



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización de los quimiorreceptores McpA y McpB de
Rhodobacter sphaeroides: análisis funcional y de
expresión.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

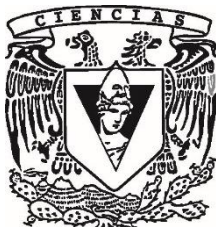
José de Jesús Hernández Valle

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía

2016

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Hernández

Valle

José de Jesús

5510096289

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

2. Datos del Tutor

Dra.

Rosa Laura

Camarena

Mejía

3. Datos del Sinodal 1

Dr.

Víctor Manuel

Valdés

López

4. Datos del Sinodal 2

Dra.

Laura

Kawasaki

Watanabe

5. Datos del Sinodal 3

Dra.

Claudia Andrea

Segal

Kischinevzky

6. Datos del Sinodal 4

M. en C.

Alfonso José

Vilchis

Peluyera

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización de los quimiorreceptores McpA y McpB de *Rhodobacter sphaeroides*: análisis funcional y de expresión.

76 p

2016

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, que durante los últimos 5 años han sido más que mi hogar.

A la Dra. Laura Camarena, gracias por compartirme su conocimiento, su tiempo y por haberme ayudado a confirmar mi amor por la ciencia. Gracias por toda la paciencia, tolerancia, y confianza, así como por permitir mi estancia en su laboratorio y por mostrarme que es posible ser un excelente científico y un estupendo ser humano.

A la Dra. Clelia Domenzain y al Dr. Sebastian Poggio por sus valiosos consejos y observaciones para la realización de este trabajo, así como a Aurora Osorio por su inmenso apoyo técnico.

A los Doctores George Dreyfus y Javier de la Mora, así como a Teresa Ballado y Ana Martínez del Campo del Instituto de Fisiología Celular, por haberme facilitado algunas cepas y anticuerpos utilizados en este trabajo, así como por sus valiosos consejos.

A mis sinodales, gracias por su valioso tiempo y comentarios para la mejora de este trabajo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio y generación: Elidet, Raúl, Caleb, Clelia, Benja, Vero, Paulina, Ana, Marintia, Melisa, David, Manuel, Chio, Anet, Bruno, Sandra, Alí, Kevin y Felipe por la grata compañía y consejos académicos y de vida.

A Víctor, Jesús y César, por su sincera amistad.

A Edouard Faria y a Octavio González, por ser tanto mis maestros como mis amigos.

A mi hermana Fátyma y a mi sobrina Roesli, pero en especial a mis padres Jesús e Irma, a quienes no sólo les debo la vida, sino también la confianza y el inmenso apoyo para que yo pudiera seguir este sueño, gracias por ser mis amigos, mis confidentes, mis socios y padres, gracias por ser tanto en mi vida.

A mis padres

Índice

Resumen	1
Marco Teórico	3
▪ Señales ambientales y taxis	3
▪ Sistemas de transducción de señales	3
▪ Nado bacteriano y Quimiotaxis	4
▪ Respuesta Quimiotáctica	6
▪ Componentes del sistema quimiotáctico	10
▪ Flagelo bacteriano	18
▪ Generación de la fuerza rotacional	18
▪ Regulación de la expresión génica de genes flagelares y quimiotácticos	19
▪ <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	21
▪ Organización genética de los genes quimiotácticos de <i>R. sphaeroides</i>	22
▪ <i>R. sphaeroides</i> presenta dos sistemas flagelares funcionales	23
▪ Control quimiotáctico del Fla1 de <i>R. sphaeroides</i>	24
▪ Control quimiotáctico del Fla2 de <i>R. sphaeroides</i>	25
Planteamiento del problema	28
Hipótesis y Objetivos	29
Materiales y Métodos	30
Resultados	42
▪ Control quimiotáctico	42
▪ Regulación transcripcional de <i>cheOp1</i>	47
▪ Análisis Bioinformático	52
Discusión	56
Conclusiones	62
Perspectivas	62
Anexos	63
Referencias	67

RESUMEN

La capacidad de responder y adaptarse a cambios en las condiciones ambientales, tales como la carencia de nutrientes y la acumulación de sustancias tóxicas determina la supervivencia de las bacterias. Dichas respuestas pueden involucrar alteraciones en la expresión de genes y/o un desplazamiento direccionado hacia determinados ambientes (Wadhams & Armitage, 2004). La quimiotaxis es una respuesta celular compleja mediante la cual las bacterias pueden direccionar un nado aleatorio para así dirigirse hacia un atrayente o alejarse de un repelente. Una extensa red de proteínas citoplásmicas y receptores asociados controlan esta respuesta. En el sistema quimiotáctico, las señales son transducidas desde un quimiorreceptor, a través de un sistema de dos componentes hacia el motor flagelar, para controlar su rotación (Porter et al, 2011).

En el sistema quimiotáctico de *Escherichia coli*, los receptores denominados MCPs se encuentran asociados a una cinasa de histidina, CheA, mediante la proteína adaptadora CheW. En ausencia de atrayente, un receptor activo estimula la actividad de la cinasa dimérica, promoviendo su autofosforilación en un residuo de histidina. Una vez fosforilada CheA, cede su grupo fosforilo a uno de sus reguladores de respuesta: CheY o CheB. CheY fosforilado interactúa con el interruptor del motor flagelar, cambiando la rotación del flagelo de un sentido contrario a las manecillas del reloj, al sentido de las manecillas, provocando la reorientación de la célula. CheB es parte del sistema de adaptación junto con CheR. Mientras la metiltransferasa CheR metila a los MCPs en residuos de glutamato, CheB en estado fosforilado los desmetila, inhibiendo la actividad de la cinasa, lo que permite desensibilizar el receptor. El estado activo/inactivo del receptor depende de la interacción del mismo con sus ligandos y de su estado de metilación (Hazelbauer et al, 2007).

La regulación transcripcional de genes quimiotácticos normalmente está dada por factores sigma alternativos, como sigma 28 (FliA) y sigma 54 (RpoN). En bacterias como *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*, homólogos de sigma 28 regulan tanto la transcripción de genes flagelares tardíos como la flagelina, y los genes quimiotácticos (Tsang & Hoover, 2014). En cambio, en α -proteobacterias como *Caulobacter crescentus* y *Rhodobacter capsulatus*, la regulación transcripcional de los genes quimiotácticos está dada por el regulador maestro CtrA y el factor sigma 70 (Laub et al, 2002; Mercer et al, 2010).

Rhodobacter sphaeroides es una α -proteobacteria que tiene dos sistemas flagelares y múltiples copias de genes quimiotácticos que se encuentran organizados principalmente en tres operones: *cheOp1*, *cheOp2* y *cheOp3*. Recientemente se ha demostrado que las proteínas codificadas por el *cheOp1* son las responsables del control quimiotáctico del sistema flagelar Fla2. Análisis fenotípicos de las cepas mutantes para genes contenidos en el *cheOp1*, como *cheA1*, *cheW1*, *cheY2*, *cheY5*, *cheR1*, y *mcpA*, permitió vincularlos al control quimiotáctico del flagelo 2. Sin embargo, para los genes *mcpB*, *cheB*, y *cheY1* no fueron obtenidos datos concluyentes (Martínez del campo et al, 2011).

En cuanto a la regulación transcripcional de los genes quimiotácticos, se sugiere que en *R. sphaeroides* el *cheOp2* es regulado por los factores sigma 70 y sigma 28, mientras que el *cheOp3* es regulado por RpoN3 (Martin et al, 2006), sin embargo, la regulación transcripcional del *cheOp1* no ha sido investigada. Considerando que el sistema flagelar 1 fue adquirido por transferencia horizontal de una γ -proteobacteria, mientras que el sistema flagelar 2 es el nativo (Poggio et al, 2007), la regulación transcripcional de las proteínas que mantienen el control quimiotáctico del sistema

flagelar Fla2 (proteínas codificadas por el *cheOp1*), debería estar dado por el factor transcripcional CtrA, como se ha visto en otras α -proteobacterias.

En el presente trabajo se determinó que el control del motor flagelar es mediado por los quimiorreceptores McpA y McpB. El análisis fenotípico de las mutantes generadas AM1 *cheR1⁻ mcpA⁻*, AM1 *cheR1⁻ mcpB⁻* y AM1 *cheR1⁻ mcpA⁻ mcpB⁻*, indican que McpA es suficiente para activar a la cinasa CheA1 a los niveles vistos en la mutante simple RS2R1 (AM1 *cheR1⁻*). Lo anterior puede deberse a que solo McpA sea dependiente de CheR1, o a que no lo sea, y que por lo tanto sea clave en la formación de complejos de señalización estables y funcionales, que permitan un adecuado control quimiotáctico del flagelo 2 por parte de otros MCPs asociados. Se demostró además que la expresión de los genes *mcpA*, *cheY2* y *cheY5* contenidos en el *cheOp1* es dependiente del factor transcripcional CtrA, por lo que se sugiere que el *cheOp1* es regulado por dicho factor.

MARCO TEÓRICO

Señales ambientales y taxis

Las bacterias pueden sentir una amplia variedad de señales, como lo son la presencia de nutrientes, toxinas, niveles de oxígeno, pH, osmolaridad, intensidad y longitud de onda de la luz, el campo magnético de la Tierra, así como los quimioefectores producidos por plantas e inclusive por otras bacterias (Rappuoli et al, 1996).

La capacidad de responder y adaptarse a cambios en las condiciones ambientales determina su supervivencia. Dichas respuestas pueden involucrar alteraciones en la expresión de genes, transiciones a estadios estacionarios de resistencia o a una fase de esporulación, así como un desplazamiento direccionado hacia ambientes favorables, mediante un proceso denominado taxis (Wadhams & Armitage, 2004; Armitage, 2007).

La taxis es el movimiento direccionado de un organismo en respuesta a un estímulo, que le permite acercarse o alejarse de éste. Las bacterias, mediante el sentido constante de su ambiente, pueden direccionar su movimiento hacia ambientes óptimos de crecimiento. La taxis bacteriana puede clasificarse en función al estímulo que la ocasiona, por lo que tenemos a la taxis de energía, donde es sentido el estado redox de la célula mediante la unión de moléculas como FAD a dominios específicos de receptores, como es el caso de la aerotaxis en *E. coli*, o la fototaxis, donde bacteriorrodopsinas le permiten a bacterias como *Halobacterium salinarium* controlar su movimiento, para acercarse o alejarse de determinadas longitudes de onda; la magnetotaxis, donde las bacterias usan sus magnetosomas para alinearse a lo largo del campo geomagnético, para entonces mediante aerotaxis moverse hacia sus concentraciones predilectas de oxígeno; y la quimiotaxis, en la que se responde a cambios en las concentraciones de quimioefectores (Armitage, 2007).

La motilidad bacteriana y su regulación por el sistema quimiotáctico puede interpretarse como una ventaja adaptativa, de la que diversas bacterias se han valido, por ejemplo, en procesos de colonización, tal es el caso de *Agrobacterium tumefaciens* y los sistemas radiculares de plantas, *Helicobacter pylori* y el epitelio gástrico, *Salmonella* y el intestino; en procesos de formación de biofilm (Armitage, 2007); o simplemente para la búsqueda de nutrientes.

Sistemas de transducción de señales

Los sistemas de transducción de señales funcionan como vías de procesamiento de información, que vinculan un estímulo externo a una respuesta celular. Una de las estrategias fundamentales para la señalización es la fosforilación de proteínas. En eucariontes los principales residuos que son blanco de dicha modificación, son serina (Ser), treonina (Thr) y tirosina (Tyr), mientras que los sistemas de señalización de procariontes operan principalmente mediante la fosforilación de residuos histidina-aspártico. Dichos sistemas son denominados HAP (Histidine-Aspartate Phosphorelay), por la transferencia del grupo fosfato desde una proteína fosforilada en un residuo His hacia otra proteína que es fosforilada en un residuo Asp. Estos sistemas de transducción presentan al menos dos proteínas altamente conservadas, por lo que se les ha denominado sistemas de dos componentes, constan de una cinasa de histidina dimérica y un regulador de respuesta. La fosfotransferencia de la cinasa al regulador de respuesta lleva a su activación, lo que provoca una respuesta celular (West &

Stock, 2001). Dichos sistemas de dos componentes pueden estar involucrados en diversos procesos como la quimiotaxis, la osmorregulación y el metabolismo (Mizuno, 1997).

En *A. tumefaciens*, compuestos fenólicos y monosacáridos producidos por heridas en las raíces de monocotiledóneas no sólo promueven la migración de la bacteria hacia la planta mediante su sistema quimiotáctico, sino que mediante otro sistema HAP se desencadena en la bacteria la expresión de genes requeridos para la transferencia del plásmido Ti al DNA de la planta (Winans, 1992). Es sabido que fenoles, monosacáridos de tipo aldosa, y condiciones de bajo pH y bajo fosfato promueven la activación del sistema VirA/VirG. En este sistema, la cinasa sensora VirA, una vez activada por sus ligandos, se autofosforila, transfiriendo su fosfato al regulador de respuesta VirG. VirG fosforilado activa la transcripción de los genes *vir*, requeridos para la transferencia del plásmido Ti a la célula vegetal, así como para su integración en el cromosoma (McCullen & Binns, 2006).

A pesar de que la mayoría de sistemas HAP están involucrados en la regulación de la expresión de genes, una de las vías mejor comprendidas es la que regula el comportamiento de nado de las bacterias (Wadhams & Armitage, 2004).

Nado bacteriano y quimiotaxis

La **quimiotaxis** es una compleja respuesta celular mediada por un sistema de dos componentes por el cual las bacterias pueden direccionar un nado aleatorio, para así dirigirse hacia un atrayente o alejarse de un repelente (Porter et al, 2008).

Bacterias como *E. coli* y *Salmonella typhimurium* nadan utilizando flagelos, dichas estructuras se arreglan en forma de delgados filamentos helicoidales anclados a las envolturas celulares, siendo impulsados por un motor rotatorio, mediante la energía electroquímica, ya sea de un gradiente de protones o de sodio (ver “Generación de Fuerza Rotacional”). El **nado bacteriano** puede describirse como el resultado de la alternancia entre dos modos de movimiento celular: corridas y reorientaciones (Falke et al, 1997).

Dependiendo de la distribución y arreglo de los flagelos en la célula, las bacterias se clasifican en monótricas, con un solo flagelo; lofótricas, con varios flagelos en un polo celular; anfítricas, con flagelos en ambos polos; y perítricas, con flagelos distribuidos a lo largo de la superficie celular.

Nado o corrida. Cuando los filamentos de la bacteria perítrica *E. coli* rotan en sentido contrario a las manecillas del reloj, individualmente se encuentran formando una hélice levógira, mientras que el conjunto de ellos se arreglan en una trenza paralela al eje longitudinal de la célula, cuya rotación impulsa el cuerpo celular. Las fuerzas hidrodinámicas y mecánicas permiten que la célula alcance una velocidad aproximada de 20 micras por segundo (Macnab & Orston, 1977) (ver Figura 1). Cuando en el nado de una bacteria predomina este tipo de movimiento celular, se dice que presenta un fenotipo “smooth”. Sin embargo, aún en este tipo de movimiento celular, se presentan cambios en la dirección de nado debidos a difusión (Berg & Brown, 1972). La difusión puede ser vista como la migración azarosa de moléculas o de pequeñas partículas, derivado del movimiento causado por la energía térmica del objeto en cuestión (Berg, 1993).

Reorientación. El cambio en la rotación del flagelo de un sentido contrario a las manecillas del reloj (CCW) al sentido de las manecillas del reloj (CW), genera la torsión del filamento flagelar, cambiando de una hélice levógira a dextrógira. Dicha transición ocurre rápidamente, desde la base del flagelo. Entonces, la trenza generada por la rotación CCW se desorganiza. La reorientación es el resultado del movimiento caótico (“tumble”) generado por el conjunto de flagelos que se encuentran rotando y de aquellos que se encuentran en transición (Macnab, 1977) (ver Figura 1). En dichos periodos, la célula presenta una alta velocidad angular y una prácticamente inexistente velocidad lineal (Berg & Brown, 1972). Cuando en el nado de una cepa predominan los eventos de reorientación, se dice que presenta un fenotipo “tumbly”.

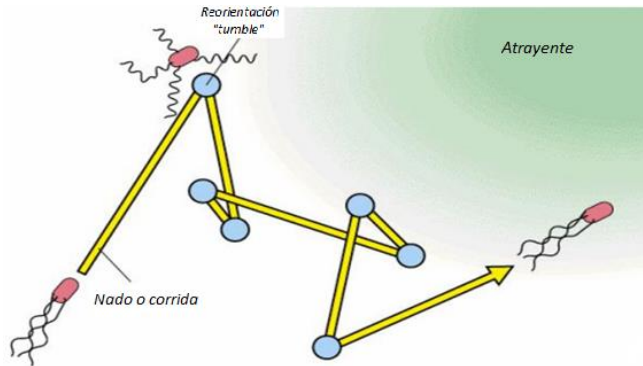


Figura 1. El **nado bacteriano** es el resultado de la alternancia entre dos modos de movimiento celular: corridas y reorientaciones. Mediante la quimiotaxis las bacterias pueden sesgar su nado para dirigirse a un atrayente. Modificado de La Vecchia, 2010.

Las células no estimuladas o en ambientes uniformes isotrópicos (en ausencia de un gradiente de quimioatrayente), llevan a cabo un nado aleatorio, consistente en corridas en línea recta (+/- 1 seg) interrumpidas por eventos de reorientación (+/- 1/10 seg), en los cuales la célula se detiene brevemente para después reorientarse estocásticamente antes de reanudar el nado en una nueva dirección (Falke et al, 1997; Baker et al, 2005). El resultado es una trayectoria azarosa en tres dimensiones, si la célula se encuentra en solución (Blair, 1995).

Un nado aleatorio, en el que las corridas y reorientaciones fueran igualmente probables, sería una pobre estrategia de dispersión, ya que la distancia cubierta sería proporcional a la raíz cuadrada del tiempo de desplazamiento (Blair, 1995; Berg, 1993), lo que sería desfavorable adaptativamente.

En *E. coli*, una célula nadando en presencia de un gradiente de atrayente como el ácido aspártico, generaría una supresión momentánea de la rotación CW de su motor flagelar, prolongando la duración de las corridas, y por lo tanto disminuyendo los eventos de reorientación, acercándola al atrayente (ver Figura 2). En presencia de un repelente o en la disminución significativa de atrayentes, se incrementaría la probabilidad de rotación CW, recortando la duración de las corridas, en otras palabras aumentando los eventos de reorientación, alejando a la célula (Brown et al, 1974).

Debido a su pequeño tamaño, las células de *E. coli* no pueden mantener ninguna trayectoria por más de 3 seg, tiempo en el cual la difusión impondría una nueva dirección de nado. Por lo tanto la célula tiene una cantidad de tiempo limitada para poder sensor y responder a los cambios de concentración de ligandos en el medio (Berg, 1993).

Respuesta quimiotáctica

Un sistema de dos componentes permite que una señal de entrada (la presencia o ausencia de un ligando) sensada y transducida por un receptor, sea convertida en una señal de salida, alterando la rotación del motor flagelar y de esta manera la dirección de nado de la célula. El sistema quimiotáctico mejor descrito es el de *E. coli*, que se ha convertido en un paradigma para la caracterización molecular de diversos mecanismos de señalización (Hazelbauer, 2007).

En dicho sistema, las MCPs (Methyl accepting Chemotactic Proteins: quimiorreceptores transmembranales que presentan adaptación dependiente de metilación) y proteínas alternativas a MCPs (Wadhams & Armitage, 2004), median la respuesta quimiotáctica de la célula, a través de complejos de señalización ternarios que contienen a dichos receptores, a la cinasa de histidina CheA y a la proteína adaptadora CheW, que asocia la actividad de la cinasa al control del receptor (Gegner et al, 1992). Además, un sistema de adaptación conformado por las proteínas CheR y CheB, que mediante la metilación/desmetilación de los MCPs regulan la actividad de la cinasa, permitiendo la desensibilización del receptor al estado previo al estímulo y permitiendo a la célula sensar en tiempo real los cambios en las concentraciones de quimioefectores (Krembel et al, 2015).

La respuesta quimiotáctica puede dividirse en dos fases: fase de estimulación y fase de adaptación.

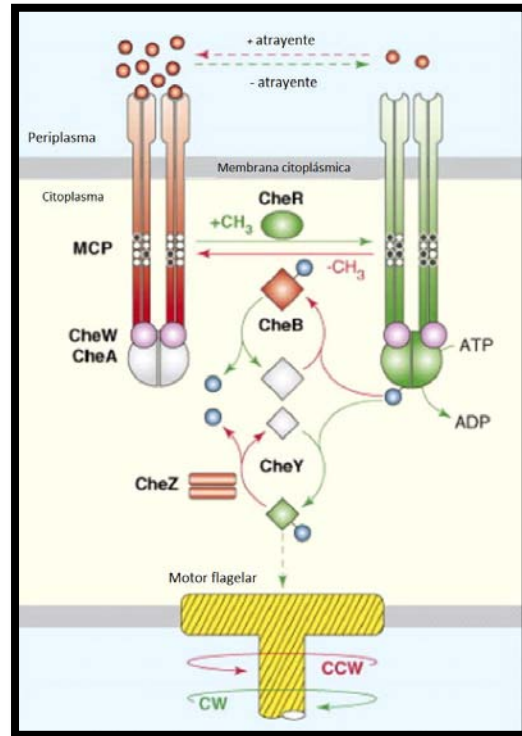
Fase de estimulación

Los complejos de señalización (MCPs/CheW/CheA) pueden encontrarse en dos estados conformacionales, denominados “cinasa-on” y “cinasa-off”, denominados así por el estado conformacional del receptor. Un estado “cinasa-on”, es aquel en el cual el receptor estimula la autofosforilación de CheA, mientras que el estado “cinasa-off” la mantiene inactiva. Incrementos en la concentración del atrayente llevan a dichos complejos ternarios a un estado “cinasa-off”, mientras que disminuciones de atrayentes o presencia de repelentes lo llevan a un estado “cinasa-on” (Hazelbauer, 2007).

La activación de la cinasa de histidina dimérica implica su autofosforilación, en un residuo conservado de histidina, siendo el donador del grupo fosfato el ATP. Una vez fosforilada CheA, su grupo fosfato es cedido a uno de sus reguladores de respuesta: CheY o CheB (Hess et al, 1988). Ambos reguladores presentan una competencia de asociación por la cinasa CheA, siendo CheY por quien tiene mayor afinidad (Li et al, 1995). CheY-P tiene dos blancos: FliM y CheZ. CheY se une de manera reversible a CheA, disociándose de esta dada su fosforilación y difundiendo rápidamente al motor flagelar. CheY-P interactúa con el interruptor del motor flagelar, específicamente con la proteína FliM, cambiando la rotación del flagelo, de un sentido CCW a CW, lo que provoca la reorientación de la célula (Welch et al, 1993). Los reguladores de respuesta CheY y CheB pueden espontáneamente defosforilarse (Hess et al, 1998), sin embargo, en *E. coli*, la fosfatasa CheZ incrementa la tasa de defosforilación de CheY-P, permitiendo una rápida terminación de la señal (Bren et al, 1996). La reacción de defosforilación debe ocurrir rápidamente para permitir un continuo sensado, generando respuestas oportunas (Porter et al, 2011). Por ejemplo, en respuesta a una disminución de atrayente en el medio,

los receptores de *E. coli* promueven un fenotipo “tumbly”, mediante la activación de CheA y consecuentemente la fosforilación de CheY (Sourjik & Berg, 2000) (Ver figura 2).

Figura 2. Control quimiotáctico de *E. coli*. **Fase de Estimulación.** Dada una condición en la cual la concentración de atrayente en el medio se viera disminuida, o en la ausencia de éste, receptores libres estimularían la activación/autofosforilación de la cinasa dimérica. Una vez fosforilada, el fosfato sería cedido preferentemente al regulador de respuesta CheY, por el cual tiene mayor afinidad. CheY-P se disociaría del complejo Mcp/CheW/CheA, difundiendo hacia la base del motor flagelar. CheY-P presenta una mayor afinidad por la proteína del interruptor del motor flagelar, FliM. La interacción CheY-P – FliM desencadenaría un cambio en la rotación del flagelo, de un sentido CCW a CW, desorganizando la trenza de flagelos y permitiendo la reorientación de la célula. Un nado donde las reorientaciones son predominantes sería el favorable para encontrar condiciones de mayor concentración de atrayente (modificado de Hazelbauer et al, 2007).



E. coli responde a cambios en la concentración de ligandos de menos del 10% sobre un rango de seis órdenes de magnitud (nM a mM) (Armitage, 2007). A bajas concentraciones de ligando es requerida una considerable sensibilidad y amplificación de la señal. La sensibilidad a dichas concentraciones depende de una relación no lineal entre la concentración del ligando y la respuesta de salida del complejo quimiotáctico. Los quimiorreceptores trabajan de manera altamente cooperativa (comunicación inter-receptor), imitando el comportamiento de proteínas alostéricas, lo que permite una alta integración y amplificación de la señal (Gestwicki & Kessling, 2002; Sourjik & Berg, 2004).

Fase de adaptación

El proceso de quimiotaxis depende de un sensado y comparación a lo largo del tiempo de las concentraciones de quimioefectores en el medio. En bacterias como *E. coli*, un sistema de metilación de los MCPs, mediado por las proteínas CheR/CheB, les permite detectar dichos cambios a lo largo de sus trayectorias de nado, para así continuar nadando en cierta dirección o reorientarse (Krembel et al, 2015).

Mientras la metiltransferasa constitutiva CheR metila a los MCPs en sus 4 ó 5 residuos glutamato específicos, la metilesterasa CheB, en su forma fosforilada los desmetila (Anand & Stock, 2002; Stock & Koshland, 1978). Se ha visto que la fosforilación de la metilesterasa provoca un aumento de su actividad, de hasta 100 veces (Anand & Stock, 2002). A su vez, desamina residuos de glutamina específicos, convirtiéndolos en glutamatos, blancos de metilación (Kehry et al, 1983). CheR preferencialmente reconoce receptores en estado inactivo, incrementando la actividad del receptor

mediante su metilación. En cambio, CheB presenta una mayor afinidad por receptores activos, desmetilándolos, disminuyendo su actividad y la activación de la cinasa (Perez et al, 2004). De manera complementaria la fosforilación de CheB por CheA funciona como un asa de retroalimentación negativa, en la que CheB-P aumenta su actividad y la desmetilación de los receptores, trayendo consigo una disminución en la actividad de la cinasa (Kehry & Dahlquist, 1982).

En ausencia de un gradiente de quimioatrayente, el sistema de adaptación permite generar niveles intermedios de CheY-P, por lo que se produce una alternancia azarosa entre corridas y reorientaciones, que le permiten a la célula explorar su ambiente (Krembel et al, 2015). En respuesta a incrementos en la asociación de atrayentes a sus respectivos receptores, se da la inhibición de la cinasa, disminuyendo la producción de CheY-P, suprimiendo las reorientaciones y prolongando los nados en dirección al atrayente. CheR continuamente metila a los receptores, permitiendo de manera gradual regresar a los niveles basales de actividad de la cinasa, y por lo tanto de CheY-P (Sourjik & Wingreen, 2012). Dicha etapa funge como una memoria a corto plazo, que le permite comparar las condiciones actuales con aquellas experimentadas en el pasado inmediato (Porter et al, 2011) (ver Figura 3).

Los MCPs de *E. coli* son expresados a niveles variables, teniendo los de alta (Tar y Tsr) y baja abundancia (Tap y Trg). En esta bacteria, los complejos sensoriales están formados por los diferentes MCPs, así como por las proteínas CheW y CheA (Bi & Lai, 2015).

En *E. coli* y *S. enterica*, sólo los MCPs de alta abundancia, presentan un motivo NWETF en el extremo C-terminal (Le Moual et al, 1997), dicho motivo permite el reclutamiento de la maquinaria del sistema de adaptación CheR/CheB (Barnakov et al, 1999), incrementando la concentración de estas proteínas en los complejos sensoriales (Wu et al, 1996), facilitando la metilación de los MCPs aledaños, ya sean de alta o de baja abundancia (Le Moual et al, 1997; Li & Hazelbauer, 2005). Se ha mostrado *in vivo* que una vez reclutadas las proteínas CheR y CheB por el pentapéptido NWETF de algún receptor, la enzima puede actuar sobre de 5 a 7 receptores cercanos (Li & Hazelbauer, 2005). Por lo tanto, los receptores de alta abundancia asisten a los receptores de baja abundancia en los procesos de adaptación y mediación de la quimiotaxis.

Congruentemente con la cooperatividad observada entre receptores, como se mencionará más adelante, al analizar las tasas de adaptación (derivadas del tiempo necesario para recuperar la actividad basal de la cinasa antes de la estimulación) hacia diversos atrayentes sensados por diferentes tipos de receptores, estas resultaron invariables, lo que debe resultar de las interacciones alostéricas entre receptores en los complejos sensoriales (Krembel et al, 2015).

La evidencia experimental indica que la comunicación inter-receptor en los complejos de MCPs es responsable de la amplificación de la señal durante las respuestas excitatorias y de adaptación (Gestwicki & Kessling, 2002; Sourjik & Berg, 2004; Krembel et al, 2015; Li & Hazelbauer, 2005).

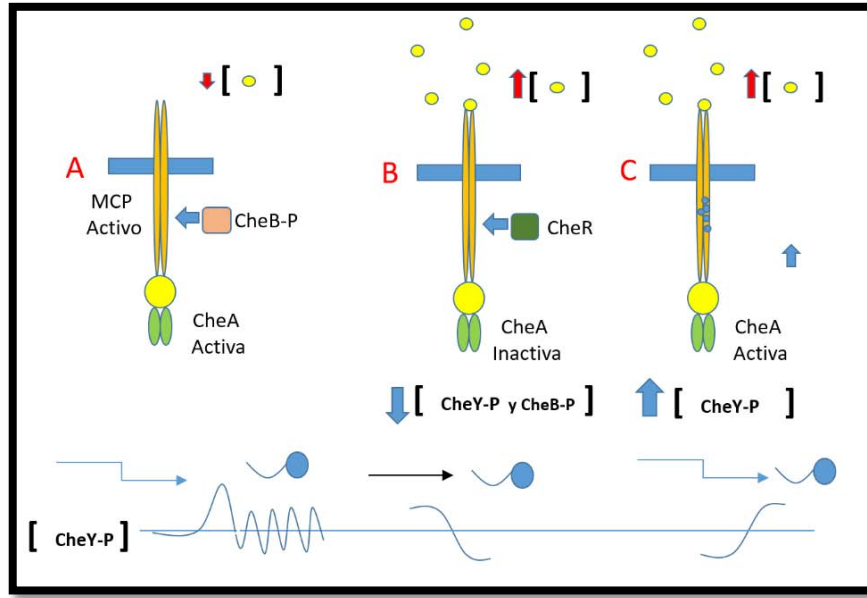


Figura 3. Control quimiotáctico en *E. coli*. **Fase de Adaptación.** **A.** En ausencia de un atrayente, el MCP activa a CheA, generando altos niveles de CheY-P, sin embargo la fosforilación de CheB genera receptores desmetilados que inactivan el sistema. Por lo tanto, los niveles de CheY-P se mantienen oscilando, generando un fenotipo intercalado entre corridas y reorientaciones. **B.** Dado un estímulo (unión del ligando), el receptor inactiva a la cinasa, disminuyendo los niveles de CheY-P globales. CheR que presenta mayor afinidad por receptores inactivos, comenzaría a metilar a los receptores. **C.** El estado activo de la cinasa dado por la metilación de los receptores le permitiría a la célula regresar a los niveles de CheY-P previos al estímulo, a pesar de la presencia del ligando.

Existen sistemas de adaptación alternativos al de *E. coli*. El de *Bacillus subtilis* es uno de los sistemas más ampliamente estudiados. Su sistema de adaptación en realidad está compuesto de tres subsistemas: (1) un sistema dependiente de la metilación de los receptores, el cual es regulado por las proteínas CheR/CheB, en este caso, la metilación de algunos residuos resulta en la activación de la cinasa, mientras que la metilación de otros la inactivan; (2) el circuito CheC/CheD, en el que CheC es una fosfatasa de CheY-P, mientras que CheD es una desamidasa de receptores, que convierte residuos glutamina específicos, en glutamatos blancos de metilación. El homólogo de CheD en *Thermotoga maritima* ha mostrado funcionar además de desamidasa como una metilesterasa. La proteína CheD tiene la capacidad de formar complejos ternarios, CheC-CheY-P-CheD, que estimulan la actividad de fosfatasa de CheC. Se ha propuesto que cuando los niveles de CheY-P son bajos, la proteína CheD se asocia a los receptores, incrementando la actividad de la cinasa, una vez que los niveles de CheY-P se ven aumentados CheD forma los complejos CheC-CheY-P-CheD que promueven la terminación de la señal, a su vez la disociación de los receptores disminuye la actividad de la cinasa. En este caso un mecanismo de competencia entre los receptores y CheC-CheY-P por la unión con CheD determina la adaptación; y (3) en el que la proteína CheV que presenta un dominio amino terminal tipo CheW y un dominio REC receptor, susceptible de ser fosforilado, ubicado en el extremo C-terminal de la proteína. CheV se asocia al dominio de señalización del receptor y a la cinasa CheA, se propone que cuando CheV es fosforilada por CheA en su dominio receptor, inhibe la actividad de la cinasa, fungiendo como una vía de retroalimentación negativa (Rao et al, 2008; Porter et al, 2011; Chao et al, 2006).

Componentes del sistema quimiotáctico

MCPs

Los quimiorreceptores son las proteínas de señalización responsables de sensor quimioefectores con una alta especificidad y de transducir dichas señales a las proteínas río abajo en la cascada de señalización quimiotáctica. Los quimiorreceptores transmembranales conocidos como Proteínas Quimiotácticas Aceptoras de Metilo o **MCPs (Methyl-accepting Chemotaxis Proteins)** dirigen el nado celular mediante la regulación de la cinasa de histidina CheA, en respuesta a estímulos químicos externos (Hazelbauer et al, 2007).

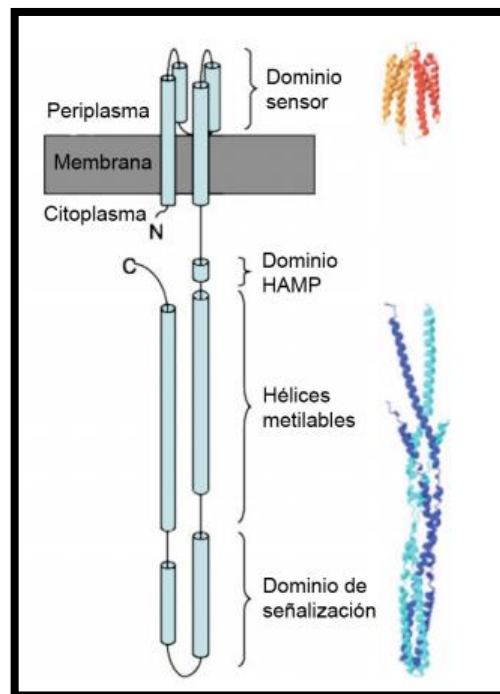


Figura 4. Estructura general de un quimiorreceptor MCP. Se observan las representaciones esquemáticas de los principales dominios, y la estructura tridimensional del dominio periplásmico y citoplásmico. Modificado de Baker et al, 2006.

Los MCPs presentan dos dominios bien definidos, un dominio periplásmico de unión a ligando y uno citoplásmico de transducción de señal. El dominio **periplásmico** se encuentra flanqueado por dos cruces transmembranales característicos de estas proteínas, esta región también denominada LBD (Ligand Binding Domain, para *E. coli*) o LBR (Ligand Binding Region, para *Pseudomonas spp.*) es la responsable de la interacción con los ligandos, ya sea de manera directa o indirecta mediante el acoplamiento de LBPs (Ligand Binding Proteins), como en el caso del sensado de la maltosa en *E. coli*. Cada MCP puede presentar múltiples ligandos, sean atrayentes o repelentes (ver Tabla 1). El tamaño de este dominio oscila entre 150 y 250 aa. Se ha visto que en bacterias como *Pseudomonas* existe una correspondencia entre el tamaño del LBR y el tipo de ligando, clasificándoles actualmente en dos grupos: grupo I y II. Por ejemplo, dentro del grupo I se encuentran receptores con dominios PAS, CACHE, 4_{HB} involucrados en el sensado de O₂, malato e hidrocarburos, mientras que en el grupo II, se encuentran dominios PDC y HDM, cuyos ligandos son aminoácidos y ácidos orgánicos (ver figura 5) (Hazelbauer, 1975; Bi & Lai, 2015; Sampedro et al, 2014).

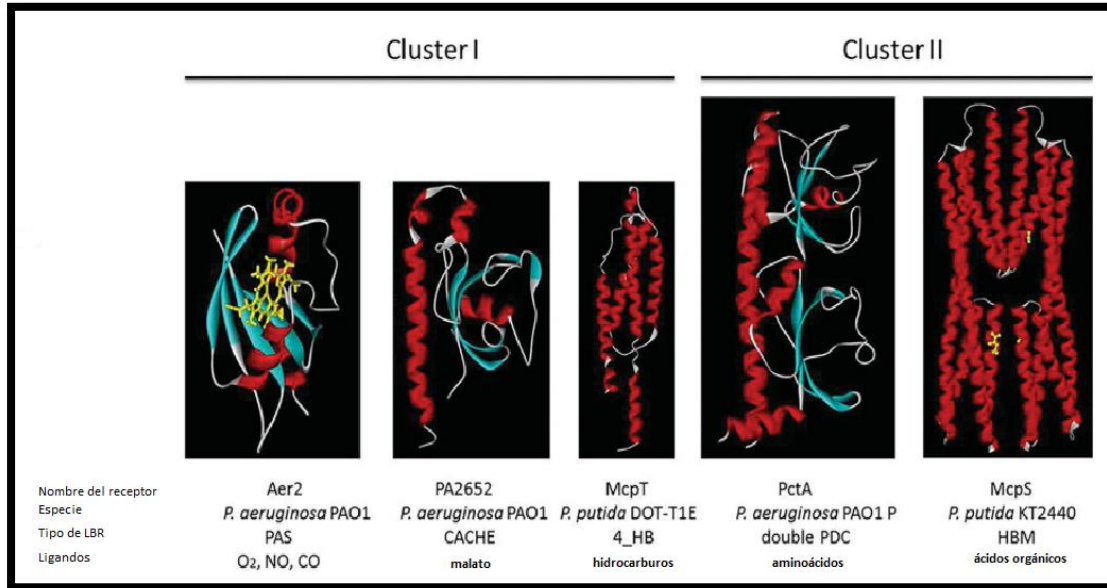


Figura 5. Diversidad estructural de la Región de Unión a Ligando (LBR) de *Pseudomonas aeruginosa* y *P. putida*. Se muestran los tipos de LBR, sus ligandos, su estructura obtenida por cristalografía de rayos X y su clasificación en función a su tamaño, Grupo I: 150 aa y Grupo II: 250 a.a. Modificado de Sampedro et al, 2014.

En el año de 1991, los laboratorios de Kin y Koshland colaboraron para determinar mediante cristalografía de rayos X la estructura tridimensional del dominio de unión a ligando del receptor Tar de *S. typhimurium*, con o sin su ligando aspártico. Se determinó que dicho dominio forma un homodímero; que cada subunidad consiste de una trenza o “bundle” de 4 hélices alfa; que el sitio de unión a ligando está localizado entre la interfase de las dos subunidades, entre dos alfa hélices (una de cada subunidad), en un hueco cargado positivamente formado por tres argininas; que la unión del ligando provoca un cambio en la orientación de las subunidades, una con respecto a la otra; y que la cuarta alfa hélice correspondiente al extremo C-terminal está conectada al dominio de señalización del citoplasma (Milburn et al, 1991). El homodímero presenta dos sitios simétricos, no sobrepuestos de unión a Aspartato. La unión de Aspartato a cualquiera de los dos sitios, genera un cambio conformacional que imposibilita la unión al segundo sitio (Biemann & Koshl, 1994).

El movimiento tipo pistón entre el primer y segundo cruces transmembranales, así como la rotación de las subunidades una con respecto a la otra, son la fuente de la señalización a través de la membrana celular para el control de la cinasa (Baker et al, 2006) (Ver Figura 30, en sección de Anexos).

La función principal del dominio citoplásmico, es el transducir la señal hacia la cinasa de histidina CheA. Este dominio puede ser dividido en cuatro subdominios, iniciando por el extremo N-terminal: (1) dominio HAMP (Histidine kinases, Adenyl cyclases, Methyl-binding proteins & Phosphatases), (2) hélice metilable 1 (MH1), (3) dominio de señalización, y (4) hélice metilable 2 (MH2) (Baker et al, 2006) (ver Figura 4). La primera región identificable después del segundo cruce transmembranal es el subdominio enlazador HAMP, que consiste en dos hélices anfipáticas conectadas por una estructura globular (Appleman et al, 2003), que transduce la señal del dominio periplásmico al

citoplásmico. Las hélices metilables (MH1 y MH2), que adoptan una estructura de hélice super enrollada, poseen en conjunto cuatro o más residuos de glutamato y glutamina, que son sustrato para las modificaciones: desaminación, metilación y desmetilación, dadas por CheR y CheB (Terwilliger et al, 1983; Terwilliger et al, 1984). El estado de modificación de las hélices metilables puede regular la activación de la cinasa, independientemente de la señalización dada por la porción periplásmica del receptor (Surette et al, 1996). El dominio de señalización altamente conservado característico de los MCPs permite la interacción con las proteínas CheW y CheA (Liu & Parkinson, 1989; Surette et al, 1996; Ames & Parkinson, 1994), a su vez presenta los sitios de interacción entre subunidades de receptores para la formación de homodímeros, así como el sitio de interacción entre dímeros para la formación de trímeros (Ames et al, 2002).

Algunos MCPs presentan en su extremo C-terminal, después de la segunda hélice metilable, un pentapéptido altamente conservado NWETF. Dicho pentapéptido funge como un “docking site” o sitio de unión para las proteínas del sistema de adaptación CheB y CheR (Barnakov et al, 1999). Este motivo es requerido para una eficiente metilación, desmetilación y desaminación de los residuos glutamato y glutamina en el sistema de adaptación de bacterias como *E. coli* y *S. enterica* (Li & Hazelbauer, 2005). En la sección “Anexos” se amplía la información de la función y estructura de este motivo.

Como se mencionó anteriormente, los MCPs conforman homodímeros estables, de subunidades de alrededor de 60 kDa (Milligand & Koshland, 1988), que a diferencia de los receptores de mamíferos que se oligomerizan dada la unión con su ligando, los quimiorreceptores bacterianos son diméricos aún en ausencia de éstos. A su vez, los dímeros de receptores se asocian en trímeros de composición heterogénea (Kim et al, 1999; Ames et al, 2002). Mediante la cristalización del dominio de señalización del receptor Tsr, se observó que los dímeros se asocian lateralmente a través de una región de contacto que involucra residuos en la superficie de cada subunidad del dímero. Seis residuos participan en interacciones hidrofóbicas, cuatro en interacciones polares, mientras que sólo un residuo interacciona con su contraparte en el otro dímero mediante un enlace de hidrógeno. A pesar de que estructuralmente las subunidades del dímero son idénticas, su contribución a la estabilidad del trímero varía. Mientras que una subunidad participa con 9 residuos para la interacción, la otra sólo lo hace con dos (Ames et al, 2002). Diferentes homodímeros pueden ser parte del mismo trímero (Ames et al, 2002; Studdert & Parkinson, 2004). Los trímeros forman agrupamientos mayores, que continen cientos de receptores (ver Figura 6) (Li et al, 2011). La formación de dichos agrupamientos es clave para la comunicación inter-receptor, lo que permite lograr una adecuada amplificación de señales (Parkinson et al, 2015).

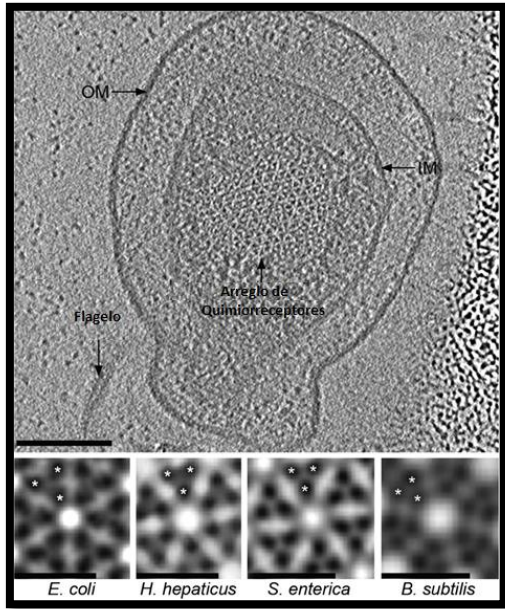


Figura 6. Arquitectura de un complejo de quimiorreceptores nativo, visto por criotomografía electrónica. Parte superior: Criotomografía electrónica de una micélula de *Salmonella enterica*. Parte inferior: Criotomografías electrónicas de los complejos de MCPs, de *Escherichia coli*, *Helicobacter hepaticus*, *Salmonella enterica*, y *Bacillus subtilis*. Los asteriscos representan los dímeros de receptores, que se encuentran organizados en trímeros. Los trímeros se encuentran organizados en arreglos hexagonales. Modificado de Briegel et al, 2012.

La actividad de la cinasa CheA bajo el control del complejo ternario MCP/CheW/CheA, se ve incrementada alrededor de 100 veces (Hazelbauer & Lai, 2010). Se ha visto que la unidad de receptores trímero de dímeros, puede activar completamente la actividad de la cinasa (Li et al, 2011). Sin embargo, la unidad funcional del complejo de señalización en *E. coli* involucra dos trímeros de dímeros, interactuando con dos proteínas CheW y un dímero de CheA (Li & Hazelbauer, 2011). Mediante tomografía crioeléctrica se ha visto que los trímeros de dímeros se encuentran asociados en entramados hexagonales, en donde las proteínas CheA y CheW, forman anillos que unen a los trímeros de dímeros en hexágonos, mediante múltiples interacciones hidrofóbicas. A su vez, el dominio P3 de dimerización de CheA, une a los hexágonos vecinos, lo que permite la formación de complejos quimiotácticos estables y extendidos (Li & Weis, 2000; Briegel et al, 2012; Liu et al, 2012; Bi & Lai, 2015) (ver Figuras 6 y 7).

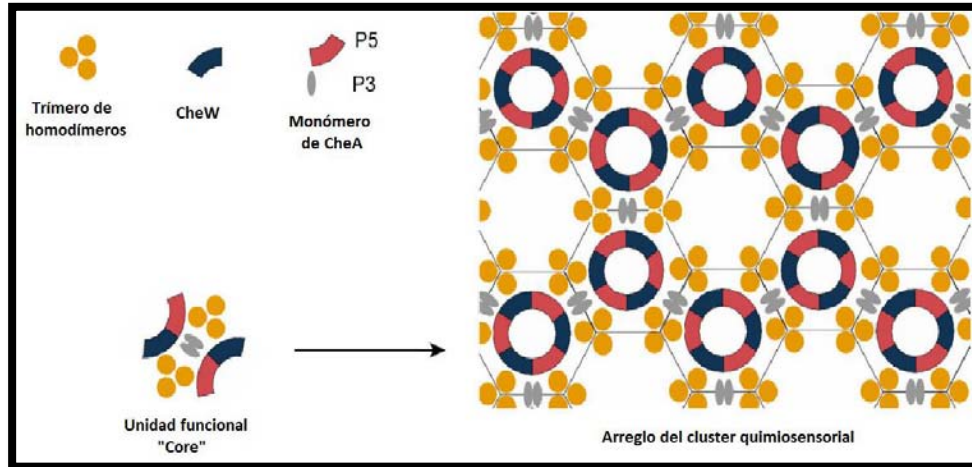


Figura 7. Arreglo del complejo quimiotáctico. Representación esquemática del arreglo de las proteínas MCPs, CheA y CheW en un segmento de un complejo quimiosensorial. Modificado de Bi & Lai, 2015.

E. coli posee cinco receptores que controlan su respuesta quimiotáctica, que son: Tar, Tsr, Tap, Trg y Aer. Cada uno de ellos reconoce de manera específica múltiples ligandos, ya sea de manera directa o indirecta (Hazelbauer, 1975); estos ligandos pueden fungir como atrayentes o repelentes (ver Tabla 1) (Bi & Lai, 2015). Los receptores Tap, Trg y Aer están presentes en la célula en una proporción de tan solo 10% de los receptores Tar y Tsr, por lo que se les denomina de baja y de alta expresión respectivamente (Feng et al, 1997). *S. enterica* carece del quimiorreceptor Tap, pero posee otros quimiorreceptores como Tcp (involucrado en sensar citrato y fenol) (Yamamoto, 1993) y los receptores McpA, McpB y McpC, sobre los cuales existe escasa información (Frye et al, 2006). En *E. coli* y *S. enterica*, sólo los MCPs de alta abundancia como Tar, Tsr y Tsp presentan el motivo NWETF, mientras que los de baja abundancia Trg y Tap, no. Mutaciones puntuales en dicho péptido, así como su delección, han mostrado disminuciones en los niveles de metilación, y una respuesta quimiotáctica inefectiva (Le Moual et al, 1997). Dicho motivo permite el reclutamiento de la maquinaria del sistema de adaptación CheR/CheB (Barnakov et al, 1999). Sin embargo la metilación de los MCPs dada por CheR, puede ocurrir en la ausencia de dicho pentapéptido en bacterias como *T. maritima* (Perez & Stock, 2007).

La alta afinidad de asociación dada por el motivo NWETF ($\pm 2 \mu\text{M Kd}$) (Wu et al, 1996) incrementa la concentración de la proteína CheR en los complejos de receptores, facilitando la metilación de los receptores cercanos, ya sean de alta o de baja abundancia (Le Moual et al, 1997; Li & Hazelbauer, 2005). Tanto en *E. coli* como en *S. enterica*, la interacción con el pentapéptido del receptor está dada por la interacción con el subdominio beta de CheR (Shiomi et al, 2002).

Tabla 1. Ligandos de los quimiorreceptores de *E. coli*. Se muestran los principales ligandos conocidos para los receptores Tar, Tsr, Tap, Trg y Aer. En rojo se muestran los ligandos que requieren de una PBP (Periplasmic Binding Protein) para asociarse a su receptor (Bi & Lai, 2015).

Receptor	Ligandos	
	Atrayente	Repelente
Tar	Aspártico, maltosa y fenol.	Co ²⁺ , Ni ²⁺ .
Tsr	Serina, ácido 3,4-dihidroximandelico.	Leucina, triptofano, valina, fenilalanina, indol y glicerol.
Tap	Dipéptidos (ej. Pro-Leu), pirimidinas (timina y uracilo).	
Trg	D-Ribosa, D-Galactosa y D-Glucosa.	
Aer	Oxígeno.	

CheA

CheA es una cinasa de histidina dimérica. Puede dividirse en 5 dominios estructurales y funcionales, denominados P1 (dominio de fosfotransferencia), P2 (dominio de asociación al regulador de respuesta), P3 (dominio de dimerización), P4 (dominio catalítico de la cinasa) y P5 (dominio regulatorio).

El dominio **P1** pertenece a la familia de proteínas HPT (histidine phosphotransfer), que funcionan como intermediarios en la transferencia del grupo fosforilo del ATP al residuo aspártico de los reguladores de respuesta (Mourey et al, 2001). La histidina fosforilable en este dominio invariablemente se encuentra en una posición expuesta, rodeada por residuos glutamato y lisina. En CheA, la fosforilación ocurre en el nitrógeno N3 de la cadena lateral del imidazol de la histidina 48 (Surette et al, 1996).

El dominio **P2** es responsable de la unión a los reguladores de respuesta, se encuentra flanqueado por dos secuencias enlazadoras flexibles (Zhou et al, 1996). Su estructura muestra cuatro láminas beta antiparalelas y de dos hélices alfa orientadas de manera opuesta (McEvoy et al, 1995; Welch et al, 1993). Cuando el dominio P2 se encuentra asociado a CheY, el sitio activo de CheY sufre un cambio conformacional, que aumenta la accesibilidad del residuo aspártico aceptor, Asp 57. En dicha asociación, aumenta la proximidad entre el dominio P1 y CheY (Stewart, 1997; Stewart et al, 2000).

El dominio de dimerización **P3** posiciona al dominio P1 para su fosforilación por parte del dominio P4. La dimerización de la proteína dada por dicho dominio es requerida para su actividad catalítica (Levit et al, 1996).

El dominio **P4** presenta la actividad catalítica de cinasa, en presencia de ATP y Mg²⁺. El acoplamiento del ATP es seguido por un cambio conformacional que permite la asociación del dominio P1 del otro

monómero. El acoplamiento de este último desencadena la transferencia de un grupo fosforilo al residuo His48, uniéndolo covalentemente, lo que lleva a la disociación del dominio P1 y a la liberación de ADP. Posteriormente, el grupo fosforilo es transferido a uno de sus reguladores de respuesta (Bilwes et al, 2001).

El dominio **P5** está involucrado en la regulación de la actividad de CheA, mediada por su interacción con CheW (Bourret et al, 1993). El control de la actividad de la cinasa dada por su unión con CheW tiene que ver con el acercamiento de los dominios P1 y P4 entre monómeros (Bilwes et al, 1999).

CheW

CheW es una proteína monomérica soluble, que permite la interacción entre el quimiorreceptor y la cinasa CheA. CheW se asocia al altamente conservado dominio de señalización del MCP (Surette, 1996), así como con el extremo C-terminal de CheA, específicamente al dominio P5 (Boukhvalova et al, 2002). No se conoce una actividad catalítica para esta proteína, se piensa que es una proteína adaptadora o de andamiaje, que por algún mecanismo transduce las señales que son generadas por el receptor a CheA (Wadhams & Armitage, 2004). En la ausencia de CheW, ni los receptores, ni CheA se localizan en los polos celulares, en otras palabras CheW es requerida para la formación de los complejos ternarios MCP/CheW/CheA (Maddock & Shapiro, 1993).

CheY

El regulador de respuesta CheY, es una proteína monomérica soluble (Stock et al, 1989). Se localiza en el complejo MCP/CheW/CheA mediante su interacción con el dominio P2 de CheA (Sourjik & Berg, 2000). La fosforilación ocurre en el residuo conservado Asp57 (Sanders, 1989), lo que provoca su activación (Cho et al, 2000); dicho residuo se encuentra en un dominio altamente conservado dentro de los reguladores de respuesta, denominado dominio receptor REC, que participa en la transferencia del grupo fosforilo (Stock et al, 1989). Sin embargo el sitio activo involucra además a los residuos Asp12, Asp13, que con Asp57 unen al catión divalente Mg^{2+} , necesario para la fosforilación/defosforilación; además Thr89 y Lys109, coordinan junto con el ion Mg^{2+} , los oxígenos del grupo fosforilo (Lukat et al, 1990; Lukat et al, 1991). CheY fosforilada presenta una disminución significativa de afinidad por CheA, en comparación con su forma no fosforilada, por lo que difunde de dicho complejo para después interactuar con FliM en el motor flagelar (Lee et al, 2001). La interacción entre CheY-P y FliM genera la transición entre la rotación del motor flagelar de dirección CCW a CW (Welch et al, 1993).

CheZ

La terminación de la señal (presencia o ausencia de un atrayente) es esencial para un sensado temporal en la quimiotaxis (Wadhams & Armitage, 2004). En *E. coli*, la proteína citoplásmica homodimérica CheZ (Blat & Eisenbach, 1996), cataliza la defosforilación de CheY-P (Hess et al, 1988), disminuyendo su vida media de ± 20 segundos a ± 200 milisegundos. La unión de CheZ a CheY, depende de su estado fosforilado. Se ha visto que dímeros de CheZ pueden oligomerizar al

interactuar con CheY-P. El dominio de unión a CheY-P se encuentra en su extremo C-terminal (Blat & Eisenbach, 1996). A pesar de que se sugiere que el papel de CheZ es el de ser un activador alostérico de la actividad intrínseca de autodefosforilación de CheY, la estructura cristalográfica de CheZ con CheY-BFe₃⁻-Mg²⁺ (BFe₃⁻-Mg²⁺ simula el estado fosforilado de CheY), sugiere que es una fosfatasa verdadera, dada la presencia de residuos de CheZ en el sitio activo de CheY, sugiriendo que estos podrían participar directamente en la catálisis de la defosforilación de CheY, como lo es la cadena lateral de Gln147 de CheZ, que se inserta en el sitio activo de CheY (Zhao et al, 2002).

CheR

La proteína CheR es la metiltransferasa de los MCPs, que como su nombre lo indica lleva a cabo la metilación de 4 a 5 residuos de glutamato específicos en sus proteínas blanco, utilizando como donador de grupos metilo a la S-adenosilmetionina (SAM) (Springer & Koshl&, 1977; Stock & Koshl&, 1978). CheR es una proteína monomérica citoplásmica, que presenta un dominio N-terminal con residuos cargados positivamente que se propone son indispensables para el reconocimiento de residuos con carga negativa en los MCPs. El dominio C-terminal es el dominio catalítico y es responsable de la interacción directa entre ambas proteínas (Djordjevic & Stock, 1988).

CheR presenta una alta afinidad por el pentapéptido NWETF ubicado en el extremo C-terminal de algunos MCPs. Al ser reclutada por este motivo aumenta su concentración en los complejos de señalización, facilitando la metilación de MCPs aledaños. Dicha interacción ocurre por medio del subdominio beta de CheR (para mayor información del subdominio beta de CheR, ver “Posible función del pentapéptido GWEDF de McpA”, en la sección de Anexos). Existen dos clases de CheRs: aquellas que utilizan un mecanismo dependiente del pentapéptido para la metilación de los receptores y aquellas que no. Ambos tipos de CheR presentan diversos residuos altamente conservados en el subdominio beta, mientras que aquellos dependientes del pentapéptido presentan un conjunto específico de residuos conservados (ver Figura 32, en la sección de Anexos) (Le Moual et al, 1997; Barnakov et al, 1999; Wu et al, 1996; Li & Hazelbauer; Perez & Stock, 2007).

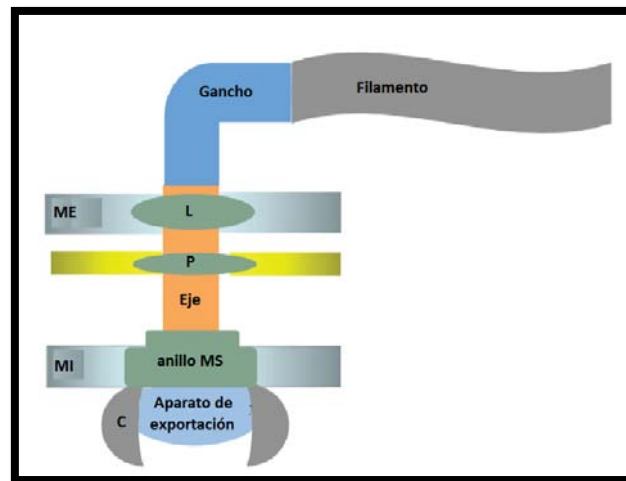
CheB

La proteína CheB es una proteína de función dual. Por un lado funciona como metilesterasa de residuos de glutámico específicos en los MCPs, desmetilando los residuos previamente metilados por CheR (Kehry & Dahlquist, 1982). Por otro, desamina residuos glutamina específicos que se convierten en glutamatos blancos de metilación. Al ser fosforilada por CheA, su actividad esterasa aumenta hasta 100 veces. Es una proteína dimérica compuesta por dos dominios: un dominio N-terminal de función regulatoria y un C-terminal catalítico (Djordjevic et al, 1998). El dominio regulatorio es homólogo al dominio REC de CheY, por lo que la fosforilación del Asp56 de éste, expone el sitio activo del dominio catalítico incrementando 100 veces su actividad de metilesterasa (Anand & Stock, 2002). El proceso de desmetilación de los MCPs consiste en la hidrólisis del enlace metil éster de los residuos glutamato previamente metilados por CheR, liberando metanol como subproducto (Kehry et al, 1985). El motivo NWETF en el extremo C-terminal de algunos MCPs (Le Moual et al, 1997) permite el reclutamiento de CheB (Barnakov et al, 1999) al complejo de receptores.

Flagelo bacteriano

El flagelo bacteriano es una estructura proteica compleja, embebida en las envolturas celulares e impulsada por un motor rotatorio, mediante la energía electroquímica, ya sea un gradiente de protones o de sodio (Falke et al, 1997). La estructura flagelar básica se encuentra conservada entre las diferentes especies bacterianas. En todos los casos se compone de tres partes estructurales: cuerpo basal, gancho y filamento. Los componentes del cuerpo basal están localizados o asociados a la envoltura celular. El cuerpo basal está conformado de un anillo C, un aparato de exportación, que en realidad es un sistema de secreción tipo III, un motor, un eje y un sistema de anillos denominados anillos MS, P y L. El anillo MS en ambos tipos bacterianos se localiza en la membrana interna, mientras que el anillo P en la pared de peptidoglicano. De manera exclusiva, las bacterias Gram negativas poseen un anillo L anclado a la membrana externa. La función de dichos anillos es anclar a la membrana y proveer soporte al eje flagelar. El anillo C está conformado por un complejo de tres proteínas (FliG, FliM y FliN) arregladas alrededor del poro que alberga al aparato de exportación flagelar, y se extiende hacia el citoplasma. Permite el cambio en la dirección rotacional del flagelo, así como en direccionar substratos proteicos al aparato de exportación flagelar. El aparato de exportación flagelar transporta los componentes axiales del flagelo, como son las proteínas del eje, gancho y filamento a través de la membrana celular, donde son incorporados a la región más distal del flagelo naciente. El gancho flagelar es una estructura cilíndrica que permite enlazar al cuerpo basal y al filamento. El filamento es una larga estructura cilíndrica helicoidal, compuesta de flagelina, cuya rotación permite propulsar a la célula (ver Figura 8) (Minamino et al, 2008; Macnab, 1996; Minamino et al, 2008b; Tsang et al, 2014).

Figura 8. Representación del flagelo de bacterias Gram negativas. Se representan las tres partes estructurales que lo conforman: cuerpo basal (anillos C, MS, P y L, aparato de exportación y eje), gancho y filamento. ME: membrana externa, MI: membrana interna. Modificado de Tsang et al, 2014.



Generación de la fuerza rotacional

El motor bacteriano es una estructura proteica capaz de transformar energía química en energía mecánica. Se divide en dos estructuras: el rotor y el estator. El rotor, en cuya base se encuentra el

anillo C, está formado por las proteínas FliM, FliN y FliG. Un tetrámetro de FliN forma un complejo con el extremo C-terminal de un monómero de FliM. El extremo N-terminal de FliM une a la proteína CheY-P. El tercer componente del anillo C, es la proteína FliG, que está dividida en tres dominios: el dominio N-terminal interacciona con la proteína FliF del anillo MS, su dominio medio interacciona con FliM, mientras que el C-terminal interacciona con el estator mediante un conjunto de residuos cargados (Paul & Blair, 2006; Osawa et al, 1994; Zhou et al, 1998).

El estator es un complejo proteico que rodea al anillo MS en la membrana citoplásmica, formado por las proteínas MotA/MotB para los motores flagelares que obtienen la energía de la fuerza protón motriz, o de las proteínas PomA/PomB para los motores de sodio (Asai et al, 1997). MotA presenta 4 cruces transmembranales, formándose entre los cruces 2 y 3 una asa citoplásmica de residuos cargados que interacciona con el C-terminal de FliG (Zhou & Blair, 1997). En cambio MotB solo presenta un cruce transmembranal, en su extremo N-terminal presenta el residuo Asp32 que se predice es el sitio de unión del ión (Zhou et al, 1998b), mientras que el extremo C-terminal permite su anclaje a la pared de peptidoglicano. MotA y MotB forman hexámeros (MotA₄MotB₂), en los cuales el dímero MotB se encuentra en el centro. Se sugiere que la unión del protón al Asp32 de MotB genera un cambio conformacional en MotA que permite la interacción entre los residuos con carga positiva y negativa del asa citoplásmica de MotA y de FliG. La repulsión de cargas entre dichos residuos permite la rotación del rotor y por lo tanto de sus estructuras asociadas: eje, gancho y filamento (Lloyd & Blair, 1997; Zhou & Blair, 1997).

CheY-P interactúa específicamente con la proteína FliM del anillo C, cambiando la rotación del flagelo de un sentido contrario a las manecillas del reloj, al sentido de las manecillas del reloj, lo que provoca la reorientación de la célula (Welch et al, 1993).

Regulación de la expresión génica de genes flagelares y quimiotácticos

La formación del flagelo bacteriano así como de los complejos sensoriales representa para las bacterias un alto costo energético y de recursos, por lo que su síntesis está sujeta a numerosos niveles de regulación. Los genes codificantes para las proteínas flagelares y quimiotácticas son expresados en una compleja casacada transcripcional, lo que asegura que las proteínas estructurales de alta expresión como la flagelina sean sintetizadas solo después de que otras proteínas como las del cuerpo basal y el gancho han sido expresadas y correctamente ensambladas (Helmann, 1991). En el mecanismo de regulación de dicha jerarquía, un regulador maestro inicia la casaca de transcripción de los genes flagelares. Como ejemplo de dichos reguladores tenemos a FleQ (ej. *Pseudomonas spp.*), CtrA (ej. *Caulobacter crescentus*), y FlrA (ej. *Vibrio spp.*). El regulador maestro estimula la transcripción de los genes flagelares tempranos, que normalmente codifican a componentes del cuerpo basal, así como proteínas regulatorias como RpoN, FliA (sigma 28) y FlgM (factor anti sigma 28) (Tsang, 2014).

La transcripción de la mayoría de los genes bacterianos es dependiente de la actividad del núcleo catalítico de la RNA polimerasa, asociado a la subunidad sigma-70 (σ -70), que le brinda especificidad para el reconocimiento de los promotores. El factor σ -70 se conoce también como el factor sigma de mantenimiento (“Hosekeeping”), ya que la mayoría de los genes esenciales son dependientes del mismo. Sin embargo existen factores sigma alternativos que facilitan el reconocimiento de otros

promotores y la transcripción de regulones específicos (Martin et al, 2006). En algunas especies bacterianas, holoenzimas conformadas por factores sigma alternativos como sigma 28 y 54, en conjunto con el núcleo catalítico de la RNA polimerasa son requeridos para la transcripción de los genes quimiotácticos y flagelares (Helmann, 1991).

En la jerarquía transcripcional del flagelo 1 de *R. sphaeroides*, el regulador maestro FleQ funciona como un activador transcripcional del factor sigma alternativo σ -54 (RpoN2), promoviendo la transcripción de genes que codifican para los componentes del aparato de exportación, así como del activador transcripcional FleT. El complejo FleQ/FleT + RpoN2 transcriben los genes cuyos productos codifican para el resto de proteínas del aparato de exportación, del cuerpo basal, MotA, MotB, así como para el factor sigma alternativo σ -28 (FliA), con su correspondiente factor antisigma FlgM. Una vez formada la estructura del gancho y del cuerpo basal, el factor anti-sigma FlgM, es secretado al medio extracelular, a través de esta estructura. Ahora, el factor FliA puede asociarse al núcleo catalítico de la RNA polimerasa, para iniciar la transcripción de los genes flagelares de clase IV, entre los cuales destaca la flagelina (FliC) (ver Figura 9) (Poggio et al, 2005).

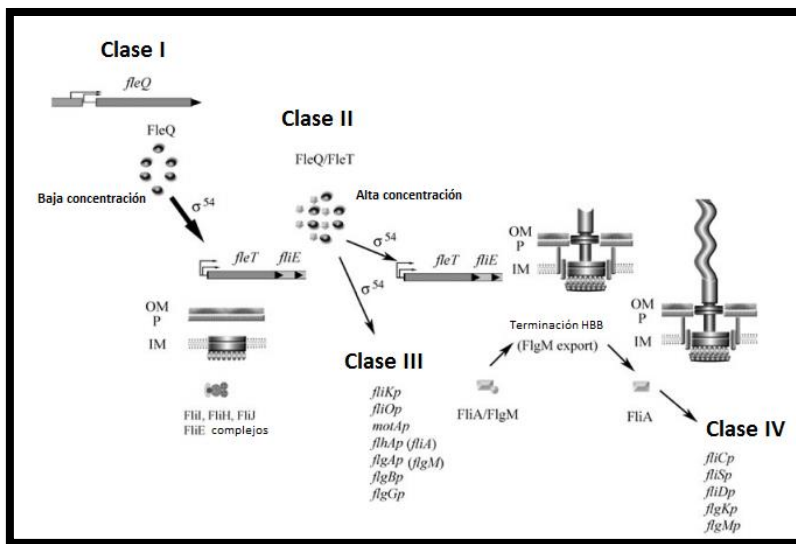


Figura 9. Representación esquemática de la regulación de la biogénesis flagelar del flagelo 1 de *R. sphaeroides*. IM: membrana interna, OM: membrana externa, P: pared de peptidoglicano. Modificado de Poggio et al. 2005.

En bacterias como *E. coli* y *S. typhimurium*, la regulación transcripcional de los genes quimiotácticos está acoplada a la de los genes flagelares. En *E. coli*, la transcripción de los genes de la clase III como la flagelina y los genes quimiotácticos, incluyendo Tar, Tsr y Trg, es dependiente del factor σ -28 (FliA). Dicha regulación es muy similar en *S. typhimurium* (Gillen & Huges, 1991; Macnab & Parkinson, 1991). De igual manera el factor sigma D, de *B. subtilis*, homólogo de FliA de *E. coli*, es requerido para la síntesis de la flagelina en este organismo y probablemente para la expresión de MCPs en esta bacteria (Márquez et al, 1990). Consistente con lo propuesto para la regulación de la expresión de MCPs en *B. subtilis*, los genes de *E. coli* que codifican para los MCPs, han sido correctamente transcritos por la RNA polimerasa asociada al factor sigma D de *B. subtilis* (Arnosti & Chamberlin, 1989).

En *P. aeruginosa*, los genes tardíos que codifican para las proteínas FliC (flagelina), FliL, FlgM, FlgN y algunas proteínas quimiotácticas, son dependientes de FliA. Debemos contemplar que en la jerarquía transcripcional de esta bacteria, la transcripción de FliA es constitutiva, pero regulada por su factor antisigma FlgM (dependiente de FleQ) (Frisk et al, 2002).

Caulobacter crescentus, es una α -proteobacteria, organismo modelo para estudios de ciclo celular. Se divide asimétricamente para producir dos células con distinta morfología: una célula flagelada nadadora y una célula sésil prostecada. La célula prostecada inicia la replicación del DNA, mientras que en la nadadora, que posee un flagelo polar, la replicación es reprimida hasta que se diferencia en una célula prostecada. La iniciación de la replicación de DNA en la célula prostecada es debida a la expresión y activación del regulador maestro o factor de transcripción global CtrA. CtrA activa la transcripción de los genes flagelares tempranos, que codifican al anillo MS, anillo C, aparato de exportación y los reguladores transcripcionales FlbD y FliX (Malakooti & Ely, 1995). La biogénesis flagelar no involucra a FliA (σ -28), ya que los seis genes de flagelina en esta bacteria son dependientes de RpoN (σ -54). La expresión de la flagelina está sujeta además a una regulación post-transcripcional dada por las proteínas FlaF y FlbT, las cuales se asocian a la región 5' UTR de los mensajeros de flagelina, reprimiendo la traducción hasta que las estructuras del cuerpo basal y gancho están ensambladas (Muir et al, 2005).

A pesar de que la transcripción de los genes flagelares tardíos de *C. crescentus* es dependiente del factor sigma alternativo σ -54, la regulación de la expresión de su mayor operón quimiotáctico no lo es. Mediante ensayos de actividad de promotor, se mostró que CtrA regula positivamente la expresión de los genes quimiotácticos *McpA* y *CagA* contenidos en el operón quimiotáctico de esta bacteria (Jones et al, 2001). Estudios posteriores mostraron que proteínas quimiotácticas como CheY, CheYII, CheYIII, CheA, CheW, CheB, CheD contenidos en el mismo operón que *McpA* y *CagA*, son directamente reguladas por CtrA (Laub et al, 2002). Sin embargo, dentro de las α -proteobacterias también se ha reportado que la expresión de los genes quimiotácticos, podría ser directamente dependiente del factor σ -70 y σ -54. Por ejemplo, se sugiere que σ -54 regula la transcripción de genes quimiotácticos en *Rhodospirillum centenum* (Jiang & Bauer, 1997).

Análisis del transcriptoma y proteoma de *Rhodobacter capsulatus* han mostrado que dentro de los genes desregulados por la pérdida de CtrA se encuentran diversos genes que codifican a proteínas quimiotácticas como: CheA, CheW, CheY, CheR, CheB, CheD, CheX, *McpA*, *McpC*, *McpH*, por mencionar algunos. Cabe destacar que solo el gen *cheR1* del genoma de *R. capsulatus* pareció no haberse visto afectado por la pérdida de CtrA (Mercer et al, 2010).

CtrA es uno de los factores transcripcionales más importantes para algunas α -proteobacterias (Laub et al, 2002). Además de ser un importante regulador de la progresión del ciclo celular en algunas de ellas, puede bloquear la iniciación de la replicación del DNA a través de la unión al origen de replicación, así como regular la transcripción de una amplia gama de genes, dentro estos, están aquellos involucrados en la división celular, en la metilación del DNA, en la biogénesis flagelar y del pili, así como en la quimiotaxis (Brilli et al, 2010).

El factor transcripcional CtrA es miembro del sistema de dos componentes CckA/ChpT/CtrA. CckA es una cinasa de histidina híbrida, que cuando está activa se autofosforila en un residuo de histidina, para después transferir el grupo fosforilo a un residuo aspártico ubicado en el extremo C-terminal de la proteína. Subsecuentemente CckA fosforila a la fosfotransferasa ChpT, ChpT-P puede fosforilar al regulador de respuesta CtrA en su residuo Asp. La forma fosforilada de CtrA es capaz de asociarse a secuencias específicas de DNA, gracias a su dominio hélice-giro-hélice, regulando la expresión de sus genes blanco (Laub & Goulian, 2007). Los sitios de unión de CtrA han sido caracterizados en la

bacteria *C. crescentus*, identificándose dos secuencias consenso: TTAA-N7-TTAAC (sitio completo) y TTAACCAT (medio sitio) (Quon et al, 1996; Laub et al, 2002).

Rhodobacter sphaeroides

Rhodobacter sphaeroides es una bacteria púrpura no sulfurosa perteneciente al grupo de las α -proteobacterias. Presenta un amplio repertorio metabólico, ya que puede crecer mediante respiración aeróbica o anaeróbica, fotosíntesis y fermentación. Puede realizar fotosíntesis, ya sea fotoheterotroficamente utilizando compuestos orgánicos como fuente de carbono y poder reductor, o fotoautotroficamente utilizando dióxido de carbono como fuente de carbono e hidrógeno como poder reductor. A su vez puede ser quimioheterótrofa o quimioautótrofa. Puede además fijar N_2 cuando escasean otras fuentes de nitrógeno. La secuenciación del genoma de la cepa 2.4.1 de *R. sphaeroides* mostró que este está conformado por dos cromosomas circulares CI y CII, de 2.9 y 0.9 Mbp respectivamente, así como de cinco plásmidos (A, B, C, D y E) (Mackenzie et al, 2001). La cepa WS8N es un derivado resistente al ácido nalidíxico de la cepa WS8, que exhibe una incrementada motilidad y quimiotaxis en comparación a la cepa 2.4.1., por lo que es utilizada en estudios de quimiotaxis y motilidad. El genoma de la cepa WS8N es de 4.42 Mbp, tiene un contenido de GC de 69.1% y consta de dos cromosomas circulares de 3.14 y 0.97 Mbp, así como de dos plásmidos de 200 y 100 Kbp. Cuenta con 4,205 marcos de lectura abierta. De los cuales, 33 codifican para proteínas de señalización quimiotáctica. Cabe destacar que al igual que la cepa 2.4.1 presenta dos conjuntos de genes flagelares (*fla1* y *fla2*). A su vez, el genoma de la cepa WS8N, presenta 1 gen para el factor σ -28 (*fliA*), así como 4 homólogos del factor σ -54 (*RpoN*) (Porter et al, 2011b).

R. sphaeroides presenta respuestas tácticas hacia diversos estímulos, como son los ácidos orgánicos como propionato, succinato y acetato, azúcares, luz y oxígeno. Es de desatacar que la respuesta quimiotáctica hacia algunos atrayentes como azúcares requiere su previo transporte y metabolismo (Porter et al, 2008; Jeziore-Sassoon et al, 1998). En esta bacteria el O_2 puede ser sensado como un atrayente o como un repelente, dependiendo de las condiciones de crecimiento, por ejemplo, para una célula crecida en condiciones fotoheterotróficas el O_2 es un repelente, mientras que es un atrayente para aquellas con crecimiento aeróbico (Romagnoli et al, 2002).

Organización genética de los genes quimiotácticos de *R. sphaeroides*

La mayoría de los genes quimiotácticos de *R. sphaeroides* se encuentran distribuidos en tres operones: *cheOp1*, *cheOp2* y *cheOp3* (cromosoma I), teniendo además los loci *cheY4*, *mcpG* (cromosoma II) y *cheBRA*. En cada operón encontramos homólogos reiterados de los genes quimiotácticos de *E. coli* (Porter et al, 2008). Como se mencionó anteriormente, el genoma de *R. sphaeroides* presenta 33 genes que codifican para diferentes proteínas quimiotácticas: 13 quimiorreceptores (9 transmembranales y 4 citoplásmicos), 4 proteínas CheA, 6 proteínas CheY, 4 proteínas CheW, 3 proteínas CheR, 2 proteínas CheB y una proteína CheD (Porter et al, 2011b). Todos estos genes se localizan en el cromosoma grande (cromosoma I), con excepción de seis genes para quimiorreceptores y el gen *cheY4* que se localizan en el cromosoma pequeño (ver Figura 10). CheBRA es una proteína que contiene fusionados un dominio de metilesterasa de CheB, el dominio de metiltransferasa de CheR, un dominio PAS y un dominio de cinasa de histidina. Dentro de las proteínas quimiotácticas de *R. sphaeroides* no existen homólogos de fosfatasa para CheY-P (Porter

et al, 2008). Sin embargo, se ha demostrado que la cinasa CheA3 de *R. sphaeroides*, no es sólo un fosfodonor, sino que también es una fosfatasa específica para el regulador de respuesta CheY6-P (Porter et al, 2008b).

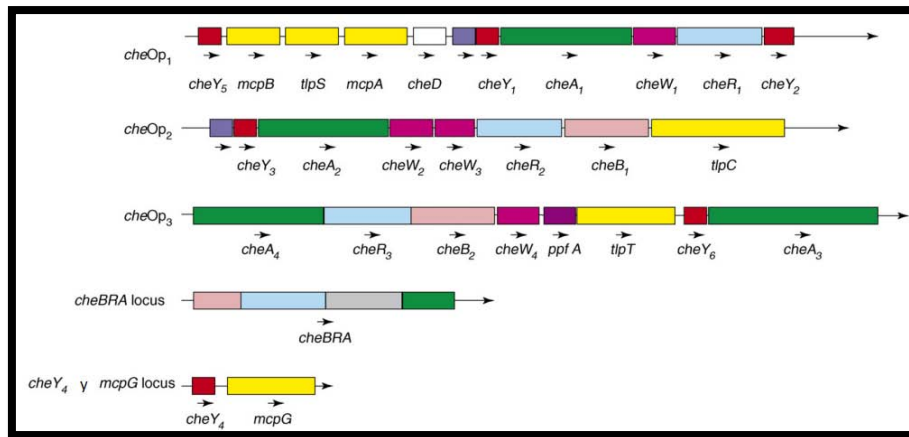


Figura 10. Organización de los genes quimiotácticos de *R. sphaeroides*. Los operones *cheOp1*, *cheOp2* y *cheOp3* así como el locus *cheBRA* se localizan en el cromosoma I, mientras que el locus formado por *cheY4* y *mcpG* se encuentra en el cromosoma II. Los siete MCPs restantes se encuentran en loci independientes (uno en el cromosoma I y seis en el cromosoma II). Modificado de Porter et al, 2008.

Como se mencionó, de los 13 quimiorreceptores que presenta *R. sphaeroides*, sólo 9 son transmembranales, mientras que cuatro son citoplásmicos: TlpS, TlpC, TlpT y TlpL (Mackenzie et al, 2001). Dichos receptores citoplásmicos podrían permitirle sentir quimioefectores producto del metabolismo celular, facilitándole el migrar hacia ambientes favorables para lograr altas tasas metabólicas (Porter et al, 2008; Jeziore-Sassoon et al, 1998; Storch et al, 1999).

Ha sido sugerido que la expresión del operón quimiotáctico *cheOp2* es dependiente de los factores σ -70 y σ -28, mientras que la expresión de *cheOp3* es dependiente de RpoN3 (Martin et al, 2006).

***R. sphaeroides* presenta dos sistemas flagelares funcionales**

R. sphaeroides presenta dos conjuntos de genes flagelares, denominados: *fla1* y *fla2*, cada uno de ellos codifica para un flagelo funcional (ver Figura 11). Bajo condiciones estándar de laboratorio, la cepa WS8N de *R. sphaeroides* ensambla únicamente un flagelo subpolar, el flagelo Fla1, formado por las proteínas codificadas por los genes contenidos en el grupo *fla1*, y no expresan el conjunto de genes *fla2*. No obstante, mutantes espontáneas móviles han sido obtenidas a partir de una cepa Fla1⁻, estas cepas son capaces de ensamblar un flagelo polar lofótrico, debido a la expresión de los genes *fla2* (Poggio et al, 2007).

El flagelo 1 posee un filamento con diámetro de 20 nm que le permite a la célula alcanzar una velocidad promedio de 27 μ m/s (Armitage et al, 1999). Mientras que las células que expresan el sistema flagelar 2 presentan de 2 a 4 flagelos en un solo polo, con un diámetro del filamento de 10 nm (Poggio et al, 2007), llevando a las células a una velocidad promedio de 60 μ m/s (Martínez de

Campo et al, 2011). La rotación de ambos flagelos depende de un gradiente de protones. A su vez, presentan rotación unidireccional.

A diferencia de *E. coli*, cuyas reorientaciones dependen de un cambio en la rotación del flagelo de CCW a CW. La reorientación en *R. sphaeroides* para ambos flagelos depende de un paro en la rotación del flagelo seguido del redireccionamiento provocado por movimiento Browniano (Martínez del Campo et al, 2011; Armitage & Macnab, 1987).

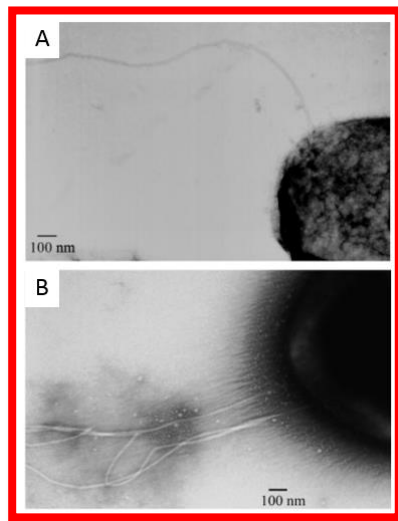


Figura 11. Micrografías electrónicas de los Flagelos Fla1 y Fla2 de *Rhodobacter sphaeroides*. **A.** Flagelo subpolar Fla1 de la cepa WS8N. **B.** Flagelo lofótrico Fla2 de la cepa SP18 Fla2+. Tomado de Poggio et al, 2007.

Análisis filogenéticos indican que el conjunto de genes *fla2* corresponde a los genes flagelares nativos de *R. sphaeroides*, mientras que los genes *fla1* fueron adquiridos como resultado de un proceso de transferencia horizontal de una γ -proteobacteria. La conservación del grupo flagelar nativo debe ser resultado de un proceso de presión selectiva positiva (Poggio et al, 2007), lo que implica que bajo alguna condición ambiental, *R. sphaeroides* debe expresar el sistema flagelar Fla2.

Control quimiotáctico del Fla1 de *R. sphaeroides*

El control quimiotáctico de ambos flagelos está dado por proteínas quimiotácticas diferentes. El flagelo 1 es controlado por las proteínas codificadas por los genes del *cheOp2* y *cheOp3*, mientras que el flagelo 2 es controlado por las proteínas codificadas en el *cheOp1* (Shah et al, 2000; Porter et al, 2002; Martínez del Campo et al, 2011).

Las proteínas del sistema quimiotáctico que regulan el flagelo 1 de *R. sphaeroides* se agrupan en complejos multiproteicos, los cuales se localizan en la membrana y en el citoplasma (Porter et al, 2011). Se ha visto que una adecuada respuesta quimiotáctica requiere la presencia de ambos complejos (ver Figura 12) (Porter et al, 2002).

Complejo Polar. Está conformado por el quimiorreceptor McpG (hasta ahora es el único MCP reportado, sin embargo por lo visto en otras bacterias, múltiples MCPs deben conformarlo), así como de las proteínas codificadas por el *cheOp2*: CheA2, CheW2, CheW3 y CheR2. Tanto CheA2, CheW2 y CheW3 son esenciales para la formación de este complejo (Wadhams et al, 2003; Wadhams et al, 2005; Martin et al, 2001). Normalmente se encuentran dos agrupamientos sensoriales polares, uno en cada polo de la célula (Wadhams et al, 2002). A pesar de que no se conocen todos los MCPs

involucrados en este complejo, estos deben sentir quimioefectores periplásmicos. Dichos receptores controlan la actividad de la cinasa CheA2 que in vitro ha mostrado ser capaz de fosforilar a todos los reguladores de respuesta de esta bacteria (Porter & Armitage, 2002).

Complejo citoplásmico. Está conformado por los receptores citoplásmicos TlpC y TlpT (Transducer-like proteins), que a diferencia de los MCPs del cluster polar, no presentan cruces transmembranales, por lo que son proteínas solubles; y por las proteínas codificadas por el *cheOp3*: CheA3, CheA4, CheW4 y CheR3 (Wadhams et al, 2003). CheA3, CheA4, CheW4, así como los receptores citoplásmicos son necesarios para la formación del complejo (Wadhams et al, 2005). Mediante la proteína PpfA codificada por este operón, se da la partición del complejo citoplásmico durante la división celular, con esto, después de la citocinesis cada célula hija posee un complejo quimiotáctico citoplásmico (Thomson et al, 2006).

Aunque los ligandos de este sistema pudieran ser productos del metabolismo celular o derivados del transporte y metabolismo de atrayentes como alanina, amonio, glutamato y azúcares (Jeziore-Sassoon et al, 1998; Poole & Armitage, 1989; Poole et al, 1993; Jacobs et al, 1995), estos no han sido descritos. Se sabe que dichos receptores citoplásmicos controlan la actividad de CheA3 y CheA4. Ambas son homólogos trancos de la proteína CheA de *E. coli*. CheA4 presenta los dominios P3, P4 y P5, mientras que CheA3 solo presenta los dominios P1 y P5, espaciados por una región de 794 a.a. (Porter et al, 2008b). CheA4 tiene la capacidad de fosforilar a CheA3 en el residuo His51 del dominio P1. Esta a su vez puede ceder su grupo fosforilo a CheY1, CheY6 y CheB2 (Porter et al, 2004). La región espaciadora entre los dominios P1 y P5 de CheA3 le permiten tener actividad de fosfatasa sobre CheY6, permitiendo que la defosforilación de esta proteína suceda en la mitad del tiempo (Porter et al, 2008b).

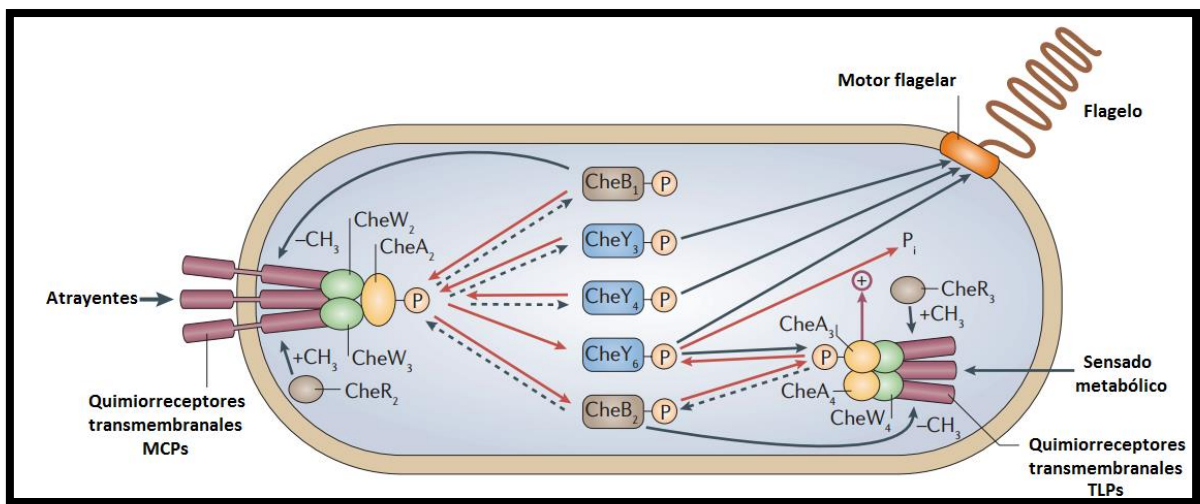


Figura 12. Sistema quimiotáctico del flagelo 1 de *Rhodobacter sphaeroides*. Modificado de Porter et al, 2011.

Control quimiotáctico del Fla2 de *R. sphaeroides*

La primera evidencia experimental que se tuvo sobre las proteínas involucradas en el control quimiotáctico del flagelo 2, fue la de Martínez del Campo et al, 2007. Donde se mostró que los

reguladores de respuesta CheY1, CheY2 y CheY5 contenidos en el *cheOp1* eran las únicas CheYs responsables del control del comportamiento quimiotáctico de la cepa AM1. La cepa AM1 es una cepa capaz de nadar con el flagelo 2 y no con el flagelo 1 (Fla2⁺Fla1⁻), proviene de la cepa SP13 que tiene interrumpido el gen que codifica para el regulador maestro flagelar, FleQ (Martínez-del Campo et al, 2007).

Dado que los reguladores de respuesta CheY1, CheY2 y CheY5 están contenidos en el *cheOp1*, se planteó la posibilidad de que el conjunto de proteínas codificadas por este operón (CheY5, McpB, TlpS, McpA, CheD, CheY1, CheA1, CheW1, CheR1 y CheY2) regulara la respuesta quimiotáctica del sistema flagelar 2. Análisis fenotípicos de cepas mutantes no polares para cada uno de los genes del *cheOp1*, en cajas de nado así como la determinación de las tasas de reorientación de trayectorias de nado de células de cada cepa, llevaron a inferir que *cheA1*, *cheW1*, *cheY2*, *cheY5*, *cheD*, *cheR1*, y *mcpA* están claramente vinculados al control quimiotáctico del flagelo 2. Sin embargo para los genes *mcpB*, *tlpS*, *cheB*, y *cheY1* no fueron obtenidos datos concluyentes (ver Figura 13). Las mismas mutantes fueron obtenidas y analizadas en el contexto del flagelo 1 (WS8N), no teniendo efectos significativos (Martínez del campo et al, 2011), lo que permite decir que las proteínas codificadas por el *cheOp1* sólo controlan al flagelo 2.

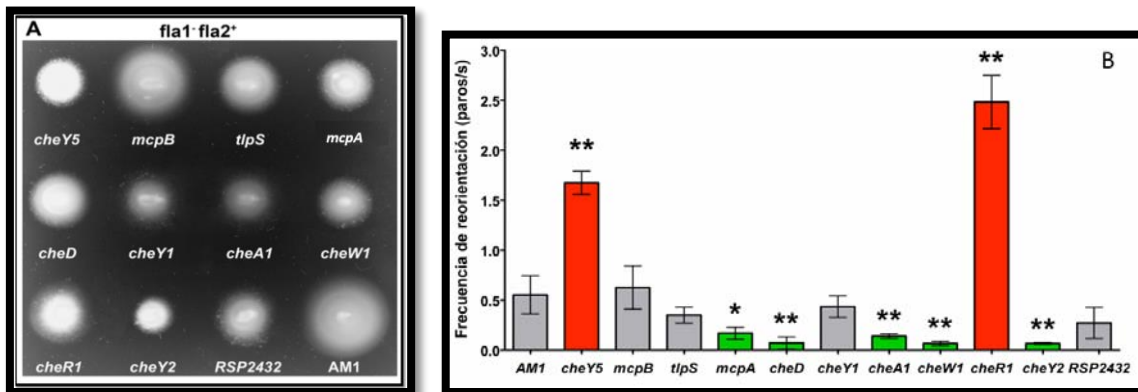


Figura 13. Fenotipos de cepas mutantes no polares para cada uno de los genes del *cheOp1*, derivadas de la cepa AM1. **A.** Halos de nado en cajas de agar suave. **B.** Frecuencias de reorientación (paros/s). Modificado de Martínez del Campo et al, 2011.

El análisis de las trayectorias de nado consistió en la determinación de la frecuencia de reorientación de cada cepa. Para ello se cuantificó el número de eventos de paro durante 2 segundos, de 100 células para cada cepa. Un evento de paro en ese trabajo fue aquel en el que la velocidad de la trayectoria de nado de la célula cayera por debajo de 10 $\mu\text{m}/\text{seg}$. Para llevar a cabo este análisis fue utilizado el programa CellTrack 1.5. En base a esto, se determinó que las cepas mutantes para los genes *mcpA*, *cheD*, *cheA1*, *cheW1* y *cheY2* presentaban una disminución significativa en la frecuencia de reorientación, lo que puede interpretarse como un nado "smooth". De manera opuesta, las mutantes para los genes *cheY5* y *cheR1* mostraron una incrementada frecuencia de reorientación, por lo tanto presentan un comportamiento "tumbly". Sin embargo para las cepas mutantes de *mcpB*, *tlpS*, *cheY1* y *RSP2432* no se observaron cambios significativos. Por lo que se sugiere que para la condición de crecimiento anaeróbico fotoheterótrofo en medio SIS adicionado con 100 μM de ácido succínico a 30°C, solo las proteínas codificadas por los genes cuyas cepas mutantes mostraron una

diferencia significativa en la frecuencia de reorientación con respecto a la cepa silvestre, participan en el control quimiotáctico del flagelo 2.

En base a estos resultados, Martínez-del Campo propuso un modelo en el cual CheA1 sería la cinasa de histidina del sistema, asociada a los MCPs mediante la proteína adaptadora CheW1. El quimiorreceptor McpA, fue el único en mostrar una clara participación en el control de esta vía, no siendo así para McpB o para el quimiorreceptor citoplásmico TlpS. Dentro de los posibles reguladores de respuesta blancos de fosforilación por CheA1, CheY2 parece estar claramente involucrado, a pesar de que las tres CheYs de este operón pueden ser fosforiladas in vitro por CheA1 (Porter & Armitage, 2002), por lo que debe ser el principal responsable de generar el paro en la rotación del motor flagelar.

El resultado obtenido para la cepa carente de CheY5 (incremento significativo en la reorientación), indica que en esta condición la concentración de CheY-P se vió incrementada (en este caso CheY2-P, la cual debe ser responsable de detener el motor flagelar), lo que llevó a sugerir que CheY5 podría funcionar como una poza de fosfatos en el sistema, similar a la observado en *Sinorhizobium meliloti* (Sourjik & Schmitt, 1998).

Como se mencionó anteriormente en *E. coli*, el estado metilado de los receptores estimula la activación de la cinasa CheA, en cambio, según la tasa de reorientación observada para la cepa mutante en *cheR1* (incremento significativo), se sugiere que receptores metilados inhiben a la cinasa, o que su estado desmetilado los activa. Por los resultados obtenidos para la mutante en *mcpA*, se sugiere que este quimiorreceptor sea blanco de CheR1 (ver Figura 14). En cambio no fueron obtenidos datos concluyentes para McpB, ya que no hubo un cambio significativo en la tasa de reorientación con respecto a la cepa silvestre, por lo que se propone que McpB podría sensor señales diferentes, las cuales estuvieron ausentes en la condición probada (Martínez- del Campo et al, 2011).

Se propone que la proteína CheD pueda fungir como la metilesterasa del sistema de adaptación, ya que este operón no presenta genes *cheB* (ver “Posible función dual de CheD”, Anexos) (Martínez- del Campo et al, 2011).

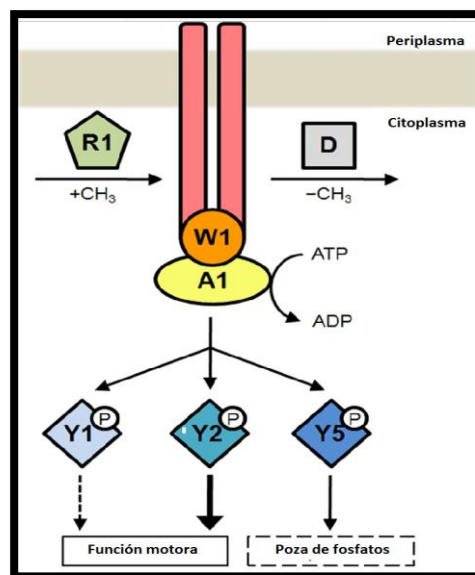


Figura 14. Modelo del sistema quimiotáctico que controla al flagelo 2 de *R. sphaeroides*, propuesto por Martínez-del Campo et al, 2011.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Rhodobacter sphaeroides es una α -proteobacteria que presenta dos sistemas flagelares funcionales: Fla1 y Fla2. Se ha sugerido que el sistema flagelar Fla1 fue adquirido de una γ -proteobacteria, mientras que el sistema flagelar Fla2 es el nativo de las α -proteobacterias. A su vez presenta múltiples genes quimiotácticos reiterados, distribuidos principalmente en tres operones: *cheOp1*, *cheOp2* y *cheOp3*.

Bajo condiciones de laboratorio, esta bacteria exclusivamente expresa y nada con el flagelo 1, por lo que ha sido el más ampliamente estudiado. Se descubrió que las proteínas involucradas en su control quimiotáctico están codificadas principalmente por los operones *cheOp2* y *cheOp3* y que el *cheOp1* es prescindible, ya que mutantes individuales de sus genes así como su completa ablación no afectan la respuesta quimiotáctica de la bacteria.

Recientemente lograron obtenerse cepas capaces de nadar utilizando exclusivamente el flagelo 2. Posteriormente se demostró que las proteínas codificadas por el *cheOp1* son las responsables del control quimiotáctico de este flagelo. Análisis fenotípicos de las cepas mutantes para los genes contenidos en el *cheOp1*, como *cheA1*, *cheW1*, *cheY2*, *cheY5*, *cheR1*, y *mcpA*, en un contexto *fla1⁻fla2⁺* (cepa AM1), permitió vincularlos al control quimiotáctico del flagelo 2, sin embargo para los genes *mcpB*, *cheB*, y *cheY1* no fueron obtenidos datos concluyentes. Particularmente quedaba claro que McpA tenía la capacidad de modular la actividad de la cinasa de este sistema, sin embargo parecía no ser así para McpB.

Asumiendo que la ausencia de la metiltransferasa CheR1 genera receptores desmetilados activos, el aislar cepas mutantes en los genes *mcpA* y *mcpB* en un contexto celular *cheR1⁻*, permitiría analizar la contribución de McpB en la activación de la cinasa y por lo tanto su funcionalidad en este sistema quimiotáctico.

Considerando que los genes del *cheOp1* codifican para las proteínas responsables del control quimiotáctico del flagelo 2 (nativo), y siendo *R. sphaeroides* una α -proteobacteria, es muy probable que la regulación transcripcional de estos receptores pudiera estar regulada por CtrA como en otras bacterias del mismo clado.

La inmunodetección de McpA y McpB en un contexto celular silvestre y en otro carente de CtrA, podría esclarecer si la regulación transcripcional de estos receptores es mediada por dicho factor transcripcional.

HIPÓTESIS

- La participación de McpB en el sistema quimiotáctico es necesaria para una adecuada respuesta quimiotáctica.
- La regulación transcripcional de los quimiorreceptores McpA y McpB está dada por el factor transcripcional CtrA, por lo que el operón quimiotáctico *cheOp1* está sujeto a la misma regulación.

OBJETIVOS

Objetivos generales

- Analizar el papel de los receptores McpA y McpB en el control quimiotáctico del sistema flagelar Fla2 de *Rhodobacter sphaeroides*.
- Determinar si la expresión del *cheOp1* es dependiente del regulador maestro CtrA.

Objetivos particulares

- Obtención de las cepas dobles mutantes AM1 *cheR1::aadA mcpA::Hyg* y AM1 *cheR1::aadA mcpB::Rif*, así como de la triple mutante AM1 *cheR1::aadA mcpA::Hyg mcpB::Rif*.
- Realizar ensayos de complementación de las cepas mutantes.
- Análisis fenotípico de las cepas mutantes y de las cepas complementadas.
- Generar la cepa AM1 *mcpA-FLAG* y AM1 *mcpB-FLAG*, para la inmunodetección de McpA-FLAG y McpB-FLAG por Western Blot.
- Generar la cepa AM1 *mcpA-FLAG ctrA⁻* y AM1 *mcpB-FLAG ctrA⁻* para la inmunodetección de McpA y McpB respectivamente, en la ausencia de *ctrA*.
- Detectar mediante Western blot la presencia de los reguladores de respuesta CheY2 y CheY5 en la cepa AM1 y en ausencia de CtrA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y plásmidos

Para el desarrollo de este trabajo fueron utilizadas las cepas y plásmidos enlistados en las siguientes tablas:

Cepas utilizadas

Escherichia coli

TOP10	Cepa para clonación	Invitrogen
HB101	Cepa para clonación	Boyer and Roulland-Dussoix, 1969.

Rhodobacter sphaeroides

WS8N	Silvestre; Nal ^r espontánea	Sockett et al, 1990.
AM1	Derivado de SP13; <i>fla2</i> ⁺	Martínez-del campo et al, 2007.
RS2A	Derivado de AM1; <i>mcpA::aadA</i>	Martínez-del campo et al, 2011.
RS2B	Derivado de AM1; <i>mcpB::aadA</i>	Martínez-del campo et al, 2011.
RS2Y1	Derivado de AM1; <i>cheY1::aadA</i>	Martínez-del campo et al, 2011.
RS2Y2	Derivado de AM1; <i>cheY2::aadA</i>	Martínez-del campo et al, 2011.
RS2Y5	Derivado de AM1; <i>cheY5::aadA</i>	Martínez-del campo et al, 2011.
RS2R1	Derivado de AM1; <i>cheR1::aadA</i>	Martínez-del campo et al, 2011.
JH1	Derivado de AM1; <i>cheR1::aadA mcpA::Hyg</i>	Este trabajo
JH2	Derivado de AM1; <i>cheR1::aadA mcpB::Rif</i>	Este trabajo
JH3	Derivado de AM1; <i>cheR1::aadA mcpA::Hyg mcpB::Rif</i>	Este trabajo
JV1	Derivado de AM1; <i>mcpA-FLAG</i>	Este trabajo
JV2	Derivado de AM1; <i>mcpA-FLAG ctrA::Hyg</i>	Este trabajo

Plásmidos utilizados

pCR-Blunt II-TOPO	Vector de clonación; Kan ^r	Invitrogen
pCR_ <i>mcpA</i> SD	Derivado de pCR-Blunt II-TOPO llevando <i>mcpA</i> con secuencia Shine Dalgarno	Este trabajo
pCR_Rif	Derivado de pCR-Blunt II-TOPO portando el casete de resistencia a Rifampicina (proveniente del vector pCHYC3)	Este trabajo
pCR_ <i>mcpA</i> (last700)	Derivado de pCR-Blunt II-TOPO portando los últimos 700pb de <i>mcpA</i>	Este trabajo
pTZ18R	Vector de clonación; Ap ^r	Pharmacia
pTZ18R (Eco ⁻)_ <i>mcpA</i> (Eco ⁺)	Derivado de pTZ18R sin el sitio EcoR1, llevando <i>mcpA</i> (sitio EcoR1 adicionado a la mitad del gen).	Colección
pTZ 18R (Eco ⁻)_ <i>mcpA</i> :: Hyg	Derivado de pTZ18R (Eco ⁻)_ <i>mcpA</i> (Eco ⁺) portando el alelo <i>mcpA</i> :: Hyg	Este trabajo
pTZ 18R_ <i>mcpB</i>	Derivado de pTZ18R portando <i>mcpB</i>	Colección
pTZ 18R_ <i>mcpB</i> ::Rif	Derivado de pTZ18R portando el alelo <i>mcpB</i> ::Rif	Este trabajo
pTZ19R Hyg	Derivado de pTZ19R portando el casete de resistencia a Higromicina	Colección
pRK415	Vector de expresión usado en <i>R. sphaeroides</i> ; Tc ^r	Keen et al, 1988.
pRK415_ <i>mcpA</i> SD	Derivado de pRK415 expresando <i>mcpA</i> con secuencia Shine Dalgarno	Este trabajo
pRK415_Rif	Derivado de pRK415 expresando casete de resistencia a Rifampicina	Este trabajo
pJQ200mp18	Vector suicida utilizado en Gram-negativas; Gm ^r	Quandt & Hynes, 1993.
pJQ200mp18_ <i>mcpA</i> ::Hyg	Derivado de pJQ200mp18 llevando el alelo <i>mcpA</i> ::Hyg	Este trabajo
pJQ200 mp18_ <i>mcpB</i> ::Rif	Derivado de pJQ200mp18 llevando el alelo <i>mcpB</i> ::Rif	Este trabajo
PJQ200mp18_ <i>ctrA</i> ::Hyg	Derivado de pJQ200mp18 portando el alelo <i>ctrA</i> ::Hyg	Colección
pFLGC-1	Vector para la generación de genes recombinantes, mediante la adición del epítipo FLAG al gen de interés	Invitrogen
pCHYC3	Vector de clonación; Rif ^r	Thanbichler et al, 2007.
pFLGC-1_ <i>mcpA</i> (last700)	Derivado de pFLGC-1 llevandolos últimos 700pb de <i>mcpA</i>	Este trabajo
pRK2013	Vector utilizado para la movilización de plásmidos en conjugaciones triparentales; Kan ^r	Figurski & Helinski, 1979.

Oligonucleótidos utilizados

Para la obtención de algunas cepas utilizadas en este trabajo, así como para la confirmación de alelos mutantes, fueron utilizados los oligonucleótidos enlistados en la siguiente tabla:

Oligonucleótidos

McpA SD FW (XbaI)	5'-TCTAGAGGAGGTAGCCGCATGAACCGCACCG-3'
McpA SD RV (EcoRI)	5'-GAATTCTCATGTCAAAGTCCTCCCATC-3'
McpA FLAG FW (HindIII)	5'-AAGCTTGCACCGCCGCACTCTGG-3'
McpA FLAG RV (SacI)	5'-GAGCTCGAAAGTCCTCCCATCCGGGC-3'
McpB SD FW (XbaI)	5'-GCTCTAGAGGAGGTGTAGCGATGAGACTGTCC-3'
McpB SD RV (EcoRI)	5'-GAATCCGGGTCAGGCCGCATGGTCGGT-3'
Rif I (BglII)	5'-GCAGATCTCAACTGGTCCAGAACCTTG-3'
Rif II (BglII)	5'-GGAGATCTGTTAATCTCAATAACATG-3'
FLAGtagRv	5'-GTTCTGGCCCTTTTGTGGCC-3'
CtrAInd1	5'-GCGGATCCAGAATACTGCTGGTGGAGGATG-3'
CtrAInd2	5'-GCAAGCTGTGTCAGGCCGCGATGGCGAACCG-3'

Antibióticos

De ser necesario, los siguientes antibióticos fueron adicionados a los medios de cultivo a las siguientes concentraciones:

Antibióticos	<i>E. coli</i>	<i>R. sphaeroides</i>
Espectinomycin (Spc)	100 µg/ml	50 µg/ml
Kanamycin (Kan)	50 µg/ml	25 µg/ml
Tetracycline (Tc)	15 µg/ml	1 µg/ml
Gentamicin (Gm)	30 µg/ml	5 µg/ml
Hygromycin (Hyg)	150 µg/ml	150 µg/ml (medio sólido) y 20 µg/ml (medio líquido).
Rifampicin (Rif)	50 µg/ml	1 µg/ml (medio sólido) y 0.25 µg/ml (medio líquido).
Ampicillin (Ap)	100 µg/ml	—

Medios

Medio Luria-Bertani (LB)

Fue preparado con 1% de bacto tripton, 1% de cloruro de sodio y 0.5% de extracto de levadura, disueltos en agua bidestilada y esterilizados en autoclave. Para la preparación de medio sólido se adicionó 1.5% de bacto agar. Las cajas de LB sacarosa fueron adicionadas con 5% de sacarosa.

Medio Mínimo de Sistro (SIS)

Este medio fue preparado con 15 mM de ácido succínico, 0.67 mM de ácido glutámico, 0.25 mM de ácido aspártico, 8.5 mM de cloruro de sodio, 20 mM de fosfato dibásico de potasio, 3.78 mM de sulfato de amonio, 1.04 mM de ácido nitriloacético, 1.2 mM de sulfato de magnesio, 0.23 mM de cloruro de calcio, 7 µM de sulfato ferroso, 0.16 mM de molibdato de amonio y 0.1 ml/l de elementos traza, siendo el pH ajustado a 7 con hidróxido de potasio. Una vez esterilizado y estando a temperatura ambiente, se le adicionó 0.1 ml/l de solución de vitaminas. Para la condición fotoheterotrófica anaeróbica SIS (88 µM ác. succínico), fue preparado medio SIS sin ácido succínico. La adición de 100 µl de inóculo (proveniente de un cultivo crecido en SIS adicionado con 15 mM de ácido succínico) a 17 ml de medio SIS sin ácido succínico, generaba una concentración de 88 µM de ácido succínico.

Solución de Elementos traza

Consta de 4.7 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 38 mM de sulfato de zinc, 18 mM de sulfato ferroso, 9 mM de sulfato de manganeso, 1.5 mM de sulfato cúprico y 1.8 mM de ácido bórico, disueltos en agua bidestilada.

Solución de Vitaminas

Solución de 1% de ácido nicotínico, 0.5% de tiamina y 0.01% de biotina en agua bidestilada y esterilizada por filtración.

Obtención de cepas

JH1 (AM1 *cheR1:: aadA mcpA::Hyg*). El plásmido pTZ18R Hyg fue digerido con SmaI, para la obtención del casete de resistencia a Higromicina (Hyg) de 1655pb. El casete Hyg fue ligado al vector pTZ18R (EcoRI⁻) *mcpA* (EcoRI⁺), previamente linealizado con la enzima EcoRI y al cuál se le hizo una reacción con la T4 DNA polimerasa, para la eliminación de los extremos cohesivos. Con la construcción obtenida se transformó a la cepa de *E. coli* TOP10, obteniendo a la cepa TOP10 pTZ 18R (EcoRI⁻) *mcpA:: Hyg*. El fragmento de DNA con el alelo *mcpA:: Hyg* fue obtenido mediante la doble digestión XbaI/SalI del plásmido mencionado, obteniendo un producto de 4,063 pb, al cual se le realizó una reacción con la T4 DNA polimerasa. Fue subclonado en el vector pJQ200mp18 previamente digerido SmaI, con la reacción de ligasa se transformó la cepa TOP10, obteniendo: TOP10 pJQ200mp18 *mcpA:: Hyg*. La cepa anterior fue conjugada con RS2R1 (AM1 *cheR1::aadA*) para la obtención de AM1 *cheR1::aadA mcpA:: Hyg* (**JH1**).

JH1/A (AM1 *cheR1:: aadA mcpA::Hyg/pRK415_mcpA SD*). Se amplificó el gen *mcpA* utilizando los oligos McpA SD FW y McpA SD RV a partir del DNA cromosomal de WS8N. El producto obtenido de 2408pb, que contiene al alelo *mcpA* más una secuencia Shine Dalgarno (SD) 7pb río arriba de la Met de inicio de *mcpA*, fue purificado y digerido con EcoRI/XbaI. El alelo *mcpA SD* fue clonado en el vector pCR Blunt II- TOPO. La cepa TOP10 fue transformada con esta construcción, obteniendo: TOP10 pCR *mcpA SD*. El plásmido fue digerido EcoRI/XbaI y el fragmento fue subclonado en el vector pRK415, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. La cepa TOP10 fue transformada con esta construcción, obteniendo: TOP10 pRK415 *mcpA SD* La cepa anterior fue conjugada con JH1 para la obtención de la cepa JH1(AM1 *cheR1:: aadA mcpA::Hyg*)/pRK415 *mcpA SD* (**JH1/A**).

AM1/pRK415_Rif. Con la finalidad de determinar la concentración mínima a la cual inhibir el crecimiento de AM1 con el antibiótico Rifampicina (Rif) se generó una cepa de AM1 que llevara el plásmido pRK415 con un casete de resistencia a dicho antibiótico. Se amplificó el casete de resistencia a Rif del vector pCHYC3, utilizandolos oligos RifI y RifII, obteniendo un producto de 678pb. Se clonó en el vector pCR BLunt II, se transformó TOP10 con la construcción obtenida, obteniendo: TOP10 pCR_Rif. Se extrajo el casete Rif de la construcción anterior con la enzima BglII, subclonándolo en pRK415, previamente digerido con BamHI. Se transformó la cepa TOP10 con la reacción de ligación anterior. Fue seleccionada una colonia capaz de crecer en presencia de Rifampicina, posteriormente se confirmó la presencia del casete Rif, mediante la doble digestión XbaI/SacI, obteniendo la cepa: TOP10 pRK415_Rif. La cepa anterior se conjugó con AM1 para obtener AM1/pRK415_Rif. La concentración mínima probada a la cual se logró inhibir el crecimiento de AM1 pero no de AM1/pRK415_Rif, tanto en medio líquido como sólido fue de 0.25µg/ml, sin embargo se decidió utilizarla concentración de 1 µg/ml para la selección en medio sólido. Para corroborar que la expresión del casete Rif desde el cromosoma le daba a la cepa la misma resistencia al antibiótico se probaron las concentraciones de 0.25µg/ml (líquido) y 1 µg/ml (sólido), en la cepa JH3, teniendo como control a AM1. Dichas concentraciones inhibieron el crecimiento de AM1 pero no de JH3.

JH2 (AM1 *cheR1:: aadA mcpB::Rif*) y **JH3** (AM1 *cheR1:: aadA mcpA::Hyg mcpB::Rif*). El casete de resistencia a Rif fue obtenido de la digestión BglII del vector pCR_Rif, después de hacerle una reacción con la T4 DNA polimerasa, para eliminar los extremos cohesivos, se ligó con el vector pTZ 18R *mcpB*, previamente digerido NcoI (posición 899pb). Se transformó la cepa TOP10, obteniendo: TOP10 pTZ

18R_ *mcpB*::Rif. Fue confirmado que el marco de lectura del casete Rif presentara la misma dirección de lectura que el alelo *mcpB*, esto mediante un PCR con los oligos McpB SD FW y RifII, obteniendo un producto de 1577 pb. El alelo *mcpB*::Rif se extrajo del vector anterior con las enzimas EcoNI/SacI, después de una reacción con la T4 DNA polimerasa, se subclonó en el vector pJQ200 mp18, previamente digerido Smal. Se transformó la cepa TOP10, obteniendo: TOP10 pJQ200 mp18_ *mcpB*::Rif. La cepa anterior se conjugó con las cepas RS2R1 (AM1 *cheR1*::*aadA*) y JH1, para la obtención de las cepas AM1 *cheR1*::*aadA mcpB*::Rif (**JH2**) y AM1 *cheR1*::*aadA mcpA*::Hyg *mcpB*::Rif (**JH3**), respectivamente.

JV1 (AM1 *mcpA*-FLAG) y **JV2** (AM1 *mcpA*-FLAG *ctrA*::Hyg). Se amplificó el gen *mcpA* a partir del DNA cromosomal de AM1, utilizandolos oligos McpA FLAG FW y McpA FLAG RV. El producto de 711 pb contenía los últimos 700 pb del alelo *mcpA*. Se clonó en pCR Blunt II, y se transformó a TOP10, obteniendo la cepa: TOP10 pCR_ *mcpA* (last700). Se extrajo la secuencia correspondiente a los últimos ±700pb de *mcpA* con las enzimas HindIII/SacI, y se subclonó en el vector pFLGC-1 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Se transformó la cepa TOP10, obteniendo: TOP10 pFLGC-1_ *mcpA* (last700). La cepa anterior se conjugó con AM1, para obtener la cepa recombinante sencilla AM1 *mcpA*-FLAG. Fueron probadas 6 candidatas en un Western blot anti FLAG, de las cuales 3 presentaban la proteína fusión. Fue seleccionada la candidata 4 (**JV1**) para futuros experimentos. Se conjugó la cepa TOP10 PJQ200mp18_ *ctrA*::Hyg con la cepa JV1, para la obtención de AM1 *mcpA*-FLAG *ctrA*::Hyg (**JV2**).

Confirmación de las mutantes por PCR

Para la confirmación de la presencia de alelos interrumpidos en el DNA cromosomal de las cepas mutantes obtenidas en este trabajo, así como para la confirmación del gen recombinante *mcpA*-FLAG, fueron amplificadas las siguientes secuencias, utilizandolos siguientes oligonucleótidos:

Cepa	Producto amplificado	Peso molecular esperado (pb)	Oligos empleados
JH1	<i>mcpA</i> ::Hyg	4,063 pb	McpA SD FW y McpA SD RV
JH2	<i>mcpB</i> ::Rif	2,391 pb	McpB SD FW y McpB SD RV
JH3	Los primeros 899 pb de <i>mcpB</i> más el casete Rif.	1,597 pb	McpB SD FW y Rif II
JV1	<i>mcpA</i> -FLAG	2,459 pb	McpA SD FW y FLAGtagRv
JV2	<i>ctrA</i> ::Hyg	2,369 pb	CtrAInd1 y CtrAInd2

En la Figura 15 se muestran los PCRs confirmatorios, resueltos en geles de agarosa al 1%.

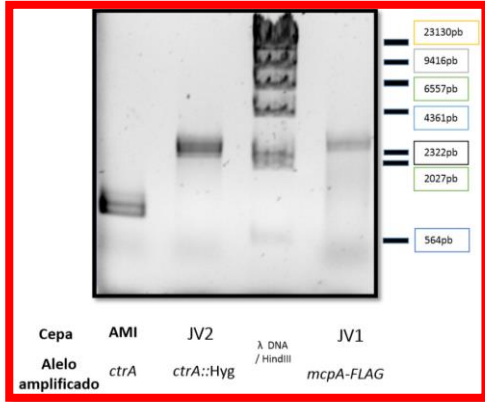
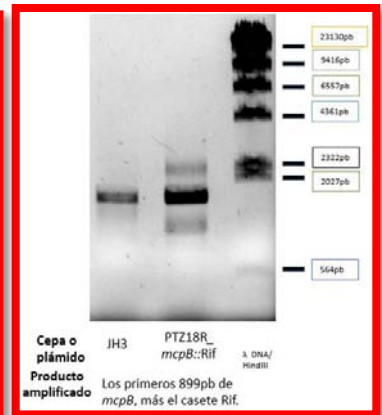
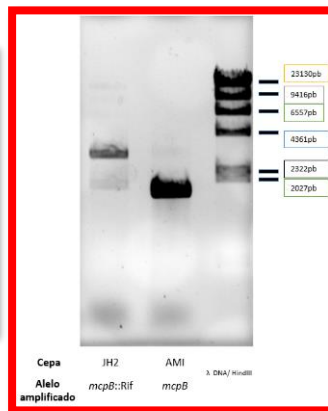
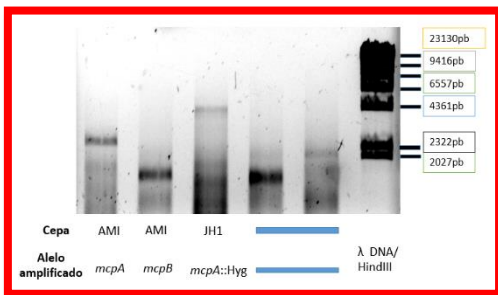


Figura 15. PCRs confirmatorios de las cepas JH1 (*mcpA*::Hyg), JH2 (*mcpB*::Rif), JH3 (*mcpB*::Rif), JV1 (*mcpA-FLAG*) y JV2 (*ctrA*::Hyg). Lo pesos esperados son: *mcpA-FLAG* ≈2500 pb, *mcpA*::Hyg ≈ 4000 pb, *mcpB*::Rif ≈ 2400 pb, y *ctrA*::Hyg ≈2400 pb. Para Los primeros 899pb de *mcpB* más el casete Rif (JH3) ≈1600 pb.



Condiciones de Crecimiento

Las diferentes cepas de *E. coli* y *R. sphaeroides* utilizadas en este trabajo, fueron crecidas bajo diferentes condiciones de crecimiento, como se muestra en la tabla siguiente:

Condiciones de crecimiento		
<i>E. coli</i>		Los cultivos líquidos contenidos en tubos de ensayo se mantuvieron en agitación constante a 200 rpm, a 37°C. Los cultivos crecidos en placas de agar fueron crecidos a la misma temperatura.
<i>R. sphaeroides</i>	Fotoheterotrófica anaeróbica	SIS (15 mM ác. succínico). Los cultivos líquidos se crecieron en viales llenados a tope con medio SIS, sellados con la película plástica "Parafilm". El volumen de los viales oscilaba de 2 a 6 ml. Los cultivos fueron crecidos a 30°C en presencia de luz artificial constante, a 20 cm de 3 focos incandescentes de 80W. Los cultivos crecidos en placas de agar suave bajo esta condición eran introducidas en el contenedor de cultivo

		anaeróbico Gas Pack™ y crecidas a 30°C bajo la misma fuente de luz.
		SIS (88 μM ác. succínico). Con la finalidad de estimular el nado de las cepas para la captura de videos o para la obtención de extractos en esta condición, se inocularon 100 μl de un cultivo previamente crecido en la condición fotoheterotrófica, anaeróbica, SIS (15mM ác. succínico) a una DO _{600nm} de 0.6, en tubos de 17 ml con medio SIS sin ácido succínico. Por lo tanto la concentración teórica de ácido succínico en esta condición es de 88 μM. Los cultivos fueron llenados a tope y sellados con la película plástica "Parafilm". Los cultivos fueron crecidos a 30°C en presencia de luz artificial constante, a 20 cm de 3 focos incandescentes de 80W.
	Quimioheterotrófica aeróbica	Los cultivos líquidos contenidos en tubos de ensayo fueron crecidos a 30°C en agitación constante a 200rpm en oscuridad.

Transformación de *E. coli* por electroporación

Alícuotas de células electrocompetentes de *E. coli* previamente preparadas, fueron utilizadas para la transformación por electroporación. El DNA a transformar fue mezclado con 50 μl de células competentes. Dicha mezcla contenida en una celda de electroporación fría fue sometida a un pulso de 1.8 kV. Las células fueron resuspendidas en 1 ml de medio LB e incubadas durante 1h a 37°C. Finalmente fueron centrifugadas a 14,000 rpm y espatuladas en su respectivo medio sólido de selección.

Conjugación

Las cepas a conjugar fueron crecidas hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.6, llegando a la fase exponencial. Al llegar a esta fase, fueron centrifugadas y resuspendidas en medio LB sin antibióticos. Dicho procedimiento se repitió al menos dos veces más, con la intención de remover los antibióticos presentes en el cultivo. Entonces, las células de las diferentes cepas se resuspendieron en un mismo volumen de LB, y fueron depositadas en una membrana de nitrocelulosa, previamente colocada en una caja de medio sólido LB. Después de incubarse por al menos 5 horas a 30°C, la membrana fue sumergida en 1ml de medio LB. Inóculos variables fueron espatulados en su respectivo medio sólido de selección. Las conjugaciones realizadas en este trabajo fueron triparentales, por lo que fue utilizado además de las cepas receptora y donadora, fue incluida la cepa de *E. coli* HB101, con el plásmido pRK2013 que lleva los genes necesarios para la transferencia de los plásmidos con OriT. Para la selección de las mutantes obtenidas por doble recombinación homóloga con el vector suicida pJQ200mp18, después del evento de conjugación fueron espatuladas en cajas de medio sólido LB Sacarosa (5%) adicionadas con el antibiótico Nalidixico.

Purificación de DNA

Minipreparaciones de DNA plasmídico

Un volumen de 1.5 ml de un cultivo bien crecido fue centrifugado, decantado y resuspendido en 300 µl de STET y 30 µl de lisozima (10µg/ml). Se incubó en agua hirviendo durante 45 seg, siendo después centrifugado por 15 min. El sobrenadante se mezcló con 300 µl de isopropanol y se incubó en hielo durante 10 min, para después ser centrifugado durante 20 min a 4°C a 14,000 rpm. La pastilla resultante fue lavada con etanol y secada a 75°C durante 10 min. La pastilla entonces fue resuspendida en 50 µl de agua bidestilada.

Solución STET

Solución que contiene 8% de sacarosa, 5% del detergente Tritón, 50mM de EDTA y 50mM de Tris-HCl disueltos en agua bidestilada (pH 8).

Extracción de DNA cromosomal

Un volumen de 1.5 ml de un cultivo bien crecido fue centrifugado. El paquete celular fue resuspendido en 500 µl de TE, 30µl de SDS 10% y 5 µl de Proteinasa K (20mg/ml). La mezcla fue incubada a 37°C durante ±2 h, hasta que presentó una apariencia cristalina. Fue adicionado 1 volumen de fenol y 1 volumen de cloroformo. Tras ser suavemente, pero completamente homogeneizado, fue centrifugado a 14,000 rpm durante 8 min. La fase acuosa se recuperó, se vertió en un tubo nuevo, y fue resuspendida en el mismo volumen de fenol/cloroformo. Tras ser homogeneizada vigorosamente se centrifugó durante 5 min. Tras repetir el paso anterior dos veces más, se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo, siendo adicionados dos volúmenes de etanol y 0.1 volumen de acetato de sodio 3M pH 3.5. La mezcla anterior fue centrifugada 2 min. La pastilla resultante fue lavada con etanol al 70% y centrifugada 2 min, secada a 65°C y resuspendida en 200 µl de agua bidestilada.

Solución TE

Solución que contiene 10 mM de Tris-HCl y 1 mM de EDTA disueltos en agua bidestilada (pH 8).

Purificación de DNA plasmídico

Para la purificación de DNA plasmídico fue utilizado el estuche “QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol” de la compañía QUIAGEN, siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante.

Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Para la purificación de DNA a partir de geles de agarosa fue empleado el estuche “QIAquick gel extraction” de la compañía QUIAGEN, siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante.

Ensayo de Western blot

Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Los extractos celulares fueron obtenidos centrifugando de 1 ml (condición aeróbica) a 6 ml (condición anaeróbica fotoheterotrófica) de un cultivo celular a una DO_{600nm} de 0.6 (condición aeróbica) y 0.1-0.2 (condición anaeróbica fotoheterotrófica), procurando que para las cepas móviles, más del 60% de la población de las bacterias se encontraran nadando. Se centrifugó y resuspendió en 100 μ l de solución PBS. Tras ser sonicadas tres veces durante 10 seg con espacios de 10 seg de incubación en hielo y hervidas por 5 min, fue cuantificada la cantidad de proteína en las muestras mediante la técnica de Bradford. Las muestras fueron resuspendidas en una solución de carga (Laemmli, 1970), adicionada con β -mercaptoetanol. Entonces 5 μ g (Western blot anti McpA-FLAG y anti CheY5) y 10 μ g de proteína total (Western blot anti CheY5) fueron resueltas mediante una electroforesis discontinua, por un gel concentrador (4% de acrilamida) y por un gel de resolución (10% de acrilamida para McpA y 15% para CheY2 y CheY5).

Inmunodetección

Fueron transferidas las proteínas resueltas por SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa. Para ello el gel de acrilamida se puso en contacto con la membrana de nitrocelulosa, entonces fueron sumergidos en una solución amortiguadora de transferencia (ver Tabla "Soluciones utilizadas en Western Blot"), y expuestos a una corriente de 250 mA durante 1 hora. Posteriormente la membrana fue incubada en una solución TBS-T (ver Tabla "Soluciones utilizadas en Western Blot") durante 1 hora. La membrana fue lavada con 10 ml de la solución TBS-T. Entonces fue incubada de 1 a 3 horas con su respectivo anticuerpo primario (ver Tabla de anticuerpos) disuelto en la solución TBS-T. La membrana fue lavada con la solución TBS-T tres veces (10min c/u). La membrana después fue incubada por 45 min con el anticuerpo secundario correspondiente, acoplado a fosfatasa alcalina de rábano (ver Tabla de Anticuerpos). Después de 4 lavados de 10 min con la solución TBS-T finalmente la membrana se incubó con un sustrato quimioluminiscente y fue expuesta una placa fotosensible, luego, la placa fue revelada y fijada.

Anticuerpos utilizados

Proteína inmunodetectada	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
McpA-FLAG	α -FLAG (SIGMA) 1:10,000 1hora	α -ratón (SIGMA) 1:20,000 45min
CheY2	α -CheY2 1:500 3horas	α -conejo (Applied Biosystem) 1:10,000 45min
CheY5	α -CheY5 1:5,000 1hora	α -conejo (Applied Biosystem) 1:10,000 45min

Soluciones utilizadas en Western Blot

Solución de Corrida del gel de acrilamida-SDS	Solución compuesta por 250 mM de glicina, 25mM de Tris base y SDS 0.1%. pH 8.3
Solución de Transferencia	Compuesta por 3 mM de carbonato de sodio, 10 mM de bicarbonato de sodio y metanol al 20%. pH 9.9
Solución TBS	Solución que contiene 50 mM de Tris-HCl y 150 mM de cloruro de sodio, disueltos en agua bidestilada estéril. pH 7.5
Solución TBS-Tween 0.1% (TBS-T)	Idéntica a la solución TBS pero adicionada con 0.1% del detergente Tween-20.
Solución PBS	Solución acuosa que contiene 137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de Na ₂ PO ₄ y 0.18 mM de KH ₂ PO ₄ . pH 7.2

Determinación de la tasa de reorientación

Toma de videos. Las cepas de *R. sphaeroides* fueron crecidas en medio SIS completo (15 mM de ácido succínico), una vez alcanzada una DO_{600nm} de 0.6, 100 μ l del cultivo fueron inoculados en 17 ml de medio SIS sin succínico (por lo que la concentración teórica de dicha condición es de 88 μ M de ác. succínico), fueron incubados a 30°C durante 16 horas en anaerobiosis, en presencia de luz constante, sin antibióticos (ver "Condiciones de Crecimiento"). A las 16 horas normalmente era alcanzada una DO_{600nm} de 0.1-0.2. A dicha densidad era tomada una muestra para confirmar que al menos el 60% de la población se encontrara nadando. De ser así, una alícuota de 4 μ l era colocada sobre un portaobjetos previamente delineado con un lápiz de cera, para generar un área circular cerrada, para así lograr un área delimitada en la cual las células serían filmadas. De ser así, fueron buscados campos en los cuales se observara un número manejable de células, esto con el microscopio NIKON ELIPSE E600, mediante microscopia de campo oscuro. Los videos fueron obtenidos gracias a la cámara acoplada HAMAMATSU ORCA-ER C4742-95, mediante el programa Micro-Manager 1.4., con los siguientes parámetros: número de cuadros: 300; tiempo de exposición por cuadro: 33 ms; binning: 2; intervalos: 33 ms. Los videos obtenidos fueron almacenados en formato AVI. Fueron tomados al menos 5 videos de diferentes campos para cada cepa. Lo anterior fue repetido al menos tres ocasiones.

Los archivos de video generados fueron analizados en el programa CellTrack 1.5. (Motion Analysis Company). Fueron procesados utilizando los siguientes parámetros: Edge Detection Method: Binary

Smoothed Edges (BSE); Threshold Value: 25; Neighborhood Size: 3; Maximum Object Size: 300; Minimum Object Size: 30; Maximum Object Speed: 25 pixeles/cuadro; Use prediction. Fueron descartadas las células u objetos que se movieran menos de 20 pixeles, así como aquellas cuya duración fuera menor de 29 cuadros. Fueron manualmente seleccionadas aquellas trayectorias que cubrieran la mayor parte del campo visual. La duración de dichas trayectorias oscilaba entre 2 y 10 segundos. A partir de dichas trayectorias fue obtenida la Velocidad Angular Promedio (VAP) para cada una de ellas. A su vez fueron determinados el número de eventos de reorientación de cada trayectoria, considerando un evento de reorientación aquel cuyo valor de Velocidad Angular Instantánea (VAI) fuera mayor de 1000 grados/seg. Fueron seleccionadas 100 células para cada cepa.

Ensayo de nado en cajas de agar suave

Para evaluar la capacidad de nado de las cepas, una alícuota de 2 μ l de cada cepa fue inoculada en una caja de agar suave (SIS adicionado con 100 μ M de ác. succínico, 0.22% de bactoagar). Las cajas inoculadas fueron introducidas en el contenedor de cultivo anaeróbico y un sobre Gas Pack™ y crecidas a 30°C bajo luz constante (ver “Condiciones de crecimiento”), durante 72h.

Análisis estadístico

Fueron analizadas 100 células para cada cepa (100 trayectorias). Dado que la desviación estándar (SD) de la VAP poblacional para cada cepa era muy alta, se decidió eliminar los valores extremos (outliers), con la finalidad de establecer el valor de VAP promedio (fenotipo) de cada cepa. Para ello solo fueron considerados los valores de VAP que se encontraran +/-1 SD del valor de media de VAP poblacional. Derivado de dicha selección, al menos 60 trayectorias se encontraban dentro de dicho rango (ver Figuras 34 y 35). Con dichos datos fue generado el promedio de VAP poblacional, con sus respectivos valores de SD (ver Gráfica 1). El mismo procedimiento fue utilizado con los valores de números de reorientaciones/seg (ver Gráfica 2). El análisis estadístico se realizó con el programa STATISTICA. La significancia se evaluó mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnett y de una prueba de Tuckey, con un valor α : 0.5.

Análisis Bioinformático

Detección del posible sitio de unión de CtrA del *cheOp1*

Utilizando la Matriz de Peso Posicional (PWM) de los sitios de unión de CtrA de *C. crescentus* (Brilli et al, 2010) (ver Figura 16), se generó una predicción de los sitios de unión de CtrA en el genoma de *R. sphaeroides* WS8N. Dicha matriz fue corrida en el programa RSAT (RSAT matrix-scan QUICK & SIMPLE), utilizando un valor de probabilidad (pval) de 1e-4. Los resultados fueron visualizados en el programa Artemis.

Posición/base	A	C	G	T
1	0.1064	0.0213	0.1915	0.6809
2	0.1064	0.1915	0.01	0.7021
3	0.8298	0.1277	0.01	0.0426
4	0.5957	0.1064	0.2979	0.01
5	0.2128	0.2553	0.2766	0.2553
6	0.383	0.234	0.234	0.1489
7	0.1277	0.234	0.383	0.2553
8	0.2766	0.2128	0.2553	0.2553
9	0.234	0.2128	0.2128	0.3404
10	0.2128	0.4681	0.2128	0.1064
11	0.2553	0.01	0.7447	0.01
12	0.01	0.01	0.0426	0.9574
13	0.1277	0.0426	0.01	0.8298
14	0.8723	0.0426	0.0213	0.0638
15	1	0.01	0.01	0.01
16	0.01	0.8723	0.1277	0.01

Figura 16. Matriz de Peso Posicional de los sitios de unión a CtrA en *C. crescentus*. Tomado de Brillì et al, 2010.

Búsqueda de dominios conservados

Para la búsqueda de dominios conservados en las proteínas McpA y McpB se utilizó el buscador de dominios conservados "NCBI Conserved Domain Search". Fue utilizado un e-value de 0.01. El buscador es accesible en la liga <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>

Predicción de cruces transmembranales

Con la finalidad de predecir la existencia y localización de cruces transmembranales en las proteínas McpA y McpB, fue utilizado el predictor "DAS - Transmembrane Prediction Server" que utiliza el método "Dense Alignment Surface (DAS)". Es accesible en la liga <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>

Identificación de residuos conservados

Para la identificación de residuos conservados fue empleada la herramienta MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation) que permitió generar alineamientos múltiples de secuencias peptídicas. Es accesible en la liga <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>

RESULTADOS

Control quimiotáctico

Obtención de cepas

Asumiendo que la ausencia de la metiltransferasa CheR1 genera receptores desmetilados activos (Martínez-del Campo et al, 2011), el aislar cepas mutantes en los genes *mcpA* y *mcpB* en un contexto celular *cheR1*⁻, permitiría analizar la contribución de McpB en la activación de la cinasa CheA1, ya que esta podría estar totalmente activa independientemente del ligando. A su vez, el obtener una cepa carente de ambos quimiorreceptores en un contexto celular *cheR1*⁻ permitiría evaluar la contribución en la activación de la cinasa por parte de otros MCPs, que no sean McpA o McpB. Por lo tanto se obtuvieron las cepas JH1 (AM1 *cheR1::aadA mcpA::Hyg*), JH2 (*cheR1::aadA mcpB::Rif*) y JH3 (AM1 *cheR1::aadA mcpA::Hyg mcpB::Rif*) (ver Figura 17). Las dobles mutantes JH1 y JH2, fueron obtenidas mediante la interrupción de los alelos silvestres *mcpA* y *mcpB* por los casetes de resistencia a higromicina y rifampicina respectivamente, partiendo de la cepa RS2R1 (*cheR1::aadA*). La cepa JH1 fue complementada con el vector PRK415 *mcpA* SD, obteniendo la cepa JH1/A. Por otro lado, se obtuvo la cepa triple mutante JH3, partiendo de la cepa JH1 e interrumpiendo el alelo silvestre *mcpB* con el casete de resistencia a rifampicina (ver Figura 17).

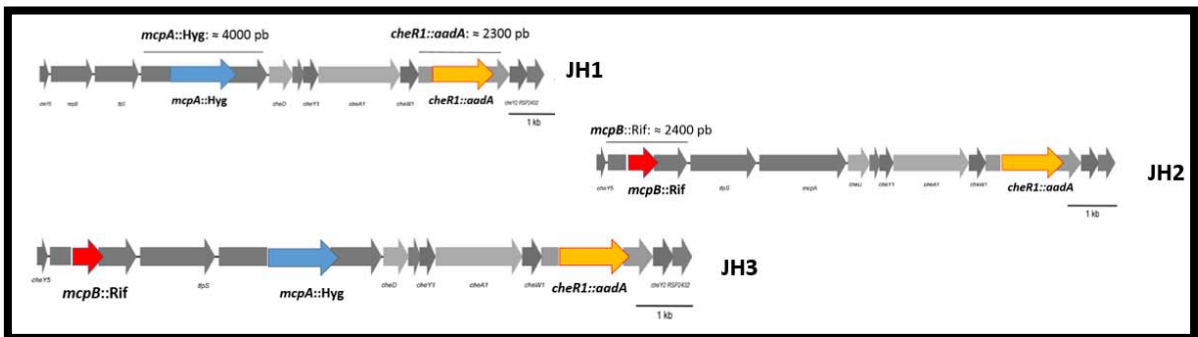


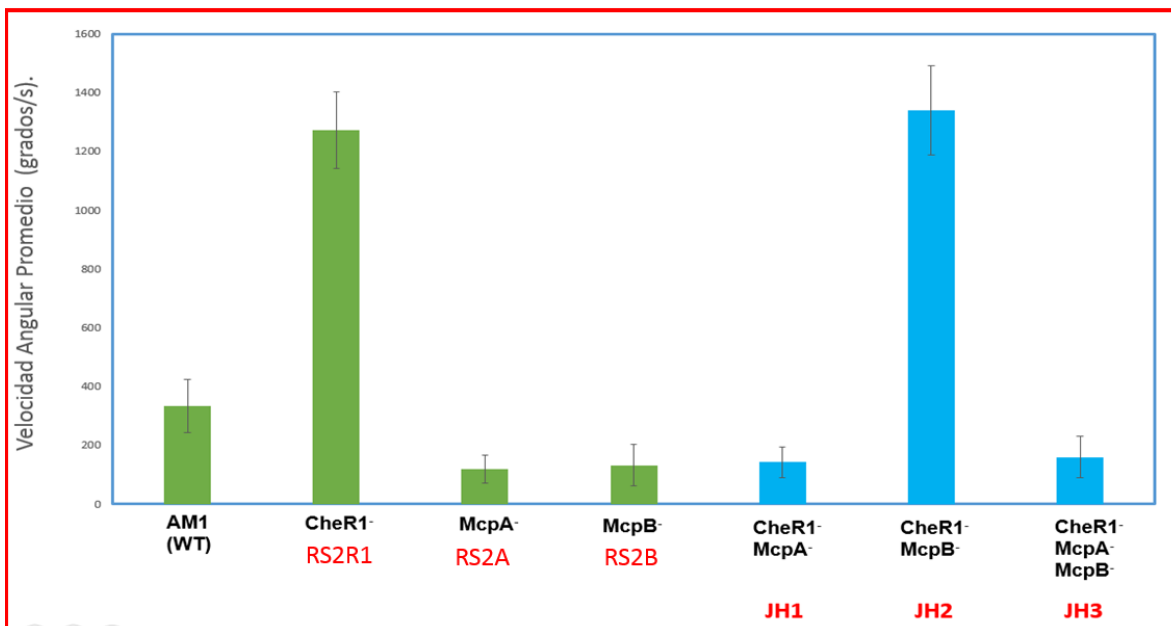
Figura 17. Representación esquemática de los alelos *cheR1::aadA*, *mcpA::Hyg* y *mcpB::Rif* en el contexto del *cheOp1* de las cepas JH1, JH2 y JH3.

Validación de la Velocidad Angular Promedio como criterio de reorientación

Con el propósito de validar la Velocidad Angular Promedio (VAP) como criterio de reorientación, se determinó la VAP de las cepas AM1, RS2A (*mcpA::aadA*), RS2R1 (*cheR1::aadA*). La tasa de reorientación de dichas cepas había sido previamente determinada, utilizando como criterio la disminución de la velocidad lineal. Un evento de paro en ese trabajo fue aquel en el que la velocidad de la trayectoria de nado de la célula cayera por debajo de 10 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (Martínez-del Campo et al, 2011). Como se reportó previamente, la cepa RS2A presenta un evidente fenotipo “smooth” con respecto a la cepa AM1, mientras que RS2R1 tiene un evidente fenotipo “tumbly” (ver Figura 13) (Martínez-del Campo et al, 2011). El análisis de estas cepas utilizando como criterio de reorientación a la VAP, permitiría determinar si este es un criterio de análisis adecuado. La VAP fue interpretada como una medida de la tasa de reorientación de la célula a lo largo de su trayectoria de nado,

partiendo del supuesto de que una célula que presenta un alto número de reorientaciones a lo largo de su trayectoria de nado, tiene una VAP mayor que una célula con una disminuida tasa de reorientación (ver Discusión). Por lo tanto, se asumió que el promedio de valores de VAP de la población de una cepa, refleja la tasa de reorientación de esta. Se cuantificó la Velocidad Angular Promedio (VAP) de 100 células de las cepas: AM1, RS2A, RS2R1 (ver Materiales y Métodos). Podemos decir que los valores de VAP obtenidos (ver Tabla 2), fueron consistentes con los previamente reportados por Martínez-del Campo, ya que se observó una disminución significativa en la VAP para la cepa RS2A, mientras que Martínez-del Campo reportó que dicha cepa presenta una disminución significativa en el número de paros/segundo. A su vez, la cepa RS2R1 presenta una velocidad angular promedio (VAP) significativamente mayor que la cepa AM1, consistente con lo reportado por Martínez-del Campo. Por lo tanto, la VAP de una cepa puede ser un criterio válido que refleja fielmente la tasa de reorientación. Como se mencionó anteriormente, la frecuencia de reorientación representa una medida de la activación de la cinasa de histidina CheA del sistema quimiotáctico, como ha sido reportado para *E. coli* y *B. subtilis* (Lamanna et al, 2002; Gestwicki & Kessling, 2002).

Fue también analizada la cepa RS2B (*mcpB::aadA*), esta mostró una disminución significativa de (VAP), de manera similar que la mutante RS2A (*mcpA::aadA*) (ver Gráfica 1). Vale la pena enfatizar que Martínez-del Campo et al, no obtuvo una diferencia significativa entre el fenotipo de la cepa RS2B y la cepa silvestre AM1 (ver Figura 13).



Gráfica 1. Tasas de reorientación de cepas mutantes obtenidas a partir de la cepa AM1. La Velocidad Angular Promedio (VAP) es una medida de la tasa de reorientación. Para cada cepa fueron analizadas 100 células. En verde se muestran las cepas obtenidas por Martínez-del Campo y en azul las obtenidas en este trabajo.

Cepa	Genes interrumpidos	VAP \pm SD (grados/seg)	Fenotipo
AM1	-	335.12 \pm 90.77	Silvestre
RS2R1	<i>cheR1</i>	1274.02 \pm 129.9	Tumbly
RS2A	<i>mcpA</i>	119.46 \pm 46.51	Smooth
RS2B	<i>mcpB</i>	133.03 \pm 69.54	Smooth
JH1	<i>cheR1 mcpA</i>	143.38 \pm 52.07	Smooth
JH2	<i>cheR1 mcpB</i>	1341.51 \pm 152.18	Tumbly
JH3	<i>cheR1 mcpA mcpB</i>	160.73 \pm 70.15	Smooth
JH1/A	<i>cheR1 mcpA + pRK415_mcpA SD</i>	752.13 \pm 297.07	¿?

Tabla 2. Valores de Velocidad Angular Promedio (VAP) con su respectiva desviación estándar (SD) de las cepas AM1, RS2R1, RS2A, RS2B, JH1, JH2, JH3 y JH1/A. Cada valor de VAP representa el promedio de los valores de VAP que se encuentran dentro de ± 1 SD con respecto a la media poblacional de las 100 células analizadas para cada cepa (ver Materiales y Métodos). Se muestra el fenotipo de cada cepa: silvestre, smooth y tumbly. Mediante una prueba de ANOVA, se determinó que existe una diferencia significativa entre los valores de VAP de las cepas analizadas. Mediante una prueba de Dunnett y una prueba de Tukey, se determinó que las cepas RS2A, RS2B, JH1 y JH3 presentaron una disminución significativa en la VAP con respecto a la cepa silvestre AM1, mientras que las cepas RS2R1 y JH2 presentaron un aumento significativo en VAP con respecto a la cepa silvestre.

Caracterización de la frecuencia de reorientación de las cepas mutantes JH1, JH2 y JH3

Considerando que la VAP puede ser interpretada como una medida de la tasa de reorientación y como una medida de la activación del sistema quimiotáctico, fue cuantificada la VAP de las cepas JH1, JH2 y JH3, con la finalidad de caracterizar sus respectivas tasas de reorientación.

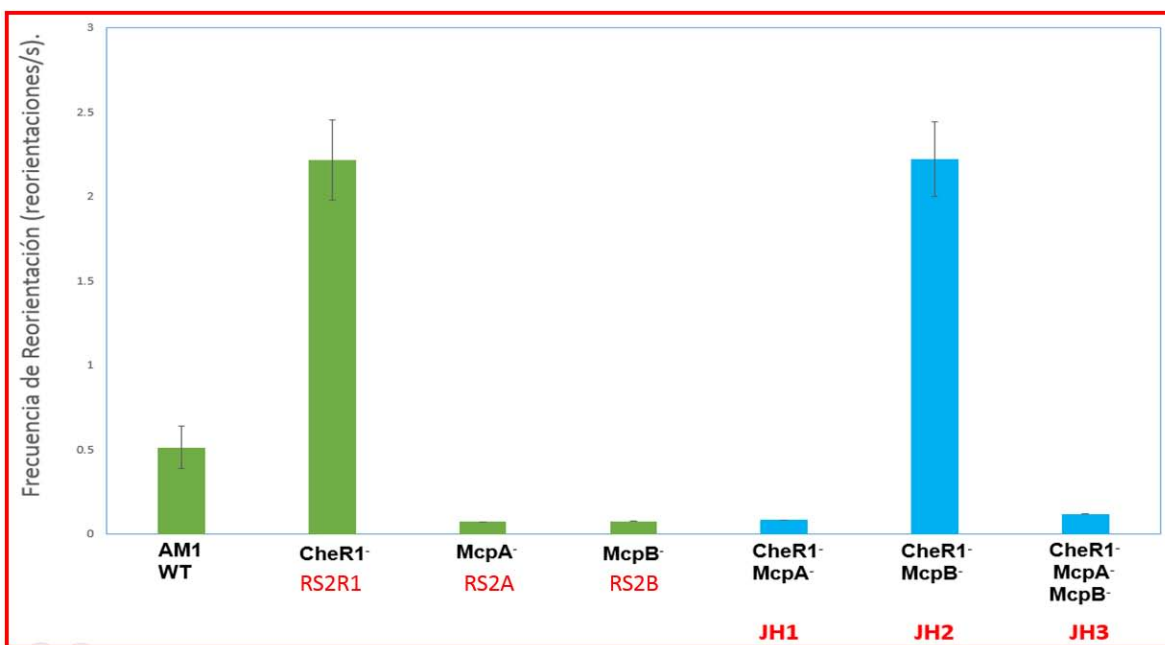
La cepa JH1 (AM1 *cheR1*⁻ *mcpA*⁻) presentó una disminución significativa en la VAP, con respecto a AM1. Lo anterior puede interpretarse como una disminución en la activación de la cinasa CheA1. Asumiendo que los quimiorreceptores McpA, McpB y quizás otros MCPs forman complejos de señalización junto con CheW1 y CheA1, la VAP obtenida en esta cepa sería una medida de la activación de la cinasa dada por McpB y otros receptores. No obstante, la VAP se vio drásticamente disminuida en comparación a la cepa RS2R1 (*cheR1*⁻), y respecto a la cepa AM1. Por lo que el aporte de McpB y otros MCPs en esta condición parece ser mínimo. Mientras que, el aporte en la activación de la cinasa por parte de McpA parece ser el principal.

La cepa JH2 (AM1 *cheR1*⁻ *mcpB*⁻) mostró un aumento significativo en la VAP, con respecto a AM1. Lo que indica un incremento en la activación de la cinasa. En esta cepa se generaría un contexto en el cual los complejos de señalización estarían conformados por McpA y quizás por otros MCPs asociados. Si McpA es responsable de activar a la cinasa en la medida que se activa en la mutante RS2R1 (*cheR1*⁻), se esperaría una activación de la cinasa similar en la cepa JH2. Tras analizar la VAP de ambas cepas, vemos que sus valores de VAP son muy similares, de hecho la VAP de JH2 es ligeramente

mayor que la de RS2R1 (ver Tabla 2). Esto refuerza la idea de que McpA es suficiente para activar a la cinasa, de la manera en que es activada en la mutante RS2R1 (*cheR1*⁻).

La cepa JH3 (**AM1** *cheR1*⁻ *mcpA*⁻ *mcpB*⁻), presentó una disminución significativa en la VAP, con respecto a AM1, de manera similar a lo visto en JH1. Asumiendo que existen otros quimiorreceptores asociados a los complejos de señalización quimiotácticos, en esta mutante veríamos el aporte que tienen en la activación de la cinasa dada la ausencia de CheR1. Por lo tanto, de existir otros MCPs asociados a este sistema quimiotáctico, su aporte en la activación de CheA1 parece ser mínimo, en estas condiciones.

En este trabajo, se calculó también la tasa de reorientación en función al número de reorientaciones por segundo. Un evento de reorientación fue aquel en el que la VAI (Velocidad Angular Instantánea) de la célula supera el umbral de 1,000 grados/segundo. Dichos incrementos corresponden a los momentos de disminución de la velocidad lineal de la célula. Es importante destacar que la tasa de reorientación obtenida mediante la determinación del número de reorientaciones por segundo es consistente con lo obtenido mediante la cuantificación de la VAP (ver Gráficas 1 y 2). En ambas metodologías fueron analizadas las mismas células, obteniendo para ambos casos, que las cepas RS2A, RS2B, JH1 y JH3 mostraron una disminución significativa en la tasa de reorientación con respecto a la cepa silvestre AM1, mientras que las cepas RS2R1 y JH2 tuvieron una tasa de reorientación significativamente mayor.

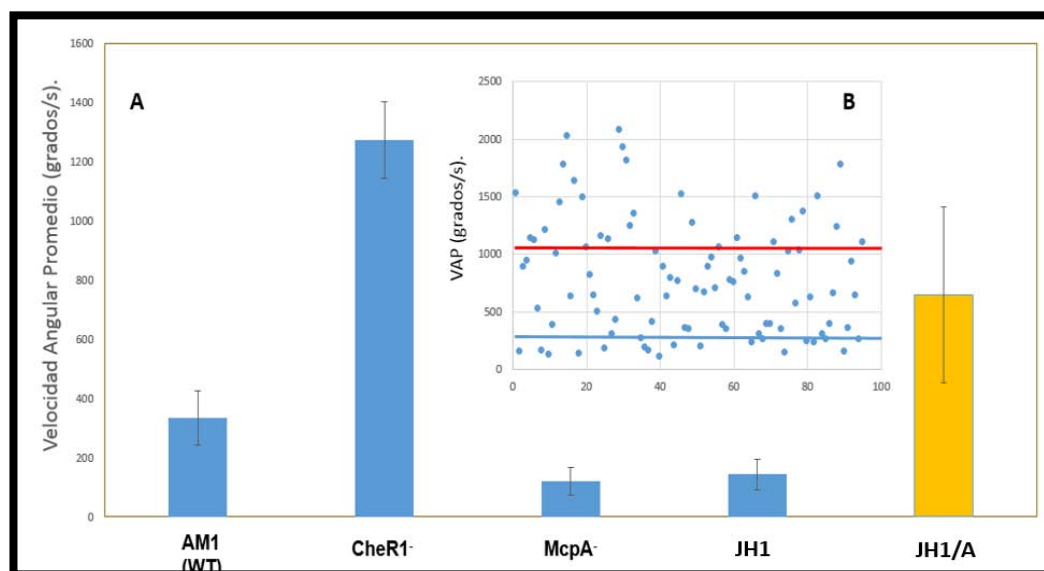


Gráfica 2. Tasas de reorientación de cepas mutantes obtenidas a partir de la cepa AM1. La Frecuencia de Reorientación fue obtenida como el número de reorientaciones por segundo. Para cada cepa fueron analizadas 100 células. En verde se muestran las cepas obtenidas por Martínez-del Campo y en azul las obtenidas en este trabajo.

Análisis de complementación de la cepa JH1

Con la finalidad de determinar si el fenotipo “smooth” observado en la cepa JH1 (*cheR1⁻ mcpA⁻*) era debido a la ausencia de *McpA*. Se llevó a cabo un ensayo de complementación, mediante la incorporación del vector pRK415_*mcpA* SD en la cepa JH1. Dicho vector contiene al gen *mcpA* más una secuencia Shine Dalgarno (SD) ubicada a 7pb río arriba de la metionina de inicio de *mcpA*, con la finalidad de promover la traducción del transcrito. Tras obtener los valores de VAP de la cepa JH1/A, nos percatamos que la VAP de la cepa JH1/A fue significativamente mayor que su cepa parental JH1 (ver Tabla 2), sin embargo, no alcanzó los niveles obtenidos por la cepa RS2R1 (*cheR1⁻*) (fenotipo parental), por lo que parece una complementación parcial (ver Gráfica 3A), esto a pesar de que al gen *mcpA* presente en la construcción pRK415_*mcpA*-SD, fue clonado río abajo de una secuencia consenso de unión a ribosomas (secuencia Shine Dalgarno), con la finalidad de facilitar su traducción. Lo anterior se hizo ya que previamente se había tratado de complementar la cepa JH1 utilizando un plásmido que no contaba con el sitio de unión al ribosoma, río arriba del gen *mcpA*, y no había sido posible recuperar el fenotipo parental. Es de destacar que la población de células analizada (con pRK415_*mcpA*-SD) presentó valores de VAP variables, ya que mientras que algunas células conservaron el fenotipo de JH1 (*cheR1⁻ mcpA⁻*), la VAP de otras células era la típica de la cepa RS2R1 (ver Gráfica 3B). Solo el 20% de las células analizadas presentaron valores de VAP por debajo del valor máximo esperado para la cepa parental JH1. En la Figura 35, se muestran las gráficas de dispersión de los valores de VAP poblacionales de las cepas AM1, RS2R1 y JH1 (ver Figura 35, en la sección de Anexos).

Las cepas JH2 y JH3 no fueron analizadas mediante la introducción del alelo silvestre, ya que como sus fenotipos son tan parecidos a los de las cepas parentales, se vería muy limitada nuestra capacidad de probar su complementación.



Gráfica 3. Tasas de reorientación de la cepa JH1/A en función de la VAP. A. Gráfica de VAP de las cepas JH1 y su complementación JH1/A. B. Gráfica de dispersión de las células analizadas de la cepa JH1/A. La línea roja muestra el valor mínimo de VAP esperado para AM1 *cheR1⁻* (1040 grados/s), mientras que la línea azul representa el valor máximo de VAP esperado para *McpA⁻* (281 grados/s). Los valores graficados son previos a la selección de +/-1 SD (ver Materiales y Métodos).

Regulación transcripcional de *cheOp1*

Expresión de McpA-FLAG

Para responder a la pregunta de si la regulación transcripcional de *mcpA* está dada por el regulador maestro CtrA, uno de nuestros objetivos era poder inmunodetectar a la proteína McpA en extractos celulares totales de las cepas AM1 y AM1 *ctrA*⁻. Para ello se decidió fusionar a *mcpA* una etiqueta FLAG, que posteriormente nos permitiera inmunodetectar a la proteína en un Western blot, utilizando un anticuerpo anti FLAG. Para ello fueron clonados los últimos 700 pb del gen *mcpA* en el vector pFLGC-1. El plásmido obtenido fue movilizado a la cepa AM1. Dado que el vector pFLGC-1 es un plásmido integrativo y este puede integrarse en puntos del genoma que no corresponden a la región de interés (gen *mcpA*), se hizo un Western blot anti FLAG de 6 candidatas resistentes a Spc (el vector pFLGC-1 le confiere a la bacteria la resistencia hacia el antibiótico Spc). Las candidatas 1, 4 y 5 presentaron una banda cercana al peso esperado para la proteína McpA (83.8kDa) (ver Figura 18). Es importante mencionar que con este resultado se confirma la expresión de este quimiorreceptor bajo la condición de crecimiento fotoheterotrófica en medio mínimo de Sistrom adicionado con 88 μ M de ácido succínico como fuente de carbono en la cepa AM1. La candidata 4 fue seleccionada para experimentos posteriores (JV1) (ver Figura 18).

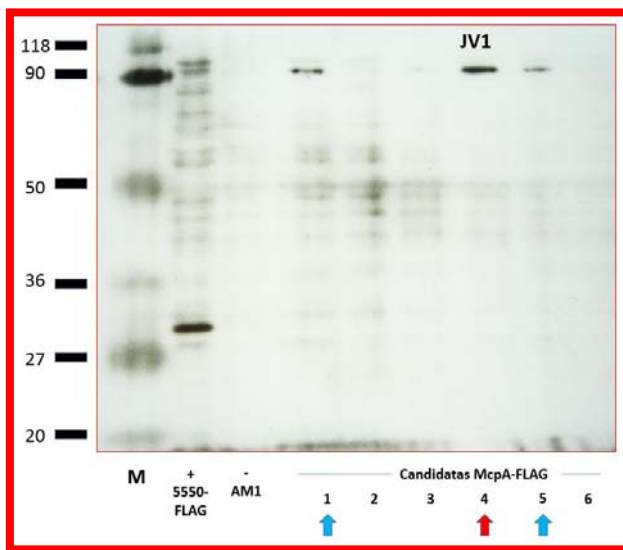


Figura 18. Western Blot anti FLAG para la detección de McpA-FLAG. Se indican con flechas las candidatas que presentaron la fusión McpA-FLAG. Con una flecha roja se indica la candidata que se utilizó para experimentos posteriores (JV1). El control positivo utilizado en este experimento fue la proteína fusión 5550-FLAG, codificada por el marco de lectura RSWS8N_05550. Condición de crecimiento fotoheterotrófica en medio mínimo de Sistrom adicionado con 88 μ M de ácido succínico.

Expresión de McpA-FLAG en AM1 *ctrA*⁻

Para responder a la pregunta de si la regulación transcripcional del receptor McpA codificado en el operón quimiotáctico *cheOp1* es dependiente del factor transcripcional CtrA, se generó una cepa mutante en el gen *ctrA* partiendo de la cepa JV1. La cepa obtenida (JV2) presenta interrumpido el gen *ctrA* con el casete de resistencia a higromicina, por lo que presenta resistencia a los antibióticos Spc e Hyg. Se obtuvieron extractos celulares totales de las cepas AM1, JV1 y JV2 bajo la condición de crecimiento fotoheterotrófica (anaeróbica) en medio mínimo de Sistrom adicionado con 88 μ M de

ácido succínico. Se probó la presencia de la proteína McpA-FLAG en los extractos celulares totales, mediante un Western Blot anti FLAG. Los resultados muestran que la presencia del quimiorreceptor McpA codificado en el *cheOp1* es dependiente del regulador CtrA en la condición probada (ver Figura 19).

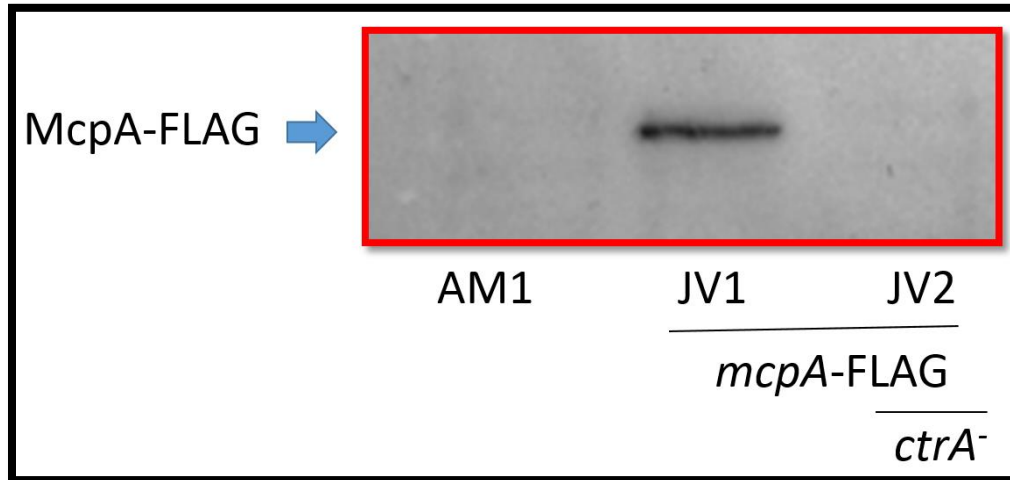
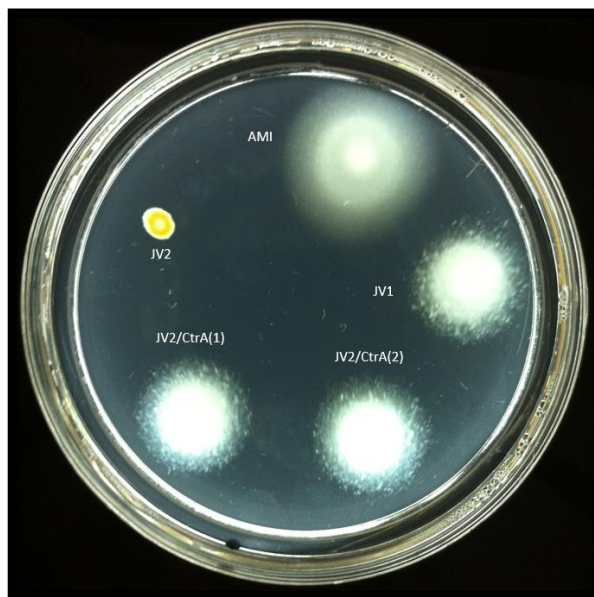


Figura 19. Western Blot anti FLAG para la detección de McpA-FLAG. Las cepas fueron crecidas en la condición fotoheterotrófica (anaeróbica) en medio mínimo de Sistrom adicionado con 88 μ M de ácido succínico.

Complementación de la cepa JV2

Se caracterizó el fenotipo de nado de la cepa JV2 (AM1 *mcpA-flag ctrA::Hyg*), y se observó que a diferencia de la cepa JV1 (AM1 *mcpA-flag*) (cepa parental), esta es incapaz de desplazarse, lo cual se explicó por la pérdida de CtrA, que se sabe regula la expresión de genes flagelares en esta bacteria (Vega-Baray et al, 2015). Para verificar que el gen CtrA está interrumpido con el casete de resistencia a higromicina en la cepa JV2, se llevó a cabo un ensayo de complementación de esta cepa, mediante la inserción del plásmido pRK415_ctrA (JV2/CtrA) (ver Materiales y Métodos). La complementación de JV2 fue probada mediante la comparación de la capacidad de nado de esta cepa con respecto a las cepas JV1 (cepa parental) y AM1 en cajas de agar suave. Podemos observar que la cepa JV2/CtrA recuperó el fenotipo de nado de su cepa parental, expresando CtrA desde el vector pRK415. Además, se observa una disminución del diámetro de halo de nado de la cepa JV1 con respecto a AM1 (ver Figura 20), que puede deberse a la pérdida de la funcionalidad de McpA por la adición del péptido FLAG al extremo C-terminal de McpA.

Figura 20. Complementación de la cepa JV2. Capacidad de nado de las cepas AM1, JV1 (AM1 *mcpA-flag*), JV2 (AM1 *mcpA-flag ctrA::Hyg*) y JV2/CtrA en caja de agar suave (0.22% agar, MM de Sistrom adicionado con 100 μ M de ácido succínico. Crecimiento fotoheterotrófico anaeróbico).



Inmunodetección de CheY2 y CheY5 en la cepa AM1 *ctrA*⁻

Con base en lo observado para la regulación transcripcional de *McpA*, se planteó la posibilidad de que el resto de genes quimiotácticos contenidos en *cheOp1*, también estuvieran regulados por *CtrA*. Por lo que se realizó la inmunodetección de las proteínas CheY2 y CheY5 codificadas en este operón. Para ello fueron empleados los anticuerpos anti-CheY2 y anti-CheY5 previamente obtenidos (ver Materiales y Métodos). La inmunodetección se llevó a cabo en extractos totales de las cepas AM1, EA1 (*ctrA*⁻), RS2Y1 (*cheY1*⁻), RS2Y2 (*cheY2*⁻), RS2Y2 (*cheY5*⁻), WS8N y SP13 (*fleQ*⁻). Las diferentes cepas fueron crecidas en la condición fotoheterotrófica (anaeróbica) en medio mínimo de Sistrom adicionado con 88 μ M de ácido succínico. Los resultados demuestran que ambas proteínas están reguladas por *CtrA*. Es importante señalar que bajo esta condición de crecimiento ninguna de las CheYs se expresa en la cepa WS8, ni en su cepa derivada SP13 (carente del activador transcripcional *FleQ*) (ver Figura 21).

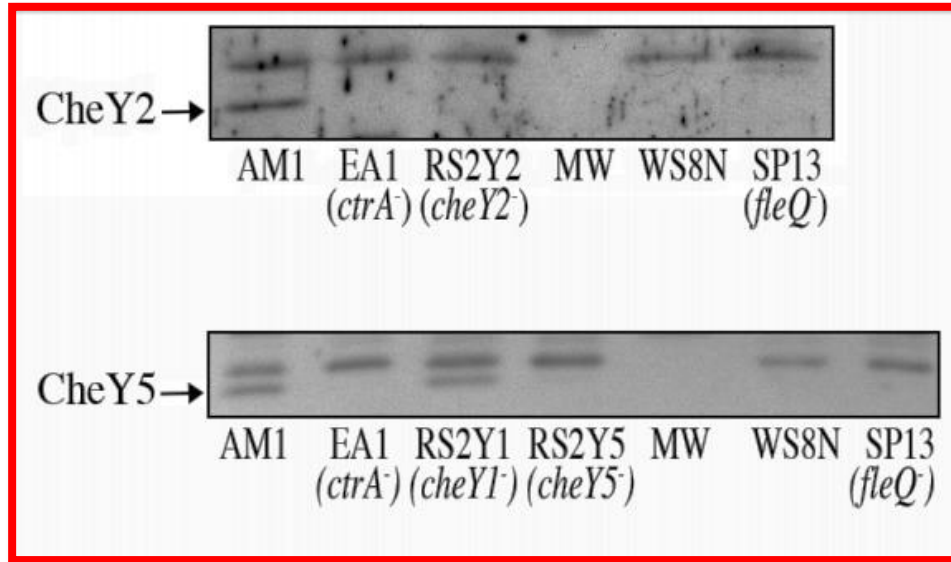


Figura 21. La proteína CtrA es necesaria para la expresión de CheY2 y CheY5. Western Blot anti CheY2 y anti CheY5. Las diferentes cepas fueron crecidas en la condición fotoheterotrófica (anaeróbica) en medio mínimo de Sistrom adicionado con 88 μ M de ácido succínico.

Identificación del posible sitio de unión de CtrA del *cheOp1* mediante análisis bioinformático

Dado que la regulación de CheY2, CheY5 y McpA-FLAG mediada por CtrA, podría deberse a un efecto directo del regulador sobre la expresión de *cheOp1* o aun efecto indirecto, en el cual CtrA podría activar la expresión de una proteína activadora de *cheOp1*, se decidió analizar la región regulatoria de *cheOp1*, con el fin de identificar posibles sitios de unión a CtrA, que dieran sustento a la hipótesis de que CtrA activa directamente la transcripción de este operón. Para ello se analizó el genoma de la cepa WS8N, empleando la Matriz de Peso Posicional obtenida a partir del regulón de CtrA de *C. crescentus*, con un pval de $1e-4$, se obtuvo un posible sitio de unión a CtrA, con la secuencia TTAGggaaccTTATG (score: 6.4), ubicado a 67 pb río arriba de la posible metionina de inicio del ORF RSWS8N_02465 el cual se ubica río arriba del gen *cheY5* (ver Figura 22).

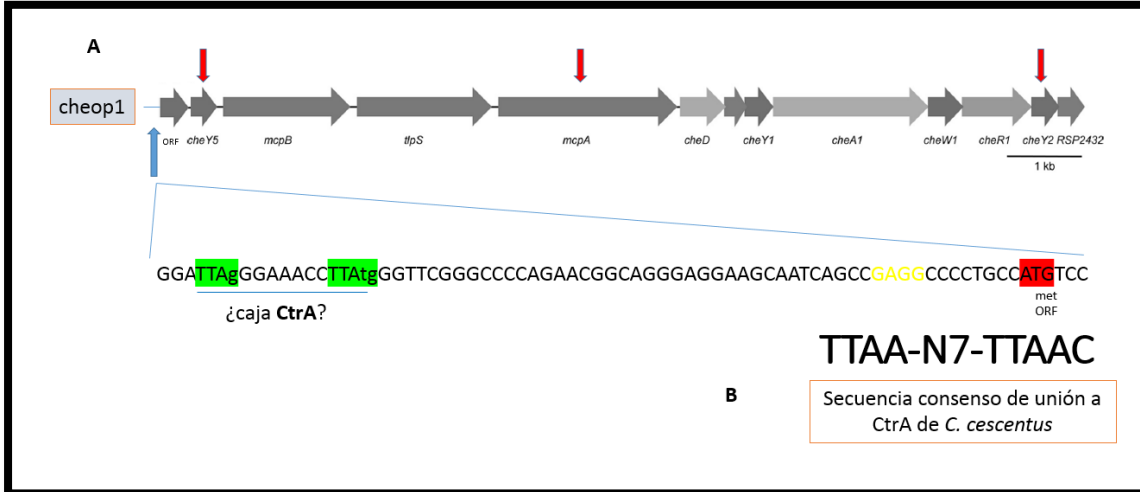


Figura 22. Posible sitio de unión de CtrA en la región regulatoria del *cheOp1*. **A**. El posible sitio de unión a CtrA está ubicado a 67 pb río arriba de la putativa metionina de inicio del ORF RSWS8N_02465 localizado río arriba del gen *cheY5*. En rojo se marca el posible codón de inicio de la traducción de RSWS8N_02465. En amarillo se muestra la posible secuencia Shine-Dalgarno. Las flechas indican los genes cuya expresión depende de CtrA (probado en este trabajo) **B**. Secuencia consenso de unión de CtrA de *C. crescentus*.

Análisis Bioinformático

Con la finalidad de identificar posibles dominios y residuos involucrados en el funcionamiento de las proteínas McpA y McpB de *R. sphaeroides*, se llevó a cabo su análisis bioinformático.

Análisis bioinformático de McpA y McpB

McpA es una proteína de 792 a.a. Presenta un peso molecular teórico de 83.76 kDa (ExPASy Compute pl/Mw tool). Tras realizar una predicción de dominios conservados, se determinó la presencia del **Dominio de Señalización**, característico de los MCPs, el cual se encuentra altamente conservado, así como de un dominio **PAS** (e-value: 4.89e-04) (NCBI Conserved Domain Search). Se predicen dos cruces transmembranales en el extremo N-terminal, que corresponden a los residuos 21-31 (**TM1**) y 166-179 (**TM2**) ("DAS" - Transmembrane Prediction Server). Entre los cruces transmembranales existe una región de 135 a.a. que corresponde al dominio periplásmico de unión a ligando. Los últimos 5 a.a. en el extremo C-terminal, corresponden al pentapéptido **GWEDF**, que representa el motivo de reclutamiento de las proteínas de adaptación (ver "Posible función del pentapeptido GWEDF de McpA", en la sección de Anexos). Mediante un alineamiento de secuencias entre los receptores Tar, Tsr, Trg, McpA y McpB, se observa que existen dos posibles regiones de metilación (**M1** y **M2**) que flanquean el dominio de señalización, dichas regiones corresponden a las regiones metilables K1 y R1 de Tar, Tsr y Trg de *E. coli* (Nowlin et al, 1987). El alineamiento de estas regiones muestra residuos conservados de glutamina y glutamato que podrían ser modificados por CheR y CheB (Ver Figura 23 y Figura 24). Además, se observa que McpA presenta 10 de 11 residuos conservados para la formación de contactos triméricos con otros MCPs, teniendo solo la sustitución I377L (ver Figura 25).

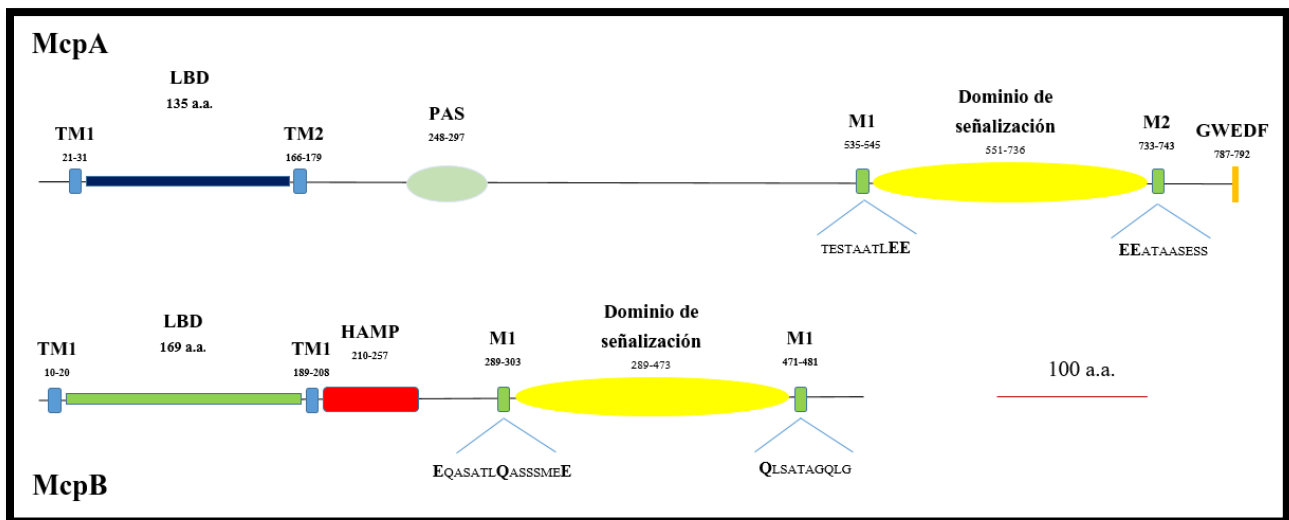


Figura 23. Representaciones esquemáticas de los dominios y regiones relevantes identificados en los quimiorreceptores McpA y McpB tras su análisis bioinformático.

Figura 24. Alineamiento entre Tar, Tsr, Trg, McpA y McpB para la búsqueda de posibles regiones metilables. Los residuos encerrados en cuadros rojos corresponden a los sitios de metilación conocidos para Tar, Tsr y Trg de *E. coli* (Nowlin et al, 1987).

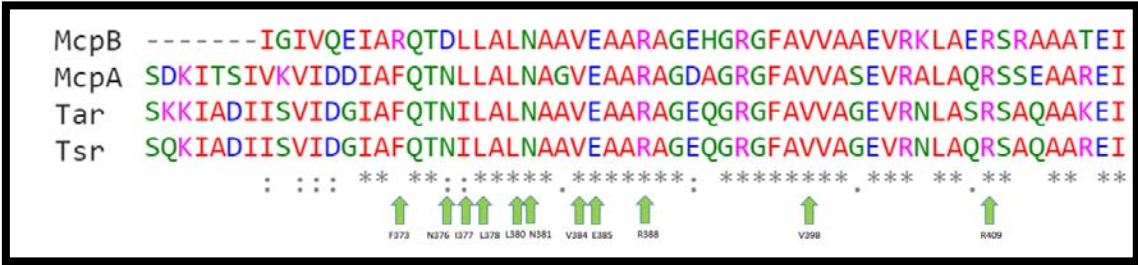


Figura 25. Alineamiento entre Tar, Tsr, McpA y McpB de *E. coli* y *R. sphaeroides* para la identificación de residuos clave para la formación de contactos triméricos entre dímeros de receptores. Las flechas verdes indican los residuos relevantes para la formación de contactos triméricos en el receptor Tsr de *E. coli* (Ames et al, 2002).

El dominio PAS está presente en proteínas de arqueas, bacterias, plantas, animales y hongos. En bacterias está involucrado en el sentido del estado redox de la célula, en el sentido de luz, oxígeno y de algunas otras moléculas. Este dominio puede ser periplásmico o citoplásmico. Cuando el dominio PAS es periplásmico, se asocia al sentido directo de O₂, NO, CO (Sampedro et al, 2014) y de aminoácidos como asparagina (Glekas et al, 2010), en algunos MCPs. Además se ha vinculado en el sentido de ácidos carboxílicos tipo C3-C4 (ej. malato y succinato) y C6 (citrato) (Krämer et al, 2007), así como en el sentido de luz (Ávila-Pérez et al, 2006) y de cationes divalentes como Mg²⁺ (García-Vescovi et al, 1997), en algunas cinasas de histidina sensoras.

Cuando el dominio PAS es citoplásmico participa principalmente en el sentido del estado redox de la célula, pudiendo asociarse a flavinas (FMN y FAD). En el caso de la aerotaxis de *E. coli*, lo hace mediante la unión de FAD (componente de la cadena respiratoria) (Bibikov et al, 2004). El sistema de dos componentes ArcA/ArcB regula el metabolismo energético de *E. coli*, en este, el dominio PAS de ArcB interactúa con ubiquinonas (activan su actividad cinasa) y menaquinonas (inhiben su actividad cinasa), que generan y rompen puentes disulfuro respectivamente entre cisteínas de dicho dominio. La activación del sistema es dada en condiciones anaeróbicas, en las que se aumenta la producción

de menaquinona, mientras que en condiciones aeróbicas en que las ubiquinonas predominan, se inhibe el sistema (Nuñez-Oreza et al, 2014).

En *B. subtilis*, PhoR es una cinasa sensora, cuyo dominio PAS intracelular permite el sensado de un intermediario en el metabolismo del ácido teicoico (uno de los componentes de la pared celular de esta bacteria) durante la respuesta a limitación de fosfatos (Botella et al, 2014).

La ubicación del dominio PAS citoplásmico es variable entre las proteínas Aer, PhoR y ArcB, se observa que puede encontrarse antes o después del cruce transmembranal (ver Figura 26).

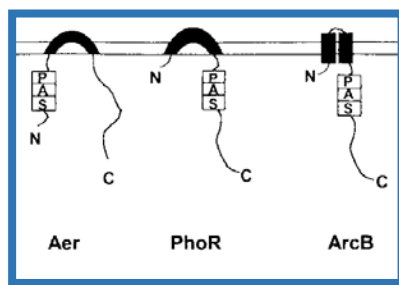


Figura 26. Representaciones esquemáticas del quimiorreceptor Aer y de las cinasas de histidina sensoras PhoR y ArcB. Modificado de Thaylor & Zhulin, 1999.

Independientemente de la posición del dominio PAS citoplásmico en la proteína, este dominio está frecuentemente asociado al sensado del metabolismo celular, principalmente al estado redox. Por lo tanto, el putativo dominio PAS de McpA podría tener una función similar.

McpB. Es una proteína de 560 a.a. Presenta un peso molecular teórico de 59.9kDa (Expasy Compute pl/Mw tool). Tras realizar una predicción de dominios conservados, se identificó el **Dominio de Señalización** altamente conservado, característico de los MCPs, así como del dominio linker **HAMP** (NCBI Conserved Domain Search). Se predicen dos cruces transmembranales en el extremo N-terminal, que corresponden a los residuos 10-20 (**TM1**) y 189-208 (**TM2**) ("DAS" - Transmembrane Prediction Server). Entre los cruces transmembranales existe una región aproximada de 169 a.a. que corresponde al dominio periplásmico de unión a ligando. Dicha región muestra una alta similitud con los dominios LBD de Tar y Tsr de *E. coli* (e-value: 7.4e-09) (ver Figura 23). Mediante un alineamiento de secuencias entre los receptores Tar, Tsr, Trg, McpA y McpB, se sugiere que existen dos posibles regiones de metilación (**M1** y **M2**) que flanquean el dominio de señalización, dichas regiones corresponden a las regiones metilables K1 y R1 de Tar, Tsr y Trg de *E. coli* (Nowlin et al, 1987) (Ver Figura 23 y Figura 24). Además, McpB tiene 8 de 11 residuos conservados para la formación de contactos triméricos, presentando tres sustituciones: F373R, N376D y I377L (ver Figura 25).

Los dominios periplásmicos de Tar y Tsr de *E. coli* han sido ampliamente descritos. Tras comparar los residuos involucrados directamente en la unión al ligando de Tar y Tsr (Milburn et al, 1991; Tajima et al, 2011) en un alineamiento de secuencias peptídicas con McpB, podemos ver que muchos de estos residuos se encuentran conservados en McpB. La mayor similitud se encuentra entre McpB y Tar, ya que de los 8 residuos del sitio de unión a Asp, 3 son idénticos y 3 pertenecen al mismo grupo. Para el

caso de Tsr, sólo 5 residuos de 14 fueron idénticos, mientras que 2 fueron similares (ver Figura 27 y Figura 28). A partir de este análisis podemos decir que es probable que McpB sense aminoácidos.



Figura 27. Alineamiento entre Tar de *E. coli* y McpB de *R. sphaeroides* para la identificación de los residuos importantes en la interacción con el ligando aspártico. En amarillo se indican los residuos clave que se sugieren para la especificidad de ligando (Milburn et al, 1991; Tajima et al, 2011).



Figura 28. Alineamiento entre Tsr de *E. coli* y McpB de *R. sphaeroides* para la identificación de los residuos relevantes en la interacción con el ligando Serina (Tajima et al, 2011).

DISCUSIÓN

Control quimiotáctico

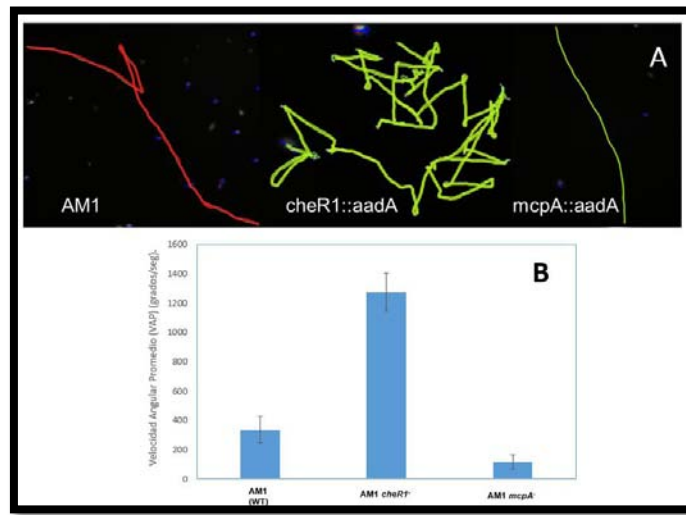
Uso de la VAP como criterio de reorientación

El nado celular puede describirse como el resultado de la alternancia entre dos modos de movimiento celular: corridas y reorientaciones. En la quimiotaxis de *E. coli* la reorientación es el resultado del cambio en la rotación del flagelo de un sentido CCW a CW, debido a la activación de la cinasa CheA y por lo tanto de la producción de CheY-P y de su interacción con FliM, provocando un cambio en la dirección de nado con respecto a la trayectoria de nado que la célula presentaba justo antes de reorientarse.

Hoy en día, no existe un estándar bien definido para determinar de forma automatizada que parámetros definen un evento de reorientación durante el nado bacteriano. Una propuesta inicial consistió en definir un evento de reorientación en *R. sphaeroides* como aquel en el cual la velocidad lineal de la célula se viera disminuida a menos de 10 micras/segundo (Martínez-del Campo et al, 2011). Por otro lado, Topp y Gallivan consideraron que una reorientación en *E. coli* era aquella en la cual la velocidad lineal de la célula fuera menor al 30% de la velocidad máxima alcanzada y que la tasa de cambio de dirección fuera mayor a 5.9 rad/seg durante dos cuadros consecutivos (Topp & Gallivan, 2007). Sin embargo, dado que disminuciones en la velocidad lineal, no implican necesariamente cambios en la trayectoria de nado o eventos de reorientación, en este trabajo proponemos el utilizar los valores de Velocidad Angular (VA) como una medida de la tasa de reorientación.

Para fundamentar el uso de la VA como medida de la frecuencia de reorientación, hemos considerado que cuando una partícula se reorienta exhibe un ángulo girado entre la trayectoria de nado nueva y la vieja, en *E. coli* el ángulo girado en promedio es de 70° (Lamanna et al, 2002). Una manera de representar el ángulo girado de una partícula a lo largo del tiempo es la VA. La VA es el desplazamiento angular de un objeto con respecto al tiempo. Por lo tanto, una célula que presenta un alto número de reorientaciones a lo largo de su trayectoria de nado presentará una VA mayor que una célula que presenta una disminuida tasa de reorientación. Si calculamos el promedio de la VA a lo largo de una trayectoria definida para una célula, entonces podremos tener una medida de su tasa de reorientación (a lo largo del espacio y el tiempo), dicho de otra manera podremos conocer el fenotipo de reorientación de una célula, y por lo tanto de manera indirecta una medida de la activación de la cinasa de su sistema quimiotáctico (Lamanna et al, 2002; Gestwicki & Kessling, 2002; Rosser et al, 2013) (ver Figura 29).

Figura 29. Correlación entre la frecuencia de reorientación y la VAP. A. Trayectorias de nado representativas de las cepas AM1, AM1 *cheR1*⁻ y AM1 *mcpA*⁻. B. VAP de las cepas AM1, AM1 *cheR1*⁻ y AM1 *mcpA*⁻. Fueron analizadas 100 células por cepa.



En el presente trabajo, se determinó la Velocidad Angular Promedio (VAP) de 100 trayectorias de nado con duración de 2 a 10 seg, de las diferentes cepas provenientes de AM1, empleando el programa CellTrack 1.5. Los promedios de VAP de cada cepa representan su respectiva tasa de reorientación (Ver Gráfica 1). Tal y como se demostró en el presente trabajo, el uso de la VAP fue consistente en términos generales con los resultados de Martínez- del Campo, lo que indica que la VAP refleja los parámetros esenciales que se consideran como reorientación. No obstante, con este criterio se hizo evidente que el fenotipo de nado de la cepa RS2B (*mcpB*⁻), difiere del de la cepa silvestre, sugiriendo que la VAP podría ofrecer una alternativa altamente sensible, como para diferenciar alteraciones menores en las trayectorias de nado.

Conducta de nado de las cepas mutantes

A diferencia de *E. coli*, los receptores desmetilados en el sistema quimiotáctico que regula al flagelo 2 de *R. sphaeroides*, activan a la cinasa. Esta conclusión se basa en el fenotipo de la mutante simple en *cheR1* (RS2R1), que muestra un incremento en la tasa de reorientación y por lo tanto un aumento en la activación de CheA1 (Martínez- del Campo et al, 2011).

La VAP de la cepa *cheR1*⁻ (RS2R1), es una medida de la activación de la cinasa total generada por los MCPs de este sistema quimiotáctico, dado su estado desmetilado. Por lo tanto puede ser vista como una medida de la concentración de CheY-P producida por CheA1.

En este trabajo determinamos que ambas mutantes simples RS2A (*mcpA*⁻) y RS2B (*mcpB*⁻), muestran una disminución de la VAP, con respecto a la cepa AM1, lo que implica que ambas proteínas están involucradas en el control quimiotáctico del flagelo 2, ya que ambas tienen la capacidad de activar a CheA1. En otras palabras, de no estar presente alguno de los dos MCPs, la activación de CheA1 se ve disminuida. El fenotipo de la cepa RS2B (*mcpB*⁻) resultó ser significativamente diferente al fenotipo silvestre, según las dos metodologías de análisis utilizadas en este trabajo: VAP y frecuencia de reorientación (paros/seg), a diferencia de lo obtenido por Martínez- del Campo et al, 2011.

La idea de generar las dobles y triple mutantes AM1 *cheR1*⁻ *mcpA*⁻; AM1 *cheR1*⁻ *mcpB*⁻ y AM1 *cheR1*⁻ *mcpA*⁻ *mcpB*⁻, fue el analizar el aporte individual en la activación del sistema por parte los receptores

McpA y McpB, así como de otros MCPs asociados, en un contexto en el cual su estado desmetilado, dado por la ausencia de CheR1 en todas ellas, favorecería la activación de la cinasa. Esto considerando que en condiciones silvestres CheR1 es su metiltransferasa.

Asumiendo que los quimiorreceptores McpA y McpB forman complejos de señalización junto con CheW1 y CheA1 (como ha sido ampliamente reportado para otros sistemas quimiotácticos), en la doble mutante **AM1 *cheR1⁻ mcpA⁻***, se generaría un contexto celular en el cual los complejos de señalización estarían conformados por McpB y otros MCPs asociados. De ser dependientes de CheR1, al estar desmetilados, activarían el sistema. Por lo tanto, la VAP obtenida en esta cepa sería una medida de la activación de la cinasa dada por McpB y otros receptores. Sorprendentemente, la VAP se vio drásticamente disminuida en comparación a la mutante simple RS2R1, además de una disminución significativa con respecto a AM1. Dado que los valores de VAP se encuentran por debajo de los valores de la cepa silvestre, es factible suponer que el aporte de McpB y otros MCPs debe ser mínimo o nulo, resultado que se ve seriamente contrastado por el de la mutante simple en McpB, en la que parece tener un aporte en la activación de la cinasa. Considerando que la única diferencia entre esta cepa y la mutante simple en CheR1 es la ausencia de McpA, la activación de la cinasa debe ser mediada principalmente por McpA.

En la doble mutante **AM1 *cheR1⁻ mcpB⁻***, se generaría un contexto en el cual los complejos de señalización estarían conformados por McpA y otros MCPs asociados. Si McpA es responsable de activar a la cinasa en la mutante simple RS2R1 (*cheR1⁻*), se esperaría una activación de la cinasa muy similar a lo observado en la mutante RS2R1 (*cheR1⁻*). Tras analizar la VAP de ambas cepas, vemos que sus valores de VAP son muy similares. De hecho la VAP de JH2 (*cheR1⁻ mcpB⁻*) es ligeramente mayor que la de RS2R1 (*cheR1⁻*) (ver Tabla 2). Esto refuerza la idea de que McpA es suficiente para activar a la cinasa, de la manera en que es activada en la mutante RS2R1 (*cheR1⁻*).

En la triple mutante podría detectarse el aporte que otros MCPs tienen en la activación de la cinasa dada la ausencia de *cheR1* (RS2R1). Sorprendentemente, la VAP se vio significativamente disminuida en comparación a la cepa silvestre.

Las dobles y triple mutantes indican que McpA es suficiente para activar a la cinasa a los niveles de la mutante simple en *cheR1*.

El resultado de las dobles y triple mutantes puede interpretarse de dos maneras. La primera es que solo McpA es dependiente de CheR1, y que por lo tanto en la cepa JH1 (AM1 *cheR1⁻ mcpA⁻*), no habría ningún otro receptor desmetilado capaz de activar a la cinasa, mientras que en la cepa JH2 (AM1 *cheR1⁻ mcpB⁻*), McpA al ser el único receptor desmetilado activaría a la cinasa a niveles similares a los vistos en la mutante simple RS2R1 (*cheR1⁻*). Finalmente la triple mutante lo corroboraría, ya que de existir algún otro MCP dependiente de CheR1, se vería algún incremento en la VAP con respecto a la cepa silvestre, cosa que no se observó. Sin embargo no tendría sentido biológico que solo un MCP fuera dependiente de la metiltransferasa que controla a este sistema, ya que como se ha visto en otras bacterias, múltiples MCPs están bajo el control de la misma CheR. A pesar de que no se ha probado que la expresión de CheR2 y CheR3 de *R. sphaeroides* sea exclusiva de WS8 (Fla1⁺), se ha probado que CheR2 está involucrado en el cluster polar y CheR3 en el cluster citoplásmico que regulan al flagelo 1. A su vez se ha demostrado que CheR1 no participa en el control quimiotáctico de este sistema flagelar, por lo que es exclusivo del sistema flagelar 2 (Martin et al, 2001). Por lo cual

no podemos descartar la participación de CheR2 en el sistema quimiotáctico que controla al flagelo 2.

Por otro lado, debemos recordar que los quimiorreceptores MCPs, se encuentran asociados entre sí en diferentes niveles de organización. El más básico está constituido por un homodímero. Tres homodímeros conforman un trímero de dímeros. A diferencia del homodímero, la composición del trímero puede ser heterogénea, coexistiendo receptores de alta y baja abundancia. A su vez, los trímeros de dímeros están asociados entre sí mediante las proteínas CheA y CheW, generando arreglos hexagonales. La asociación generada entre trímeros de dímeros permite su intercomunicación, logrando una adecuada amplificación de señales. Es gracias a esto, que receptores de baja abundancia como Trg y Tap de *E. coli*, pueden señalizar (activar o inactivar a la cinasa) de la misma manera que lo hacen los receptores de alta abundancia Tar y Tsr (Li & Weis, 2000; Briegel et al, 2012; Liu et al, 2012; Bi & Lai, 2015; Li & Hazelbauer, 2011; Parkinson et al, 2015).

Para lograr una adecuada comunicación inter-receptor, los complejos proteicos MCPs/CheW/CheA deben ser estables. Se ha visto que al mutar los residuos clave en la interacción trimérica de los homodímeros, se ve afectada la estabilidad del complejo sensorial, perjudicando su funcionalidad y por lo tanto la activación de CheA (Ames et al, 2002). A su vez, en la ausencia de receptores de alta abundancia (Tar y Tsr), las células de *E. coli* presentan una disminución en la frecuencia de reorientación, por lo tanto en la activación de la cinasa, así como de una respuesta quimiotáctica inefectiva hacia los ligandos de los receptores de baja abundancia (Tap y Trg) (Barnakov et al, 1998). El aumentar la concentración de Trg en la célula al mismo nivel que el conjunto de MCPs silvestres, no disminuyó este efecto, sin embargo, la adición del dominio citoplásmico de un MCP de alta abundancia al receptor Trg, si lo hizo (Feng et al, 1997), permitiéndole tener una adecuada respuesta quimiotáctica. Lo anterior fue atribuido a la importancia del pentapéptido NWTEF presente en el dominio citoplásmico del MCP, para permitir el reclutamiento de CheR y por lo tanto de asegurar adecuados niveles de metilación de los receptores de baja abundancia. Sin embargo, la adición de dicho pentapéptido al receptor de baja abundancia Tap, no restauró la quimiotaxis mediada por Tap, ni la marcada disminución de la activación de la cinasa (Weerasuriya et al, 1998). Estas observaciones sugieren que la habilidad de soportar la quimiotaxis podía ser más compleja que tan solo variaciones en los estados de metilación de los MCPs (Lybarger & Maddock, 2000).

Ahora sabemos que a pesar de que todos los MCPs de *E. coli* pueden localizarse polarmente, aun cuando se les expresa de manera única en la célula, se ha demostrado que su habilidad para formar los complejos de señalización varía. Cepas que solo expresan alguno de los receptores de alta abundancia, son capaces de formar los complejos de señalización como en la cepa silvestre, en cambio, células que solo expresan alguno de los receptores de baja abundancia (Trg y Tap) son deficientes en su formación. Por ejemplo, en una cepa mutante de *E. coli* que solo expresa al receptor Trg, la formación de complejos sensoriales disminuye un 75% en comparación a los observados en la cepa silvestre (Lybarger & Maddock, 2000). De manera consistente, se ha demostrado que ligandos multivalentes son capaces de formar complejos de señalización de mayor estabilidad que los silvestres, incrementando la sensibilidad y amplificación de la señal de los complejos de señalización (Gestwicki & Kessler, 2002).

Lo anterior destaca la importancia de los complejos de señalización para lograr un adecuado control de la cinasa. La funcionalidad de dichos complejos depende principalmente de la composición, concentración e interacciones entre los componentes (Sourjik & Berg, 2004; Parkinson et al, 2015).

A partir de estas consideraciones, una explicación alternativa para nuestros resultados, es que McpA sea necesario para la formación de complejos sensoriales funcionales, mediante los cuales el resto de los MCPs dependientes de CheR1 pudieran señalar.

Con base en la idea anterior, es factible suponer que un complejo de señalización funcional estaría formado principalmente por McpA, CheW1 y CheA1, así como por otros receptores expresados en esta condición. En ausencia de CheR1 (cepa RS2R1) los receptores desmetilados "X" incluyendo a McpA, activarían a CheA1, incrementando la tasa de reorientación con respecto a la cepa silvestre (lo visto en CheR1 podría ser la suma de la activación dada por varios receptores). Si a dicho complejo sensorial se le quita McpA su funcionalidad se vería afectada, quizás por la estabilización de los complejos, dada por este receptor. Así, en la cepa JH1 (*cheR1⁻ mcpA⁻*), los receptores desmetilados (dependientes de CheR1) serían incapaces de activar a la cinasa. Por lo tanto, McpB que ya había mostrado poder regular a la cinasa, ahora no puede hacerlo. En la cepa JH2 (*cheR1⁻ mcpB⁻*), los complejos no se verían afectados, ya que McpA está presente, por lo que la activación de la cinasa puede darse a niveles de la cepa RS2R1 (*cheR1⁻*). En la cepa JH2, la activación de CheA1 podría seguir siendo dada por los diferentes MCPs. En una cepa triple mutante JH3 (*cheR1⁻ mcpA⁻ mcpB⁻*), al no estar McpA, otros receptores activos (desmetilados) en el complejo de señalización no funcional, serían incapaces de activar a la cinasa.

Tras comparar los dominios de señalización de los receptores Tar y Tsr de *E. coli* con McpA y McpB de *R. sphaeroides*, podemos observar que los residuos clave en la formación de contactos triméricos entre dímeros se encuentran altamente conservados en McpA y McpB. McpA presenta 10 de 11 residuos conservados, teniendo solo la sustitución I377L, mientras que McpB tiene 8 de 11 residuos conservados, presentando tres sustituciones: F373R, N376D y I377L. Esto sugiere que los receptores McpA y McpB tienen la capacidad de formar contactos triméricos (ver Figura 25), así como interactuar en los complejos de señalización.

Considerando el hecho de que McpA es el único quimiorreceptor transmembranal que presenta un motivo de reclutamiento para la proteína CheR, su presencia podría ser esencial para facilitar la metilación de los MCPs asociados en los clusters de señalización (ver Posible función del pentapeptido NWETF de McpA", en la sección de Anexos).

A partir de lo anterior, es probable que McpA no sea el único MCP dependiente de CheR1 y que además McpA sea fundamental en la formación de complejos de señalización estables y funcionales, que permitan un adecuado control quimiotáctico del flagelo 2, mediado por McpB y por otros MCPs asociados.

Por otro lado, a pesar de que la complementación de la cepa JH1 (*cheR1⁻ mcpA⁻*) parece parcial, debemos destacar que dentro de la población analizada se presentó una gran variación en los valores de VAP. Solo el 20% de las células presentó el fenotipo de la cepa parental (valores de VAP dentro de +/-1 SD con respecto a la media de los datos sin procesar de JH1), mientras que el resto presentó valores de VAP mayores, los cuales son más cercanos a los observados para la cepa RS2R1 (*cheR1⁻*). La aparente falta de complementación en el 20% de la población, puede deberse a la pérdida del

plásmido pRK415_*mcpA*-SD en la cepa JH1/A durante su crecimiento en la condición fotoheterotrófica, anaeróbica, con medio mínimo de Sistrom adicionado con 88 μ M de ácido succínico, en la que no fue adicionado el antibiótico Tc para la selección de este vector, para no afectar la tasa de crecimiento de la cepa. Dado que la mayoría de la población presente en el cultivo de JH1/A presentó valores de VAP considerablemente mayores a los de la cepa JH1, es factible suponer que el fenotipo “smooth” observado en esta doble mutante, es debido a la ausencia de McpA.

Regulación transcripcional dada por CtrA

La biogénesis flagelar así como la expresión de las proteínas responsables del control quimiotáctico del flagelo implican para las bacterias un alto costo energético y de recursos, por lo que su expresión debe estar sujeta a una estricta regulación. La regulación transcripcional de la jerarquía flagelar es iniciada por un regulador maestro como CtrA y FleQ, mientras que las estructuras de cuerpo basal y gancho son reguladas principalmente por los factores σ -70 y el factor sigma alternativo σ -54 también conocido como RpoN, así como por otros reguladores transcripcionales. Proteínas de expresión tardía en la jerarquía flagelar, son reguladas principalmente por el factor sigma alternativo σ -28, conocido como FliA. Es importante señalar que la regulación de la expresión de los genes quimiotácticos muchas veces está acoplada a la regulación de genes flagelares tardíos. En γ -proteobacterias como *E. coli*, *S. typhimurium* y *P. aeruginosa*, así como en *B. subtilis* el factor sigma 28 regula la expresión de genes flagelares tardíos como la flagelina así como de genes quimiotácticos, como los MCPs. Sin embargo, en algunas bacterias, los genes quimiotácticos son directamente regulados por los factores que inician la expresión de la jerarquía flagelar, como es el caso de algunas α -proteobacterias. En α -proteobacterias como *C. crescentus* y *Rhodobacter capsulatus*, los genes quimiotácticos están regulados directamente por el regulador maestro CtrA y el factor α -70.

R. sphaeroides posee dos sistemas flagelares, uno endógeno (Fla2) y uno adquirido por transferencia horizontal de una γ -proteobacteria (Fla1). Considerando que el sistema flagelar 2 es el sistema endógeno de *R. sphaeroides* y que pertenece al clado de las α -proteobacterias, se esperaría que la regulación transcripcional de las proteínas que llevan a cabo su control quimiotáctico este dada por el regulador maestro CtrA, como se ha visto en *C. crescentus* y *R. capsulatus*.

La cepa silvestre AM1 tiene mutado al gen *fleQ*, por lo que el flagelo Fla1 no puede ser expresado, pero por una mutación que permite la activación constitutiva de CckA, la cepa logra expresar el flagelo Fla2.

Los ensayos de inmunodetección realizados en este trabajo, demostraron que las proteínas McpA, CheY2 y CheY5, contenidas en el operón quimiotáctico que regula al flagelo 2, se expresan en la cepa AM1. Sin embargo en la ausencia de CtrA, la cepa AM1 pierde la expresión del flagelo 2 (Vega-Baray et al, 2015) y de los genes quimiotácticos que codifican a las proteínas que llevan a cabo su control.

Previamente, mediante RT-PCR, había sido reportada la presencia de transcritos de *cheY2* y *cheY5* en la cepa WS8N crecida en condiciones fotoheterotróficas y heterotróficas, por lo que sería factible suponer que las proteínas CheY2 y CheY5 se encuentran presentes en ambas condiciones (Ferré et

al, 2005). Sin embargo, en la cepa WS8N las proteínas CheY2 y CheY5 no están presentes (ver Figura 21), a pesar de que WS8N fue crecida en condiciones muy similares a las previamente reportadas. Esto puede deberse a que los mensajeros de ambos genes no son traducidos, o a que la técnica de RT-PCR es muy sensible y puede detectar cantidades muy bajas de mensajero, que no son significativas para la acumulación de proteína.

La predicción de sitios de unión a CtrA empleando la Matriz de Peso Posicional (PWM) obtenida a partir del regulón de CtrA de *C. crescentus* (Brilli et al, 2010), con un pval de $1e-4$, permitió identificar una secuencia similar al sitio de unión a CtrA, en la región regulatoria de *cheOp1*. La PWM fue obtenida mediante la comparación de las secuencias río arriba de 54 genes pertenecientes al regulón de CtrA de *C. crescentus*. La predicción de posibles sitios de unión a CtrA en el genoma de *R. sphaeroides* WS8N, utilizando dicha PWM, y un valor de probabilidad (pval) de $1e-4$, resultó en la identificación de un posible sitio completo de unión a CtrA (TTAGggaaccTTATG) con una puntuación de 6.4, que podría estar regulando al *cheOp1*. Este sitio se encuentra ubicado a 67 pb río arriba de la putativa metionina de inicio del ORF RSWS8N_02465 localizado río arriba del gen *CheY5*.

La similitud de la secuencia TTAGggaaccTTATG con la secuencia consenso de unión a CtrA de *C. crescentus* (ver Figura 22), su posición con respecto al posible inicio de la traducción del ORF RSWS8N_02465 (se asemeja a la reportada para promotores regulados por este factor transcripcional, a +/- 35 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Curtis et al, 2013)), así como por el hecho de que la expresión de los genes *mcpA*, *cheY2* y *cheY5* es dependiente de CtrA, sugieren fuertemente que el *cheOp1* es regulado directamente por CtrA y que la secuencia TTAGggaaccTTATG es su sitio de unión.

CONCLUSIONES

- El control del motor flagelar Fla2 es mediado por los quimiorreceptores McpA y McpB.
- Los fenotipos de las cepas JH1 (AM1 *cheR1::aadA mcpA::Hyg*), JH2 (AM1 *cheR1::aadA mcpB::Rif*) y JH3 (AM1 *cheR1::aadA mcpA::Hyg mcpB::Rif*) indican que McpA es capaz de activar a la cinasa CheA1 a los niveles observados en la cepa RS2R1 (AM1 *cheR1::aadA*).
- El operón quimiotáctico *cheOp1* es regulado transcripcionalmente por CtrA.
- Las proteínas CheY2 y CheY5 se expresan en la cepa AM1 pero no en WS8, bajo la condición de crecimiento probada.

PERSPECTIVAS

- Evaluar la posible existencia de complejos de señalización para el control quimiotáctico del flagelo 2, así como identificar a las proteínas que lo conforman.
- Analizar si McpA es determinante para la formación de complejos de señalización funcionales.
- Identificar a los MCPs que pudieran ser metilados por CheR1.
- Determinar la capacidad del pentapéptido GWEDF de McpA para reclutar a CheR1.
- Evaluar la funcionalidad de la putativa caja CtrA propuesta en este trabajo.
- Determinar si CheR2 puede afectar la conducta quimiotáctica dependiente del flagelo 2.

ANEXOS

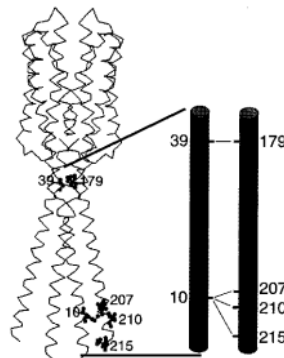


Figura 30. El movimiento tipo pistón entre el primer y segundo cruces transmembranales es parte de la fuente de señalización a través de la membrana celular para el control de la cinasa. En el receptor a aspartato de *Salmonella typhimurium* la interacción del receptor con el ligando, genera un movimiento de la alfa hélice 4 (conectada al cruce transmembranal 2), con respecto a la hélice alfa 1 (conectada al dominio transmembranal 1), además de una modificación espacial de los residuos 39 y 179 de cada subunidad, pertenecientes a los cruces transmembranales, alejándolos entre ellos (intrasubunidad), y de los residuos 39 y 39' de ambas subunidades (intersubunidad), alejándolas entre sí. Ambos son movimientos menores a 2.5 Å (Ottemann et al, 1998). A pesar de que ocurren movimientos intrasubunidad e intersubunidad, se vió que tan solo los intrasubunidad son suficientes para la señalización transmembrana, por lo que Otteman et al en 1999, mediante la misma técnica, encontraron que los residuos 10-207 se acercan dada la interacción con aspártico, mientras que 10-210 y 10-215 se alejan entre sí, lo que implica un movimiento tipo pistón entre los cruces transmembranales de cada subunidad (Otteman et al, 1999). Modificado de Ottemann, 1999.

Posible función del pentapéptido GWEDF de McpA

Receptores de alta abundancia de *E. coli* y *S. enterica* presentan en su extremo C-terminal un motivo de 5 a.a. altamente conservado, NWETF para los receptores Tar y Tsr de *E. coli* y NWFESF para Tcp de *S. enterica*. En estas bacterias se ha demostrado que dichos motivos permiten el reclutamiento de las proteínas CheR y CheB del sistema de adaptación a los complejos de quimiorreceptores, facilitando la metilación/desmetilación de MCPs aleaños, ya sean de alta o de baja abundancia.

R. sphaeroides tiene 13 quimiorreceptores, de los cuales 9 son MCPs transmembranales, mientras que 4 son citoplásmicos (TLPs). Análisis previos de las secuencias peptídicas de dichos receptores, permitieron detectar que solo McpA y TlpT presentan secuencias similares en sus extremos C-terminal a los pentapéptidos encontrados en *E. coli* y *S. enterica* (Martin et al, 2001). Tras realizar un alineamiento múltiple de las secuencias peptídicas de TlpT, McpA (*R. sphaeroides*) Tsr, Tar (*E. coli*) y Tcp (*S. enterica*), podemos observar la presencia del motivo GWEDF en McpA (Ver Figura 31). El motivo presente en McpA muestra una identidad del 60%, con respecto al motivo de Tar, Tsr y Tcp, en este, los residuos Trp, Glu y Phe están conservados. De acuerdo a un alineamiento múltiple de 1121 MCPs de 78 organismos de los diferentes clados de proteobacterias, los residuos más altamente conservados corresponden a los mismos de McpA, con valores de 83%, 65% y 99% respectivamente (Perez & Stock, 2007). A su vez, la estructura cristalográfica del complejo CheR/NWETF de *S. enterica*

demonstró la importancia estructural de estos tres residuos para la interacción entre el pentapéptido y el subdominio beta de CheR (Djordjevic & Stock, 1997). Por lo tanto, el pentapéptido de McpA podría ser funcional, permitiéndole reclutar la maquinaria de adaptación a los complejos de MCPs.

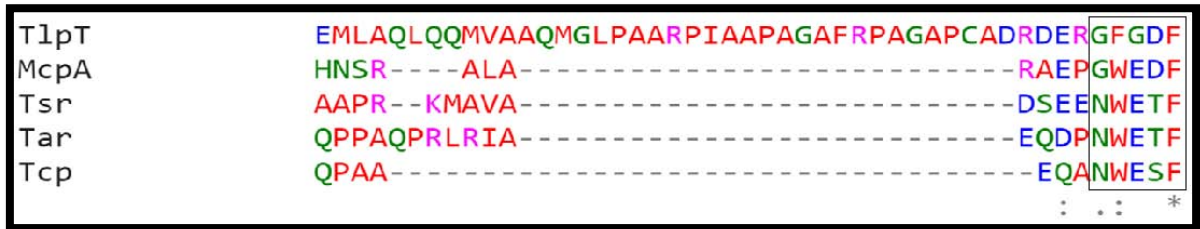


Figura 31. Alineamiento de la región C-terminal de los MCPs TlpT, McpA (*R. sphaeroides*), Tsr, Tar (*E. coli*) y Tcp (*S. enterica*), que contiene el motivo NWETF.

Mediante el análisis cristalográfico del complejo CheR/NWETF, así como mediante el alineamiento múltiple de 107 secuencias del subdominio beta de CheR de diferentes bacterias que tienen o no MCPs con el pentapéptido NWETF, se sugirió que existen dos clases de CheRs: aquellas que utilizan un mecanismo dependiente del pentapéptido para la metilación de los receptores y aquellas que no. Dicho análisis sugiere que ambos tipos de CheR presentan diversos residuos altamente conservados en el subdominio beta (ver Figura 32; flecha negra), mientras que aquellos dependientes del pentapéptido presentan un conjunto específico de residuos conservados (ver Figura 32; flechas amarillas). Considerando este criterio, la proteína CheR1 de *R. sphaeroides*, solo presenta 2 de 6 residuos conservados característicos de las CheRs dependientes del pentapéptido. A pesar de la presencia del pentapéptido GWEDF de McpA, y de su relación funcional con CheR1, no queda claro bajo el criterio de Perez y Stock, si CheR1 puede reconocer al motivo de dicho receptor (Perez & Stock, 2007; Djordjevic & Stock, 1997).

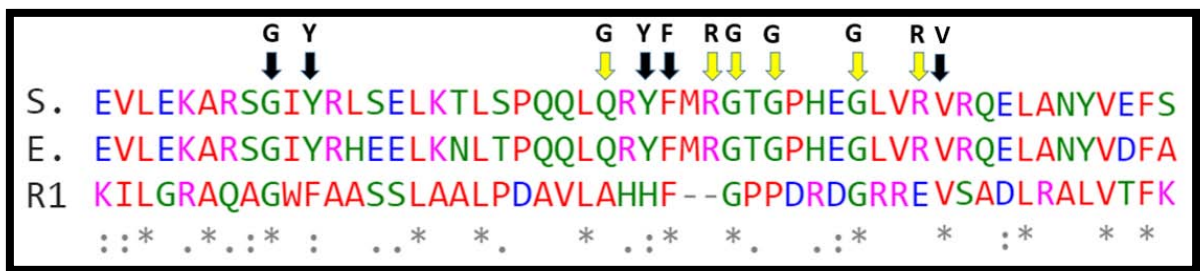


Figura 32. Alineamiento entre las proteínas CheR de *R. sphaeroides* (R1), *E. coli* (E.) y *S. enterica* (S.), para la identificación de residuos clave en el reconocimiento del pentapéptido NWETF por parte del subdominio beta de CheR. Las flechas amarillas indican los residuos encontrados en las CheRs dependientes del pentapéptido para la metilación de MCPs y en negro los encontrados tanto en las CheRs dependientes como en las que no.

A pesar de ello, en bacterias como *T. maritima*, en la cual ninguno de sus MCPs posee el pentapéptido, la metilación de estos opera de manera eficiente (Perez & Stock, 2007), por lo tanto el reconocimiento de los MCPs por la proteína CheR es independiente del pentapéptido.

Possible función dual de CheD

Mediante análisis cristalográficos y experimentales de mutagénesis dirigida, se han logrado identificar los residuos relevantes para la función deamidasas de CheD de *T. maritima*. Mutaciones en los residuos Cys27, His44 y Ser26 que forman el sitio activo, resultan en una completa pérdida de la actividad deamidasas de CheD. El aminoácido Thr21 ha mostrado ser importante en la estabilización del sitio activo deamidasas de la proteína, sin embargo es un sitio flexible, ya que sustituciones de Thr21 por Ala, sólo resultan en una disminución en la actividad de la proteína (Chao et al, 2006). Tras hacer un alineamiento de las secuencias peptídicas de CheD de *T. maritima* y CheD de *R. sphaeroides*, podemos observar que los residuos Cys27, His44 y Ser26 que forman el sitio activo, se encuentran conservados en la CheD de *R. sphaeroides*. Para el caso de Thr21, encontramos una sustitución por Ala (ver Figura 33). Los residuos conservados sugieren que CheD de *R. sphaeroides* presenta actividad deamidasas sobre sus receptores.

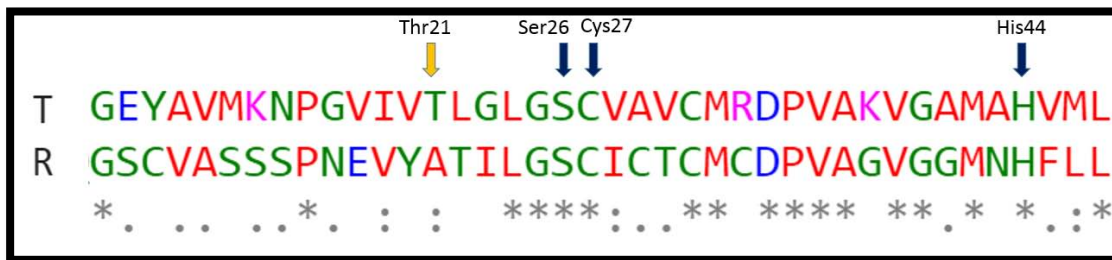


Figura 33. Alineamiento entre las proteínas CheD de *R. sphaeroides* (R) y *T. maritima* (T), para la identificación de residuos clave en la formación del sitio activo para la función deamidasas de esta proteína.

La proteína CheB de *E. coli*, no solo desamina residuos Gln específicos en los MCPs, transformándolos en Glu, sino que también desmetila estos mismos residuos, previamente metilados por la metiltransferasa CheR. Consistente con lo observado en *E. coli*, CheD de *T. maritima* también presenta función de metilesterasa, desmetilando residuos Glu de al menos dos MCPs. Cabe señalar, que *T. maritima* presenta además una proteína CheB funcional, que de manera similar a la CheB de *E. coli*, desmetila a sus receptores blanco, sin embargo, en *T. maritima* se ha demostrado que tanto CheB como CheD actúan cada una sobre un conjunto de MCPs específicos (Chao et al, 2006).

R. sphaeroides presenta en su genoma dos genes que codifican a proteínas CheB, tanto en los operones *cheOp2* y *cheOp3*, que se sabe llevan a cabo el control quimiotáctico del flagelo 1. Sin embargo, en el *cheOp1* que controla al flagelo 2, solo está presente la proteína CheD. En base a los resultados obtenidos por Martínez-del Campo en el 2011, se sugiere que CheD está cumpliendo la función de metilesterasa en el sistema de adaptación del complejo quimiotáctico del flagelo 2. Es importante señalar que en condiciones in vitro la cinasa de histidina CheA1, perteneciente a las proteínas quimiotácticas del flagelo 2, solo puede fosforilar a los reguladores de respuesta CheY1, CheY2 y CheY5 contenidos en el *cheOp1*, y no a las proteínas CheB (Porter & Armitage, 2002).

Lo anterior sugiere que la proteína CheD de *R. sphaeroides* es capaz de funcionar como metilesterasa y deamidasa de MCPs en el sistema quimiotáctico que controla al flagelo 2, y que opera independientemente de las proteínas CheB.

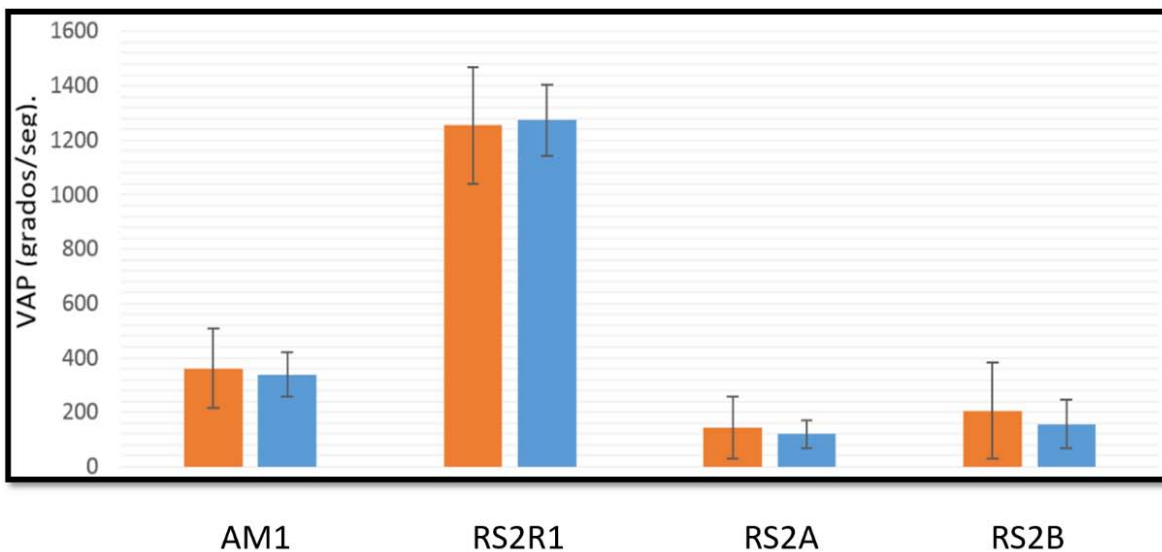


Figura 34. Procesamiento de valores de VAP. Las barras rojas representan el promedio de VAP de las 100 células analizadas para cada cepa, con su respectivo valor de desviación estándar (SD). Las barras azules representan la VAP promedio de las células cuyos valores de VAP están dentro de ± 1 SD con respecto a la media de VAP de su respectiva cepa.

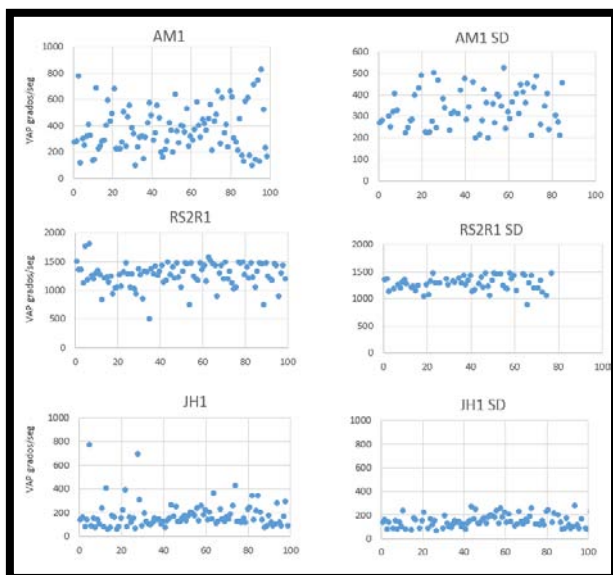


Figura 35. Gráficas de dispersión de VAP de las cepas AM1, RS2R1 y JH1. Las gráficas de la izquierda (AM1, RS2R1 y JH1) corresponden a las gráficas de dispersión de los valores de VAP de las 100 células analizadas para cada cepa. Las gráficas de la derecha (AM1 SD, RS2R1 SD y JH1 SD) corresponden a los valores de VAP de las células que se encuentran ± 1 SD con respecto a su media poblacional, posterior al procesamiento de datos (ver Materiales y Métodos).

REFERENCIAS

- Appleman, J.A., Chen, L.L. & Stewart, V. 2003. Probing conservation of HAMP linker structure and signal transduction mechanism through analysis of hybrid sensor kinases. *J Bacteriol.* 185(16):4872-4882.
- Ames, P. & Parkinson, J.S. 1994. Constitutively signaling fragments of Tsr, the *Escherichia coli* serine chemoreceptor. 176(20): 6340-6348.
- Ames, P., Studdert, C.A., Reiser, R.H. & Parkinson, J.S. 2002. Collaborative signaling by mixed chemoreceptor teams in *Escherichia coli*. *PNAS.* 99(10): 7060-7065.
- Anand, G.S. & Stock, A.M. 2002. Kinetic Basis for the Stimulatory Effect of Phosphorylation on the Methyltransferase Activity of CheB. *Biochemistry.* 41: 6752-6760.
- Armitage, J. P., Pitta, T. P., Vigeant, M. A., Packer, H. L. & Ford, R. M. 1999. Transformations in flagellar structure of *Rhodobacter sphaeroides* and possible relationship to changes in swimming speed. *J. Bacteriol.* 181: 4825–4833.
- Armitage, J.P. 2007. Bacterial Taxis. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES.* doi: 10.1002/9780470015902.a0000340.pub2
- Armitage, J.P. & Macnab, R.M. 1987. Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* 169(2):514-518.
- Arnosti, D.N. & Chamberlin, M.J. 1989. Secondary sigma factor controls transcription of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *PNAS.* 86(3): 830-834.
- Asai, Y., Kojima, S., Kato, H., Nishioka, N., Kawagishi, I. & Homma, M. 1997. Putative channel components for the fast-rotating sodium-driven flagellar motor of a marine bacterium. *J Bacteriol.* 179(16): 5104-5110.
- Ávila-Pérez, M., Hellingwerf, K.J. & Kort, R. 2006. Blue Light Activates the B-Dependent Stress Response of *Bacillus subtilis* via YtvA. *J Bacteriol.* 188(17): 6411-6414.
- Baker, M.D., Wolanin, P.M. & Stock, J.B. 2006. Signal transduction in bacterial chemotaxis. *BioEssays.* 28: 9-22.
- Barnakov, A.N., Barnakova, L.A. & Hazelbauer, G.L. 1998. Comparison in vitro of a high- and a low-abundance chemoreceptor of *Escherichia coli*: similar kinase activation but different methyl-accepting activities. *J Bacteriol.* 180(24): 6713-6718.
- Barnakov, A.N., Barnakova, L.A. & Hazelbauer, G.L. 1999. Efficient adaptational demethylation of chemoreceptors requires the same enzyme-docking site as efficient methylation. *Proc Natl Acad Sci.* 96(19): 10667-72.
- Berg, H. C. 1993. *Random Walks in Biology.* Princeton University Press. USA. P:5. Versión digital
de:<https://books.google.com.mx/books?id=DjdgXGLoJY8C&q=+thermal+motion#v=snippet&q=thermal%20motion&f=false>
- Berg, H. C. & Brown, D. A. 1972. Chemotaxis in *Escherichia coli* analyzed by three-dimensional tracking. *Nature.* 239, 500-504.
- Bi, S. & Lai, L. 2015. Bacterial chemoreceptors & chemoeffectors. *Cell Mol Life Sci.* 72: 691-670.
- Bibikov, S.I., Miller, A.C., Gosink, K.K. & Parkinson, J.S. 2004. Methylation-Independent Aerotaxis Mediated by the *Escherichia coli* Aer Protein. *J Bacteriol.* 186(12): 3730-3737.
- Biemann, H.P. & Koshl & D.J. 1994. Aspartate receptors of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* bind light with negative half-of-the-sites cooperativity. *Biochemistry.* 33(3):629-34.
- Bilwes, A.M., Alex, L.A., Crane, B.R. & Simon, M.I. 1999. Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell.* 96: 131-141.

- Bilwes, A.M., Quezada, C.M., Croal, L.R., Crane, B.R. & Simon, M. 2001. Nucleotide binding by the histidine kinase CheA. *Nature*. 8(4): 353-360.
- Blair, D.F. 1995. How Bacteria Sense and Swim. *Annu Rev Microbiol*. 49: 489-522.
- Blat, Y. & Eisenbach, M. 1996. Oligomerization of the phosphatase CheZ upon interaction with the phosphorylated form of CheY: The signal protein of bacterial chemotaxis. *J Biol Chem*. 271(2):1226-31.
- Botella, E., Devine, S.K., Hubner, S., Salzberg, L.I., Gale, R.T., Brown, E.D., Link, H., Sauer, U., Codée, J.D., Noone, D. & Devine, K.M. 2014. PhoR autokinase activity is controlled by an intermediate in wall teichoic acid metabolism that is sensed by the intracellular PAS domain during the PhoPR-mediated phosphate limitation response of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 94(6): 1242-1259.
- Boukhalova, M., VanBruggen, R. & Stewart R.C. 2002. CheA Kinase and Chemoreceptor Interaction Surfaces on CheW. *J Biol Chem*. 277: 23596-23603.
- Bourret, R., Davagnino, J. & Simon, M. 1993. The Carboxy-Terminal Portion of the CheA Kinase Mediates Regulation of Autophosphorylation by Transducer and CheW. *Journal of Bacteriology*. 175(7): 2097-2101.
- Boyer, H.W. & Roulland-Dussoix, D. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. 41(3): 459-472.
- Bren, A., Welch, M., Blat, Y. & Eisenbach. 1996. Signal termination in bacterial chemotaxis: CheZ mediates dephosphorylation of free rather than switch-bound CheY.
- Briegel, A., Li, X., Bilwes, A.M., Hughes, K.T., Jensen, G.J. & Crane, B.R. 2012. Bacterial chemoreceptor arrays are hexagonally packed trimers of receptor dimers networked by rings of kinase and coupling proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109:3766–3771.
- Brilli, M., Fondi, M., Fani, R., Mengoni, A., Ferre, L., Bazzicalupo, M. & Biondi, E.G. 2010. The diversity and evolution of cell cycle regulation in alpha-proteobacteria: a comparative genomic analysis. *BMC Systems Biology*. 4(52).
- Brown, D.A. & Berg, H.C. 1974. Temporal stimulation of chemotaxis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 71:1388-92.
- Chao, X., Muff, T., Park, S.Y., Zhang, S., Pollard, A.M., Ordal, G.W., Bilwes, A.M. & Crane, B.R. 2006. A Receptor-Modifying Deamidase in Complex with a Signaling Phosphatase Reveals Reciprocal Regulation. *Cell*. 124(3): 51-571.
- Cho, H.S., Lee, S.Y., Yan, D., Pan, X., Parkinson, J.S., Kustu, S., Wemmer, D.E. & Pelton. 2000. NMR structure of activated CheY. *J Mol Biol*. 297(3):543-51.
- Curtis, P.D., Klein, D. & Brun, Y.V. 2013. Effect of a *ctrA* promoter mutation, causing a reduction in CtrA abundance, on the cell cycle and development of *Caulobacter crescentus*. *BMC Microbiol*. 13(166). DOI: 10.1186/1471-2180-13-166.
- Djordjevic, S. & Stock, A.M. 1988. Structural analysis of bacterial chemotaxis proteins: components of a dynamic signaling system. *J Struct Biol*. 124(2-3): 189-200.
- Djordjevic, S. & Stock, A.M. 1997. Crystal structure of the chemotaxis receptor methyltransferase CheR suggests a conserved structural motif for binding S-adenosylmethionine. *Structure*. 5(4): 545-558.
- Djordjevic, S., Goudreau, P.N., Xu, Q., Stock, A.M. & West, A.H. 1998. Structural basis for methylesterase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain. 1988. 95(4): 1381-1386.
- Falke, J.J., Bass, R.B., Butler, S.L., Chervitz, S.A. & Danielson, M.A. 1997. The Two-Component Signaling Pathway of Bacterial Chemotaxis: A Molecular View of Signal Transduction by Receptors, Kinases, and Adaptation Enzymes. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 13: 457-512.

- Feng, X., Baumgartner, J.W. & Hazelbauer, G.L. 1997. High- and Low-Abundance Chemoreceptors in *Escherichia coli*: Differential Activities Associated with Closely Related Cytoplasmic Domains. *J. Bacteriol.* 179(21): 6714-6720.
- Ferré, A., de la Mora, J., Ballado, T., Camarena, L. & Dreyfus, G. 2005. Biochemical Study of Multiple CheY Response Regulators of the Chemotactic Pathway of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* 186(15): 5172-5177.
- Figurski, D.H. & Helinski, D.R. 1979. Biochemistry Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76(4): 1648-1652.
- Frisk, A., Jyot, J., Arora, S.K. & Ramphal, R. 2002. Identification and Functional Characterization of flgM, a Gene Encoding the Anti-Sigma 28 Factor in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 5(12): 2875-2882.
- Frye, J., Karlinsey, J.E., Felise, H.R., Marzolf, B., Dowidar, N., McClelland, M. & Hughes, K.T. 2006. Identification of new flagellar genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* 188(6): 2233-2243.
- Garcia-Vescovi, E., Ayala, Y.M., Di Cera, E. & Groisman, E.A. 1997. Characterization of the bacterial sensor protein PhoQ: Evidence for distinct binding sites for Mg²⁺ and Ca²⁺. *J Biol Chem.* 272: 1440-1443.
- Gegner, J.A., Graham, D.F., Roth, A.F. & Dahlquist, F.W. 1992. Assembly of an MCP Receptor, CheW, and Kinase CheA Complex in the Bacterial Chemotaxis Signal Transduction Pathway. *Cell.* 70: 975-982.
- Gestwiki, J.E. & Kiessling, L.L. 2002. Inter-receptor communication through arrays of bacterial chemoreceptors. *Nature.* 415: 81-84.
- Gillen, K.L. & Hughes, K.T. 1991. Molecular characterization of flgM, a gene encoding a negative regulator of flagellin synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 173(20): 6453-6459.
- Glekas, G.D., Foster, R.M., Cagtes, J.R., Estrella, J.A., Wawrzyniak, M.J., Rao, C.V. & Ordal, G.W. 2010. A PAS Domain Binds Asparagine in the Chemotaxis Receptor McpB in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem.* 285(3): 1870-1878.
- Hazelbauer, G.L. 1975. Maltose chemoreceptor of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 122:206–214.
- Hazelbauer, G.L. & Lai, W.C. 2010. Bacterial chemoreceptors: providing enhanced features to two-component signaling. *Curr Opin Microbiol.* 13(2): 124-132.
- Hazelbauer, G.L., Falke, J.J. & Parkinson, J.S. 2007. Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends in Biochemical Sciences.* 33(1): 9-19.
- Helmann, J.D. 1991. Alternative sigma factors and the regulation of flagellar gene expression. *Mol Microbiol.* 5(12): 2875-2882.
- Hess, J.F., Oosawa, K., Kaplan, N. & Simon, M.I. 1988. Phosphorylation of Three Proteins in the Signaling Pathway of Bacterial Chemotaxis *Cell.* 53: 79-87.
- Jacobs, M. H., Van Der Heide, T., Tolner, B., Driessen, A. J. & Konings, W. N. 1995. Expression of the gltP gene of *Escherichia coli* in a glutamate transport-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides* restores chemotaxis to glutamate. *Mol Microbiol.* 18: 641-647.
- Jeziore-Sassoon, Y., Hamblin, P.A., Bootle-Wilbraham, C.A., Poole, P. & Armitage, J.P. 1998. . Metabolism is required for chemotaxis to sugars in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology.* 144: 229-239.
- Jiang, Z.Y. & Bauer, C.E. 1997. Analysis of a Chemotaxis Operón from *Rhodospirillum centenum*. *J Bacteriol.* 179(18): 5712-5719.

- Jones, S.E., Ferguson, N.L. & Alley, R.K. 2001. New members of the *ctrA* regulon: the major chemotaxis operón in *Caulobacter crescentus* is CtrA dependent. *Microbiology*. 147: 949-958.
- Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi, & D. Trollinger. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* 70: 191-197.
- Kehry, M.R. & Dahlquist, F.W. 1982. Adaptation in bacterial chemotaxis: CheB-dependent modification permits additional methylations of sensory transducer proteins. *Cell*. 29(3): 761-772.
- Kehry, M.R., Bond, M.W., Hunkapiller, M.W. & Dahlquist, F.W. 1983. Enzymatic deamidation of methyl-accepting chemotaxis proteins in *Escherichia coli* catalyzed by the *cheB* gene product (methylation/CheB-dependent modification/sensory adaptation). *Natl Acad Sci USA*. 80: 3599-3603.
- Kehry, M.R., Doak, T.G. & Dahlquist, F.W. 1985. Sensory Adaptation in Bacterial Chemotaxis: Regulation of Demethylation. *J Bacteriol*. 163(3): 983-990.
- Kim, K.K., Yokota, H. & Kim, S.H. 1999. Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor. *Nature*. 400(6746): 787-792.
- Krämer, J., Fischer, J.D., Zientz, E., Vijayan, V., Griesinger, C., Lupas, A. & Uden, G. 2007. Citrate sensing by the C4-dicarboxylate/citrate sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: binding site and conversion of DcuS to a C4-dicarboxylate- or citrate-specific sensor. *J Bacteriol*. 189(11): 4290-4298.
- Krembel, A.K., Neumann, S. & Sourjik, V. 2015. Universal Response-Adaptation Relation in Bacterial Chemotaxis. *J Bacteriol*. 197(2): 307-313.
- La Vecchia, M. 2010. Bacterial chemotaxis in non-homogenous shear flow. Obtenido de www.diva-portal.se/smash/get/.../FULLTEXT01.pdf.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lamanna, A.C., Gestwicki, J.E., Strong, L.E., Borchard, S.L., Owen, R.M. & Kiessling, L.L. 2002. Conserved Amplification of Chemotactic Responses through Chemoreceptor Interactions. *J Bacteriol*. 184(18): 4981-4987.
- Laub, M.T. & Goulian, M. 2007. Specificity in Two-Component Signal Transduction Pathways. *Annu Rev Genet*. 41: 121-145. DOI: 10.1186/1752-0509-4-52.
- Laub, M.T., Chen, S.L., Shapiro, L. & McAdams, H.H. 2002. Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *PNAS*. 99: 4632-4637.
- Le Moual, H., Quang, T. & Koshland, D.E. Jr. 1997. Methylation of the *Escherichia coli* chemotaxis receptors: intra- and interdimer mechanisms. *Biochemistry*. 36(43): 13441-13448.
- Lee, S.Y., Cho., H.S., Pelton, J., Yan, D., Henderson, R.K., King, D.S., Huang, L., Kustu, S., Berry, E.A. & Wemmer, D.E. 2001. Crystal structure of an activated response regulator bound to its target. *Nature Structural Biology*. 8: 52-56.
- Levit, M., Grebe, T.W. & Stock, J.B. 2002. Organization of the receptor kinase signaling array that regulates *Escherichia coli* chemotaxis. *J Biol Chem*. 277: 36748-36754.
- Levit, M., Liu, Y., Surette, M. & Stock., J. 1996. Active Site Interference and Asymmetric Activation in the Chemotaxis Protein Histidine Kinase CheA. *JBC*. 271(50): 32057-32063.
- Li, G. & Weis, R.M. 2000. Covalent modification regulates light binding to receptor complexes in the chemosensory system of *Escherichia coli*. *Cell*. 100:357-365.
- Li, J., Swanson, R.V., Simon, M.I. & Weis, R.M. 1995. The response regulators CheB and CheY exhibit competitive binding to the kinase CheA.

- Li, M. & Hazelbauer, G.L. 2005. Adaptational assistance in clusters of bacterial chemoreceptors
- Li, M. & Hazelbauer, G.L. 2011. Core unit of chemotaxis signaling complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:9390–9395.
- Li, M., Khursigara, C.M., Subramaniam, S. & Hazelbauer, G.L. 2011. Chemotaxis kinase CheA is activated by three neighbouring chemoreceptor dimers as effectively as by receptor clusters. *Mol Microbiol.* 79(3): 677-685.
- Liu, J.D. & Parkinson, J.S. 1989. Role of CheW protein in coupling membrane receptors to the intracellular signaling system of bacterial chemotaxis. 86(22): 8703-8707.
- Liu, J., Hu, B., Morado, D.R., Jani, S., Manson, M.D. & Margolin, W. 2012. Molecular architecture of chemoreceptor arrays revealed by cryoelectron tomography of *Escherichia coli* minicells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109:1481–1488.
- Lloyd, S.A. & Blair, D.F. 1997. Charged residues of the rotor protein FliG essential for torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 266(4): 733-744.
- Lukat, G.S., Lee, B.H., Motonen, J.M., Stock, A.M. & Stock, J.B. 1991. Roles of the highly conserved aspartate and lysine residues in the response regulator of bacterial chemotaxis. *J Biol Chem.* 266(13):8348-54.
- Lukat, G.S., Stock, A.M. & Stock, J.B. 1990. Divalent metal ion binding to the CheY protein and its significance to phosphotransfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry.* 29(23):5436-42.
- Lupas, A., Van Dyke, M. & Stock, J. 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science.* 252(5009): 1162-1164.
- Lybarger, S.R. & Maddock, J.R. 2000. Differences in the polar clustering of the high- and low-abundance chemoreceptors of *Escherichia coli*. *PNAS.* 97(14): 8057-8062.
- Mackenzie, C., Choudhary, M., Larimer, F.W., Predki, P.F., Stilwagen, S., Armitage, J.P., Barber, R.D., Donohue, T.J., Hosler, J.P., Newman, J.E., Shapleigh, J.P., Sockett, R.E., Zeilstra-Ryalls, J. & Kaplan S. 2001. The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Photosynth Res.* 70(1): 19-41.
- Macnab, R. M. 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:77–100.
- Macnab, R. M. & Orston, M. K. 1997. Normal to Curly Flagellar transitions and their role in stabilization of an alternative quaternary structure by mechanical force. *J. Mol. Biol.* 112, 1-30
- Macnab, R.M. (ed.). 1996. *Flagella and Motility.* ASM Press.
- Macnab, R.M. & Parkinson, J.S. 1991. Genetic analysis of the bacterial flagellum. *Trends Genet.* 7(6): 196-200.
- Maddock, J.R. & Shapiro, L. 1993. Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science.* 259(5102):1717-1723.
- Malakooti, J. & Ely, B. 1995. Principal sigma subunit of the *Caulobacter crescentus* RNA polymerase. *J Bacteriol.* 177(23): 6854-6860.
- Márquez, L.M., Helmann, J.D., Ferrari, E., Parker, H.M., Ordal, G.W. & Chamberlin, M.J. 1990. Studies of sigma-D Dependent Functions in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 172(6): 3435-3443.
- Martin, A. C., Wadhams, G. H. & Armitage, J. P. 2001. The roles of the multiple CheW and CheA homologues in chemotaxis and in chemoreceptor localization in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* 40: 1261-1272.
- Martin, A.C., Gould, M., Byles, E., Roberts, M.A. & Armitage, J.P. 2006. Two Chemosensory Operons of *Rhodobacter sphaeroides* Are Regulated Independently by Sigma 28 and Sigma 54. *J Bacteriol.* 188(22): 7932-7940.

- Martin, A.C., Wadhams, G.H., Shah, D.S., Porter, S.L., Mantotta, J.C., Craig, T.J., Verdult, P.H., Jones, H. & Armitage. 2001. CheR- and CheB-dependent chemosensory adaptation system of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* 183(24): 7135-7134.
- Martínez-del Campo, A., Ballado, T., Camarena, L., Dreyfus, G. 2011. In *Rhodobacter sphaeroides*, Chemotactic Operón 1 Regulates Rotation. *J Bacteriol.* 193(23): 781-6786.
- Martínez-del Campo, A., Ballado, T., de la Mora, J., Poggio, S., Camarena, L. & Dreyfus, G. 2007. Chemotactic Control of the Two Flagellar Systems of *Rhodobacter sphaeroides* Is Mediated by Different Sets of CheY and FliM Proteins. *J Bacteriol.* 189(22): 8397-8401.
- McCullen, C.A. & Binns. 2006. *Agrobacterium tumefaciens* and Plant Cell Interactions and Activities Required for Interkingdom Macromolecular Transfer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22: 101-27.
- McEvoy, M.M., Zhou, H., Roth, A.F., Morrison, T.B., Kay, L.E. & Dahlquist, F.W. 1995. Nuclear magnetic resonance assignments and global fold of a CheY-binding domain in CheA, the chemotaxis-specific kinase of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 34(42):13871-80.
- Mercer, R.G., Callister, S.J., Lipton, M.S., Pasa-Tolic, L., Strnad, H., Paces, V., Beatty, T. & Lang, A.S. 2010. Loss of the Response Regulator CtrA Causes Pleiotropic Effects on Gene Expression but Does Not Affect Growth Phase Regulation in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol.* 192(11): 2701-2710.
- Milburn, M.V., Prive, G.G., Milligan, D.L., Scott, W.G., Yeh, J., Jancarik, J., Koshl& Jr, D. & Kim S.H. 1991. Three-dimensional structures of the ligand-binding domain of the bacterial aspartate receptor with and without a ligand. *Science.* 254: 1342-1347.
- Milligan, D.L. & Koshl&, D.E. 1988. Site-directed cross-linking. Establishing the dimeric structure of the aspartate receptor of bacterial chemotaxis. *J Biol Chem.* 263(13): 6268-6275.
- Minamino, T., Imada, K. & Namba, K. 2008b. Molecular motors of the bacterial flagella. *Current Opinion in Structural Biology.* 18(6): 693-701.
- Minamino, T., Imada, K. & Namba, K. 2008a. Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly. *Mol Biosyst.* 4(11): 1105-1115.
- Mizuno, T. 1997. Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res.* 4, 161–168
- Mourey, L., Re, S.D., Pédelacq, J.D., Tolstykh, T., Faurie, C., Guilet, V., Stock, J.B. & Samama, J.P. 2001. Crystal Structure of the CheA Histidine Phosphotransfer Domain that Mediates Response Regulator Phosphorylation in Bacterial Chemotaxis. *JBC.* 276(33): 31074-31082.
- Muir, R.E., Easter, J. & Gober, J.W. 2005. The trans-acting flagellar regulatory proteins, FliX and FliB, play a central role in linking flagellar biogenesis and cytokinesis in *Caulobacter crescentus*. *Microbiology.* 151(11): 3699-3711.
- Nowlin, D.M., Bollinger, J. & Hazelbauer, G.L. 1987. Sites of covalent modification in Trg, a sensory transducer of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 262(13): 6039-6045.
- Núñez-Oreza, L.A., Georgellis, D. y Álvarez, A.F. 2014. ArcB: El sensor del estado redox en bacterias. *TIP.* 17(2): 135-146.
- Osawa, K., Ueno, T. & Aizawa, S. 1994. Overproduction of the bacterial flagellar switch proteins and their interactions with the MS ring complex in vitro. *J Bacteriol.* 176(12): 3683-3691.
- Osterman, I.A., Dikhtyar, Y.Y., Bogdanov, A.A., Dontsova, O.A. & Sergiev, P.V. 2015. Regulation of Flagellar Gene Expression in Bacteria. *Biochemistry (Moscow).* 80(11): 1447-1456.

- Ottemann, K.M., Thorgeirsson, T.E., Kolodziej, A.F., Shin, Y.K., & Koshl&, D.E. 1998. Direct Measurement of Small Light-Induced Conformational Changes in the Aspartate Chemoreceptor Using EPR. *Biochemistry*. 37: 7062-7069.
- Ottemann, K.M., Xiao, W., Shin, Y.K. & Koshl&, D.E. 1999. A Piston Model for Transmembrane Signaling of the Aspartate Receptor. *Science*. 285: 1751-1754.
- Parkinson, J.S., Hazelbauer, G.L. & Falke, J.J. 2015. Signaling and sensory adaptation in *Escherichia coli* chemoreceptors: 2015 update. *Trends in Microbiology*. 23(5): 257-266.
- Paul, K. & Blair, D.F. 2006. Organization of FlhN subunits in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 188(7): 2502-2511.
- Perez, E. & Stock, A.M. 2007. Characterization of the *Thermotoga maritima* Chemotaxis Methylation System that Lacks Methyltransferase CheR: MCP tethering. *Mol Microbiol*. 63(2): 363–378.
- Perez, E., West, A.H., Stock, A.M. & Djordjevic. 2004. Discrimination between Different Methylation States of Chemotaxis Receptor Tar by Receptor Methyltransferase CheR. *Biochemistry*. 43(4): 953–961.
- Poggio, S., Abreu-Goodger, C., Fabela, S., Osorio, A., Dreyfus, G. & 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(8):3208-16.
- 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. *Molecular Microbiology*. 58(4): 969-983.
- Poole, P. S. & Armitage, J. P. 1989. Role of metabolism in the chemotactic response of *Rhodobacter sphaeroides* to ammonia. *J. Bacteriol*. 171: 2900-2902.
- Poole, P. S., Smith, M. J. & Armitage, J. P. 1993. Chemotactic signalling in *Rhodobacter sphaeroides* requires metabolism of attractants. *J. Bacteriol*. 175: 291-294.
- Porter, S. L. & Armitage, J. P. 2002. Phosphotransfer in *Rhodobacter sphaeroides* chemotaxis. *J. Mol. Biol*. 324: 35-45.
- Porter, S. L. & Armitage, J. P. 2004. Chemotaxis in *Rhodobacter sphaeroides* requires an atypical histidine protein kinase. *J Biol Chem*. 279: 54573-54580.
- Porter, S. L., Roberts, M. A. J., Manning C. S. & Armitage, J. P. 2008b. A bifunctional kinase-phosphatase in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 18531-18536.
- Porter, S. L., Warren, A. V., Martin, A. C. & Armitage, J. P. 2002. The third chemotaxis locus of *Rhodobacter sphaeroides* is essential for chemotaxis. *Mol. Microbiol*. 46: 1081-1094.
- Porter, S.L., Wadhams, G.H. & Armitage, J.P. 2008. *Rhodobacter sphaeroides*: complexity in chemotactic signaling. *Trends Microbiol*. 16: 251-260.
- Porter, S.L., Wadhams, G.H. & Armitage, J.P. 2011. Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nature Rev. Microbiol*. 9: 153-165.
- Porter, S.L., Wilkinson, D.A., Byles, E.D., Wadhams, G.H., Taylor, S., Saunders, N.J. & Armitage, J.P. 2011b. Genome Sequence of *Rhodobacter sphaeroides* Strain WS8N. *J Bacteriol*. 193(159): 4027-4028.
- Quandt, J., & M. F. Hynes. 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene* 127: 15-21.
- Quon, K. C., Marczynski, G.T. & Shapiro, L. 1996. Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell*. 84: 83–93.
- Rao, C.V., Glekas, G.D. & Ordal, G.W. 2008. The three adaptation systems of *Bacillus subtilis* chemotaxis. *Trends Microbiol*. 16(10): 480-487.

- Rappuoli, R., Scarlato, V. & Arico, B. (eds.). 1996. Signal transduction and Bacterial Virulence. R.G. LANDES COMPANY. 167pp.
- Romagnoli, S., Packer, H. L. & Armitage, J. P. 2002. Tactic responses to oxygen in the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* WS8N. *J. Bacteriol.* 184: 5590-5598.
- Rosser, G., Fletcher, A.G., Wilkinson, D.A., Beyer, J.A., Yates, C.A., Armitage, J.P., Maini, P.K. & Baker, R.E. 2013. Novel Methods for Analysing Bacterial Tracks Reveal Persistence in *Rhodobacter sphaeroides*. *PLOS.* 9(10): e1003276.
- Sampedro, I., Parales, R.E., Krell, T. & Hill, J.E. 2014. Pseudomonas chemotaxis. *FEMS.* doi: 10.1111/1574-6976.12081.
- Sanders, D.A., Gillette-Castro, B.L., Stock, A.M., Burlingame, A.L. & Koshland D.E. Jr. 1989. Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. *J Biol Chem.* 264: 21770-21778.
- Shah, D. S. H., Porter, S. L., Martin, A. C., Hamblin, P. A. & Armitage, J. P. 2000. Fine tuning bacterial chemotaxis: analysis of *Rhodobacter sphaeroides* behaviour under aerobic & anaerobic conditions by mutation of the major chemotaxis operons and cheY genes. *EMBO J.* 19: 4601-4613.
- Shiomi, D., Zhulin, I.B., Homma, M. & Kawagishi, I. 2002. Dual recognition of the bacterial chemoreceptor by chemotaxis-specific domains of the CheR methyltransferase. *J Biol Chem.* 277: 42325-42333.
- Sockett, R.E., Foster, J.C.A. & Armitage, J.P. 1990. Molecular biology of the *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. *FEMS Symp.* 53: 473-479.
- Sourjik, V. & Berg, H. 2004. Functional interactions between receptors in bacterial chemotaxis. *Nature.* 428: 437-441.
- Sourjik, V. & Schmitt, R. 1998. Phosphotransfer between CheA, CheY1, and CheY2 in the chemotaxis signal transduction chain of *Rhizobium meliloti*. *Biochemistry.* 37(8): 2327-2335.
- Sourjik, V. & Wingreen, N.S. 2012. Responding to chemical gradients: bacterial chemotaxis. *Curr Opin Cell Biol.* 24(2): 262-268.
- Sourjik, V., & Berg, H.C. 2000. Localization of components of the chemotaxis machinery of *Escherichia coli* using fluorescent protein fusions. *Mol Microbiol.* 137: 740-751.
- Springer, W.R. & Koshland D.E. Jr. 1977. Identification of a protein methyltransferase as the cheR gene product in the bacterial sensing system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74(2): 533-537.
- Stewart, R.C. 1997. Kinetic characterization of phosphotransfer between CheA and CheY in the bacterial chemotaxis signal transduction pathway. *Biochemistry.* 36: 2030-2040.
- Stewart, R.C., Jahreis, K., Parkinson, J.S. 2000. Rapid phosphotransfer to CheY from a CheA protein lacking the CheY binding domain. *Biochemistry.* 39: 13157-13165.
- Stock, A.M., Mottonen, J.M., Stock, J.B. & Schutt, C.E. 1989. Three dimensional structure of CheY, the response regulator of bacterial chemotaxis. *Nature.* 337: 745-749.
- Stock, J.B. & Koshland, D.E.Jr. 1978. A protein methylesterase involved in bacterial sensing. *Biochemistry.* 75(8): 3659-3663.
- Storch, K.F., Ruloph, J. & Oesterhelt, D. 1999. Car: a cytoplasmic sensor responsible for arginine chemotaxis in the archaeon *Halobacterium salinarum*. *EMBO J.* 18: 1146-1158.
- Studdert, C.A. & Parkinson, J.S. 2004. Crosslinking snapshots of bacterial chemoreceptor squads. *Proc Natl Acad Si.* 101(7): 2117-2122.
- Surette, M.G. & Stock, J.B. 1996. Role of alpha-helical coiled-coil interactions in receptor dimerization, signaling and adaptation during bacterial chemotaxis. *J. Biol Chem.* 271: 17996-17973.

- Surette, M.G., Levit, M., Liu, Y., Lukat, G., Ninfai, E.G., Ninfai, A. & Stock, J.B. 1996. Dimerization Is Required for the Activity of the Protein Histidine Kinase CheA That Mediates Signal Transduction in Bacterial Chemotaxis. *JBC*. 271(2): 939-945.
- Tajima, H., Imada, K., Sakuma, M., Hattori, F., Nara, T., Kamo, N., Homma, M. & Kawagishi, I. 2011. Ligand Specificity Determined by Differentially Arranged Common Ligand-binding Residues in Bacterial Amino Acid Chemoreceptors Tsr and Tar. *J Biol Chem*. 286(49): 42200-42210.
- Taylor, B.L. & Zhulin, I.B. 1999. PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiol Mol Biol Rev*. 63(2): 479-506.
- Terwilliger, T.C. & Koshl&, D.E. 1984. Sites of methyl esterification and deamination on the aspartate receptor involved in chemotaxis. *J Biol Chem*. 259(12): 7719-7725.
- Terwilliger, T.C., Bogonez, E., Wang, E.A. & Koshl& D.E. 1983. Sites of methyl esterification on the aspartate receptor involved in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem*. 258(16): 9608-9611.
- Thanbichler, M., Iniesta, A.A. & Shapiro, L. 2007. A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res*. 35(20): e137.
- Thompson, S. R., Wadhams, G. H. & Armitage, J. P. 2006. The positioning of cytoplasmic protein clusters in bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 8209–8214.
- Tindall, M. J., Porter, S. L., Maini, P. K. & Armitage, J. P. 2010. Modeling chemotaxis reveals the role of reversed phosphotransfer and a bi-functional kinase-phosphatase. *PLoS Comput Biol*. 6: e1000896.
- Topp, S. & Gallivan, J.P. 2007. Guiding Bacteria with Small Molecules and RNA. *JACS*. 129: 6807-6811.
- Tsang, J. & Hoover, T.R. 2014. Themes and Variations: Regulation of RpoN-Dependent Flagellar Genes across Diverse Bacterial Species. Hindawi Publishing Corporation. Scientifica. Article ID 681754, 14 pages.
- Vega-Baray, B., Domenzain, C., Rivera, A., Alfaro-López, R., Gómez-César, E., Poggio, S., D., Dreyfus, G. & Camarena, L. 2015. The Flagellar Set Fla2 in *Rhodobacter sphaeroides* Is Controlled by the CckA Pathway and Is Repressed by Organic Acids and the Expression of Fla1. 197(5): 833-847.
- Wadhams, G. H., Martin, A. C. & Armitage, J. P. 2000. Identification and localization of a methyl-accepting chemotaxis protein in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol*. 36: 1222-1233.
- Wadhams, G. H., Martin, A. C., Warren, A. V. & Armitage, J. P. 2005. Requirements for chemotaxis protein localization in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol*. 58: 895-902.
- Wadhams, G. H., Warren, A. V., Martin, A. C. & Armitage, J. P. 2003. Targeting of two signal transduction pathways to different regions of the bacterial cell. *Mol. Microbiol*. 50: 763-770.
- Wadhams, G.H. & Armitage. 2004. Making Sense Of It All: Bacterial Chemotaxis. *Nature*. 5: 1024- 1037.
- Weerasuriya, S., Schneider, B.M. & Manson, M.D. 1998. Chimeric chemoreceptors in *Escherichia coli*: signaling properties of Tar-Tap and Tap-Tar hybrids. *J Bacteriol*. 180(4): 914-920.
- Welch, M., Oosawa, K., Aizawa, S. & Eisenbach, M. 1993. Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Biochemistry*. 90: 8787-8791.
- West, A.H. & Stock, A.M. 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 26(6): 369-376.

- Winans, S.C. 1992. Two-way Chemical Signaling in *Agrobacterium*-Plant Interactions. *Microbiological Reviews*. 56(1): 12-31.
- Wu, J., Li, J., Li, G., Long, D.G. & Weis, R.M. 1996. The receptor binding site for the methyltransferase of bacterial chemotaxis is distinct from the sites of methylation. *Biochemistry*. 35: 4984–4993.
- Yamamoto, K. & Imae, Y. 1993. Cloning and characterization of the *Salmonella typhimurium*-specific chemoreceptor Tcp for taxis to citrate and from phenol. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(1): 217-221.
- Zhao, R., Collins, E.J., Bourret, R.B. & Silversmith, R.E. 2002. Structure and catalytic mechanism of the *E. coli* chemotaxis phosphatase CheZ. *Nature Structural Biology*. 9(8): 570-575.
- Zhou, H., McEvory, M.M., Lowry, D.F., Swanson, R.V., Simon, M. & Dahlquist, F.W. 1996. Phosphotransfer and CheY-Binding Domains of the Histidine Autokinase CheA Are Joined by a Flexible Linker. *Biochemistry*. 35: 433-443.
- Zhou, J. & Blair, D.F. 1997. Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for torque generation in the bacterial flagellar motor. *J Mol Biol*. 273(2): 428-439.
- Zhou, J., Lloyd, S.A. & Blair, D.F. 1998a. Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Microbiology*. 95(11): 6436-6441.
- Zhou, J., Sharp, L.L., Tang, H.L., Lloyd, S.A., Billins, S., Braun, T.F. & Blair, D.F. 1998b. Function of protonatable residues in the flagellar motor of *Escherichia coli*: a critical role for Asp 32 of MotB. *J Bacteriol*. 180(10): 2729-2735.