  
sphaeroides*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

SANDRA MARGARITA FLORES GONZÁLEZ



DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA

Cd. Universitaria, D. F. 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.

### **1. Datos del alumno**

Flores  
González  
Sandra Margarita  
55 40 81 99 82  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
307226978

### **2. Datos del Tutor**

Dra.  
Rosa Laura  
Camarena  
Mejía

### **3. Datos del Sinodal 1**

Dr.  
Alejandro  
Zentella  
Dehesa

### **4. Datos del Sinodal 2**

Dr.  
Luis  
Servín  
González

### **5. Datos del Sinodal 3**

Dra.  
Claudia Andrea  
Segal  
Kischinevzky

### **6. Datos del Sinodal 4**

Dr.  
Saúl  
Cano  
Colín

### **7. Datos del trabajo escrito**

Mapeo del promotor del gen *fleQ* en *Rhodobacter sphaeroides*  
50p  
2014

## AGRADECIMIENTOS

A la técnico de laboratorio Aurora Ventura Osorio quien fue un gran apoyo en la realización de esta investigación.

Este proyecto fue parcialmente financiado por el donativo de PAPIIT (UNAM) IN204614.

## AGRADECIMIENTOS ESPECIALES Y DEDICATORIAS

A quienes han facilitado mi educación desde que nací, mi familia.

A la Dra. Laura Camarena quien aceptó ser mi tutora, mi primer guía oficial hacia la investigación científica, a quien tendré presente el resto de mi vida por su maravillosa enseñanza, su apoyo académico, paciencia y la confianza depositada en mí.

Al Dr. Alejandro Zentella que conocí en el mejor momento, quien en tan poco tiempo me enseñó tantas cosas, y tuvo el tiempo para escucharme y aconsejarme tanto académica como personalmente.

Al Dr. Sebastián Poggio por los consejos y ayuda brindada durante mi estancia en el laboratorio.

A mis sinodales: Dr. Saúl Cano, Dr. Luis Servín y a la Dra. Andrea Segal por sus consejos para el mejoramiento de este trabajo, por el tiempo invertido para revisar esta tesis.

A quienes hicieron que los días dentro y fuera del laboratorio fuesen más agradables: Rocío, Caleb, Luis David, Paulina, José, Elidet, Raúl, Diego, Bruno, Benjamín, Sebastián, Manuel, Andrés.

Ana Laura y sus charlas matutinas en el carro, quien en muchas ocasiones fue el motivo para levantarme temprano, y en quien encontré a una guía espiritual, y sobre todo a una amiga.

A Salvador, quien me introdujo al ambiente social en el laboratorio con su característica labia y humor. Espero que mis recomendaciones de maestros de Matemáticas le hayan ayudado.

A Clelia que siempre estuvo dispuesta a ayudarme en cualquier aspecto.

Y sobre todo a quien me sacó en más de una vez de algún apuro, a Auro, gracias por tus consejos y ayuda.

A la persona que a través de sus clases hizo que me gustara la biología molecular y que me interesara la vida en un laboratorio, quien fue mi primer ídolo y a quien le debo tan valiosos consejos, Luis Robledo.

A quienes encontré en ellos más que un amigo:

A Brenda, por las risas, por ser mi cómplice, por estar presente en los momentos más importantes de mi vida, por enseñarme a hacer pasteles, prestarme tu horno y tiempo.

A Alejandro, por tus pláticas, y tu humor que nos une desde la primer semana de clases.

A Gaby, por siempre alegrarme el día dentro y fuera de la facultad y ser parte de mis aventuras y dejarme ser parte de las tuyas.

A Edith y Efraín, con quienes pasé menos tragos amargos en las materias y siempre puedo encontrar un brazo de apoyo.

¡Salud por ellos!

A los amigos que fui encontrando en mi estancia en la universidad y que jamás olvidaré: Lulú, Laura, Bibi, Fernanda, Yisus, Ernesto, Mauricio, y Luis.

A todos y cada uno de ustedes ¡Gracias!

# ÍNDICE

Resumen .....	7
El flagelo bacteriano .....	8
Generalidades de la regulación de la transcripción en bacterias .....	11
Regulación de la expresión de los genes flagelares y biogénesis del flagelo. ....	15
El gen <i>fleQ</i> .....	22
Objetivo principal.....	25
Objetivos particulares .....	25
Materiales y métodos .....	26
Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados. ....	26
Medios y condiciones de cultivo.....	29
Transformación de <i>E. coli</i> (células competentes químicas). ....	30
Purificación de plásmidos en pequeña escala (miniprep). ....	30
Purificación de plásmidos y recuperación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa. ....	31
Conjugación .....	31
Construcción de las cepas $\Delta recA$ .....	31
Resultados.....	33
Análisis de delección de la región regulatoria de <i>fleQ</i> . ....	40
Discusión .....	42
Conclusiones .....	46
Perspectivas .....	47
Apéndice .....	48
Bibliografía .....	49

## RESUMEN

El flagelo bacteriano se divide para su estudio en tres partes: el filamento, el gancho y el cuerpo basal. La estructura conocida como cuerpo basal se extiende desde el citoplasma hasta la membrana externa, el gancho es la primera estructura flagelar extracelular. Sobre el gancho se forma el filamento, formado por subunidades de una sola proteína denominada flagelina. Más de cincuenta genes están involucrados en la formación y funcionamiento del flagelo. En general, estos genes se expresan siguiendo un patrón jerárquico; sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en el control de dicha jerarquía varían entre las diversas especies bacterianas. *Rhodobacter sphaeroides* es una  $\alpha$ -proteobacteria que se desplaza gracias a la acción de un flagelo subpolar. La formación de este flagelo es absolutamente dependiente de la presencia del activador transcripcional, FleQ.

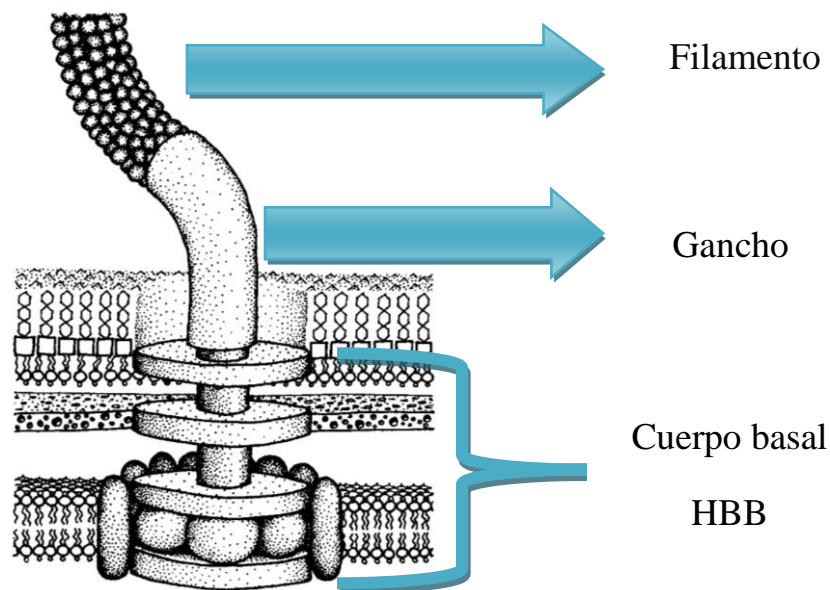
Anteriormente en el laboratorio, se trató de identificar el promotor responsable de la transcripción del gen *fleQ*, en dicho trabajo se llevó a cabo un ensayo de protección a RNAsas. A partir de ese experimento se identificaron dos fragmentos resistentes a RNAsas. Uno de los fragmentos correspondería a un mensajero cuyo +1 se ubicaría 150 pb río arriba del codón de metionina iniciadora de FleQ, mientras que el otro iniciaría 300 pb río arriba del ATG. En este trabajo nos propusimos identificar la región mínima necesaria para la expresión del gen *fleQ* mediante un análisis de delección. La expresión de este gen fue valorada a través de ensayos de complementación.

El mapeo por delección de la región regulatoria y el análisis *in silico* realizados en este trabajo sugieren que el sitio de inicio de la transcripción (+1) se encuentra aproximadamente a -81 pb río arriba de la metionina iniciadora de *fleQ* y la transcripción iniciaría aproximadamente 11 pb río arriba de una posible caja -10.



## EL FLAGELO BACTERIANO

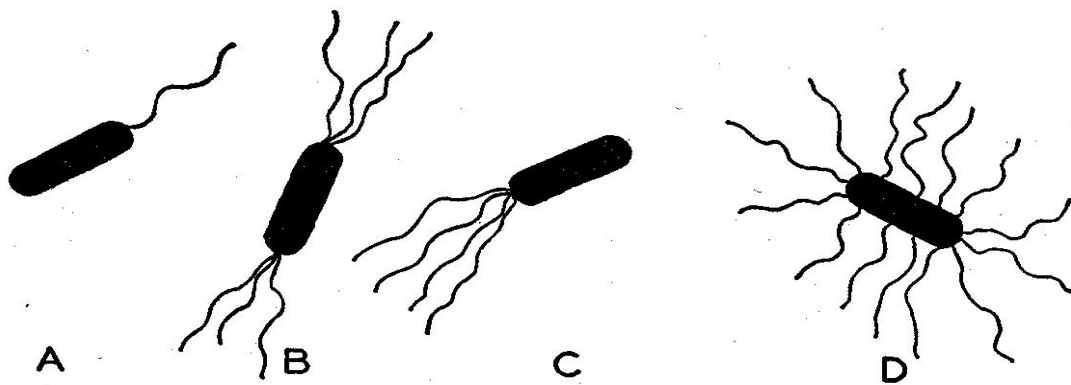
La motilidad es requerida para responder a estímulos ambientales a través de varios tipos de taxis, entre las que destacan: la quimiotaxis, aerotaxis, magnetotaxis; entre otras, sin embargo, la motilidad también se encuentra involucrada en procesos más complejos como son la formación de biopelículas, la virulencia, el desarrollo celular, la colonización bacteriana, etc. El flagelo tiene una función de locomoción e impulsa a las bacterias a través de medios líquidos (swimming o nado) y, sobre superficies o medios viscosos (swarming movimiento en enjambre) (McCarter, 2006; Maes et al., 2013). Dicha estructura está compuesta de un cuerpo basal, un gancho (o HBB, *Hook Basal Body*) y un filamento (**fig. 1**). (Jacobi & Heuner, 2004; Smith & Hoover, 2009).



**Figura 1** Esquemización del flagelo bacteriano

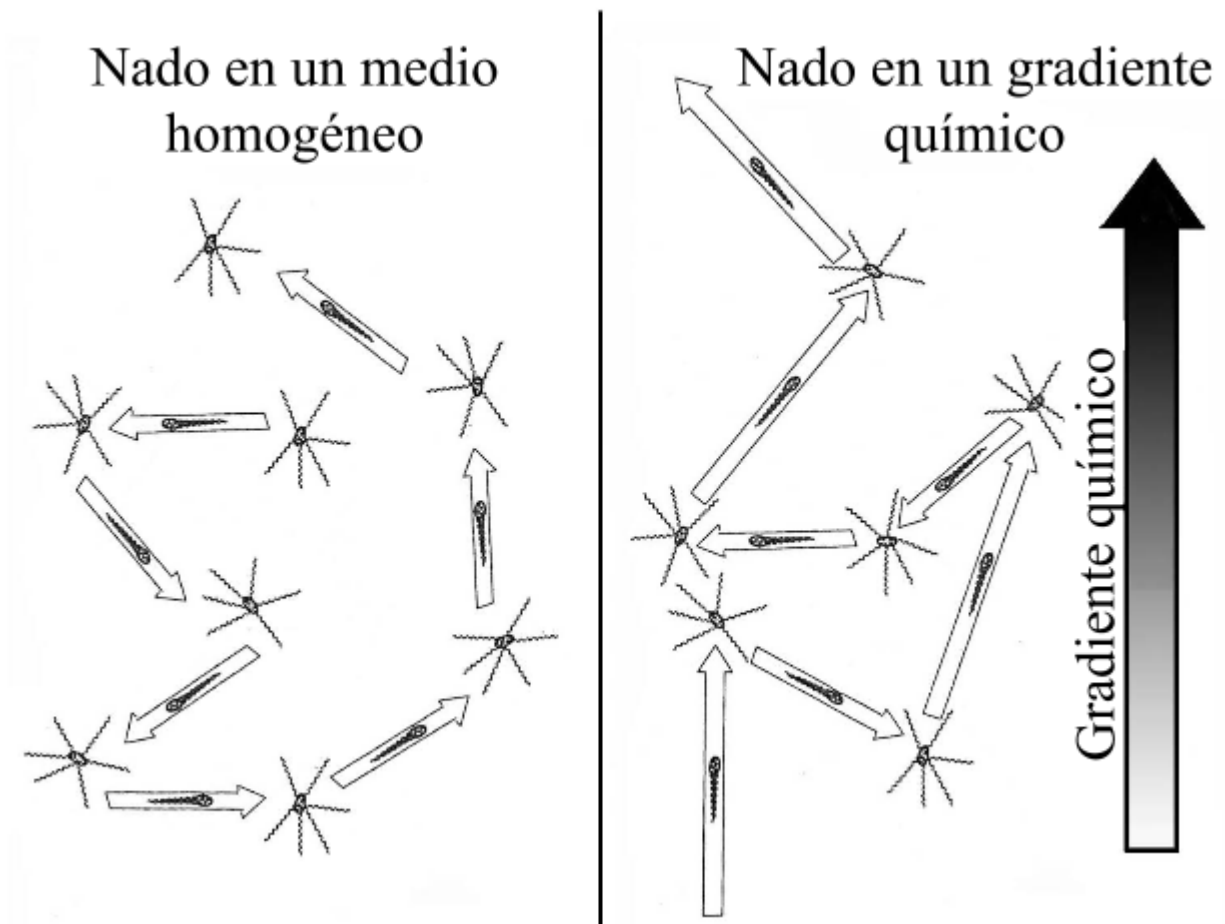
La motilidad dependiente de flagelos está ampliamente distribuida en el mundo bacteriano y más del 80% de las especies conocidas de bacterias poseen estos organelos, incluyendo varias arqueas flageladas. La motilidad flagelar representa una ventaja muy importante para las bacterias, ya que les permite moverse hacia donde haya condiciones favorables; así como evitar ambientes perjudiciales, lo que permite a las bacterias flageladas competir exitosamente con otros microorganismos (Fenchel, 2002).

Las bacterias flageladas producen diferentes patrones de flagelación característicos de cada especie. Estos modelos van desde la flagelación perítrica (producción de muchos flagelos a lo largo de toda la célula), hasta la flagelación polar (producción de flagelos exclusivamente en los polos). Entre las bacterias que presentan una flagelación polar existe otro patrón dependiendo del número de flagelos y del lugar en donde se encuentren. Éstas pueden ser monótricas (un flagelo en un polo de la célula), anfítricas (un flagelo en cada polo de la célula) o con una flagelación lofótrica (pocos flagelos en un solo polo) (Kazmierczak & Hendrixson, 2013). La estructura y arreglo del número de flagelos en las células difiere de especie a especie y ambas características parecen estar relacionadas al ambiente específico en donde las células residen (Soutourina & Bertin, 2003) (**fig. 2**).



**Figura 2** Tipos de flagelación en bacterias (A) Monótrica, (B) Polar, (C) Lofótrica, (D) Perítrica

Independientemente del patrón de flagelación, en condiciones homogéneas el nado bacteriano sigue un movimiento aleatorio en tres dimensiones, el patrón que se observa consiste en una serie de trayectorias de desplazamiento sin una dirección determinada, interrumpida por breves eventos de reorientación. Sin embargo, en presencia de un estímulo atrayente (habitualmente alimento), la frecuencia de los eventos de reorientación disminuye y la bacteria muestra un desplazamiento neto a favor del gradiente de concentración de estos atrayentes químicos (**fig. 3**). La frecuencia con la que ocurre el cambio en la dirección del nado está regulada por una cascada de fosforilación de proteínas citoplasmáticas denominada, en conjunto, como sistema quimiotáctico (Ping, 2010).

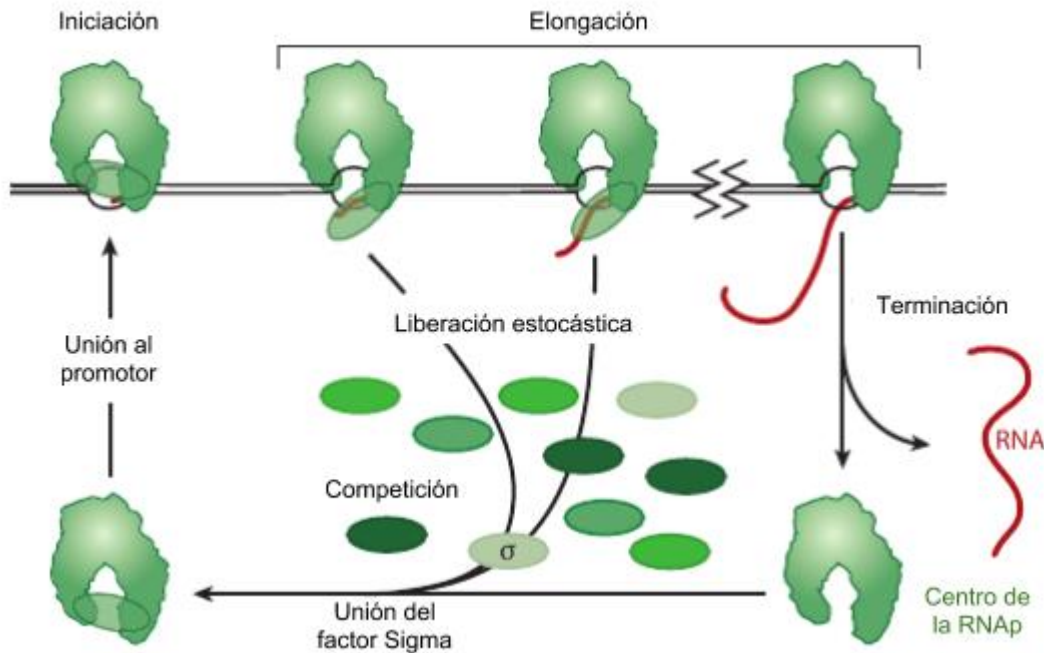


**Figura 3** Nado bacteriano en un medio homogéneo (izquierda) y nado en un medio en gradiente químico (derecha)

La motilidad bacteriana por medio de flagelos requiere de la expresión de una gran cantidad de genes que son necesarios para el completo ensamblaje flagelar (Macnab, 1996); es por ello que el flagelo es la estructura más compleja en bacterias y la transcripción de estos genes necesita ser finamente regulada (Armitage, 2009). En *Escherichia coli* y *Salmonella spp*, cerca de 50 genes agrupados en al menos 17 operones necesitan expresarse para el ensamblaje y funcionamiento del flagelo bacteriano; estos incluyen a aquellos que codifican para las subunidades estructurales, proteínas reguladoras, las proteínas que forman parte de la maquinaria quimiosensora y a los motores generadores de la fuerza motriz (Kutsukake et al., 1990; Chilcott & Hughes, 2000; Aldridge & Hughes, 2002; Poggio et al., 2005; McCarter, 2006; Armitage, 2009).

## GENERALIDADES DE LA REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN EN BACTERIAS

La iniciación de la transcripción en bacterias está mediada por el núcleo de la RNA polimerasa (E) asociado a un factor sigma determinado (Österberg et al., 2011). Aunque el núcleo catalítico de la RNA polimerasa (E) contiene todos los componentes necesarios para la transcripción, éste sólo se puede unir débilmente y de forma inespecífica al DNA. Para iniciar la transcripción de forma específica, E debe primero unirse a una subunidad reguladora disociable, llamada factor sigma ( $\sigma$ ), con lo cual se forma la holoenzima (referida como  $E\sigma$ ), que es capaz de llevar a cabo la iniciación de la transcripción a partir de una secuencia específica en el DNA denominada promotor (Beck et al., 2007; Ghosh et al., 2010) (**fig. 4**).



**Figura 4** Ilustración esquemática del ciclo de la transcripción en donde cada factor sigma compete para asociarse con E para dirigir la holoenzima hacia los promotores (Modificado de Österberg et al., 2011).

Todas las especies bacterianas tienen un factor sigma principal, que es responsable de la transcripción de la mayor parte de los promotores presentes en el cromosoma; además, las bacterias poseen uno o más factores sigma alternativos.

Los factores sigma alternativos son utilizados para redirigir a la RNA polimerasa hacia conjuntos de genes específicos que son requeridos para dar lugar a una respuesta adaptativa (Österberg et al., 2011). Por lo tanto, la capacidad de la mayoría de las bacterias para adaptarse a los cambios de las condiciones de su entorno se sustenta en la variación entre los diferentes factores sigma que dictaminan cuándo y en qué medida las diferentes clases de genes pueden ser transcritos (Österberg et al., 2011) (**tabla 1**).

**Tabla 1.** Tipos de factores  $\sigma$  presentes en *E. coli*

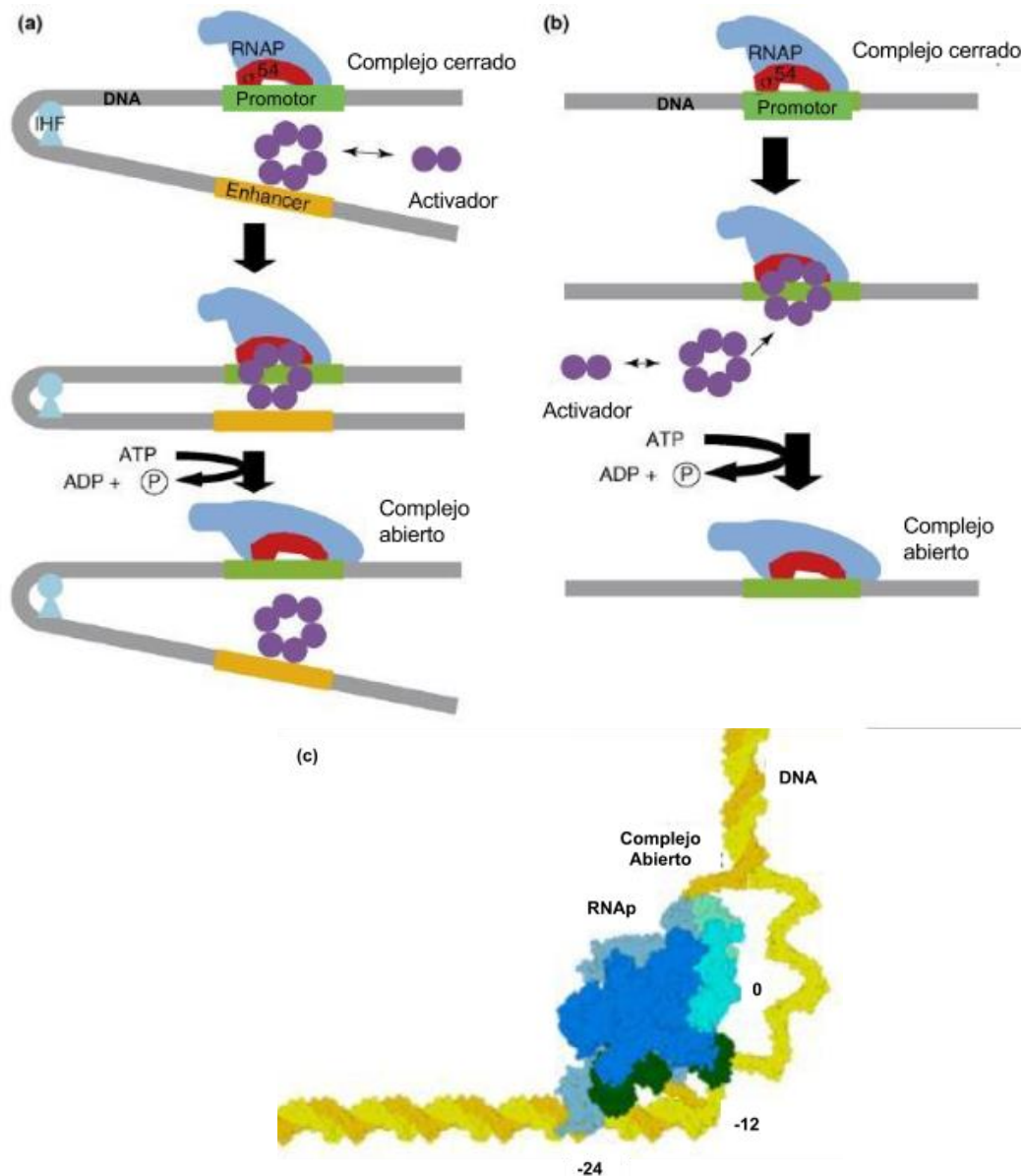
Función	Gen	Factor sigma
Factor $\sigma$ principal, (Housekeeping)	RpoD	$\sigma^{70}$
Regulación del gen <i>fec</i> para el transporte de hierro	FecI	$\sigma^{19}$
Estrés por calor extremo	RpoE	$\sigma^{24}$
Genes flagelares	RpoF	$\sigma^{28}$
Choque térmico	RpoH	$\sigma^{32}$
Inanición / fase estacionaria	RpoS	$\sigma^{34}$
Limitación de nitrógeno	RpoN	$\sigma^{54}$

Los factores  $\sigma$ , además de unirse a E para reconocer e interactuar de forma específica con el promotor, son también dianas para algunos activadores transcripcionales; también están involucrados en la desnaturalización del promotor cerca del sitio del inicio de la transcripción y regulan la transcripción temprana, desactivando y liberando al promotor (Ghosh et al., 2010).

Los factores  $\sigma$  de la familia de  $\sigma^{70}$  son capaces de llevar a cabo la desnaturalización del promotor (formación de complejo abierto) de forma espontánea; sin embargo, el factor  $\sigma^{54}$  no es capaz de llevar a cabo la formación del complejo abierto, y para ello es indispensable la asistencia de proteínas activadoras, usualmente denominadas bEBPs (*Bacterial Enhancer Binding Proteins*). Estas proteínas se unen a sus secuencias blanco en el DNA llamadas UAS (*Upstream Activation Sequences*) ubicadas a 100 o 150 pb río arriba del sitio en el cual el complejo E $\sigma^{54}$  se encuentra unido al promotor, y de ahí que fueron nombradas como EBPs.

Muchos activadores transcripcionales bacterianos estimulan la transcripción uniéndose a sitios cerca del promotor y subsecuentemente reclutando a la RNA polimerasa al promotor (Rhodius & Busby, 1998). Sin embargo, los activadores del

complejo  $E\sigma^{54}$  ( $\sigma^{54}$ -holoenzima) se unen a gran distancia del promotor y mediante la formación de un asa en el DNA interactúan con  $E\sigma^{54}$  para estimular la formación del complejo abierto a través de una reacción que requiere la hidrólisis de ATP (Xu & Hoover, 2001; Burrows et al., 2009) (**fig. 5**).



**Figura 5** Activación transcripcional con el complejo  $E\sigma^{54}$ . (a) En la activación enhancer-dependiente, el activador (mostrado en morado) se une al enhancer (mostrado en amarillo) ubicado río arriba del promotor (mostrado en verde) como un anillo oligomérico activo. La oligomerización es desencadenada por la activación de la proteína (e. g. fosforilación del dominio regulador), pero también es estimulada por la unión del enhancer. A través de un bucle

de DNA el activador contacta al complejo  $E\sigma^{54}$  uniéndolo al promotor. El bucle de DNA es a menudo facilitado por una proteína auxiliar, como el factor de integración huésped (IHF *Integration Host Factor*), el cual se une a un sitio localizado entre el promotor y el enhancer. La hidrólisis de ATP por el activador se acopla a la conversión del complejo cerrado del promotor a uno abierto, que es capaz de iniciar la transcripción. (b) Para un promotor carente de un dominio de unión a DNA, el activador debe ensamblarse en un anillo oligomérico y contactar con el complejo  $E\sigma^{54}$  (c) Esquemática del complejo abierto (*Imagen modificada de: Beck et al., 2007*).

## REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES FLAGELARES Y BIOGÉNESIS DEL FLAGELO.

La formación del flagelo involucra una combinación de mecanismos regulatorios a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional (Aldridge & Hughes, 2002). Todos estos niveles de regulación son necesarios para tener un control en el orden en el cual se expresan y se ensamblan los componentes individuales del flagelo (Dasgupta et al., 2002).

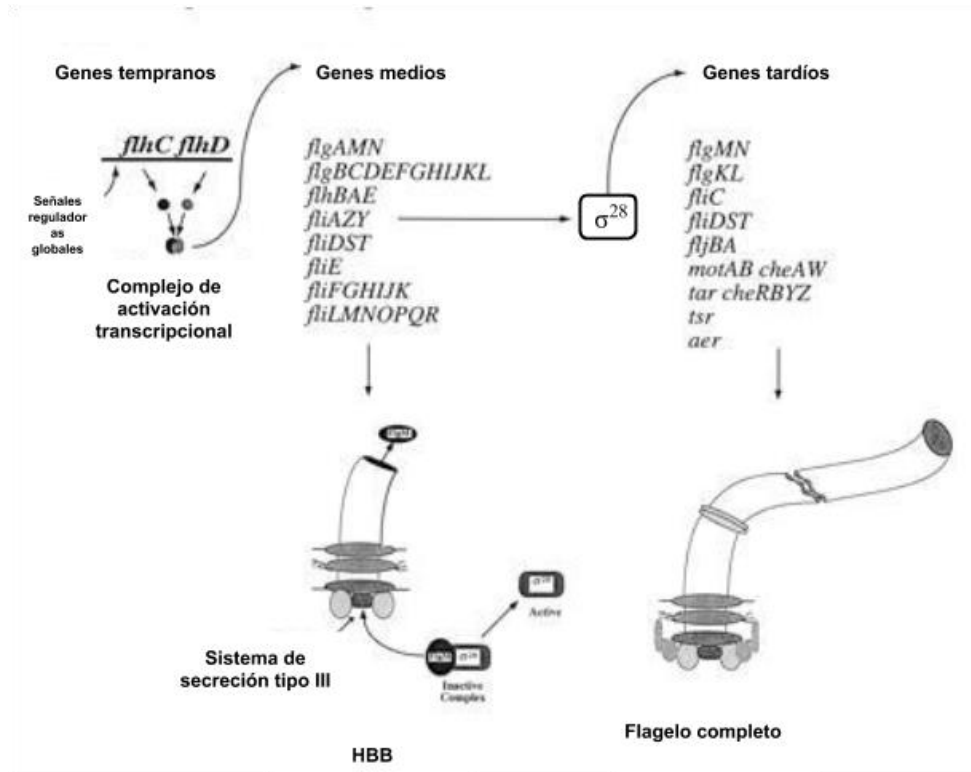
En términos generales, la expresión de los genes flagelares se activa durante la fase exponencial de crecimiento, en la cual la expresión de los genes se lleva a cabo de una manera ordenada y formando una jerarquía, en donde la expresión de un determinado gen requiere de la transcripción de otro gen de nivel superior. Esta regulación de genes flagelares controla la expresión de un gran número de operones flagelares, los cuales en conjunto se denominan como, regulón flagelar (Kalir et al., 2001; Soutourina & Bertin, 2003; Smith & Hoover, 2009).

Esta cascada o jerarquía de regulación es sensible a “checkpoints” (puntos o sitios de regulación) específicos de la biosíntesis flagelar, que ayudan a coordinar la regulación de genes flagelares con el ensamblaje, este punto varía entre las diferentes especies bacterianas (Smith & Hoover, 2009).



En general, en las diferentes jerarquías flagelares los primeros genes que se transcriben codifican para proteínas que controlan la expresión del resto del regulón. A continuación, se expresan los genes cuyos productos incluyen a los componentes estructurales del HBB (**fig. 1**), el TTSS (sistema de secreción tipo III), así como las proteínas reguladoras que acoplan la formación del HBB con la expresión génica tardía necesaria para la terminación del flagelo. Los últimos productos génicos en ser sintetizados, incluyen el filamento, los generadores de la fuerza motriz y la maquinaria quimiosensora (Chilcott & Hughes, 2000; Aldridge & Hughes, 2002).

En las enterobacterias *E. coli* y *Salmonella enterica*, los genes flagelares se agrupan en tres regiones del cromosoma bacteriano, denominadas regiones I, II y III. En la cascada de expresión, los operones flagelares se dividen en clases en función de su jerarquía transcripcional. Los genes de la Clase I codifican para el o los activadores transcripcionales de los operones de la clase II que son dependientes de  $E\sigma^{70}$ . En la clase II se encuentran los genes que codifican para los componentes estructurales tempranos, los cuales dan lugar a la formación del gancho y del HBB. En esta misma clase se expresan los genes *fliA* y *flgM*, los cuales codifican para el factor  $\sigma^{28}$  y su correspondiente factor anti-sigma. La expresión de los genes de la clase III es dependiente de FliA y es bloqueada por FlgM, que impide la transcripción de los promotores dependientes de FliA hasta que se ha formado completamente el HBB (**fig. 6**). Una vez formada la estructura flagelar que comprende el gancho y el cuerpo basal, el factor anti-sigma, FlgM se secreta fuera de la célula a través del aparato de exportación flagelar y en consecuencia, el factor  $\sigma^{28}$  o FliA inicia la transcripción de los genes de Clase III, entre los que se encuentran los genes que codifican para los componentes involucrados en la formación del filamento flagelar y para el sistema quimiotáctico (Chilcott & Hughes, 2000; Aldridge & Hughes, 2002) (**fig. 6**).



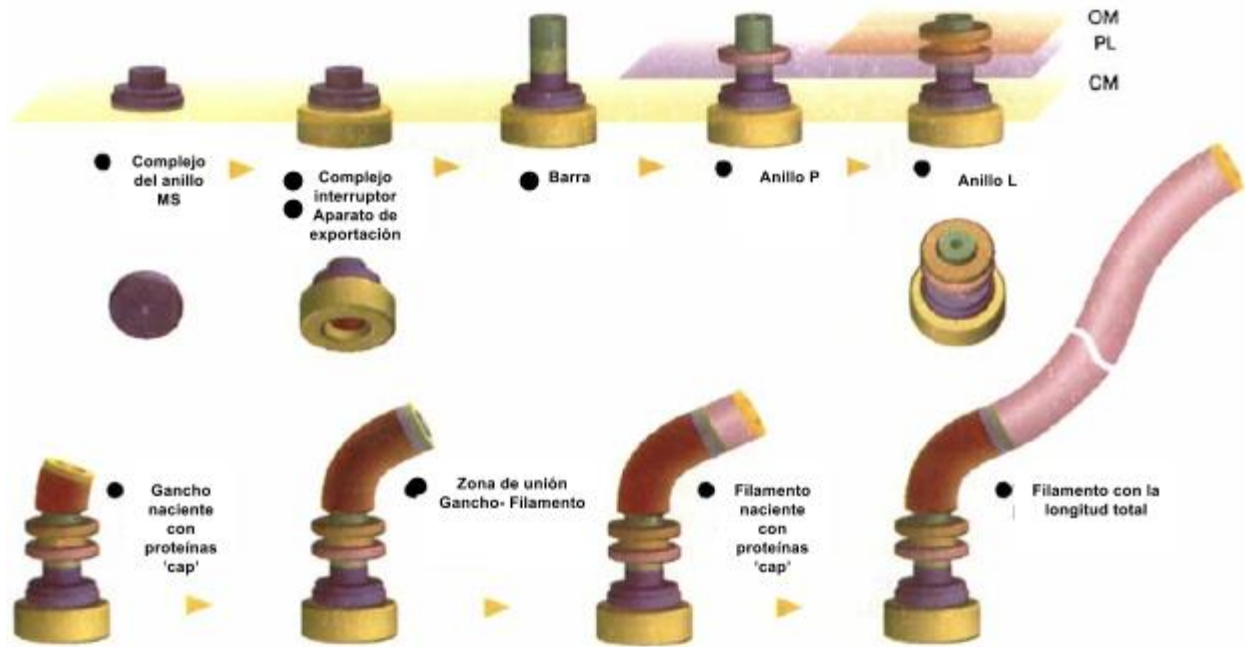
**Figura 6** Formación del HBB y el filamento flagelar indicándose la expresión temporal de los genes involucrados.

La expresión de las jerarquías flagelares involucran la participación de uno o varios factores sigma alternativos. En las bacterias entéricas, la jerarquía flagelar tiene tres niveles, y todos los genes son transcritos por holoenzimas asociadas a factores sigma de la familia  $\sigma^{70}$ ; esto es, por  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^{28}$  (Komeda, 1986; Kutsukake et al., 1990; Spohn & Scarlato, 1999; Kalir et al., 2001; Aldridge & Hughes, 2002; Smith & Hoover, 2009).

Como se mencionó, el flagelo se subdivide básicamente en al menos tres subestructuras: el HBB que se extiende a través de las membranas bacterianas, el gancho y el filamento (**fig. 1**).

El ensamblaje del flagelo es un proceso secuencial (**fig. 7**) que comienza con la inserción en la membrana interna de las subunidades de la proteína FliF, las cuales forman el anillo MS. Se ha postulado que en el centro del anillo MS se ensambla el

aparato de exportación flagelar, el cual es necesario para la secreción de las subunidades flagelares extracitoplasmáticas. Este sistema está formado por proteínas membranales y algunos componentes solubles citoplásmicos que son característicos de los sistemas de secreción de tipo III (TTSS). En el lado citoplásmico del anillo MS, se forma el anillo C, que está formada por tres diferentes proteínas (FliM, FliN y FliG) y se encuentra involucrada en estabilizar el aparato de exportación y en controlar la rotación del flagelo. Una vez que el aparato de exportación es funcional, la primera proteína en ser secretada es la proteína FliE, la cual se une al lado periplásmico del anillo MS y es indispensable para formar la siguiente estructura denominada eje. El eje está formado por cuatro diferentes proteínas, FlgB, FlgC, FlgG y FlgF, y se requiere de la proteína FlgJ para ensamblar esta estructura. Los anillos L y P se forman en la pared de peptidoglicanos y en la membrana externa, respectivamente y rodean al eje, formando una especie de forro que permite la libre rotación del flagelo. Vale la pena mencionar que las proteínas FlgI y FlgH que forman los anillos L y P son secretadas por el sistema de secreción general dependiente de Sec. Una vez formado el eje, con la ayuda de FlgH se libera la proteína FlgJ y se ensambla la proteína de andamiaje denominada FlgD, proteína necesaria para ensamblar las subunidades de la proteína FlgE, que dan lugar a la estructura conocida como gancho. Mediante un mecanismo no del todo conocido, el gancho adquiere una longitud determinada, que es de aproximadamente 55 nm y en este momento cambia la especificidad del aparato de exportación, esto es, dejan de ser exportados sustratos tipo eje-gancho e inicia la exportación de las subunidades del filamento y de las proteínas acopladoras denominadas HAPs (*hook-associated proteins*).



**Figura 7** Vía morfológica de la construcción del flagelo. El anillo MS aparece al principio de la construcción del flagelo. Después, del lado citoplásmico del anillo MS se forman el anillo C (complejo interruptor) y el aparato de exportación. Las estructuras posteriores se forman por la adición secuencial de las proteínas de las subunidades del eje en el extremo en crecimiento. El gancho y el filamento requieren para su ensamblaje de la ayuda de las proteínas 'cap' o proteínas de coronamiento. OM, la membrana externa; PL, capa de peptidoglicano; CM, la membrana citoplásmica (Imagen modificada de: Aizawa, S., 1996)

## *Rhodobacter sphaeroides*

*Rhodobacter sphaeroides* es una bacteria Gram-negativa, pertenece al subgrupo  $\alpha$  de las proteobacterias, caracterizado por un alto contenido de G+C en su DNA (>60%) y que incluye a microorganismos encontrados en un amplio rango de ambientes naturales (por ejemplo *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Caulobacter* y *Sinorhizobium*). Además, *R. sphaeroides* es una bacteria móvil y con una gran plasticidad metabólica, ya que puede

crecer en una gran variedad de compuestos de forma fotoheterotrófica, mediante respiración aeróbica o anaeróbica y también es capaz de fijar nitrógeno y CO<sub>2</sub>.

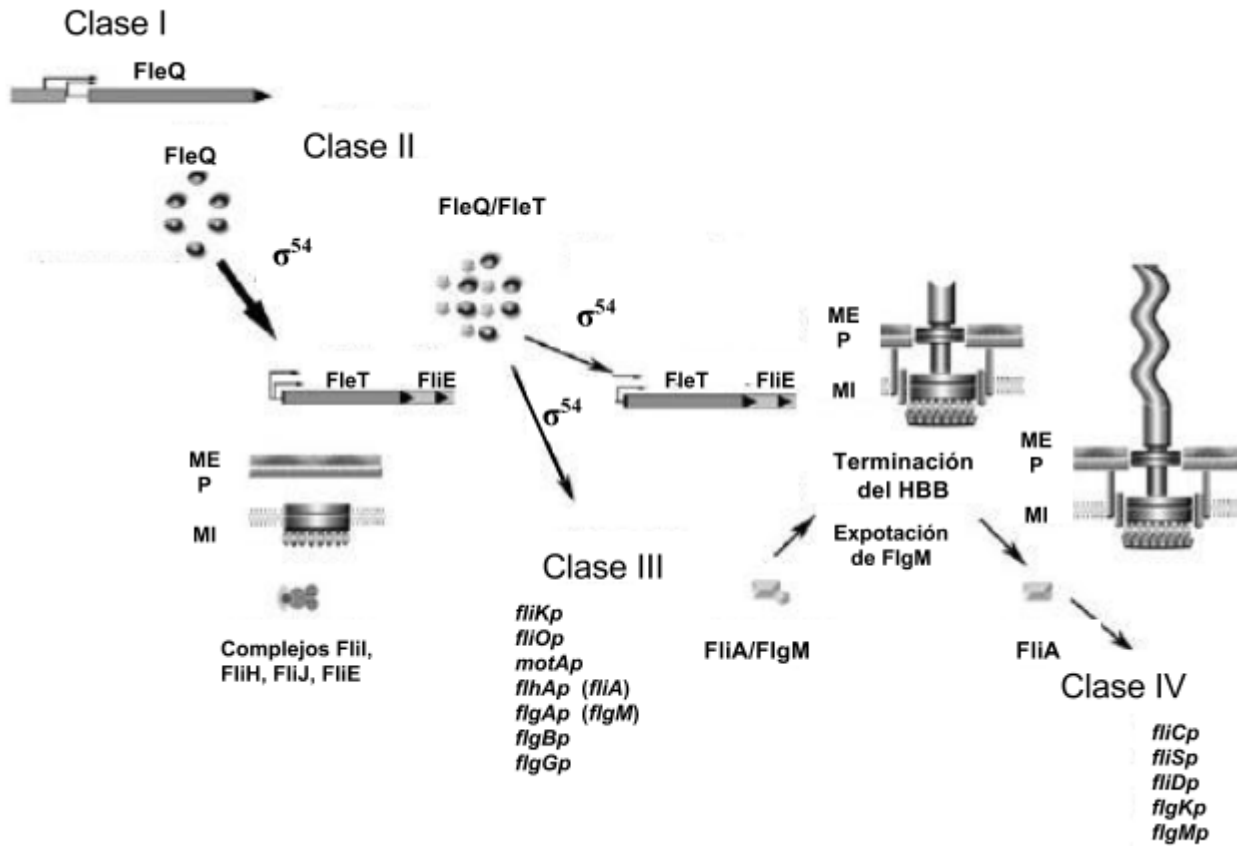
*R. sphaeroides* fue inicialmente descrita como una bacteria con un solo flagelo de localización subpolar (Armitage & Macnab, 1987) (**fig. 8**); posee bacterioclorofila *a* y esferodeno (pigmento carotenoide) y forma colonias con un característico color púrpura.



**Figura 8** Micrografía electrónica de *R. sphaeroides*, donde se muestra su único flagelo subpolar.

Los eventos de reorientación en esta bacteria ocurren cuando el flagelo deja de rotar y el movimiento browniano modifica, al azar, la trayectoria de nado de la célula (Armitage & Macnab, 1987). El paro de rotación trae como consecuencia la relajación del filamento flagelar desde la forma normal, con amplitud pequeña y longitud de onda larga usada en la propulsión, a una forma enrollada, con amplitud de onda grande y longitud de onda corta. Se ha observado que las células de *R. sphaeroides* crecidas en condiciones fotoheterotróficas nadan más activamente en la fase logarítmica tardía para después perder el nado en la fase estacionaria junto con el flagelo (Kobayashi et al., 2003).

La forma en la cual se expresan los genes flagelares de *R. sphaeroides* ha sido ampliamente estudiada (Poggio et. al., 2000, Poggio et al., 2005). Se sabe que la expresión de los genes que codifican para el HBB es dependiente del factor  $\sigma^{54}$  y de las proteínas activadoras o EBPs (*Enhancer Binding Proteins*) denominadas FleQ y FleT. Los genes flagelares se encuentran organizados en una jerarquía de expresión de cuatro niveles. En la clase I se encuentra el regulador maestro FleQ, la expresión de los genes de la clase II es dependiente de  $\sigma^{54}$  y de FleQ. En esta clase se expresa el operón *fleT-fliEFGHIJ*, cuyos productos dan lugar a la proteína activadora FleT, al anillo MS y a algunos componentes solubles necesarios para la exportación de los componentes axiales. La expresión de los genes de clase III requiere de ambas EBPs (FleQ y FleT), las cuales parecen formar un complejo necesario para la activación de dichos promotores. Dentro de la clase III se expresan los genes que codifican para el resto de las proteínas involucradas en completar el HBB y los reguladores FliA ( $\sigma^{28}$ ) y su factor anti-sigma FlgM. De la misma forma en la que ocurre en *E. coli* y *Salmonella spp*, al completarse el HBB, el factor anti-sigma es secretado y  $\sigma^{28}$  inicia la expresión de los genes de la clase IV, entre los cuales se encuentra el gen de la flagelina (*fliC*) (**fig. 9**).



**Figura 9** Representación esquemática de los pasos en la regulación de la expresión de los genes flagelares de *R. sphaeroides* ME, membrana externa; P, capa de peptidoglicano; MI, membrana interna. Imagen modificada de: Poggio et al., 2005

## EL GEN *fleQ*

El gen *fleQ* codifica una proteína que pertenece a la subfamilia NtrC de reguladores de respuesta, y forman parte de un sistema de transducción de señales de dos componentes. En esta familia el dominio REC (*signal receiver domain*) está asociado al dominio de EBP, por lo que generalmente en estas proteínas su actividad como activadores transcripcionales está regulada por la fosforilación del dominio REC. Sin

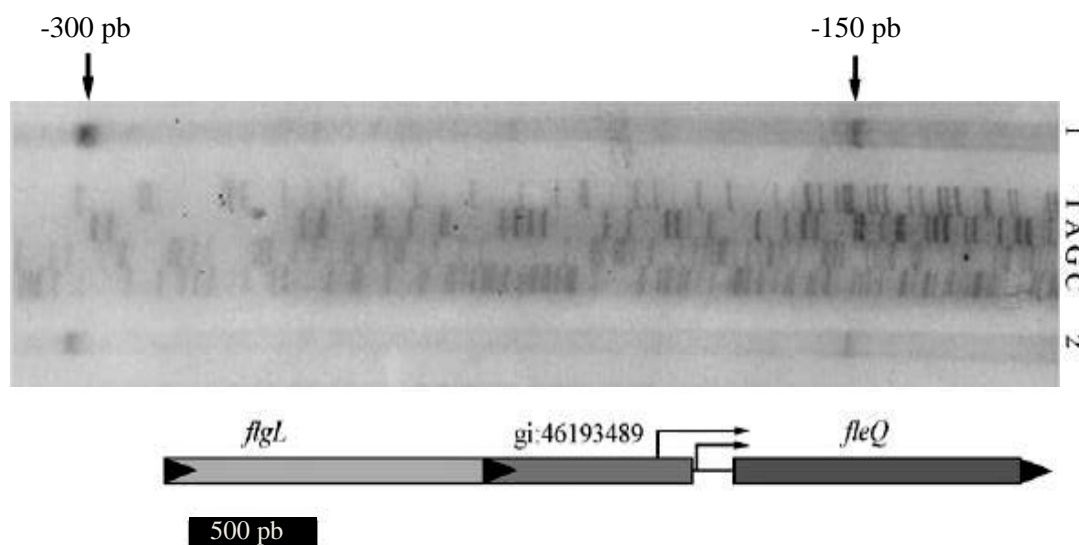
embargo, la proteína FleQ carece del dominio REC y sólo conserva el dominio característico de las EBPs y el dominio de unión al DNA (HTH, *Helix-Turn-Helix*); por lo tanto, la actividad de FleQ no está sujeta a control postranscripcional por fosforilación (Poggio, et al., 2005).

El control postranscripcional es una forma eficiente de activar o inactivar de forma inmediata una proteína ya sintetizada. Dado que FleQ es el regulador maestro de la jerarquía flagelar, y no se ha observado ningún tipo de control postranscripcional, se ha propuesto que basta con que la proteína se encuentre presente para lograr la expresión del resto de los genes flagelares. De ahí surge la hipótesis de que la expresión de dicho gen debe estar de alguna forma regulada para llevar a cabo la activación de los genes flagelares sólo cuando las bacterias están en condiciones adecuadas para ensamblar un nuevo organelo. Una hipótesis aduce que su expresión podría estar controlada, de algún modo, por (o durante) el ciclo celular, de tal forma que se sintetice un solo flagelo por célula.

Anteriormente (Poggio, et al, 2007), se trató de identificar el promotor responsable de la transcripción del gen *fleQ* e inicialmente se aisló una cepa que llevaba en el cromosoma la fusión de *fleQ* con el gen reportero *uidA* (*fleQ::uidA-aadA*), reemplazando al alelo silvestre *fleQ*. La introducción de los alelos *rpoN2::kan*, o *fleTΔ::kan*, no modificaron el nivel de expresión del gen reportero, indicando que la expresión de *fleQ* es independiente de las proteínas RpoN2 ( $\sigma^{54}$ ), FleQ o FleT, y por ende no tiene un promotor dependiente de  $\sigma^{54}$  (Poggio, et. al., 2005). Dado que la búsqueda in silico de una posible secuencia promotora ubicada río arriba de *fleQ* no proporcionó resultados significativos, 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 extendía desde el codón de inicio de la traducción de FleQ hasta 1200 pb río arriba. A partir de ese experimento se identificaron dos fragmentos resistentes a RNAsas. Uno de los fragmentos correspondería a un mensajero cuyo +1 se ubicaría 150 pb río arriba del codón de la metionina iniciadora de FleQ, mientras que el otro iniciaría 300 pb río arriba



del ATG. Este resultado sugiere la presencia de dos promotores, o la existencia de un sólo mensajero con una larga región 5' no traducida, la cual sería procesada postranscripcionalmente (Poggio, et. al., 2005) (**fig. 10**). Dado que en bacterias, no es común la presencia de regiones no traducidas tan extensas, consideramos necesario utilizar otro enfoque experimental para confirmar estos resultados. Es por ello que nos hemos propuesto como primer paso, para una posterior caracterización más detallada, el identificar la región mínima necesaria de la región promotora para la expresión del gen *fleQ*.



**Figura 10** Mapeo del inicio de la transcripción de *fleQ* por ensayo de protección a RNasas. Los carriles 1 y 2 indican experimentos independientes. En el esquema de la izquierda se señala la posición de los posibles inicios de la transcripción en el contexto genómico de *fleQ* (Tomado de Poggio et al., 2005).

## OBJETIVO PRINCIPAL

Identificar la región mínima necesaria para la expresión del gen *fleQ* mediante un análisis de delección. Valorar la expresión del gen *fleQ* mediante el análisis de complementación de la cepa SP13 ( $\Delta fleQ::kan$ ).

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener mediante PCR fragmentos que reduzcan de forma secuencial la región regulatoria de la del gen *fleQ*
- Clonar en pTZ19R los fragmentos de PCR obtenidos.
- Subclonar los fragmentos en un plásmido estable en *R. sphaeroides* (pRK415).
- Introducir por conjugación a la cepa SP13 ( $\Delta fleQ::kan$ ) cada una de las clonas obtenidas.
- Analizar el fenotipo de nado de cada cepa en cajas de agar suave

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS.

Las cepas de *Escherichia coli*, y de *Rhodobacter sphaeroides* utilizadas en la realización de este trabajo se encuentran en la **tabla 2** y la lista de oligonucleótidos en la **tabla 3**.

**Tabla 2.** Cepas, vectores y plásmidos

Cepa, vector o plásmido	Genotipo o descripción	Referencia o fuente
<i>Cepas R. sphaeroides</i>		
WS8	Cepa silvestre	(Simon et al., 1983)
SP13	Derivado WS8 $\Delta fleQ::kan$	(Poggio et al., 2005)
SP13 pRK415 ActII 3	Derivado SP13 que lleva el plásmido pRK415 con la delección desde -234 del promotor de <i>fleQ</i>	Este estudio
SP13 pRK415 ActII 7	Derivado SP13 que lleva el plásmido pRK415 con la delección desde -83 del promotor de <i>fleQ</i>	Este estudio
SP13 pRK415 ActII 8	Derivado SP13 que lleva el plásmido pRK415 con la delección desde -142 del promotor de <i>fleQ</i>	Este estudio

SP13 pRK415 ActII 9	Derivado SP13 que lleva el plásmido pRK415 con la deleción desde -174 del promotor de <i>fleQ</i>	Este estudio
SP13 pRK415 ActII 10	Derivado SP13 que lleva el plásmido pRK415 con la deleción desde -111 del promotor de <i>fleQ</i>	Este estudio
SF1	Derivado WS8 $\Delta recA::aadA$	Este estudio
SF2	Derivado SP13 $\Delta recA::aadA$	Este estudio
<b><i>Cepas E. coli</i></b>		
TOP 10	<i>recA endA thi hds</i> RP4-2	(Invitrogen™)
S17	RP4-2 ( <i>Tc::Mu</i> ) ( <i>Kn::Tn7</i> )	(Simon, et al., 1983)
<b><i>Plásmidos</i></b>		
pRK415	Vector de clonación Tc <sup>R</sup>	(Keen et al., 1988)
pJQ200mp18	Vector movilizable suicida	(Quandt & Hynes 1993)
pTOPO (pCR 2.1)	Vector de clonación	(Invitrogen™)

**Tabla 3.** Lista de oligonucleótidos

Nombre del oligo	Secuencia	Posición
<b><i>ActII</i></b>		
ActII 3	5'-GAATTCGAGGCGGACCTTCCGCAGCG-3'	-234
ActII 7	5'-GAATTCAAGCCATTGATGCAGTTGC-3'	-83
ActII 8	5'-GCGAATTCGTCCAAAAGGATAGTGCCTCT-3'	-142
ActII 9	5'-GCGAATTCCTGCTCGCAATGCAACCGTG-3'	-174
ActII 10	5'-GGAATTCCTGACCCCTGCTTTTATCCG-3'	-111
ActII CO Xba	5'-TCTAGATCACGCCGCGCTGCACCGCATG-3'	-652
<b><i>fleQ</i></b>		
SITF up	5'-GCGATATCCAGAGGCACTATCCTTTTGGA-3'	
SITF down	5'-CGGAATTCATACCCGAGGGGCTGAT-3'	
FliD up	5'-GCGATATCACGACGCTGATCGAGAAGAT-3'	
FliD down	5'-CGGAATTCGAGAAACCGGTCTACCTCTC-3'	

<i>recA</i> Δ		
rec A1	5'-GCTCTAGAGCTTCCACGACATCTTCCCGC-3'	
rec A2	5'-GCTCTAGACTTGGTCAGCAACTCCCAGGC-3'	

## MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

*R. sphaeroides* fue cultivada aeróbicamente en medio mínimo Sistrom (Sistrom 1962) adicionado con 1 mL/L de una disolución stock de vitaminas (donde 100 mL contienen: 1 g de ácido nicotínico; 0.5 g de tiamina y 0.01g de biotina. La disolución se esteriliza por filtración (Poggio 2007)) bajo condiciones de oscuridad y agitación constante (200 rpm) a 30°C. Cuando se requirió, se añadió al medio de cultivo kanamicina (25 µg/mL), espectinomicina (25 µg/mL), y tetraciclina (1 µg/mL), ácido nalidíxico (25 µg/mL).

Las cepas de *E. coli* se cultivaron aeróbicamente en medio de Luria-Bertani (LB) (Ausubel et al., 1987) a 37°C en agitación constante (200 rpm). Para cultivos en medio sólido se añadió 15 g/L de bacto-agar. En caso necesario los antibióticos que fueron utilizados se agregaron en las siguientes concentraciones: espectinomicina 100 µg/mL, gentamicina 1 µg/mL, tetraciclina 10 µg/mL y ampicilina 100 µg/mL.

## TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* (CÉLULAS COMPETENTES QUÍMICAS).

Se creció el cultivo de *E. coli* hasta la fase exponencial media (D.O 550 nm 0.5), se enfrió en hielo por 10 min., antes de que las células se cosecharan por centrifugación a 5000 rpm en un rotor tipo SS34 (Sorvall). El botón celular se resuspendió en la mitad de volumen utilizado en una disolución fría y estéril de CaCl<sub>2</sub> 100 mM. Las células se incubaron en el hielo durante 20 min. Posteriormente se centrifugó nuevamente y se resuspendió en 1/10 del volumen original con CaCl<sub>2</sub> 100 mM. Las células se incubaron en el hielo por un periodo de 1 hr. El DNA que se desea transformar es mezclado con 200 µL de las células competentes y se incubó en hielo por 30 min. Pasado ese tiempo las células se incuban a 42°C por 2 min. e inmediatamente son puestas en hielo por 10 min. Se agregan entonces 0.8 mL de medio LB y se incuban a 37°C por 30 min. con el objeto de permitir que los genes de resistencia sean expresados. Después las células se plaquean en medio selectivo y se incuban a 37°C por 8 hrs.

## PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS EN PEQUEÑA ESCALA (MINIPREP).

Se cosecharon células de un cultivo de 3mL crecido durante 12 h, y se resuspendieron en 300 µL de disolución SET (8% sacarosa, 5% tritón, 50 mM EDTA pH 8, 50mM Tris-HCl pH 8). Se añadió 25 µL de lisozima (10 µg/mL), se agitó en vortex 2seg. y se incubó en un baño de agua hirviendo por 45 seg. Se centrifugó a temperatura ambiente por 20 min. Se recuperó el sobrenadante y se mezcló con 230 µL de isopropanol. Se precipitó el DNA incubando a -70°C y se centrifugó por 15 min. a 4°C. El pellet se resuspendió en 40 µL de agua y posteriormente se utilizaron 5 µL para su análisis en un gel de agarosa.

## PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS 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 Qiagen QIAEXII

## CONJUGACIÓN

Las cepas de *E. coli* y de *R. sphaeroides* se crecieron hasta fase exponencial media. Las células se lavaron con medio LB, se mezcló en proporción 1:1 y se concentró 10 veces. Dicha mezcla se depositó en un rectángulo de nitrocelulosa estéril colocado sobre una caja petri con medio LB sólido. Se incubó por 6 hrs. a 30°C. Las células se cosecharon y se plaquearon en medio selectivo.

## CONSTRUCCIÓN DE LAS CEPAS $\Delta recA$

Para la creación de las mutantes  $\Delta recA::aadA$ , se hizo una amplificación por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) del gen *recA* con los oligos Rec A1 y Rec A2, con sitios de reconocimiento para *EcoRI* que fueron incluidos en el final 5' de cada oligonucleótido. Se digirió con *EcoRI* y se purificó el producto resultante del PCR. Se clonó en el vector pTOPO, y posteriormente se digirió con *XbaI*, obteniéndose los fragmentos esperados. El plásmido resultante fue purificado.

Para interrumpir el gen (*recA*) el plásmido purificado pTOPO se digirió con *SalI* y posteriormente se trató con una fosfatasa (SAP *shrimp alkaline phosphatase*). El plásmido linearizado se ligó a un casete de resistencia a espectinomicina, que lleva la



porción interna del omega-Spc (*aadA*). Este cassette fue obtenido mediante PCR y digerido previamente con *SalI*.

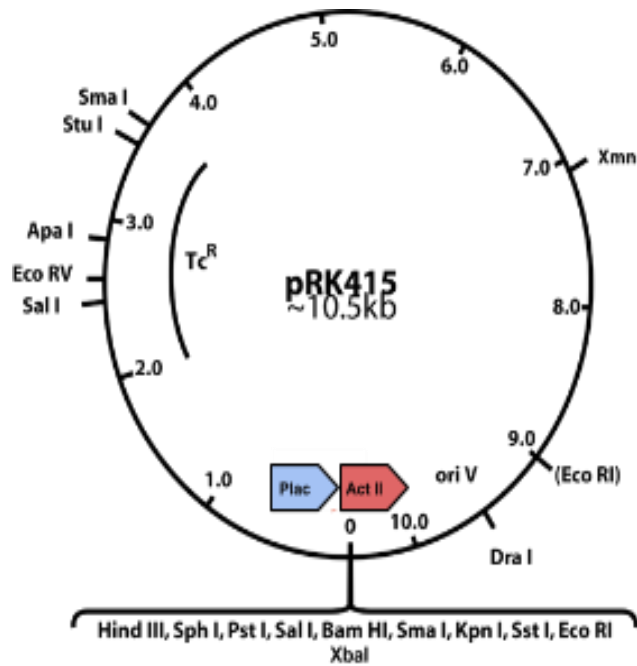
Los productos de la reacción de ligasa fueron introducidos a las células TOP10 por electroporación, se verificó la construcción con las enzimas correspondientes y el plásmido fue purificado. A partir de este se obtuvo el fragmento  $\Delta recA::aadA$ , se trató con la T4 DNA polimerasa para generar extremos romos y dicho fragmento se subclonó en pJQ200mp18 digerido con *SmaI* e introducido en *R. sphaeroides* WS8 y SP13. Las mutantes resultantes fueron llamadas SF1 y SF2 respectivamente.

El vector suicida pJQ200mp18 fue usado para la construcción de mutantes por genética inversa. Este plásmido contiene el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*. La resistencia en las colonias a sacarosa y la sensibilidad a gentamicina surge después de un intercambio alélico con la consiguiente pérdida del vector (Ballado et al., 2001).

## RESULTADOS

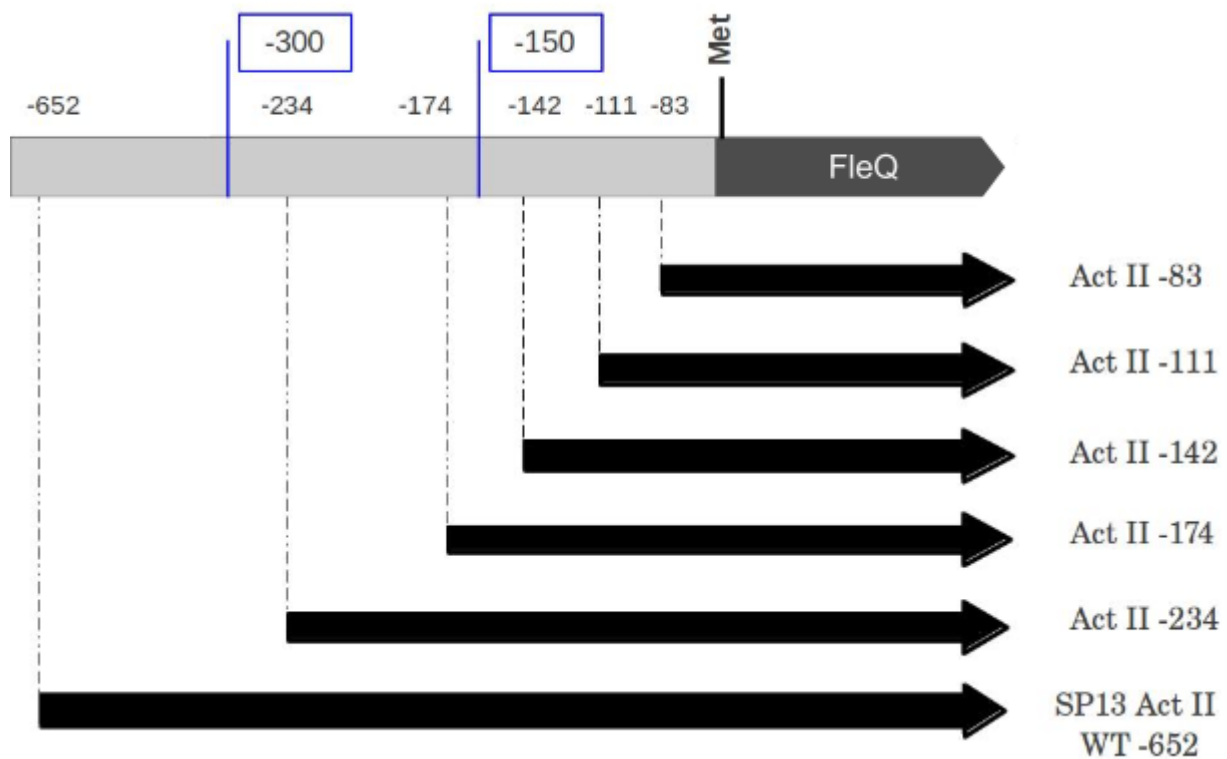
Con el propósito de identificar la o las regiones de control necesarias para expresar el gen *fleQ*, se decidió realizar un análisis de delección a partir de una clona que lleva un inserto de 1753 pb, de los cuales 652 pb corresponden a la región río arriba de la posible metionina iniciadora de FleQ y el resto a la región codificadora (**fig. 12**). Esta clona es capaz de complementar el fenotipo Fla- de la cepa SP13 (*fleQ::kan*), independientemente del promotor presente en el vector, indicando que la información presente en la región regulatoria es suficiente para lograr la expresión de FleQ, a un nivel adecuado para permitir el nado de la cepa mutante.

Se decidió, reducir el tamaño de la región reguladora eliminando cada vez un fragmento de mayor tamaño correspondiente al extremo 5' de *fleQ*. Los fragmentos se obtuvieron por PCR utilizando oligonucleótidos específicos y el DNA de la clona original como sustrato. Con el fin de facilitar la clonación inicial de los fragmentos de PCR, éstos fueron insertados inicialmente en el plásmido pTZ19R, el cual es un plásmido de alto número de copias y de tan sólo 2.9 kb. Una vez confirmada la presencia del inserto y verificado su tamaño, se purificó el inserto y se subclonó en el vector pRK415, el cual es un plásmido de bajo número de copias, con un origen de replicación funcional en *E. coli* y *R. sphaeroides*, y sobre todo incapaz de expresar el gen clonado cuando éste se encuentra orientado en dirección opuesta al promotor *plac* (**fig. 11**).



**Figura 11** Vector pRK415 con el promotor *plac* (en azul) seguido de las deleciones de *fleQ* (Act II) (en rojo) en dirección al sentido de transcripción de *plac*.

Se inició el proyecto eliminando 418 pb (ubicándose el límite del fragmento a -234 pb a partir del codón de inicio de *fleQ*) (penúltima construcción en **fig. 12**) y 569 pb (en este caso el límite del fragmento se ubica a -83 pb) (primera construcción en flecha negra, **fig. 12**), mediante PCR. Los fragmentos amplificados, fueron purificados y clonados en pTZ19R, y posteriormente subclonados en pRK415. La orientación de los insertos en el vector fue confirmada mediante digestiones con las enzimas *EcoRI*, *XbaI* y *EcoRI-XbaI*. Las clonas apropiadas para cada construcción fueron denominadas pRK\_ActII -234 y pRK\_ActII -83, respectivamente (**Fig. 12**).



**Figura 12** Esquema del mapeo por delección de *fleQ* realizado en este trabajo

Ambas construcciones fueron introducidas a la cepa SP13 mediante conjugación y se observó el fenotipo de nado en una caja de agar suave. Como se puede observar en la figura 13, la cepa silvestre al ser sembrada en estas condiciones mostró la formación de un halo alrededor del punto de inoculación; la formación de éste se debe al nado continuo de las células, permitiendo la expansión radial de la población hacia el exterior, como una monocapa (Kearns 2010). En *R. sphaeroides* una colonia al ser sembrada se difunde uniforme y continuamente desde el punto de inoculación hacia la periferia. Sin embargo, al observar los halos de nado producidos por la cepa SP13/pRK\_ActII -83 se observa un nado irregular, donde se notan halos irregulares en tamaño y densidad alrededor del punto de inoculación.



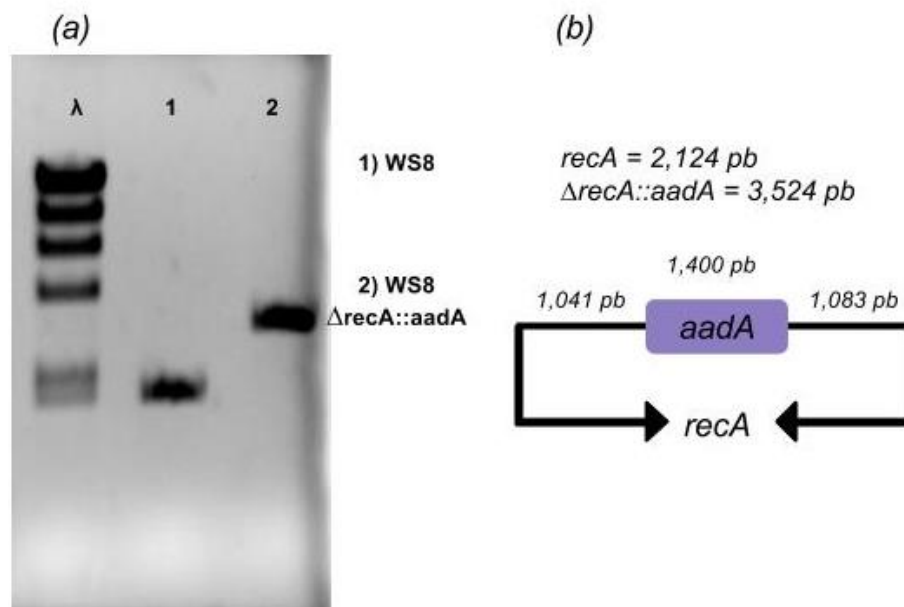
**Figura 13** Cajas de nado de las construcciones SP13 ActII -234 (izquierda) y SP13 ActII -83 (derecha)

La formación de halos irregulares en la cepa SP13/pRK ActII -83 nos llevó a proponer que dicha cepa no era capaz de nadar pero que a lo largo del periodo de incubación aparecían células móviles a diferentes tiempos. La aparición de dichas células podría deberse a la recombinación entre el segmento de *fleQ* presente en el plásmido y la región homóloga cromosomal. Para evitar dicho inconveniente se decidió eliminar por completo el gen *fleQ*, sustituyendo esta región del cromosoma por un casete de resistencia. Desafortunadamente, los fragmentos de PCR de las zonas aledañas a *fleQ* no pudieron obtenerse, quizá por un diseño inapropiado de los oligonucleótidos. Por lo anterior se decidió realizar todas las pruebas de complementación en un fondo genético  $\Delta recA$ .

Para la obtención de la cepa con la mutación  $\Delta recA::aadA$ , inicialmente se hizo una amplificación por PCR del gen *recA* y parte de sus regiones aledañas, utilizando los

oligonucleótidos *recA1* y *recA2*. El fragmento de 2,124 pb fue purificado y clonado en el vector pTOPO. El plásmido purificado pTOPO\_RecA se digirió con *SaII*, cuyo único sitio de reconocimiento en este plásmido se encuentra dentro de la región codificadora del gen *recA*. El plásmido linearizado se ligó a un casete de resistencia a espectinomicina (*aadA*) el cual, se sabe, no ejerce un efecto polar (Ballado et al., 2001). El plásmido presente en las células transformadas ( $Ap^R$   $Spc^R$ ) fue verificado por restricción. Posteriormente, una de estas cepas fue utilizada para obtener el plásmido puro pTOPO\_RecA::*aadA*. El inserto con el fragmento *recA* interrumpido fue purificado y subclonado en el vector suicida pJQ200mp18. El plásmido pJQ200mp18 fue utilizado para la obtención de las mutantes mediante un evento de doble recombinación. Este plásmido es incapaz de replicarse en *R. sphaeroides*, y además contiene el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, el cual al ser expresado en bacterias Gram-negativas, es letal y de este modo es posible contra-seleccionar la presencia del vector (Quandt & Hynes 1993).

Utilizando el plásmido pJQ200\_RecA::*aadA*, se llevó a cabo la sustitución alélica del gen *recA* en las cepas de *R. sphaeroides* WS8 y SP13. Las mutantes fueron verificadas por PCR (**fig. 14**) y se denominaron SF1 y SF2 respectivamente.

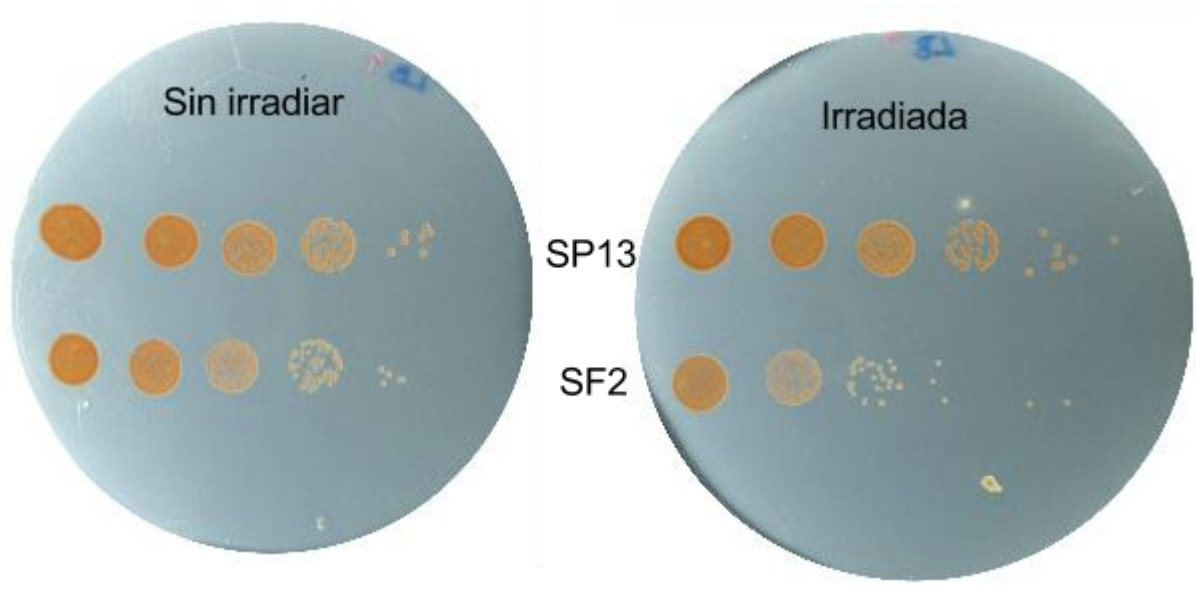


**Figura 14** Comprobación de la mutante mediante PCR. **(a)** Gel con el producto de PCR del gen *recA* en la cepa WS8 y WS8 *recA::aadA*. **(b)** Esquema del gen interrumpido *recA::aadA*.

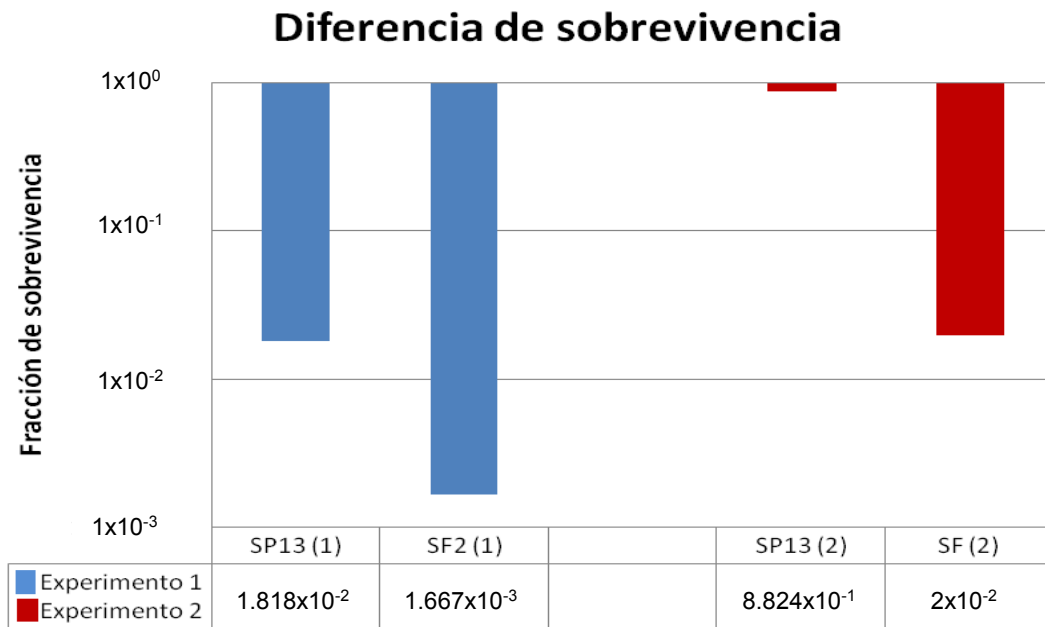
Con el fin de probar la pérdida de la función de RecA en la cepa SF2, se procedió a realizar una curva de sobrevivencia a la irradiación con luz UV de onda corta. La luz UV induce daños en el DNA (fundamentalmente dímeros de timina) que son reparados por las enzimas *uvrA*, *uvrB* y *uvrC*, siendo los genes *uvrA* y *uvrB* parte de la respuesta SOS que es inducida gracias a la acción de RecA. En ausencia de RecA, las enzimas responsables de la respuesta SOS no son inducidas, y en consecuencia las bacterias mueren debido a que su DNA no puede ser reparado.

Las cepas SP13 y SF2 fueron irradiadas con luz UV y fue determinado el número de células sobrevivientes a este tratamiento. En la **figura 15 A** se muestran resultados representativos de este experimento, en donde se observa que la irradiación disminuyó el número de UFC (unidades formadoras de colonias) respecto a la cepa silvestre (*recA+*), sujeta al mismo tratamiento. La proporción relativa de sobrevivientes para ambas cepas se muestra en la **figura 15 B**.

(A)



(B)



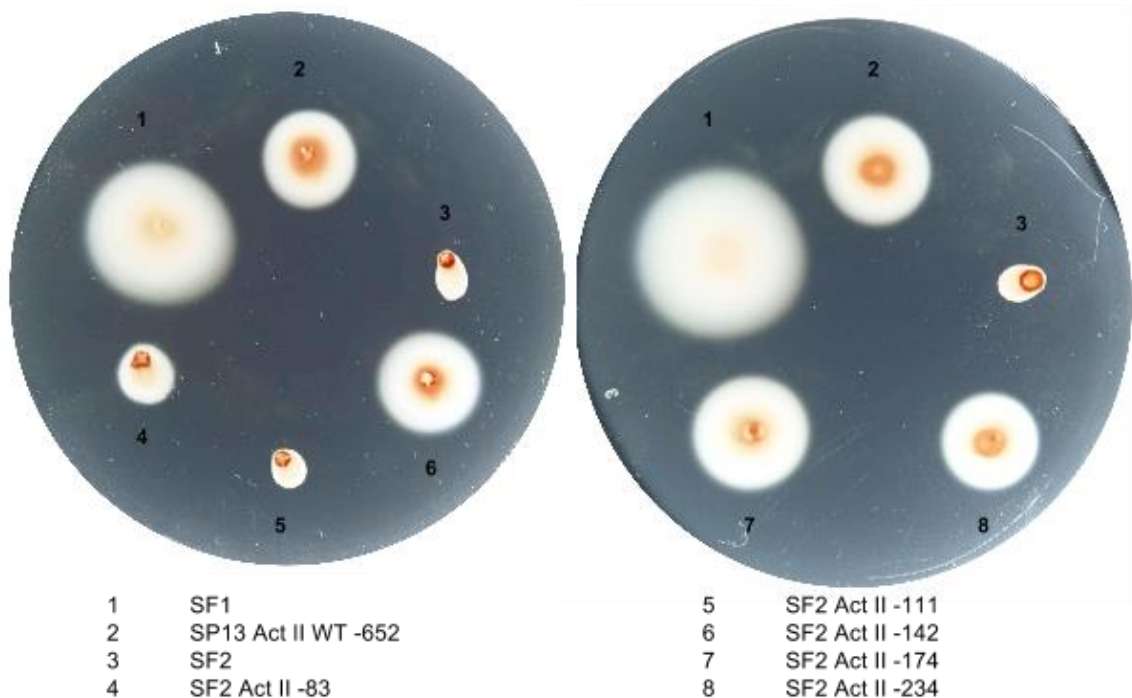
**Figura 15** (A) Fotografías de diluciones de células no irradiadas (izquierda) y de diluciones de células irradiadas (derecha). (B) Gráfica de la diferencia de sobrevivencia de dos diluciones de células SP13 y SF2 irradiadas vs. SP13 y SF2 sin irradiar.



## ANÁLISIS DE DELECIÓN DE LA REGIÓN REGULATORIA DE *fleQ*

Una vez comprobada la deficiencia de RecA en la cepa SF2, se procedió a obtener versiones de *fleQ* con límites en las posiciones -111, -142, -174 (**fig. 12**) y las cuales fueron introducidas en la cepa SF2, al igual que las construcciones con límites en -83 y -234. El fenotipo de nado de las cepas fue evaluado en un ensayo de movilidad en cajas de agar suave.

Como se puede observar en la **figura 16**, la cepa SP13/pRK ActII -83 (marcada con el número 4) es incapaz de restablecer el fenotipo de nado, lo cual apoya la idea de que los halos inicialmente observados eran producto de eventos de recombinación entre el plásmido y el cromosoma. De este modo, al utilizar la cepa SF2, tenemos la certeza de que el fenotipo de nado en verdad representa la expresión de FleQ a partir de la región de control presente en el plásmido.



**Fig. 16** Ensayo de movilidad de la cepa SF2 (*recA::aadA fleQ::kan*) con las construcciones Act II -83 (4); Act II -111 (5); Act II -142 (6); Act II -174 (7) y Act II -234 (8).

Al probar el resto de las construcciones en la cepa SF2 (**Fig. 16**), nuestros resultados demuestran que la secuencia río abajo de la posición -142 es esencial para lograr la recuperación del fenotipo.

El análisis bioinformático de dicha región se discute en la siguiente sección.

## DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo revelan la importancia de los eventos de recombinación para promover la restauración del alelo silvestre *fleQ*, utilizando como sustratos los fragmentos del gen presentes en el cromosoma y en el plásmido. En este caso, la presencia de las células que sufrieron los eventos de recombinación es fácilmente detectable ya que en la caja de nado, las células con el gen *fleQ* silvestre se alejan rápidamente del punto de inoculación, mientras que otras células de la población en las cuales se retrasa la aparición de dicho evento o son no recombinantes, permanecen en el centro del inóculo, generando un nado desigual. En este sentido, el ensayo en una caja de nado también ejerce una cierta presión de selección, ya que el óptimo crecimiento de las bacterias requiere de una apropiada concentración de nutrientes, los cuales se encuentran en la periferia de la zona de crecimiento.

Una cepa mutante en el alelo *recA* es más sensible a la irradiación UV y otros agentes que causen daño al DNA, por lo tanto tendrán una menor sobrevivencia en el medio ambiente. Es por ello que la expresión de un fenotipo mutante creado en laboratorio es más estable en una mutante de fondo  $\Delta recA$  (Sander et al., 2001), por lo tanto se tomó la decisión de hacer pruebas de complementación en este trabajo, en dicho fondo genético.

Dado que la presencia del alelo *recA::aadA* no afecta la capacidad de nado de las cepas, a partir de este trabajo podemos concluir que el uso de este alelo es una herramienta útil para evitar la complementación con secuencias de DNA clonadas en plásmidos con los alelos genómicos. Del mismo modo, siempre que existan dos versiones del mismo gen será posible obtener variantes derivadas de la recombinación que enturbien la interpretación de los resultados obtenidos.

A pesar de que sólo se hizo una repetición del experimento de cuantificación de UFC sobrevivientes a la irradiación UV, los dos experimentos muestran que en la cepa

SF2 hay menos UFC sobrevivientes después de la irradiación, en ambos casos presentando una diferencia logarítmica.

Los ensayos de movilidad de la cepa SF2 con las delecciones Act II -142; -174 y -234 mostraron que éstas son capaces de complementar la deficiencia del alelo  $\Delta fleQ::kan$  cromosomal, y por lo tanto deben permitir la expresión del gen clonado a un nivel suficiente para que la bacteria lleve a cabo dicha función. El plásmido con el fragmento ActII -111 pierde la capacidad de complementar el fenotipo de la cepa SF2 y de ahí se puede inferir que en la región entre -142 a -111 deben existir elementos importantes para la correcta transcripción del gen *fleQ*. Estos elementos pueden corresponder a la secuencia del promotor o a la secuencia blanco de unión de algún activador transcripcional.

La secuencia de 31 pb ubicada entre las posiciones -142 a -111 junto 20 pb adyacentes a cada lado fue analizada con el programa Bprom (“Softberry”) para la búsqueda de promotores dependientes de  $\sigma^{70}$ , pero el resultado arrojó que en dicha región no existe secuencia parecida al consenso propuesto para los promotores de  $\sigma^{70}$  de *E. coli*. No obstante, analizando una región de 81 pb que además de los 31 pb incluye 44 pb río abajo de la posición -111 y 6 pb río arriba de la posición -142, el mismo programa encuentra un promotor potencial en el cual la región -35 (CTGTCT) que estaría a 20 pb río abajo del límite de la construcción -142 y 15 pb río abajo de ésta se encuentra la caja -10 (TGCTTTTAT). Por lo tanto la construcción -111 incluye la caja -10 predicha pero no la caja -35. Esta predicción requiere ser confirmada experimentalmente ya que otros programas que identifican posibles promotores como por ejemplo, el programa “Virtual footprinting V.3”, al utilizar la matriz de probabilidades para la caja -10 de *E. coli*, no identifica el promotor predicho por el programa “Softberry”, en su lugar sólo identifica como posible -10 a la secuencia previamente propuesta como caja -35 y una segunda caja pero en la cadena complementaria. Claramente, las predicciones de este último programa no coinciden con los resultados experimentales.

Por lo anterior, es razonable proponer que las cajas identificadas por el programa “Softberry”, podrían representar el promotor funcional de *fleQ*.

En caso de que la secuencia propuesta represente al promotor, nuestros resultados no arrojaron evidencia al respecto de posibles regiones que pudieran participar en la activación del promotor de *fleQ* (*fleQp*) que puedan estar ubicadas más allá de 20 pb río arriba de la caja -35. Sin embargo, en estos 20 pb bien podría unirse algún activador transcripcional que directamente pueda interactuar con la RNA polimerasa. En *E. coli* y otras bacterias es común identificar el sitio de unión de ciertos FT (*factores de transcripción*) a aproximadamente -50 pb del sitio de inicio de la transcripción, esto es, a tan sólo unas pocas bases río arriba de la caja -35 (Collado-Vides et al., 1991; Diniz MM et al., 2011). Para probar esta posibilidad, el primer paso consistiría en corroborar la ubicación del promotor, y posteriormente mutar algunas de las bases río arriba de la caja -35 para determinar si estos cambios afectan la fuerza del promotor *in vivo*.

En un estudio previo a este trabajo (Poggio et al., 2005) se realizó ensayo de protección a RNAsas, este método es útil para definir el sitio de inicio de transcripción y puede ser usado también para la delimitación de finales 3' y uniones de empalme (Carey et al., 2013). Este ensayo requiere de más tiempo que la técnica de extensión del iniciador (o *primer extension*), con la excepción del 5' RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*), es a menudo el método más sensible para la localización del sitio de inicio de la transcripción. La desventaja principal del procedimiento es que el ensayo puede ser difícil de establecer para un nuevo gen debido a las condiciones de hibridación y las condiciones de digestión deben de ser determinadas empíricamente. Además la sonda radiomarcada es susceptible a la formación de estructuras secundarias estables que pueden generar productos resistentes a la RNAsa (Carey et al., 2013).

Los resultados obtenidos en dicho estudio contrastan con los obtenidos en este trabajo, ya que se propuso la existencia de dos sitios posibles para el inicio de la

transcripción (+1) de *fleQ*, ubicados a -300 y -150 nt río arriba del inicio de *fleQ* (Poggio et al., 2005).

En contraste, el mapeo por delección de la región regulatoria y el análisis *in silico*, realizados en este trabajo sugieren que el sitio de inicio de la transcripción (+1) se encuentra aproximadamente a -81 pb río arriba de la metionina iniciadora de *fleQ* y la transcripción iniciaría aproximadamente 11 pb río abajo de la caja -10.

La discrepancia entre ambos trabajos podría ser explicada si se considera que el ensayo de protección a RNAsas pudo haber detectado un producto de procesamiento de un transcrito mayor. Dado que *fleQ* se encuentra río abajo de los genes flagelares *flgLK* y *sltF*, es posible que parte del transcrito de estos genes pudiera penetrar hacia *fleQ*, para dar lugar a un transcrito policistrónico de *fleQ*. Alternativamente, es posible que se hubiese formado una estructura secundaria resistente a la degradación por RNAsas que interfiriera con la detección del verdadero inicio de la transcripción.

## CONCLUSIONES

1. El mapeo por delección indica que la expresión de *fleQ* requiere de las secuencias ubicadas río abajo de la posición -142, con respecto al codón de inicio de la traducción de *fleQ*.
2. El análisis *in silico* de esta región sugiere que la caja -35 del promotor se encuentra ubicada a -123 pb, mientras la caja -10 a -102 pb, con respecto al codón de inicio de *fleQ*. Por lo tanto, el sitio de iniciación de la transcripción estaría ubicado a -81 pb.

## PERSPECTIVAS

- Hacer el mapeo del inicio de la transcripción del gen *fleQ* mediante la técnica de RACE.
- Hacer mutagénesis dirigida y al azar de la región comprendida entre -142 a -111 pb para observar si hay algún cambio significativo en el nado y determinar si existen pares de bases determinantes en el promotor putativo para la correcta transcripción de FleQ.



## APÉNDICE

Secuencia de *fleQ* utilizada en este trabajo con la posición de cada oligonucleótido indicado con color:

>gi|552535527|ref|NC\_007493.2|:1778852-1780226 Rhodobacter sphaeroides 2.4.1 chromosome 1, complete sequence

CCCGGCAGGATCGGGCGCCCTCACGCCGCGCTGCACCGCATGATGCCGAACCTTCTTCATCTTCTCGATCAGCGTTCGTGCGGGCGCAGGGCGAGCGCATCGGCCGCACGGCTCACGCAGCCATCGCGCTTGGCCAGCGCCGCTCGATCAGCGCCACCTCGATGTCGCGCAGATAGCCGCGCAGGTCGAGGTCGGCCCGCCCTCGAGCATGTCATGGAACCTGGCTCGGTTTCGGGCAGTCCCTGCGCCTCTGGCGCAGCCGCCGGTTGCTGGCCCGGGGCCCTCGGGATCGGGCATGGCGAGCTGCAGAAGGTTCTCGCGCACATGGCGCGCGGTCACGATCCGGCCCGGAAAGAGCACGATGGCGCGGGCAAGCACGTTGCGCAATTCGCGCACATTGCCCGGCCACGAATGCCCGGCGAGCGCCGCGCAGCGCTGGTGTTCGAAATGCGGCAGATCCAGTGCCGGATCCCGCGCCAGCTGATCCTCCAGCATCCGCGCGAGGATCAGCGGAATGTCCGAGGCGCGCTCGCGCAGGTCGGGCAGTTCGAGCGGAAAGACGTTGATGCGGTAGTAGAGATCGCAGCGAAAGCCGCCCGCCACCTGCGCGTTCGAGGTTGCGGTGCGTGCCGTCACGAGGCGGAAATCGACCTCGATCTCGCTGGTGCCGCCACGCGCGAGATGCGGCGGCTTTCGA GAACGCGGAGCAGCTTGGCCTGCAGCGCCAGCGGCATGTCCCCGATCTCGTCGAGAAAGAGCGTGCCGCCGTGGGCCATCTCGATCCGGCCGATCCGCTGCCGGTTCGGCGCCGGTAAAGGCGCCCTTCTCATGGCCGAAAAGCTCGGATTCGAGCAGGTCGCCCGGAATGGCGGGCGAGTTGACCGCGATCAGCGCCCCGCCGCGGGCCGAGGCCCGGTGCAGCGCCTCGGGCGCCAGTTTCCTTGCCGGTTCGGTTCGATCCCCGCACGAGGACGGGCGCATCGCTGACGGCGACCGCGGGCGATCAGTTGCTTACCCGGCAGATCGAAACCGACTCGCCCGGGATCACC CGATTGATGAGGCCGGCAGGAGGGGGAAGCGGGCGGGAGCGGGCGCCCTCGGGCGAGAAGTGACTGGTCA TGCGGCGGGGCCATGCCTCAAAAATGGTTAACTGATCCTCAAGATCGTCGACCTGCGCCCATGCTGCAAC TGCATCAATGGCTTGTCCGAAACGGATAAAAAGCAGGGGTCACGCCCGAGAGACAAGAGCACTATCCTTTTGA CAGGTATGCGCCTCACGGTTGCATTGCGAGCAAGGTCGCGGAAGGACTGGACCGCGTGGAACCGGGCGC GCAGGCCTGCGGAAGGTCCGCCTCGGCGAGGAGGTCGGGGCGG

ActII 3	5'-GAATTCGAGGCGGACCTCCGCAGCG-3'	-234
ActII 7	5'-GAATTC AAGCCATTGATGCAGTTGC-3'	-83
ActII 8	5'-GCGAATTCGTCCAAAAGGATAGTGCTCT-3'	-142
ActII 9	5'-GCGAATTCCTGCTCGCAATGCAACCGTG-3'	-174
ActII 10	5'-GGAATTCCTGACCCCTGCTTTTATCCG-3'	-111
ActII CO Xba	5'-TCTAGATCAGCCGCGCTGCACCGCATG-3'	

## BIBLIOGRAFÍA

- Aldridge, P. & Hughes, K.T., 2002. Regulation of flagellar assembly. *Current opinion in microbiology*, 5(2), pp.160–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11934612>.
- Alonso, J.C. et al., 2013. Early steps of double-strand break repair in *Bacillus subtilis*. *DNA repair*, 12(3), pp.162–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23380520> [Accessed March 26, 2013].
- Armitage, J.P., 2009. Swimming and Behavior in Purple Non-Sulfur Bacteria. In N. Hunter et al., eds. *The Purple Phototrophic Bacteria*. Springer Science, pp. 643–654.
- Armitage, J.P. & Macnab, R.M., 1987. Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of bacteriology*, 169(2), pp.514–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=211807&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Arora, S.K. et al., 1997. A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *Journal of bacteriology*, 179(17), pp.5574–81. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=179431&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ausubel, F.M. et al., 1987. Current protocols in molecular biology. In F. M. Ausubel et al., eds. New York, N. Y.: John Wiley & Sons.
- Ayora, S. et al., 2011. Double-strand break repair in bacteria: a view from *Bacillus subtilis*. *FEMS microbiology reviews*, 35(6), pp.1055–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21517913> [Accessed February 18, 2014].
- Ballado, T. et al., 2001. The Hook Gene ( flgE ) Is Expressed from the flgBCDEF Operon in *Rhodobacter sphaeroides* : Study of an flgE Mutant. *Journal of bacteriology*, 183(5).
- Beck, L.L., Smith, T.G. & Hoover, T.R., 2007. Look, no hands! Unconventional transcriptional activators in bacteria. *Trends in microbiology*, 15(12), pp.530–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17997097> [Accessed June 18, 2013].
- Bourret, R.B., Borkovich, K. a & Simon, M.I., 1991. Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. In *Annual review of biochemistry*. pp. 401–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1883200>.
- Burrows, P.C. et al., 2009. Functional roles of the pre-sensor I insertion sequence in an AAA+ bacterial enhancer binding protein. *Molecular microbiology*, 73(4), pp.519–33. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2745333&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 18, 2014].

- Bush, M. & Dixon, R., 2012. The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of  $\sigma^{54}$ -dependent transcription. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 76(3), pp.497–529. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22933558> [Accessed March 29, 2013].
- Butala, M., Zgur-Bertok, D. & Busby, S.J.W., 2009. The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 66(1), pp.82–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18726173> [Accessed February 18, 2014].
- Camarena, L. et al., 2006. La transcripción de los genes flagelares de Rhodobacter sphaeroides es mediada por un complejo activador heteromultimérico y el factor sigma RpoN2. *Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. XXVI Congreso nacional*. Available at: <http://www.smb.org.mx/smb-anterior/XXVICONGRESO/text/Resumen-Invitados/LauraCamarena.pdf>
- Carey, M.F., Peterson, C.L. & Smale, S.T., 2013. The RNase protection assay. *Cold Spring Harbor protocols*, 2013(3). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23457339> [Accessed April 5, 2014].
- Chilcott, G. & Hughes, K., 2000. Coupling of Flagellar Gene Expression to Flagellar Assembly in Salmonella enterica Serovar Typhimurium and Escherichia coli. *Microbiology and molecular biology ...*, 64(4). Available at: <http://mmb.asm.org/content/64/4/694.short> [Accessed January 17, 2014].
- Collado-Vides J et al., 1991. Control Site Location and transcriptional regulation in Escherichia coli. *Microbiol. Rev.* 55:371-394
- Dasgupta, N. et al., 2002. fleQ, the Gene Encoding the Major Flagellar Regulator of Pseudomonas aeruginosa is sigma 70 dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of Escherichia coli cyclic AMP receptor protein. *Journal of bacteriology*, 184(19), pp.5240–5250.
- Dinniz, MM. et al., 2011. Fine-tuning control of phoBR expression in Vibrio cholerae by binding of phoB to multiple pho boxes. *J. Bacteriol.* 193:6929-38.
- Domenzain, C. et al., 2012. Evolutionary origin of the Rhodobacter sphaeroides specialized RpoN sigma factors. *FEMS microbiology letters*, 327(2), pp.93–102. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22093079> [Accessed June 18, 2013].
- Fenchel, T., 2002. Microbial behavior in a heterogeneous world. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5570), pp.1068–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12004118> [Accessed September 27, 2013].
- Ghosh, T., Bose, D. & Zhang, X., 2010. Mechanisms for activating bacterial RNA polymerase. *FEMS microbiology reviews*, 34(5), pp.611–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20629756> [Accessed August 5, 2013].
- Gómez-Gómez, J.-M. et al., 2007. A novel role for RecA under non-stress: promotion of swarming motility in Escherichia coli K-12. *BMC biology*, 5(14). Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1852089&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 9, 2014].

- Gruss, a & Michel, B., 2001. The replication-recombination connection: insights from genomics. *Current opinion in microbiology*, 4(5), pp.595–601. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11587938>.
- Huston, U. of T.-, 2008. *Rhodobacter sphaeroides*. 11 May. Available at: <http://www.rhodobacter.org/>.
- Jacobi, S. & Heuner, K., 2004. Characterization of the Alternative Sigma Factor  $\sigma_{54}$  and the Transcriptional Regulator FleQ of *Legionella pneumophila*, Which Are Both Involved in the Regulation Cascade of Flagellar Gene Expression. *Journal of Bacteriology*, 186(9), pp.2540–2547.
- Jyot, J., Dasgupta, N. & Ramphal, R., 2002. FleQ, the major flagellar gene regulator in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to enhancer sites located either upstream or atypically downstream of the RpoN binding. *Journal of bacteriology*, 184(19). Available at: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:FleQ,+the+major+flagellar+gene+regulator#9> [Accessed October 8, 2013].
- Kalir, S. et al., 2001. Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5524), pp.2080–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11408658> [Accessed January 27, 2014].
- Kazmierczak, B.I. & Hendrixson, D.R., 2013. Spatial and numerical regulation of flagellar biosynthesis in polarly flagellated bacteria. *Molecular microbiology*, 88(4), pp.655–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23600726> [Accessed May 23, 2013].
- Kearns, D.B., 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature reviews. Microbiology*, 8(9), pp.634–44. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3135019&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 29, 2014].
- Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* 70:191-7
- Kobayashi, K., Saitoh, T. & Shah, D., 2003. Purification and characterization of the flagellar basal body of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of bacteriology*, 185(17). Available at: <http://jb.asm.org/content/185/17/5295.short> [Accessed January 27, 2014].
- Komeda, Y., 1986. Transcriptional control of flagellar genes in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 168(3), pp.1315–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=213639&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kutsukake, K., Ohya, Y. & Lino, T., 1990. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 172(2), pp.741–747.

- Macnab, R.M., 1996. In Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium. In F. Neidhardt, ed. *Flagella and Motility*. Washington, D.C.: ASM Press, pp. 123–145.
- Maes, A. et al., 2013. Role of polyadenylation in regulation of the flagella cascade and motility in Escherichia coli. *Biochimie*, 95(2), pp.410–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23123524> [Accessed September 26, 2013].
- McCarter, L.L., 2006. Regulation of flagella. *Current opinion in microbiology*, 9(2), pp.180–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16487743> [Accessed March 17, 2013].
- Österberg, S., del Peso-Santos, T. & Shingler, V., 2011. Regulation of alternative sigma factor use. *Annual review of microbiology*, 65, pp.37–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21639785> [Accessed August 5, 2013].
- Ping, L. 2010. The asymmetric flagellar distribution and motility of Escherichia coli. *Journal of molecular biology*, 397(4), 906–16. doi:10.1016/j.jmb.2010.02.008
- Poggio, S. et al., 2000. Sigma-54 promoters control expression of genes encoding the hook and basal body complex in Rhodobacter sphaeroides. *J. Bacteriol.* 182, 5787-5792
- Poggio, S. et al., 2005a. The flagellar hierarchy of Rhodobacter sphaeroides is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins. *Molecular microbiology*, 58(4), pp.969–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16262784> [Accessed March 26, 2013].
- Porter, S.L., Wadhams, G.H. & Armitage, J.P., 2008. Rhodobacter sphaeroides: complexity in chemotactic signalling. *Trends in microbiology*, 16(6), pp.251–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18440816> [Accessed March 26, 2013].
- Quandt, J. & Hynes, M.F., 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram- negative bacteria. *Gene*, 127, pp.15–21.
- Radman, M., Matic, I. & Taddei, F., 2003. The evolution of evolvability. *Annals of the New York Academy Sciences.*, 870(1), pp.146–156.
- Rhodus, V. & Busby, S., 1998. Positive activation of gene expression. *Current opinion in microbiology*, 1(2), pp.152–159. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527498800052> [Accessed February 19, 2014].
- Sander, P. et al., 2001. Mycobacterium bovis BCG recA Deletion Mutant Shows Increased Susceptibility to DNA-Damaging Agents but Wild-Type Survival in a Mouse Infection Model. *Infection and Immunity*, 69(6), pp.3562–3568.
- Seigneur, M. et al., 1998. RuvAB acts at arrested replication forks. *Cell*, 95(3), pp.419–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9814711>.
- Simon, R., Prierer, U. & Pühler, 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology*, 1, pp.37–45.

- Sistrom, W.R., 1962. The kinetics of the synthesis of photopigments in Rhodopseudomonas spheroides. *Journal of general microbiology*, 28, pp.607–618. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sistrom,+W.R.+\(1962\)+The+kinetics+of+the+synthesis+of+photopigments+in+Rhodopseudomonas+spheroides.+J+Gen+Microbiol+28:+607-616](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sistrom,+W.R.+(1962)+The+kinetics+of+the+synthesis+of+photopigments+in+Rhodopseudomonas+spheroides.+J+Gen+Microbiol+28:+607-616).
- Smith, T.G. & Hoover, T.R., 2009. Deciphering Bacterial Flagellar Gene Regulatory Networks in the Genomic Era. In S. S. Allen I. Laskin & G. M. Gadd, eds. *Current opinion in microbiology*. Academic Press, pp. 257–295. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16262784> [Accessed March 26, 2013].
- Sokett, R.E., Foster, J.C.A. & Armitage, J.P., 1990. Molecular biology of the Rhodobacter sphaeroides flagellum. *FEMS symp*, 53, pp.473–479.
- Soutourina, O. a & Bertin, P.N., 2003. Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(4), pp.505–523. Available at: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0168-6445\(03\)00064-0](http://doi.wiley.com/10.1016/S0168-6445(03)00064-0) [Accessed September 26, 2013].
- Spohn, G. & Scarlato, V., 1999. Motility of Helicobacter pylori is coordinately regulated by the transcriptional activator FlgR, an NtrC homolog. *Journal of bacteriology*, 181(2), pp.593–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=93415&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Volkert, M.R. & Landini, P., 2001. Transcriptional responses to DNA damage. *Current opinion in microbiology*, 4(2), pp.178–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22223567>.
- Wigley, D.B., 2013. Bacterial DNA repair: recent insights into the mechanism of RecBCD, AddAB and AdnAB. *Nature reviews. Microbiology*, 11(1), pp.9–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23202527> [Accessed January 22, 2014].
- Wu, Y.Q. et al., 1991. Genetic and physical mapping of the Rhodobacter sphaeroides photosynthetic gene cluster from R-prime pWS2. *Plasmid*, 25(3), pp.163–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1924554>.
- Xu, H. & Hoover, T.R., 2001. Transcriptional regulation at a distance in bacteria. *Current opinion in microbiology*, 4(2), pp.138–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11282468>.