



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**Estudio de la regulación transcripcional de *ctrA* en *Rhodobacter sphaeroides***

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Elidet Gómez César**

**TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Rosa Laura Camarena Mejía**

**Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: Dr. Georges Dreyfus Cortés**

**Instituto de Fisiología Celular, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: Dr. Luis Servín González**

**Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.**

**MEXICO, CDMX., JUNIO DE 2018**



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.



Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM.  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de abril del 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **GÓMEZ CESAR ELIDET** con número de cuenta **308221048** con la tesis titulada "**Estudio de la regulación transcripcional de *ctrA* en *Rhodobacter sphaeroides***", realizada bajo la dirección de la **DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA**:

Presidente: DR. FERNANDO SUASTE OLMOS  
Vocal: DRA. LAURA KAWASAKI WATANABE  
Secretario: DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ  
Suplente: DR. ADRIÁN FERNANDO ALVAREZ  
Suplente: DR. RODOLFO GARCÍA CONTRERAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 7 de junio del 2018.

**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por los donativos CB235996 y a PAPIIT (UNAM) por los donativos IN204317.

A la Dra. Laura Camarena, Dr. Georges Dreyfus y al Dr. Luis Servín por su interés en el trabajo.

A la QFB Aurora Osorio por más que su trabajo técnico.

A los sinodales por el tiempo dedicado a la revisión de mi trabajo.

## **Agradecimientos personales**

A mi hermosa madre por absolutamente todo. Gracias por tus días.  
Formación de recursos humanos: Diana Gómez César, Elidet Gómez César  
y Gerardo Gómez César.

A mis hermanos Gerardo y Diana por su infancia, adolescencia y madures.  
Diana nos has dado la mejor noticia de este año.

Al resto de mi familia por su alegría y simpatía con los que más amo.

A mis amigos Alicia, Ángel, Maritza, Gaby, José, Laura, Clelia, Karen,  
Caleb, Melania, Benjamín, Víctor, Yuritzi, David, Isaac, Verónica y Sahid  
por ser plural.

A ese hombre con todo y sus apellidos, eres mi final y mi comienzo.

## Dedicatoria

Tú la alfarera yo tan sólo barro, entre tus manos.

**F. S**

# Índice

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>5</b>
Flagelo	
Regulación de los genes flagelares	
Regulador de respuesta, CtrA	
Mecanismos de regulación de CtrA	
<b>Antecedentes particulares</b> .....	<b>24</b>
Rhodobacter sphaeroides	
Regulación de los sistemas flagelares en <i>R. sphaeroides</i> .	
Exclusión flagelar en <i>R. sphaeroides</i> .	
<b>Planteamiento del problema</b> .....	<b>29</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>31</b>
<b>Objetivo general</b> .....	<b>31</b>
<b>Objetivos particulares</b> .....	<b>31</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>32</b>
Cepas y condiciones de cultivo	
Cajas de nado	
Plásmidos utilizados	
Técnicas de ADN recombinante	
Conjugación bacteriana	
Complementaciones de cepas mutantes	
Fusiones transcripcionales de las regiones 5ÚTR de <i>sciP</i> y <i>ctrA</i>	
Fusiones transcripcionales $\Delta ctrA::uidA-aadA$	
Ensayo de $\beta$ -glucuronidasa	
Inmunodetecciones de las proteínas CtrA y CckA	
Cepa LEA	
Cepa EC5 y EC6	
Extracción de ARN	
RT-PCR	
<b>Resultados</b> .....	<b>46</b>
Actividad promotora de las regiones inter-cistrónicas de <i>sciP</i> y <i>ctrA</i>	
Organización transcripcional de <i>sciP-ctrA</i>	
Expresión de la proteína reguladora de respuesta CtrA en las cepas de <i>R. sphaeroides</i> .	
Regulación positiva del operón <i>sciP-ctrA</i>	
Actividad transcripcional del operón <i>sciP-ctrA</i> en distintas fuentes de carbono	
Transcripción del gen <i>cckA</i> en presencia de CtrA	
Transcripción de los genes <i>cckA</i> y <i>sciP-ctrA</i> en presencia de CtrAD51A	
Transcripción del gen <i>fleQ</i> en presencia de CtrA	
<b>Discusión</b> .....	<b>68</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>78</b>
<b>Perspectivas</b> .....	<b>79</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>79</b>

## Resumen

*Rhodobacter sphaeroides* es un  $\alpha$ -proteobacteria que posee dos sistemas flagelares. El sistema flagelar 1, presente en la cepa silvestre WS8N, que es controlado por el regulador maestro FleQ; y el segundo sistema flagelar, activado en la cepa AM1, que se encuentra regulado por el sistema de dos componentes CckA-ChpT-CtrA, en donde CtrA es la proteína reguladora de respuesta encargada de activar la transcripción de los genes tempranos y tardíos de la jerarquía flagelar. A la fecha no se han obtenido células que ensamblen ambos flagelos simultáneamente por lo que se ha sugerido que estos sistemas flagelares son excluyentes mediante un mecanismo hasta ahora desconocido.

En este trabajo y continuando con la caracterización del sistema flagelar Fla2, se planteó como objetivo determinar la regulación transcripcional del gen *ctrA* de *R. sphaeroides* utilizando diferentes fondos genéticos, así como distintas condiciones de crecimiento. Aquí demostramos que el gen *ctrA* forma parte de un operón cuyo promotor se encuentra regulado positivamente por la proteína CtrA. Además, se determinó que la transcripción del gen *ctrA* es inducida cuando las cepas son crecidas en cas aminoácidos al 0.2% y ácido succínico 100  $\mu$ M en comparación al nivel de expresión observado en ácido succínico 15 mM (concentración común de crecimiento). Mientras que la expresión del gen *ctrA* a partir de un promotor constitutivo presente en un plásmido de expresión no produjo una



acumulación de CtrA en todas las cepas ni en todas las condiciones de cultivo, lo que sugiere que existe regulación a nivel postranscripcional.

Por otro lado, con la evaluación de la actividad transcripcional de los genes *cckA* y *fleQ* en presencia y ausencia de la proteína CtrA, se demostró que ambos genes son blancos de esta proteína reguladora de respuesta. Estos resultados, nos permitieron proponer, el control de CtrA sobre la expresión de los genes que codifican para las proteínas activadoras de ambos sistemas flagelares en *R. sphaeroides*.

## Abstract

*Rhodobacter sphaeroides* is an  $\alpha$ -proteobacteria with two flagellar systems. The flagellar system1, expressed in WS8N wild-type strain, is controlled by the master regulator FleQ. The second flagellar system, expressed in AM1 strain, is regulated by the two-component system formed by CckA, ChpT and CtrA. CtrA controls the transcription of the early and late genes of the flagellar hierarchy. Given that these two different types of flagella have not been observed to be present simultaneously, it has been suggested that these flagella are excluding each other by an unknown mechanism.

In this work and continuing with the characterization of the flagellar system Fla2, we determined the transcriptional regulation of the *ctrA* in *R. sphaeroides*, using different genetic backgrounds, as well as different growth conditions. Here, we show that the *ctrA* is a part of an operon whose promoter is positively regulated by the protein CtrA. In addition, it was determined that *ctrA* transcription is induced when 0.2 % casamino acid or a low concentration of succinic acid (100  $\mu$ M succinic acid) are used as carbon source, as compared with the expression level of *ctrA* in cells grown in 15 mM succinic acid (common growth concentration). When *ctrA* was expressed constitutively from a plasmid promoter, CtrA was not accumulated in all the strain or culture conditions, suggesting that there is regulation at the posttranscriptional level.

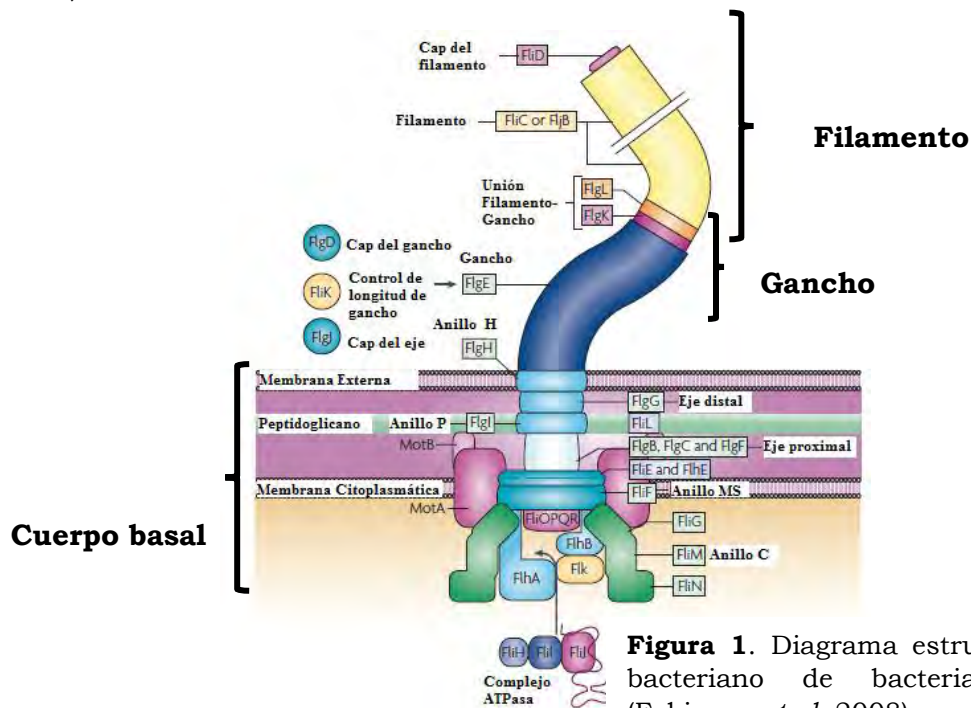
We also show that CtrA is required to transcribe the *cckA* gene, which encodes the histidine kinase that activates CtrA as a transcription factor; but CtrA reduce the expression of *fleQ*, that encodes the activator protein of the Fla1 flagellum. These results allowed us to propose, that CtrA controls the expression of the two master regulators controlling the Fla2 and the Fla1 systems in this bacterium.

# Introducción

## Flagelo

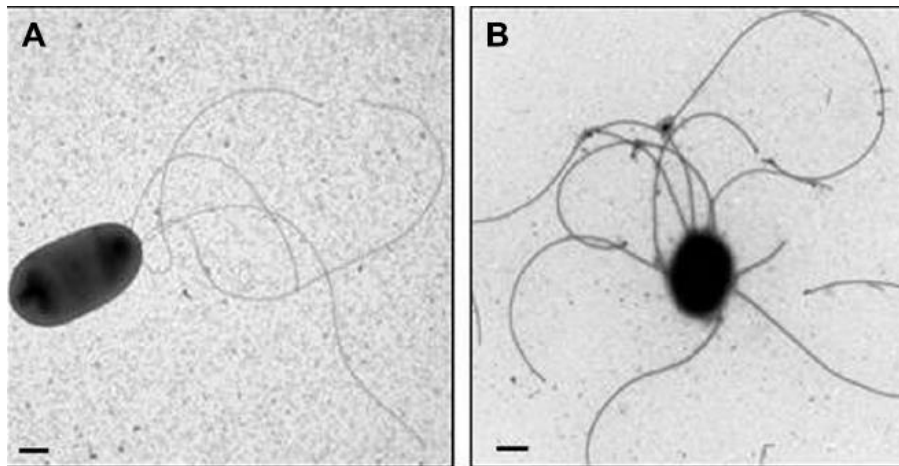
La motilidad bacteriana es requerida para varios procesos importantes, incluyendo respuestas de taxis (por ejemplo, quimiotaxis, aerotaxis, magnetotaxis), colonización de células vegetales y animales, formación de biopelículas, desarrollo bacteriano y dispersión de bacterias (Hoover *et al*, 2009).

El flagelo es un organelo de locomoción que está presente en muchas especies bacterianas de diversos *Phyla*. Las bacterias nadan por rotación de uno o más flagelos, alcanzando velocidades de 15-100  $\mu\text{m/s}$  o hasta 100 longitudes del cuerpo celular por segundo (Belas *et al*, 2014; Xue, *et al*, 2015).



**Figura 1.** Diagrama estructural del flagelo bacteriano de bacteria Gram-negativa (Fabienne *et al*, 2008)

El flagelo puede ser dividido para fines de estudio en tres subestructuras que son ensambladas jerárquicamente. El primer componente en ensamblarse es el cuerpo basal, el siguiente componente es el gancho y la tercera estructura es el filamento helicoidal (Belas *et al*, 2014) (**figura 1**).



**Figura 2.** *Pleisomonas shigelloides* 302-73. **A)** flagelo lofótrico medio líquido (swimming) **B)** flagelo peritrítico medio sólido (swarming) Merino *et al*, 2015.

Tanto el número como la distribución de los flagelos es variable según la especie bacteriana. Algunas especies bacterianas expresan uno o múltiples flagelos polares como *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* y *Helicobacter pylori* o bien flagelos peritricos como *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* y *Proteus mirabilis*. Sin embargo, algunas bacterias tienen y producen dos tipos diferentes de flagelo dependiendo de las condiciones de crecimiento en el laboratorio, en estos casos, un solo flagelo de tipo polar (Fla) está presente bajo todas las condiciones de crecimiento y es utilizado para su desplazamiento en medio líquido (“swimming”); y los flagelos laterales (Laf) que son producidos cuando las células son crecidas

sobre medios sólidos o viscosos para su desplazamiento en enjambre (“swarming”) (Merino *et al*, 2006 y 2015) (**figura 2**). Entre las bacterias caracterizadas por tener dos sistemas flagelares funcionales las mejor estudiadas son *Vibrio parahaemolyticus* y *Aeromonas hydrophila* (Merino *et al*, 2006).

### **Regulación de los genes flagelares**

La síntesis del flagelo bacteriano es un proceso complejo que requiere más de 50 genes para su biogénesis (Macnab *et al*, 2003). El ensamblaje del flagelo es un proceso altamente ordenado y en muchas bacterias los genes estructurales se expresan en una jerarquía transcripcional donde las proteínas codificadas por estos genes son sintetizadas a medida que se necesitan para la biosíntesis (Joyce *et al*, 2012). La regulación temporal de los genes flagelares es a través de redes de regulación sofisticadas que utilizan puntos de control o “checkpoints” en la vía de ensamblaje para coordinar la expresión de los genes.

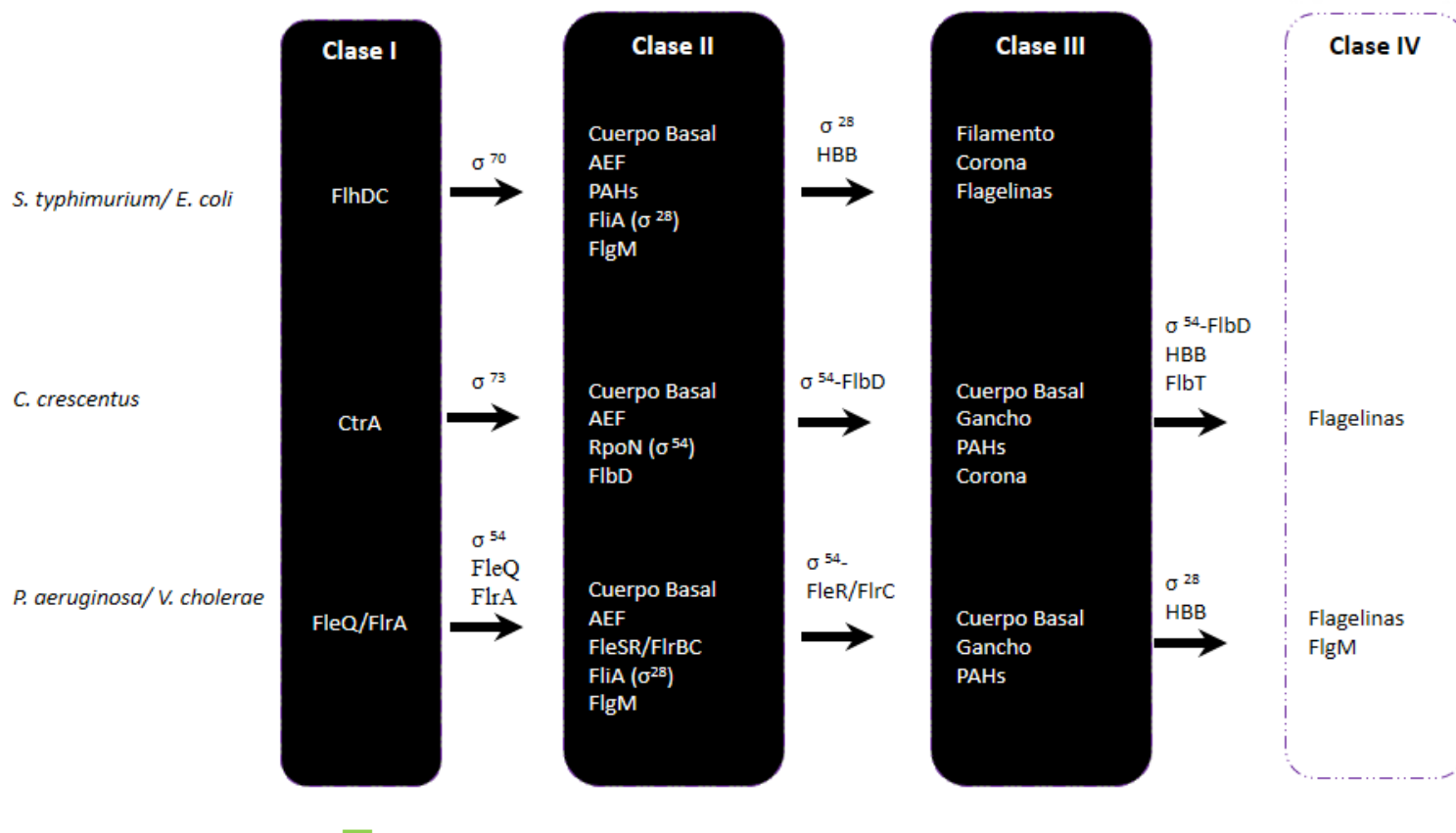
Tradicionalmente la jerarquía flagelar es dividida en varias clases: los genes de clase I, que son los primeros en expresarse y que codifican para un regulador maestro que inicia la cascada transcripcional: esta proteína activa la transcripción de un grupo de genes regulatorios y estructurales que se refieren como los genes de clase II que a su vez codifican para las proteínas que conforman el cuerpo basal, y el aparato de exportación. En esta clase

se sintetizan también, las proteínas regulatorias necesarias para la expresión de los genes de las clases III y IV (Hoover *et al.*, 2009).

Entre los sistemas más estudiados, el regulador maestro mejor caracterizado es FlhDC de *E. coli*, *S. enterica* y *Proteus mirabilis* (**figura 3**). Las proteínas FlhD y FlhC forman un complejo heterohexamérico que reconoce en el DNA repeticiones largas invertidas y causa la flexión del mismo (Lui *et al.*, 1994; Claret *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006). FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> se une río arriba de los promotores flagelares activando la transcripción de genes cuyos productos incluyen a los componentes del cuerpo basal, aparato de exportación flagelar, gancho y a las proteínas reguladoras FliA y FlgM (Claret *et al.*, 2002; Frye *et al.*, 2006; Gillen *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1994; Pruss *et al.*, 2001). Los genes activados por este complejo son nombrados genes de clase II o medios. Uno de los genes bajo el control de FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> es *fliA* que codifica para el factor sigma alternativo,  $\sigma^{28}$ . La expresión de los genes de clase III o tardíos incluyendo el gen *fliC* que codifica para la flagelina, es dependiente de  $\sigma^{28}$  (Kutsukake *et al.*, 1990; Ohnishi *et al.*, 1990). Por su parte, FlgM es un factor anti-sigma que interactúa con  $\sigma^{28}$  para prevenir la transcripción de los genes de clase III. La inhibición de los genes de clase III es interrumpida una vez que es completada la estructura del cuerpo basal-gancho (HBB por sus siglas en inglés Hook Basal Body), entonces el aparato de exportación flagelar cambia la especificidad del sustrato y transporta la proteína FlgM fuera de la célula permitiendo así la activación de promotores

dependientes de  $\sigma^{28}$ , concluyendo así la síntesis total del flagelo (Hughes *et al.*, 1993).





**Figura 3.** Paradigmas de jerarquía de genes flagelares. Comparación de redes regulatorias de genes flagelares. Los genes de clase I codifican los reguladores maestros. Las proteínas reguladoras codificadas por los genes de clase II incluyen:  $\sigma^{28}$  (FliA), el factor anti-sigma (FlgM) y el regulador dependiente de  $\sigma^{54}$ , FlbD en *C. crescentus*, además, de FleRS en *P. aeruginosa* y FlrBC en *V. cholerae*. La regulación de los genes de clase III/IV son controladas por el correcto y completo ensamblaje del cuerpo basal-gancho (HBB) (Smith, 2009).

Como es de esperar, existen variaciones entre los mecanismos que forman la arquitectura de las redes regulatorias que controlan la biosíntesis del flagelo en las diferentes especies bacterianas (**figura 3**).

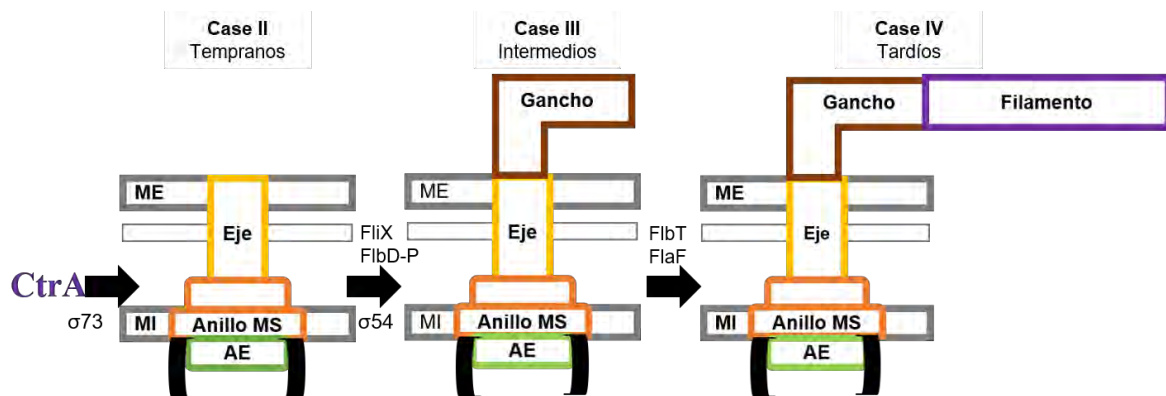
En la  $\alpha$ -proteobacteria *C. crescentus* los genes flagelares constituyen una parte importante de los genes controlados por CtrA (Laub *et al*, 2002). La unión de CtrA junto con la holoenzima  $\sigma^{73}$ -RNA polimerasa a sitios de las regiones regulatorias de los promotores de clase II activa la transcripción (Reisenauer *et al*, 2002; Wu *et al*, 1998). CtrA-P se une a repeticiones directas de la secuencia TTAA que se separan por un espaciador crítico de 7 pb (Ouimet *et al*, 2000; Quon *et al*, 1996) sobre el elemento -35 de los promotores (Reisenauer *et al*, 1999). Los genes de clase II codifican para los componentes del aparato de exportación, así como para las proteínas reguladoras RpoN ( $\sigma^{54}$ ) y FlbD (Laub *et al*, 2002; Quon *et al*, 1996) que son también dependientes de CtrA (Laub *et al*, 2002). La expresión de los genes flagelares tardíos, clase III y clase IV, está regulada por el activador transcripcional FlbD (Brun *et al*, 1992; Ramakrishnan *et al*, 1990) que es un activador con tres dominios funcionales: un dominio regulador de respuesta, un dominio ATPasa AAA+ y un dominio de unión a DNA (Ramakrishnan *et al*, 1990). La actividad de FlbD está tanto positivamente como negativamente regulada a través de su interacción con FliX (Mohr, 1998; Muir *et al*, 2001), que es transcrito en la clase II e igualmente controlado por CtrA (Mohr *et al*, 1998). FliX forma un complejo estable con FlbD que le impide unirse al DNA y activar la transcripción de los genes

dependientes de  $\sigma^{54}$  (Dutton *et al*, R. 2005). Tras la formación de la estructura flagelar naciente que consiste del anillo MS, el interruptor del motor (“switch”) y el aparato de exportación de proteínas flagelares, FliX responde a una señal aún no conocida para activar la fosforilación de FlbD provocando así la activación transcripcional de los genes de clase III, dependientes de  $\sigma^{54}$  (Mohr *et al*, 1998; Muir *et al*, 2001).

Además de esta regulación, en *C. crescentus* se ha descrito el control post-transcripcional para los genes de clase IV dado por las proteínas FlbT y FlaF. Actualmente se sabe que los dos principales genes de la flagelina *fljK* y *fljL* son transcritos en ausencia del complejo HBB completo, sin embargo, estos RNAs mensajeros no se traducen. A partir de estudios de la expresión de *fljK* a nivel transcripcional y traduccional, ha sido propuesto que la proteína reguladora FlbT, inhibe la traducción y disminuye la estabilidad del transcrito *fljK* antes de completar el complejo HBB. A la fecha se piensa que FlbT se une a la región 5' no traducida (UTR) del transcrito para estabilizar la conformación que inhibe la traducción, lo que resulta en una disminución del transcrito (Anderson *et al*, P, 2000), que posteriormente y una vez completado el complejo HBB por un mecanismo aún desconocido el efecto inhibitorio de FlbT es aliviado permitiendo la síntesis de la flagelina (Anderson *et al*, P, 2000).

Sumado a esto, también se ha reportado que la proteína FlaF de apenas 120 aminoácidos también se encuentra regulando a *fljK*. Mutantes en *flaF* son incapaces de mostrar la expresión de flagelina, sin embargo, al obtener

cepas doble mutantes (en los genes *flaF* y *flbT*) la expresión de flagelina se recupera, pero no la motilidad, lo que ha permitido pensar en la participación de FlaF para el ensamblaje del filamento (Llewellyn *et al*, 2005) (figura 4).



**Figura 4.** El regulador maestro en *C. crescentus*, CtrA activa la transcripción de los genes de clase II junto con la forma de la holoenzima RNA polimerasa (holoenzima  $\sigma^{73}$ ). Los genes de clase II codifican componentes del aparato de exportación flagelar y el cuerpo basal, así como al sistema FliD/FliX que a su vez estimula la transcripción de los genes de clase III (dependientes de  $\sigma^{54}$ ). La formación completa del cuerpo basal es necesaria para interrumpir el efecto inhibitorio de FliB en la traducción de los genes flagelares de clase IV, que incluyen los genes de flagelina *fljK* y *fljL*. (Smith *et al*, 2009).

### Regulador de respuesta, CtrA

Además de participar como el regulador maestro de la biosíntesis del flagelo, CtrA es la proteína reguladora de respuesta que forma parte del sistema de dos componentes CckA-ChpT-CtrA.

En las bacterias, los sistemas de dos componentes constituyen una forma dominante para el control de genes en respuesta a cambios en el entorno (Buelow *et al*, 2010). Estos han sido implicados en la adaptación a una variedad de condiciones de estrés, interacciones patogénicas y simbióticas

con células eucariotas, así como en vías intracelulares esenciales (Groisman *et al*, 2016).

Los sistemas de dos componentes clásicos consisten de una proteína sensora que responde a una señal física o química modificando el estado fosforilado de una proteína reguladora de respuesta afin. Los reguladores de respuesta a menudo son represores y/o activadores transcripcionales que se unen al DNA, y la consecuencia de una condición inducida para el sistema de dos componentes es típicamente un cambio en el perfil transcripcional de un organismo. La fosforilación generalmente aumenta la afinidad de un regulador por su DNA blanco. Aunque también existen reguladores que carecen de dominios de unión al DNA y ejercen sus efectos reguladores al establecer interacciones directas con proteínas o RNAs blancos (Groisman *et al*, 2016).

Como regulador de respuesta, CtrA se encuentra agrupado dentro de la familia de OmpR, que se caracteriza por tener un dominio receptor ubicado en el extremo N-terminal que puede ser fosforilado en su residuo de ácido aspártico conservado 51 (Asp51) para activar a la proteína; y un dominio C-terminal de unión al DNA, hélice-vuelta-hélice, que en *C. crescentus* reconoce y se une principalmente a dos secuencias; un palindrómico completo TTAA-N7-TTAA ubicado comúnmente en la región -35 que activa la transcripción y un palindrómico medio TTAA que puede ser reconocido

en dos regiones, la posición -10 provocando represión o la posición -35 provocando activación (Zhou *et al*, 2015).

CtrA controla múltiples procesos celulares en diversas  $\alpha$ -proteobacterias, análisis bioinformáticos han identificado ortólogos de CtrA en la mayoría de las bacterias en este grupo (Brilli *et al*, 2010), dentro de las cuales su funcionalidad ha sido dividida de tal forma que se reconoce, esencial para la sobrevivencia en especies como *Sinorhizobium meliloti*, *Brucella abortus* y *C. crescentus* (Barnett *et al*, 2001; Bellefontaine *et al*, 2002; Quon *et al*, 1996); contrario a lo reportado en las especies *Rhodospirillum centenum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Sphingomonas melonis* y *R. sphaeroides*, donde su función parece no comprometer directamente la viabilidad de las células (Bird *et al*, 2011; Lang *et al*, 2002; Vega-Baray *et al*, 2015).

Actualmente y con la utilización de métodos masivos, son varios los trabajos que han reportado el perfil transcripcional de genes controlados de manera positiva o negativa por CtrA en las distintas  $\alpha$ -proteobacterias. Estudios en *S. meliloti* han demostrado la importancia del regulador en al menos 126 genes que son afectados con la depleción de CtrA, entre los que se encuentran los genes involucrados en la motilidad bacteriana (*flaA*, *flaB*, *flaC*, *pilA*, etc.), quimiotaxis (*mcpZ*, *mcpW*, *mcpT* etc.) y la división celular (*minCDE*) (Pini *et al*, 2015). De manera similar en *B. abortus*, el regulón de CtrA es conservado al compararlo con *C. crescentus* y con la misma *S.*

*meliloti* al incluir a los genes involucrados en la división celular (operón *minCDE*, en el caso de *B. abortus* y *S. meliloti*), replicación del DNA (*dnaA*), metilación del DNA (*ccrM*) y control del ciclo celular (*repAB*, *ctrA* y *ccrM*). Además de regular de forma característica los componentes de la membrana externa que participan en la exportación de proteínas de membrana y síntesis de lipopolisacáridos (Francis *et al*, 2017).

Por su parte, en *Sphingomonas melonis* la caracterización de la mutante en *ctrA* ha permitido reconocer su participación en la expresión de los genes blancos para el control de la motilidad (*fleT*, *flgI*, *flaA*, etc.), síntesis de exopolisacáridos y formación de biopelículas (Francez *et al*, 2015).

Cabe mencionar que sumado, al reconocimiento de estos genes, estos trabajos a su vez han demostrado la regulación de CtrA sobre los genes que codifican para las proteínas encargadas de controlar su actividad, sugiriendo así la existencia de redes complejas de regulación. Entre estos podemos encontrar a *sciP* y *divJ* en *S. meliloti* (Pini *et al*, 2015); y *divJ*, *divK*, *divL*, *chpT*, *cdpR*, *rcdA*, *sciP* y *ccrM* en *B. abortus* (Francis *et al*, 2016).

### **Mecanismo de regulación de CtrA**

Hasta la fecha son pocos los estudios que abordan el análisis de los mecanismos de regulación del sistema de dos componentes y/o la activación

de CtrA en  $\alpha$ -proteobacterias distintas a *C. crescentus* por lo que, son principalmente los estudios en esta bacteria los que han demostrado que CtrA es controlada por la combinación de tres factores: transcripción, fosforilación y proteólisis (Tan *et al*, 2010) (**figura 5**), de los cuales el control por transcripción es el más estudiado entre las especies.

A nivel transcripcional y como sucede con los reguladores de respuesta de muchos de los sistemas de dos componentes, entre los que se incluyen; OmpR de *S. enterica* serovar Typhimurium (Bang *et al*, 2002), ComE de *Streptococcus pneumoniae* (Martin *et al*, 2010) y PhoQ de *E. coli* (Minagawa *et al*, 2003); en *C. crescentus*, *S. meliloti*, y *B. abortus* se ha demostrado que CtrA retroalimenta su propia transcripción (Domian *et al*, 1999; Barnett, 2001; Bellefontaine *et al*, 2002).

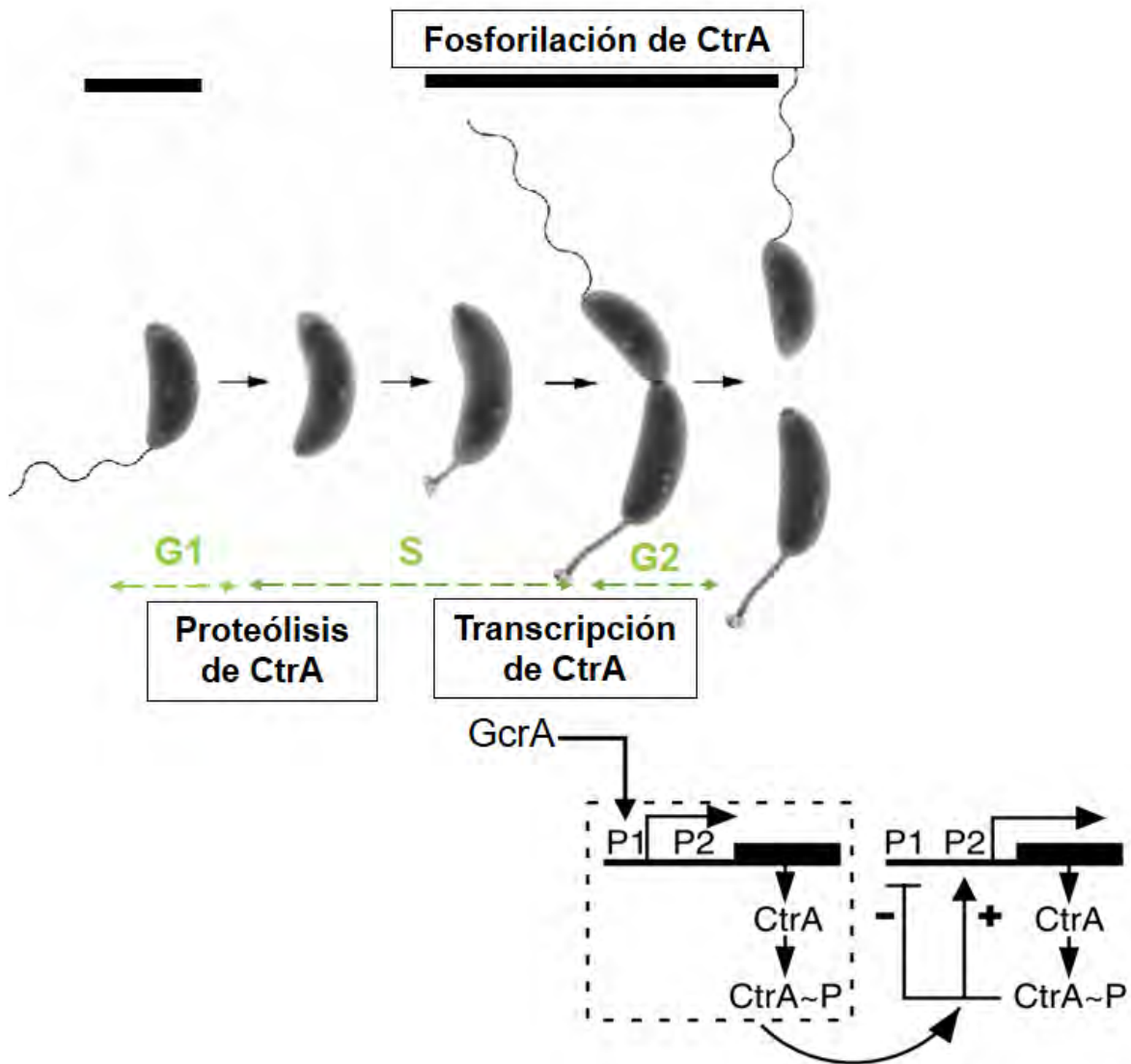
En *C. crescentus* el ciclo celular está programado para producir una célula flagelada mótil y una célula prostecada sésil como resultado de la oscilación de los cuatro reguladores globales; GcrA, CcrM, SciP y CtrA (Panis *et al*, 2015); donde CtrA-P es la responsable de controlar cerca de 55 operones de los genes involucrados en la regulación del ciclo celular, entre los que destacan; los de la biogénesis del flagelo, el pili, metilación del DNA y la división celular (Laub *et al*, 2002).

En esta bacteria, CtrA es una proteína que se acumula en la célula móvil solo después de que DnaA ha iniciado la replicación del DNA y ha activado la transcripción de los genes para la transición celular, entre los que se



encuentra *gcrA* cuyo producto, GcrA, activa la transcripción de los genes implicados en la elongación de la replicación del DNA, la segregación cromosómica, así como el promotor P1 de *ctrA*.

El gen *ctrA* es transcrito a partir de dos promotores; un promotor débil temprano, P1, que es activado por GcrA solo en la célula predivisional temprana después de que su *locus* se ha replicado y el promotor P1 queda en estado hemimetilado (por metilación de N<sup>6</sup>-adenosina) (Holtzendorff *et al*, 2004; Reisenauer *et al*, 2002); y un promotor tardío fuerte, P2, que es activado en la célula predivisional tardía por CtrA-P (Domian *et al*, 1999) (**figura 5**). Ya ha sido reportado que ambos promotores contienen secuencias motivo de unión a CtrA y una regulación de tipo retroalimentación mediada por CtrA-P, donde el promotor P1 con una caja de unión media a CtrA (TTAA) es regulado negativamente; mientras el promotor P2, con una caja completa a CtrA (TTAA-N7-TTAA) es regulado positivamente (Domian *et al*, 1999; Zhou *et al*, 2015). Asimismo, y con estudios más recientes se ha reconocido un tercer promotor, P3, localizado entre estos dos promotores con un patrón temporal de activación similar a P1, permitiendo sugerir que tanto P1 como P3 funcionan acelerando la producción de CtrA inicialmente (Zhou *et al*, 2015).



**Figura 5.** Esquema de retroalimentación de la transcripción de *ctrA* en *C. crescentus*. Diagrama del ciclo celular. La célula nadadora tiene un flagelo polar, contiene la proteína CtrA y no puede iniciar la replicación del ADN. Durante la diferenciación a célula prostecada, el flagelo es eliminado y una prosteca se construye en el mismo polo, CtrA es degradada por proteólisis y la célula es capaz de iniciar la replicación del ADN. CtrA se transcribe y se vuelve a acumular en la célula predivisional, y un flagelo se construye en el polo opuesto a la prosteca. CtrA se elimina de la porción con prosteca en la célula predivisional tardía. La división asimétrica proporciona una célula nadadora y una célula prostecada competente para la replicación. También se muestran la fosforilación de la proteína.

Por otra parte, y contrario a la regulación ya descrita, en *R. capsulatus*, donde se han reconocido hasta 216 genes afectados por la ausencia de CtrA (Mercer *et al*, 2010), se ha demostrado que *ctrA* no se auto-regula (Leung *et al*, 2013). Experimentos en esta bacteria han reportado que la expresión transcripcional de *ctrA* es afectada por la condición de crecimiento y el sistema “quorum sensing” (Leung *et al*, 2013). Cuantificaciones de la actividad transcripcional del gen *ctrA* determinadas mediante el uso de un gen reportero en plásmido, y utilizando distintas condiciones de crecimiento, mostraron que los niveles más altos de transcripción para *ctrA* son obtenidos en condición fotoheterotrófica en medio mínimo al compararse con la condición quimioheterotrófica en medio rico. De igual manera, y al evaluarse la transcripción del gen en medios con reducción de nutrientes (fosfato, carbono y nitrógeno) el mismo estudio reportó que concentraciones reducidas de fosfato disminuyen de un 20% hasta un 50% la expresión de *ctrA*, contrario a las reducciones en la concentración de fuente de carbono o nitrógeno donde no se presentaron efectos sobre la transcripción del gen. Además, y con el objetivo de identificar vías de regulación para el gen, Leung y colaboradores demostraron que los homólogos del sistema LuxR-LuxI, actúan regulando la expresión del gen *ctrA*; en ausencia de la sintasa GtaI, así mismo, se determinó que GtaR regula de forma negativa la expresión de *ctrA*, mientras que *ctrA* se expresó a niveles semejantes al de la cepa silvestre en ausencia de ambas proteínas (Leung *et al*, 2013).

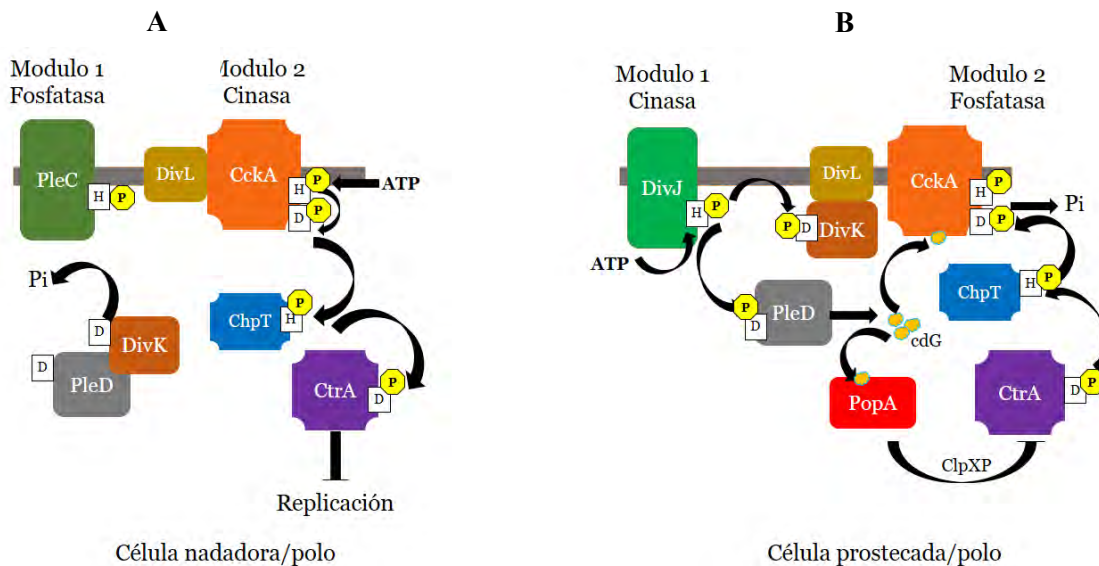
Cabe mencionar, que al igual que ocurre en *R. capsulatus*, estudios realizados en *Ruegeria sp. KLH11* también han demostrado la participación de su sistema “quorum sensing” SsaI-SsaR, en la regulación transcripcional del sistema de dos componentes CckA-ChpT-CtrA (Zan *et al*, 2013).

Por otro lado, y como ya se mencionó, en *C. crescentus*, CtrA es controlada mediante fosforilación y proteólisis. Actualmente se sabe que en *C. crescentus*, tanto la desfosforilación como la proteólisis son necesarias específicamente en la célula prostecada para permitir la replicación del DNA y la expresión de genes reprimidos por CtrA-P (Mann *et al*, 2016).

Una vez terminada la fase S, CtrA es activada por fosforilación a través de la histidín cinasa híbrida CckA y la histidín fosfotransferasa ChpT (Tsokos *et al*, 2011). CckA es una proteína de membrana que se encuentra presente durante todo el ciclo celular, inactiva en la célula prostecada y activa durante la fase media de la célula predivisional tardía (Curtis *et al*, 2010, Tsokos *et al*, 2011); está formada por una región sensorial N-terminal (dominios PAS), un núcleo catalítico (con el dominio de dimerización y fosforilación de histidina y el dominio catalítico de unión a ATP) y un dominio receptor C-terminal (RD) que indirectamente proporciona el fosfato a CtrA a través de ChpT (Mann *et al*, 2016).

Ya se ha demostrado que la actividad de CckA es controlada a su vez por la proteína reguladora de respuesta DivK y el segundo mensajero c-di-GMP (Tsokos *et al*, 2011, Ozaki *et al*, 2015, Mann *et al*, 2016).

En la célula nadadora, cuando la fosfatasa PleC está presente en el polo, las proteínas PleD y DivK son desfosforiladas lo que permite que CckA adopte un modo de cinasa determinado por la interacción con DivL, lo que provoca la activación de CtrA por fosforilación, que bloquea la iniciación de la replicación del ADN (**figura 6A**). Por el contrario, durante la transición de célula nadadora a célula prostecada (G1-S), la proteína PleC es reemplazada por la cinasa DivJ en el polo prostecado, lo que genera el aumento en la fosforilación de las proteínas PleD y DivK, provocando esta última (DivK-P) la regulación negativa en la actividad cinasa de CckA, que actúa ahora como fosfatasa regresando la transferencia del fosfato de ChpT a RD (dominio receptor de CckA) generando la inactivación de CtrA y la iniciación de la replicación del ADN (Ozaki *et al*, 2015) (**figura 6B**).



**Figura 6.** Modelo del circuito regulatorio que controla a CtrA, transiciones del ciclo celular y destino celular en *C. crescentus*. En el esquema se ilustran las interacciones proteína-proteína que regulan la actividad de CckA en polos de la célula nadadora y en célula prostecada. En paralelo, c-di-GMP sintetizado por PleD-P, inhibe la actividad cinasa de CckA, y facilita la degradación de CtrA vía PopA y la proteasa ClpXP. D y H indican sitios aceptores de fosfato Asp y His conservados (Ozaki *et al*, 2015).

Adicional a este control, estudios recientes del extremo N-terminal de CckA han demostrado la participación de dominios PAS (A y B) en la regulación de las actividades cinasa/fosfatasa. Experimentos *in vitro* han demostrado que el dominio PAS-A interviene en la actividad cinasa dependiente de la densidad superficial, inactiva a baja densidad y activa a alta densidad, mientras el dominio PAS-B provoca la inhibición de la actividad cinasa y estimula la actividad fosfatasa al unir al segundo mensajero c-di-GMP. Teniendo entonces dos eventos de señalización con regulación fina que son procesados por CckA para ser integrados a la red regulación de CtrA (Mann *et al*, 2016).

Finalmente, la proteólisis de CtrA se realiza en el complejo proteasa ClpXP (Jenal *et al*, 1998), que posee la subunidad ClpP de actividad proteasa y la subunidad ClpX de reconocimiento y despliegue de sustrato (Licht *et al*, 2008). Una vez que ChpT deja de fosforilar a CpdR (que también es su regulador afin) éste se activa favoreciendo la localización de la proteasa ClpXP al polo de la célula prostecada incipiente. Al mismo tiempo la proteína diguanilato ciclasa PleD-P, que es activa en la célula prostecada (e inactiva en su forma desfosforilada presente en célula nadadora), incrementa los niveles del segundo mensajero c-di-GMP (Ozaki *et al*, 2015), provocando que la proteína PopA que contiene dos dominios receptores seguidos de un dominio homólogo a las diguanilato ciclasas, actúe como un sensor para el c-di-GMP que se une a un sitio alostérico provocando la unión y localización polar de RcdA-CtrA donde CtrA es degradada, logrando así la disminución

intracelular rápida del regulador de respuesta y permitiendo la iniciación de un nuevo ciclo celular (Duerig *et al*, 2009; Taylor *et al*, 2009; Ozaki *et al*, 2015) .

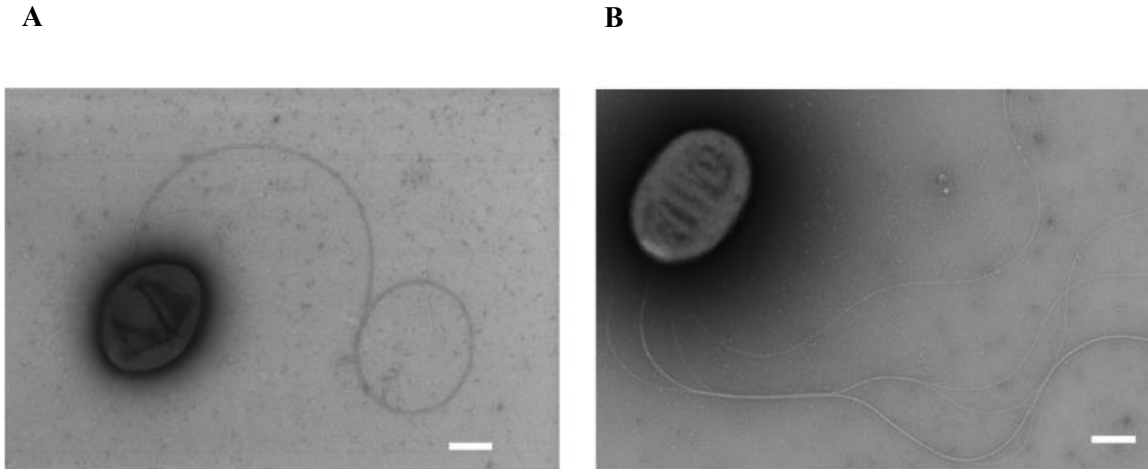
Cabe mencionar que de los mecanismos de control de CtrA aquí citados, el presente trabajo se enfocó en la regulación transcripcional del gen *ctrA* para el modelo de estudio *Rhodobacter sphaeroides*.

## **Antecedentes particulares**

### ***Rhodobacter sphaeroides***

*R. sphaeroides* es una bacteria fotosintética que pertenece al sub-grupo de las  $\alpha$ -Proteobacterias. Puede crecer en condiciones aeróbicas, anaeróbicas y aprovechar compuestos orgánicos e inorgánicos como fuente de carbono (Mackenzie *et al*, 2007).

Esta bacteria tiene dos sistemas flagelares. El flagelo 1; que está presente en la cepa silvestre, WS8N, que ensambla un flagelo de tipo monótrico subpolar considerado por mucho tiempo como el único sistema flagelar de la especie; y el sistema flagelar 2 que fue identificado en una mutante espontánea móvil en un fondo genético *fla1-*, esta mutante espontánea nombrada AM1 ensambla un flagelo de tipo lofótrico (**figura 7**) (Poggio *et al*, 2007; Vega-Baray *et al*, 2015; Mora *et al*, 2015).



**Figura 7.** Micrografías electrónicas de las cepas WS8N y AM1 de *R. sphaeroides*. **A)** *R. sphaeroides* silvestre WS8N mostrando un flagelo medialmente localizado. **B)** *R. sphaeroides* AM1 mostrando flagelos polares. Barras graduadas 500nm (Mora *et al*, 2015).

A la fecha, se sabe que ambos sistemas flagelares permiten el nado de las células en medios líquidos y ninguno de ellos es considerado un sistema lateral. Además, análisis filogenéticos y de sintenia han demostrado la herencia vertical del sistema flagelar 2 y el posible evento de transferencia horizontal por parte de una  $\gamma$ -proteobacteria que dio origen al sistema flagelar 1 en esta especie (Poggio *et al*, 2007).

#### **Regulación de los sistemas flagelares en *R. sphaeroides*.**

En el laboratorio se han caracterizado y se siguen caracterizando muchas de las proteínas involucradas en la regulación, ensamblaje y buen funcionamiento de ambos sistemas flagelares.



Ya se ha reportado, que la transcripción de los genes flagelares *fla1* es controlada siguiendo una jerarquía flagelar de cuatro niveles en donde la proteína FleQ es el activador maestro. FleQ activa la transcripción de los genes de clase II entre los que se encuentran los genes que codifican para las proteínas: FliF (anillo MS), FliG (anillo C), las proteínas del aparato de exportación (FliHI) y el activador maestro FleT, que se une con FleQ generando probablemente un complejo hexamérico de heterodímeros que activa la transcripción de los genes de clase III, que incluyen el resto de genes necesarios para la formación del cuerpo basal y del gancho (HBB), así como los genes *fliA* y *flgM*. Donde la proteína FliA es el factor alternativo  $\sigma^{28}$  que reconoce la secuencia nucleotídica de los promotores de clase IV, y FlgM el factor anti-sigma que mantiene inactivo a FliA hasta la completa formación del HBB (Poggio *et al*, 2005).

Por su parte, se conoce muy poco acerca de la regulación de los genes flagelares 2. Estudios recientes en el laboratorio han demostrado que la cepa AM1, seleccionada para nadar con este sistema flagelar posee una mutación puntual de tipo transición (G por A), que cambia la leucina 391 por una fenilalanina (L391F) en la histidin cinasa CckA, lo que favorece su autofosforilación *in vitro* permitiendo suponer *in vivo* la activación del sistema de dos componentes CckA-ChpT-CtrA, responsable de la expresión de los genes del sistema flagelar 2 en esta cepa. Donde CtrA es necesaria para la expresión de los promotores flagelares tempranos, así como para los tardíos (Vega-Baray *et al*, 2015; Hernández-Valle *et al*, 2017). Además,

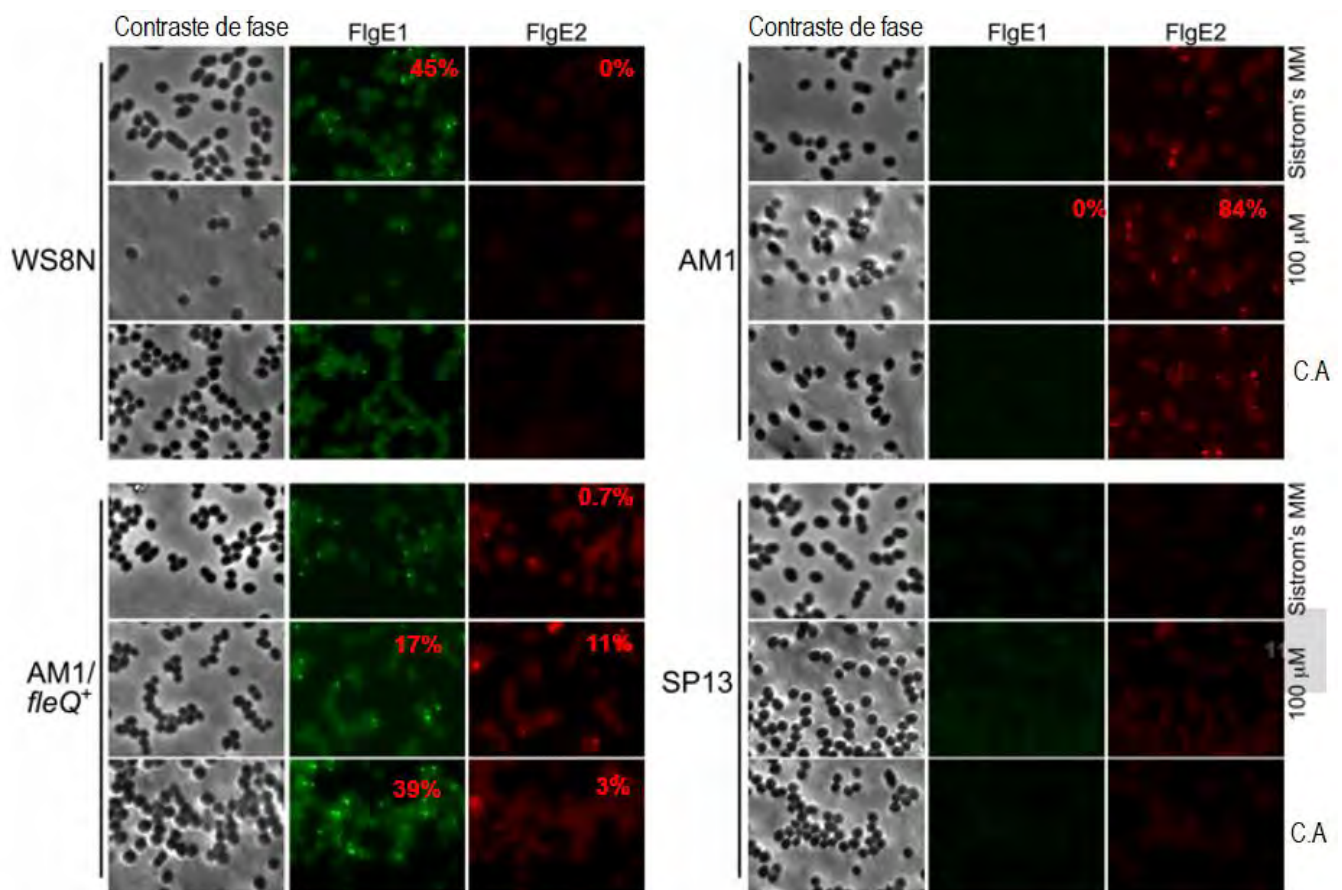
fusiones transcripcionales, también han demostrado que la actividad transcripcional de *cckA* es afectada por la concentración y fuente de carbono utilizada por *R. sphaeroides*. El gen *cckA* es fuertemente reprimido por la presencia de una alta concentración de ácidos orgánicos e inducido fuertemente con bajas concentraciones (Vega-Baray *et al*, 2015).

### **Exclusión flagelar en *R. sphaeroides*.**

Mediante la inmuno-detección *in situ* de la estructura del gancho de los sistemas flagelares 1 y 2 (FlgE1, correspondiente al flagelo 1, y FlgE2 del flagelo 2), se ha detectado la presencia del gancho en los diferentes fondos genéticos de *R. sphaeroides* bajo distintas condiciones de crecimiento.

A partir de dichos experimentos se observó que la cepa WS8N solo presenta focos fluorescentes para FlgE1 cuya detección es mayoritaria cuando la cepa es crecida en medio mínimo de Siström (Siström con 15 mM de ácido succínico), lo cual es contrario a lo observado en la cepa AM1 que presenta focos fluorescentes solo para la proteína del gancho del sistema flagelar 2 (FlgE2) principalmente en medio mínimo de Siström con 100  $\mu$ M de ácido succínico y medio de Siström sin ácido succínico adicionado con 0.2% de cas aminoácidos (CA)(**figura 8**). Asimismo, se observa que en la cepa SP13 no es posible detectar ninguno de los dos flagelos. SP13 es una cepa *fleQ*<sup>-</sup> que no ha sido seleccionada para nadar con el sistema flagelar 2. Por su parte, las detecciones de la cepa AM1/*FleQ*<sup>+</sup>, muestran una mayor cantidad

de focos fluorescentes para la proteína del gancho del sistema flagelar 1 (FlgE1) en todas las condiciones de crecimiento, incluyendo aquellas en donde el sistema flagelar 2 es inducido (100  $\mu$ M y CA) (**figura 8**). Además, cabe mencionar que no se obtuvieron células con señales simultáneas para ambos flagelos, lo que ha llevado a sugerir desde entonces la exclusión mutua entre los dos sistemas flagelares, así como la participación del flagelo 1 en la inhibición de la síntesis del flagelo 2 en *R. sphaeroides* (Vega-Baray *et al*, 2015).



**Figura 8.** Detección *in situ* de los flagelos Fla1 y Fla2. Células bacterianas obtenidas del medio de cultivo indicado a la derecha se incubaron en presencia de anti-FlgE1 o anti-FlgE2 marcado con Zenon Alexa Fluor 488 o Alexa 546 respectivamente (Vega-Baray *et al*, 2015).

## Planteamiento del problema

*R. sphaeroides* es una bacteria que posee dos diferentes sistemas flagelares: Fla1 y Fla2, ambos permiten el nado de las células en medios líquidos y ninguno de ellos es considerado un sistema lateral. En condiciones de laboratorio el sistema flagelar 1, es preferentemente expresado al compararse con el sistema flagelar 2. A la fecha, no se han reportado células que ensamblen ambos sistemas flagelares al mismo tiempo, lo que ha sugerido la participación de Fla1 en la inhibición de sistema flagelar 2 por mecanismos aún desconocidos.

Actualmente se conoce muy poco acerca de la regulación de los genes flagelares 2 y los mecanismos implicados en su regulación, por lo que este trabajo se planteó como objetivo estudiar la regulación transcripcional del regulador de respuesta, CtrA, en los diferentes fondos genéticos y distintas condiciones de crecimiento que pudieran inhibir o regular su expresión en *R. sphaeroides*.

Similar a lo que sucede en *C. crescentus* y en varias  $\alpha$ -proteobacterias, en *R. sphaeroides* la región promotora del gen *ctrA* contiene el motivo de secuencia reportado en los promotores regulados positivamente por CtrA (**figura 9**), lo que nos permitió desde un inicio sugerir la regulación autógena del gen. Sin embargo, el gen *sciP*, gen río arriba de *ctrA*, también contenía una caja de unión a CtrA en su región regulatoria, planteando entonces como inicio del trabajo la evaluación funcional de ambas regiones.

Fw1psiP  
 GGAGCGTGACGCCACCACATCGTAGCCCTCGGGCGGAGCTCGGCCGCCACCACGGAAGTGTGACGCCGCCGAC  
 ATGCCACAACCACGCGGGTGGCGGGGGGGCTTGGCGAAACCCAGCGAATTGAGCGGATGGTCGAGCATGGCTGCG *trmU*  
 CGCCTTCGGATCAGTGAAGCGCGCAATATAAGAAAATGCAGCGCAGTCTCAACCCCTCGTTTCAACCGATGATTAAGGCC  
 Caja de CtrA  
 GCTCCGTCAGCCTTCCGCCTGATGGAGGATGAGGGATGATCTCAAGCGGTTGATGGTCCGCGGCAGGTGACGCTG *sciP*  
 CCGGACGGGACCGTTCTGAGCCGGGCCGACCTGCGCCGCTCGACACACGGGCGCTGGGTTGCAAGCCGCAAGGCGG  
 RwlpsiP  
 CCGTCGTGAAGGCGGTGATCCACGGGCTCATCACGAGCGCGAGGCGCTGGACCGCTACAGCCTGTCCGAAGAGGAAT  
 Fw2pctrA  
 TCGCCCTGTGGCGGTGGCGGTGGCCGCGCACGGCGAGAAGGCGCTGAAGGTCACGATGATCCAGAAATATCGGCAA  
 STOP Caja de CtrA  
 CTTTAGATTGTATTAGCTTCGCCTATGCGAGAGTAACTCATGATTAACCATTGGGCATCATTGTAGTTAATACCTAGGGT  
*ctrA*  
 GCGCATGCGGAGCGAGTGATGAGAATACTGCTGGTGGAGGATGATCCGACCACGTCCCGCAGCATCGAATTGATGCT  
 GACTCATGCGAACCTGAACGTCTATTGCACCGATCTCGGCGAGGACGGGATCGATCTGGCCAAGCTCTACGATTACGAT  
 Rw2pctrA  
 CTCATCCTGCTG

**Figura 9.** Secuencia de DNA de las regiones río arriba de los genes *ctrA* y *sciP*. En verde se muestran los codones de inicio para cada gen: *ctrA*, *sciP* y *trmU* (tRNA, 5-metilaminometil-2-tiouridilato, metiltransferasa). En rojo se representa el codón de término del gen *sciP*. En rosa se representan los posibles sitios de unión al ribosoma para los genes *sciP* y *ctrA*. Las posibles cajas de unión a CtrA se encuentran marcadas en dorado. Además, en azul se encuentran las secuencias utilizadas para el diseño de oligonucleótidos que permitieron generar las construcciones de las dos regiones regulatorias putativas.

## Hipótesis

- La transcripción del gen *ctrA* es activada mediante un circuito de regulación positiva en *R. sphaeroides*.
- La proteína FleQ, regulador maestro del sistema flagelar 1, afecta la expresión de *ctrA* en *R. sphaeroides*.

## Objetivo

Determinar la regulación del gen *ctrA* en los diferentes fondos genéticos de *R. sphaeroides* bajo distintas condiciones de crecimiento.

### Objetivos particulares

- Determinar el nivel de expresión del gen *ctrA* en presencia y ausencia de las proteínas CtrA y CckA, en distintas condiciones de crecimiento.
- Determinar el nivel de expresión del gen *ctrA* en presencia y ausencia de la proteína FleQ, en distintas condiciones de crecimiento.

## **Materiales y Métodos**

### **Cepas y condiciones de cultivo**

Durante los experimentos se utilizaron distintas cepas de *R. sphaeroides* y *E. coli* enlistadas en la **tabla 1**.

*R. sphaeroides* fue cultivada en medio mínimo de Siström modificado, sin fuente de carbono (Siström *et al*, 1962), pero suplementado con: ácido succínico 100  $\mu\text{M}$ , ácido succínico 15 mM (15) o cas aminoácidos al 0.2% (CA). Esta bacteria fue cultivada en líquido de forma aeróbica en condición heterotrófica en la oscuridad con agitación a 250 rpm o condición fotoheterotrófica en viales de rosca bajo iluminación continua a 30°C. Los cultivos fotoheterotróficos fueron crecidos en viales con tapón de rosca llenos hasta el máximo de su capacidad, en donde la respiración celular en las primeras horas de crecimiento provoca la disminución de oxígeno. En caso de requerirlo (para la selección de plásmidos o marcadores de resistencia) se adicionaron antibióticos en las siguientes concentraciones; espectinomicina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , kanamicina 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , gentamicina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , higromicina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$  para líquido y 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para caja de Petri y/o tetraciclina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Por otra parte, *E. coli* fue cultivada en medio líquido LB (Lysogeny Broth) a 37°C con una agitación de 200 rpm. Cuando fue necesario se adicionaron antibióticos en las siguientes concentraciones: espectinomicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,

kanamicina 50µg/mL, gentamicina 30µg/mL, ampicilina 100µg/mL y/o tetraciclina 15µg/mL.

**Tabla 1.** Cepas de bacterias y plásmidos utilizados.

Cepa	Características	Fuente
<b><i>R. sphaeroides</i></b>		
WS8N	Cepa silvestre. Nal <sup>r</sup>	Sockett, 1990
SP13	Derivada de la WS8N; $\Delta fleQ::Kan^r$	Poggio, 2005
AM1	Derivada de la WS8N; $\Delta fleQ::Kan^r cckA_{L391F}$	del Campo, 2007
$\Delta cckA$	Derivada de AM1; $\Delta fleQ::Kan^r cckA_{L391F}$ $\Delta cckA::Hyg$	Colección del laboratorio
$\Delta ctrA$ (EA1)	Derivada de AM1; $\Delta fleQ::Kan^r cckA_{L391F}$ $\Delta ctrA::aadA$	Vega-Baray, 2015
EC1	Derivada de WS8N; $\Delta ctrA::uidA-aadA$	En este trabajo
EC2	Derivada de SP13; $\Delta ctrA::uidA-aadA$	En este trabajo
EC3	Derivada de AM1; $\Delta ctrA::uidA-aadA$	En este trabajo
EB1	Derivada de AM1 $\Delta ctrA::uidA-aadA \Delta cckA::Hyg$	En este trabajo
LC6	Derivada de AM1; $\Delta cckA::uidA-aadA$	Vega-Baray, 2015
LEA	Derivada de AM1 $\Delta cckA::uidA-aadA \Delta ctrA::Hyg$	En este trabajo
EC5	$AM1 \Delta fleQ::uidA-aadA$	En este trabajo
EC6	Derivada de $AM1 \Delta fleQ::uidA-aadA$ $\Delta ctrA::Hyg$	En este trabajo
<b><i>E. coli</i></b>		
TOP10	Cepa de clonación	Invitrogen
Helper	HB101 pRK2013	Boyer, 1969
<b>Plásmidos</b>		
pBBMCS53 (pBBGUS)	Vector con fusión transcripcional <i>uidA</i> , Gm <sup>R</sup>	Girard, 2000
pBBGUS_sciP	pBBMCS53 con el promotor de <i>sciP</i>	En este trabajo
pBBGUS_ctrA	pBBMCS53 con el promotor de <i>ctrA</i>	En este trabajo



pBBGUS_cckA	pBBMCS53 con el promotor de <i>cckA</i>	Colección del laboratorio
pJQ200mp18	Vector suicida movible de <i>R. sphaeroides</i> , Gm <sup>r</sup>	Quandt, 1993
pJQ200_ctrA::uidA-aadA	pJQ200 con <i>ctrA::uidA-aadA</i>	Este trabajo
pJQ200_fleQ::uidA-aadA	pJQ200 con <i>fleQ::uidA-aadA</i>	Poggio, 2005
pRK_CtrA	Derivado de pRK415 expresando CtrA	Vega-Baray, 2015
pRK_CtrAD51A	Derivado de pRK415 expresando CtrAD51A	Colección del laboratorio
pTZ19R BamHI-	pTZ19R sin sitio <i>BamHI</i>	Colección del laboratorio
pTZ19R_ctrAupdown	pTZ19 con <i>ctrA</i>	Este trabajo
pTZ19R_ctrA::uidA-aadA	PTZ19R con <i>ctrA::uidA-aadA</i>	Este trabajo
pWM5	Vector fuente del cassette <i>uidA-aadA</i>	Metcalf, 1993

### Cajas de nado

Para evaluar la capacidad de nado de las cepas se elaboraron placas de agar suave, con 0.215% de agar de medio mínimo de Siström modificado sin ácido succínico adicionado con 0.2% de CA. Las cajas de Petri fueron inoculadas e incubadas bajo condiciones anaeróbicas en jarras de anaerobiosis con sobres de reducción de oxígeno, la incubación fue a 30°C por aproximadamente 50 horas.

### Plásmidos utilizados

Para las clonaciones de rutina, se utilizaron los plásmidos: pTZ19R de ~2800 pb Ap<sup>R</sup> (Fermentas) o el plásmido pCR2.1-TOPO de 3931 pb, Ap<sup>R</sup> y Kan<sup>R</sup>. El aislamiento de cepas mutantes se realizó utilizando el plásmido suicida incapaz de replicarse en *R. sphaeroides*, pero estable en *E. coli* denominado pJQ200mp18 de 4.9 Kb Gm<sup>R</sup> (Quandt *et al*, 1993). Por su parte,

para llevar a cabo la expresión de genes en *R. sphaeroides*, fue utilizado el plásmido pRK415 el cual es un vector transferible de 10.5 Kb Tc<sup>R</sup>, que permite la expresión de los genes clonados en la región del sitio de multiclonación (MCS) a partir del promotor *lac* (Keen *et al*, 1988). El plásmido pBBMCS53 (pBBGUS) de 6698 pb Gm<sup>R</sup>, se utilizó para generar fusiones transcripcionales entre las diversas regiones promotoras estudiadas en este trabajo y el gen *uidA* ya presente en el plásmido que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (Girard *et al*, 2000).

Además, el plásmido pWM5 fue utilizado como fuente del cassette de resistencia *uidA-aadA* (Sp<sup>cR</sup>), el cual corresponde a un fragmento de ~4000 pb (Metcalf *et al*, 1993).

### **Técnicas de DNA recombinante**

Las técnicas rutinarias de purificación de ácidos nucleicos, restricción de DNA, clonación y amplificación de DNA, fueron realizadas siguiendo protocolos previamente reportados (Sambrook *et al*, 2001).

### **Conjugación bacteriana**

Cada conjugación realizada fue triparental utilizando cultivos bacterianos de *E. coli* donadora (cepa TOP10, que generalmente lleva las construcciones deseadas en los plásmidos pRK415 o pJQ200mp18), *R. sphaeroides* receptora (cepas: WS8N, SP13, AM1 y  $\Delta cckA$ ) y la cepa de *E. coli* HB101, que tiene el plásmido pRK2013 y los genes necesarios para la transferencia de los plásmidos con *oriT*, denominada “helper”.

Todos los cultivos fueron reinoculados de un cultivo crecido durante toda la noche en presencia de los antibióticos adecuados, e incubados a 37° C (*E. coli*) y 30°C (*R. sphaeroides*) hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.7. Posteriormente y en condiciones asépticas se tomaron 1.5 mL de cada cultivo y se centrifugaron a 8 000 rpm durante 4 minutos, para eliminar el medio y resuspender la pastilla celular con micropipeta. Después se les agregó 1 mL de medio LB, para luego volver a centrifugar a 8 000 rpm durante 4 minutos. Esto se repitió 3 veces con el fin de lavar a las células. Finalmente, y después de la última centrifugación se descartaron los medios LB y se resuspendieron las pastillas celulares que fueron mezcladas (cepas de *E. coli* con *R. sphaeroides*). Esta mezcla se depositó sobre un pedazo de papel nitrocelulosa en una placa de LB para incubarse durante 5h a 30°C. Finalmente el papel se sumergió y resuspendió en 500 µL o 1 mL de medio LB y las células fueron cosechadas y plaqueadas en cajas de Petri con el medio selectivo apropiado.

### **Complementación de las cepas mutantes**

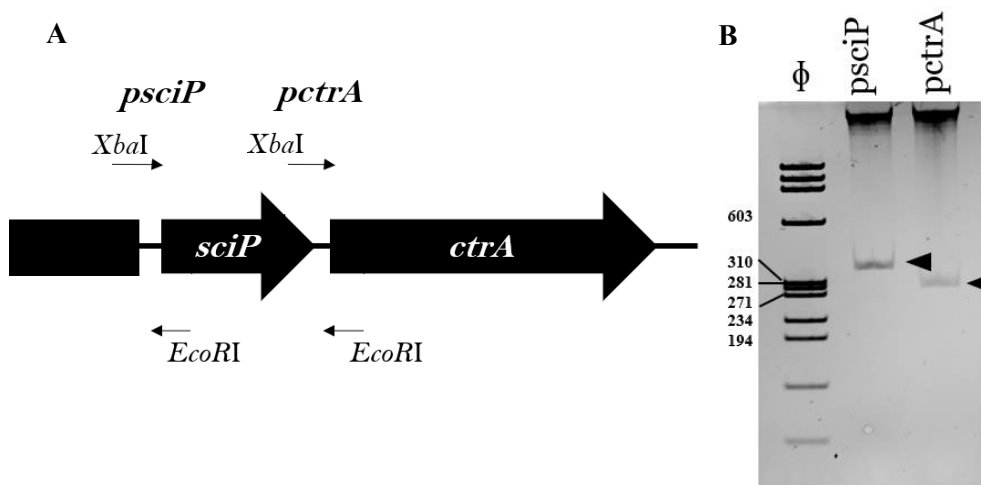
Las complementaciones de las mutantes se realizaron utilizando el gen *ctrA* silvestre (Vega-Baray *et al*, 2015) o la versión *ctrAD51A* (colección del laboratorio) clonados en el plásmido pRK415 mediante conjugación.

### **Fusiones transcripcionales de las regiones río arriba de *sciP* y *ctrA***

Se realizaron las construcciones de las regiones no codificantes ubicadas río arriba del gen *sciP* y del gen *ctrA*, con el objetivo de conocer si cada uno de

estos genes poseían promotores individuales que pudieran o no estar regulados por CtrA (**figura 10**).

Se llevó a cabo el diseño de oligonucleótidos que permitieran amplificar las regiones de los presuntos promotores putativos para cada uno de los dos genes; FwpsciPXbaI 5´GG**TCTAGAG**AGCGTGACGCCACCACATC 3´ y RvsciPEcoRI 5´CC**GAATTC**GTGTGCGAGCGGCGGCAGGTC3´ para el promotor *psciP*; y FwptrAXbaI 5´CCT**TCTAGAA**AGGTCACGATGATCCAGA 3´ y RvctrAEcoRI 5´CC**GAATTC**AGCAGGATGAGATCGTAATC 3´ para el promotor *pctrA*. Los productos de PCR fueron amplificados a partir del DNA cromosomal de WS8N como templado, fueron purificados y clonados en el plásmido PCR 2.1-TOPO y posteriormente subclonados en el vector pBBGUS que contiene la región codificante de la enzima β-glucuronidasa, gen *uidA*.



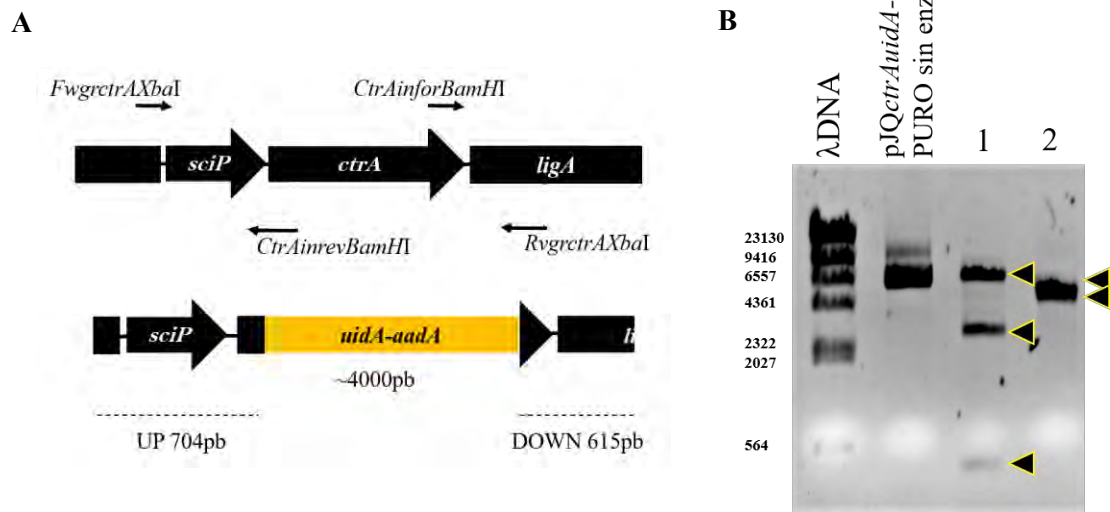
**Figura 10. A)** Representación de las dos regiones intercistronica evaluadas; *psciP*, río arriba del gen *sciP* (fragmento de 359 pb) y *pctrA*, río arriba del gen *ctrA* (fragmento de 285pb). **B)** Electroforesis de fragmentos en gel de poliacrilamida al 6%.

Una vez obtenidos los plásmidos pBBGUS+psciP y pBBGUS+pctrA estos fueron introducidos a las diferentes cepas de *R. sphaeroides* (WS8N, SP13, AM1,  $\Delta cckA::Hyg$  y  $\Delta ctrA::aadA$ ) por conjugación triparental. Posteriormente, cada una de las cepas fue crecida bajo condiciones fotoheterotróficas con tres diferentes fuentes de carbono; cas aminoácidos al 0.2% (CA), ácido succínico 100  $\mu$ M y ácido succínico 15 mM (15) para evaluar la actividad transcripcional a través de ensayos con la enzima  $\beta$ -glucuronidasa. Aeróbicamente también se midió la expresión del gen *uidA* utilizando cultivos crecidos en 0.2% de CA y 15 mM de ácido succínico.

En estas cepas la actividad específica de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa refleja la actividad promotora de cada una de las regiones inter-cistrónicas.

### Fusiones transcripcionales *ctrA::uidA-aadA*

Para obtener el alelo  $\Delta ctrA::uidA-aadA$  se realizaron dos PCR usando como templado el DNA cromosómico de la cepa WS8N y los oligonucleótidos de la **tabla 2**.



**Figura 11. A)** Representación de fusión  $\Delta ctrA::uidA-aadA$ , se señalan las regiones UP y DOWN utilizadas para la producción de la fusión. **B)** Electroforesis de los productos de digestión del vector pJQ $ctrA::aadA-uidA$ . Digestión con *EcoRI* bandas 321 pb, 2500 pb, 7900 pb (1), digestión con enzima *SacI* bandas 4800 pb, 5900 pb (2). Marcador de peso molecular ( $\Delta$ DNA). Gel de agarosa al 1%.

Los productos de amplificación UP de 704 pb y DOWN de 615 pb fueron digeridos con la enzima *BamHI* y ligados entre sí para posteriormente generar un tercer producto de amplificación UP-DO de 1319 pb que fue clonado en el vector pTZ19R *BamHI*<sup>-</sup>. El plásmido resultante fue digerido con la enzima *BamHI* para posteriormente ligar el cassette *uidA-aadA* de aproximadamente 4000 pb que también fue digerido con la enzima *BamHI*. La clonas fueron seleccionadas Ap<sup>R</sup> Spc<sup>R</sup> y los plásmidos digeridos para comprobar la orientación correcta de la construcción *uidA-aadA*.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados.

Oligonucleótido	Secuencia
Fwgrctr <i>XbaI</i>	5'-CG <b>TCTAG</b> AGAGCATGGCTGCGCGCC-3'
CtrAinrev <i>BamHI</i>	5'-CAG <b>GATCC</b> GCGGAGCTGGCGCAGGACCT-3'
Rvgrctr <i>XbaI</i>	5'-C <b>CTCTAG</b> ATCGGCAAGGTCGAACGAT-3'
CtrAinfor <i>BamHI</i>	5'-GT <b>GGATCC</b> AGGGCACGACGCTCACGAAG-3'

El fragmento UP-*uidA-aadA*-DOWN ( $\Delta ctrA::uidA-aadA$ ) fue purificado y subclonado en el plásmido suicida pJQ200mp18 (**figura 11**); para posteriormente ser introducido en las cepas de *R. sphaeroides* por medio de conjugaciones triparentales utilizando las cepas: TOP10/pJQ $\Delta ctrA::uidA-$

*aadA*, la cepa HB101/pRK2013 y cada una de las cepas de *R. sphaeroides* (WS8N, SP13, AM1 o  $\Delta cckA::Hyg$ ). Las células donde ocurrió el evento de doble recombinación fueron seleccionadas como  $Spc^R$  y  $Gm^S$ . Se aislaron y purificaron las cepas para medir la actividad transcripcional del gen *ctrA*, para ello fueron crecidas bajo condiciones fotoheterotróficas con tres diferentes fuentes de carbono; cas aminoácidos al 0.2% (CA), ácido succínico 100  $\mu$ M (100  $\mu$ M) y ácido succínico 15 mM (15). Aeróbicamente también se midió la expresión del gen con CA al 0.2% y ácido succínico 15 mM.

En estas cepas la actividad específica de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa refleja la actividad transcripcional del gen *ctrA*.

Posteriormente, también se realizaron las complementaciones de estas nuevas cepas con el alelo *ctrA* silvestre clonado en el vector pRK415 (pRK415\_CtrA) para evaluar y comparar la actividad transcripcional en ausencia y presencia de CtrA, nuevamente a través de ensayos enzimáticos con la enzima  $\beta$ -glucuronidasa.

### **Ensayo de $\beta$ -glucuronidasa**

Cada cultivo se centrifugó a 14 000 rpm y se eliminó el sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió con 250  $\mu$ L de buffer de extracción ( $Na_2HPO_4$  50 mM; pH 7.0,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, EDTA 10mM y de Tritón X-100 al 0.1%, para posteriormente ser sonicada cuatro veces por 7 segundos y centrifugadas 2 minutos a 4°C, obteniendo así los sobrenadantes.

La reacción se inició colocando 80  $\mu\text{L}$  del sobrenadante en 320  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción (MUG 0.63 mg, EDTA 0.5 M, Tritón X-100 y  $\beta$ -mercaptoetanol) a 37°C y se finalizó mezclando 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra en 1.9 mL de buffer de paro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.2M) a 10, 15 y 20 minutos o 1, 2 y 3 minutos según el caso.

La fluorescencia de las muestras se determinó en fluorómetro utilizando una onda de excitación de 360 nm y de emisión de 446 nm. Las actividades son expresadas como pmoles de 4 metil-umbelliferona formada por minuto por miligramo de proteína. El fluorómetro fue calibrado con una curva hecha previamente utilizando 4-metil-umbelliferona y el contenido de proteína fue determinado utilizando el reactivo de Bradford.

### **Inmunodetección de las proteínas CtrA y CckA**

Las detecciones de las proteínas CtrA (27kDa) y CckA (85kDa) se realizaron mediante Western blot en extractos totales obtenidos de cada una de las cepas utilizadas.

Para obtener los extractos de células con ácido succínico 15 mM y cas aminoácidos al 0.2% como fuente de carbono se utilizaron 3 mL de cultivo ( $\text{DO}_{600}$  de 0.6-0.8) y para ácido succínico 100  $\mu\text{M}$  se utilizaron 10 mL de cultivo ( $\text{DO}_{600}$  de 0.3).

Los cultivos fueron centrifugados a 14 000 rpm a 4°C por 2 minutos, los paquetes celulares fueron resuspendidos con 150  $\mu\text{L}$  de buffer TE y sonicados tres veces durante 10 segundos con espacios de 30 segundos. En



este momento se realizó la cuantificación de proteína utilizando el reactivo de Bradford. Posteriormente se agregó buffer de carga 1X y se hirvieron las muestras durante 5 minutos. Las muestras se corrieron en SDS-PAGE al 12% y las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se llevó a cabo durante 45 minutos (para los  $\alpha$ -CtrA) y 2h (para  $\alpha$ -CckA) a 250 mA en amortiguador de transferencia pH 9.9 ( $\text{NaHCO}_3$  10 mM,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3 mM y MeOH al 20%). Las membranas fueron lavadas con TBST (Tris•Cl 20 mM, pH 7.5, NaCl 500 mM y Tween 20 al 0.05%) y bloqueadas con leche descremada al 1% en TBST durante 1 hora. Enseguida sin realizar lavados fueron incubadas durante 2 horas con el anticuerpo primario policlonal (colección del laboratorio),  $\alpha$ -CtrA (1:5 000) o  $\alpha$ -CckA (1: 5 000) diluidos en TBST según el caso. Después se realizaron tres lavados con 15 mL de TBST por 15 minutos cada uno de ellos. Al término de los lavados, las membranas fueron incubadas durante 45 minutos con el anticuerpo secundario  $\alpha$ -IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina diluido en TBST (1: 10 000). Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con TBST. Las membranas se incubaron durante 10 minutos en amortiguador de lavado final (Tris 20 mM, de  $\text{MgCl}_2$  1mM a pH 9.8) y la presencia del anticuerpo secundario fue detectada por quimioluminiscencia usando 950  $\mu\text{L}$  de CDP-Star (Applied Biosystem) y 50  $\mu\text{L}$  de Nitro Block (Applied Biosystem). Las membranas fueron expuestas entonces a placas de rayos-X para detectar la señal generada por la hidrólisis del sustrato.

## Cepa LEA

Para obtener la cepa LEA ( $\Delta cckA::uidA-aadA \Delta ctrA::Hyg$ ) se realizó una conjugación triparental entre las cepas: LC6 (Vega-Baray, 2015), TOP10/pJQ200\_ $\Delta ctrA::Hyg$  (Hernández-Valle, 2017) y la cepa HB101/pRK2013 (Helper). Las células donde ocurrió el evento de doble recombinación fueron seleccionadas como  $Spc^R$ ,  $Hyg^R$  y  $Gm^s$ . Estas fueron aisladas y purificadas para evaluar la actividad transcripcional del gen *cckA* en ausencia de CtrA a través de ensayos con la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, en medio mínimo de Sistrom modificado con ácido succínico 100  $\mu M$  en condición fotoheterotrófica.

Además, también se realizó la complementación de esta cepa con el alelo *ctrA* silvestre y con alelo mutante *ctrAD51A* para evaluar y comparar la actividad transcripcional en ausencia, presencia y versión incapaz de fosforilarse de CtrA, nuevamente a través de ensayos enzimáticos con la enzima  $\beta$ -glucuronidasa en la misma condición de crecimiento.

## Cepas EC5 y EC6

Para obtener estas cepas se utilizó la cepa AM1 (derivada de WS8N  $\Delta fleQ::Kan^R cckA_{L391F}$ ) y la cepa AM1 $\Delta ctrA::Hyg$  (Derivada de AM1  $\Delta fleQ::Kan^R cckA_{L391F} \Delta ctrA::Hyg$ , Hernández-Valle, 2017) y reemplazamos la mutación de *fleQ::kan* con el alelo que lleva la fusión transcripcional  $\Delta fleQ::uidA-aadA$  (Poggio, 2007) a través de conjugaciones y eventos de doble recombinación. Las células fueron seleccionadas  $Spc^R$ ,  $Gm^s$  y  $Kan^s$  para AM1 y  $Spc^R$ ,  $Hyg^R$ ,

Gm<sup>S</sup> y Kan<sup>S</sup> para la mutante en el gen *ctrA* (AM1 $\Delta$ *ctrA*::Hyg). Las cepas fueron aisladas y purificadas para evaluar la actividad transcripcional del gen *fleQ* en presencia y ausencia de CtrA a través de ensayos con la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, en medio mínimo de Sistrom modificado con ácido succínico 100  $\mu$ M o cas aminoácidos al 0.2% en condición fotoheterotrófica.

### **Extracción de RNA**

Se llevó a cabo la extracción de RNA total a partir de un cultivo de la cepa AM1 crecida en condiciones fotoheterotróficas a una DO<sub>600</sub> de 0.7, el medio contenía cas aminoácidos al 0.2% como fuente de carbono.

Para la extracción se utilizó el estuche de reactivos “Ribo Pure<sup>TM</sup>-Bacteria Kit”, el método inició con la ruptura mecánica de las paredes celulares bacterianas con perlas de zirconio de 0.1 mm en un adaptador de vórtex durante 10 minutos. Posteriormente el lisado es mezcló con cloroformo y se centrifugó para obtener tres diferentes fases. La fase acuosa superior que contenía el RNA, la interfase semisólida que contenía el DNA y la fase orgánica inferior que contenía proteínas, polisacáridos, ácidos grasos y otros desechos celulares. La fase de RNA se recuperó y se diluyó con etanol. Después se unió a un filtro de sílice. En el filtro el RNA se lavó para eliminar contaminantes y se eluyó en una solución de baja fuerza iónica. Finalmente, la muestra de RNA se trató con los reactivos Ambion DNA-free<sup>TM</sup> para la eliminación post-elución de DNA genómico.

## RT-PCR

La transcripción reversa y la amplificación por PCR se realizó con el estuche de reactivos “Kit Access RT-PCR Introductory System” Cat.#A1250 (PROMEGA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando los

siguientes oligonucleótidos: *FwpctrAXbaI*

5' **CCTCTAGA**AAGGTCACGATGATCCAGA 3' y *RvctrAEcoRI* 5'

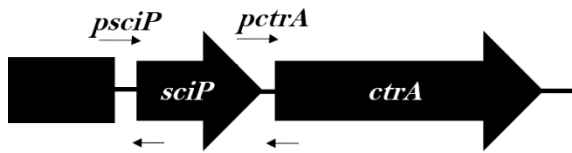
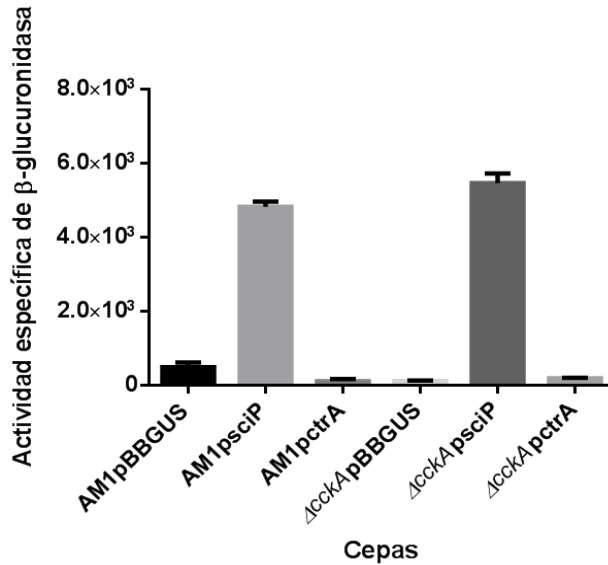
**CCGAATTC**AGCAGGATGAGATCGTAATC-3'. El resultado obtenido fue analizado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%.

## Resultados

### Actividad promotora de las regiones inter-cistrónicas de *sciP* y *ctrA*

El análisis bioinformático de las secuencias río arriba de los genes *sciP* y *ctrA* reveló dos posibles cajas de unión para la proteína CtrA; una a -41 pb río arriba del inicio de la traducción del gen *sciP* (TTCA-N7-TTAA) y otra a -54 pb río arriba de la metionina inicial del gen *ctrA* (GTAA-N7-TTAA) (**figura 9**).

Sin antecedentes de la funcionalidad de cualquiera de estas regiones regulatorias se decidió evaluar ambas regiones: *psciP* y *pctrA* (**figura 12A**), con el fin de conocer si estos genes poseían promotores individuales que pudieran o no estar regulados por CtrA. Para ello cada región fue clonada independientemente en el plásmido pBBGUS, que contiene la región codificante para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (gen *uidA*) que funciona como gen reportero de la actividad transcripcional de los promotores clonados en dicho plásmido. Los plásmidos resultantes fueron introducidos en los distintos fondos genéticos de *R. sphaeroides* por conjugación y las cepas Gm<sup>R</sup> fueron cultivadas en las distintas condiciones de crecimiento, donde a través de ensayos de  $\beta$ -glucuronidasa se cuantificó de manera indirecta la actividad promotora.

**A****B**

**Figura 12. A.** Representación de las dos regiones inter-cistrónicas probadas: *psciP*, río arriba del gen *sciP* y *pctrA*, río arriba del gen *ctrA* **B.** Actividad transcripcional de regiones intercistrónicas *psciP* y *pctrA* en las cepas AM1 y AM1Δ*cckA*. Se muestran la actividad específica de la enzima β-glucuronidasa medida en los extractos con las células crecidas en 0.2% de CA en condición fotoheterotrófica. AM1pBBGUS y Δ*cckA*pBBGUS corresponden a las cepas con plásmidos vacíos. La barra representa el error estándar (n=3). Las actividades son expresadas como pmoles de 4-metilumbelliferona formada por un minuto por miligramo de proteína.

En la **figura 12B** se muestra la actividad promotora de estas dos regiones en las cepas AM1 (cepa parental de la expresión para el sistema flagelar 2) y Δ*cckA* cultivadas en medio mínimo de Sistrom modificado sin ácido succínico adicionado con cas aminoácidos al 0.2% como fuente de carbono (CA), condición ya reportada por inducir la expresión de los genes flagelares 2 en *R. sphaeroides* (Vega-Baray, 2015). Estas cuantificaciones nos permitieron determinar que la región río arriba del gen *ctrA* no contenía un promotor activo bajo estas condiciones, y otras probadas (por ejemplo, medio mínimo de Sistrom modificado con ácido succínico 15 mM o 100 μM como fuentes de carbono, datos no mostrados), en contraste con la región

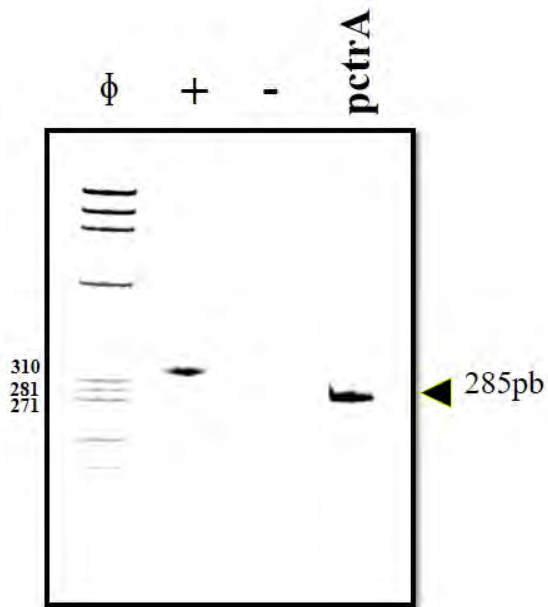
río arriba del gen *sciP* que mostró actividad promotora en las dos cepas AM1 y  $\Delta cckA$ , dejando clara la presencia de elementos importantes para la activación de la transcripción en esta región.

### **Organización transcripcional de *sciP-ctrA***

Los resultados obtenidos nos permitieron pensar en la existencia de un promotor capaz de controlar la actividad transcripcional de ambos genes: *sciP* y *ctrA*, por lo que, para confirmar que ambos genes forman parte de un solo operón y son transcritos en un mismo RNA se utilizó la técnica de RT-PCR. La reacción se llevó a cabo utilizando el RNA total extraído de la cepa AM1 cultivada en condición fotoheterotrófica en medio mínimo de Sistrom sin ácido succínico adicionado con CA al 0.2% como fuente de carbono y los oligonucleótidos: Fw2pctrA y Rv2pctrA (**figura 9**). El resultado de la reacción se analizó por electroforesis.

En la **figura 13** se muestra el carril pctrA cuyo producto esperado es de 285pb, y abarca la región 3' de *sciP* incluyendo los últimos 36 nt del gen y la región 5' de *ctrA* incluyendo los primeros 147 nt del gen. El resultado obtenido demuestra que los genes *sciP* y *ctrA* son expresados como un operón. Dicho transcrito bicistrónico podría iniciar la síntesis del mensajero a partir del promotor presente en la región río arriba de *sciP*.

La **figura 13** también presenta el control positivo (+) utilizando ARN proporcionado por el estuche y el control negativo (-), reacción carente de enzima AMV reverso transcriptasa.



**Figura 13.** Producto de la reacción de RT-PCR (+) control positivo de RT-PCR 323 pb; (-) control negativo de RT-PCR; pctrA, producto esperado de 285 pb. Gel de poliacrilamida al 6%.

### **Expresión de la proteína reguladora de respuesta CtrA en las cepas de *R. sphaeroides***

Para poder evaluar la cantidad de CtrA en presencia y ausencia de las proteínas reguladoras de ambos sistemas flagelares; FleQ del sistema flagelar 1 y CckA del sistema flagelar 2, lo primero que realizamos fue la inmunodetección por Western blot. Para ello se usaron extractos totales obtenidos de las cepas; WS8N, SP13, AM1 y sus derivadas  $\Delta cckA$  y  $\Delta ctrA$ , crecidas en medio mínimo de Sistrof modificado con distintas fuentes de carbono; ácido succínico 15 mM, cas aminoácidos al 0.2% y ácido succínico 100  $\mu$ M; en las dos diferentes condiciones de crecimiento; fotoheterotrófica



y anaeróbica. Cada carril se cargó con 10  $\mu\text{g}$  de proteína y se realizó la densitometría de tres experimentos independientes.

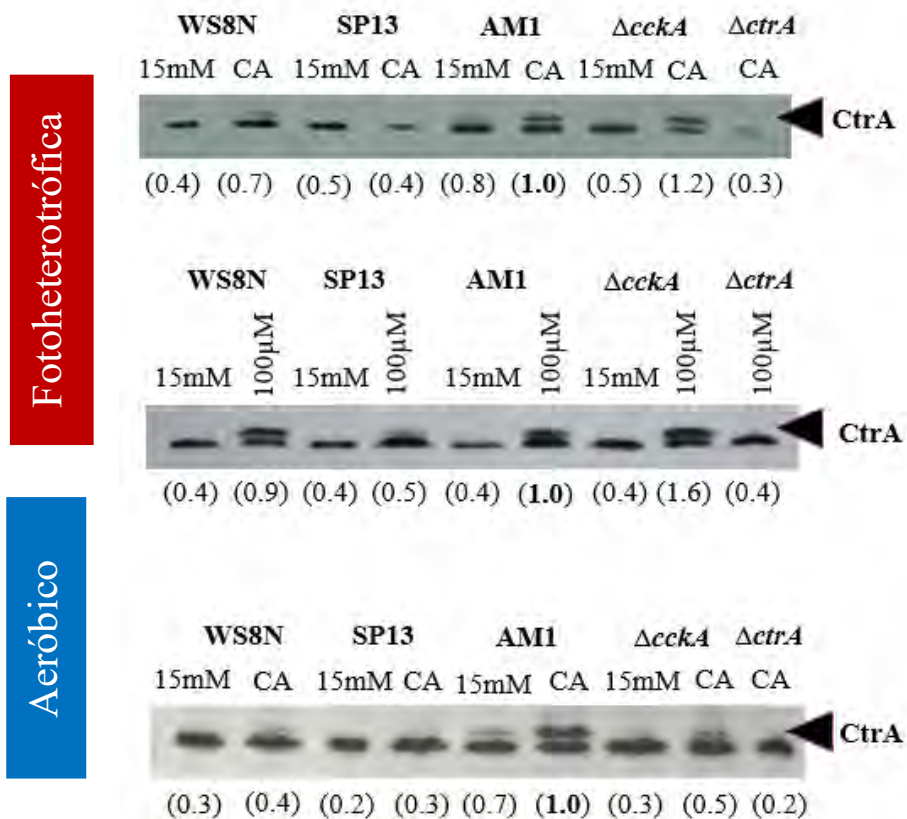
En la **figura 14**, se muestra que en los extractos totales de las cepas WS8N, AM1 y  $\Delta\text{cckA}$ , la proteína CtrA fue detectada en condición fotoheterotrófica utilizando los medios de cultivo que se sabe favorecen el nado con el sistema flagelar 2; CA al 0.2% y ácido succínico 100  $\mu\text{M}$ . Estos resultados mostraron la presencia de CtrA en la cepa WS8N que, si bien en primera instancia se podría considerar como la expresión basal en el medio con CA, es en presencia de ácido succínico 100  $\mu\text{M}$  donde la detección de CtrA se incrementa hasta alcanzar un nivel similar al de la cepa AM1. Asimismo, fue una sorpresa observar la presencia de la proteína CtrA en la cepa  $\Delta\text{cckA}$  incluso en un nivel ligeramente superior al de la cepa parental AM1, indicando la independencia funcional de la proteína CtrA de su histidín cinasa afín, CckA.

En contraste con estos resultados, la cepa SP13 mostró un nivel muy reducido de CtrA que podría ser debido a la expresión basal del gen en el medio ácido succínico 100  $\mu\text{M}$ , lo que podría sugerir, debido a los resultados de WS8N, la existencia de algún control desconocido que evita la acumulación de CtrA en ausencia de FleQ; alternativamente, la diferencia entre WS8N y SP13 podría deberse a la expresión diferencial del gen en estas cepas. Cabe mencionar que en los extractos de cultivos crecidos en los medios con la concentración ácido succínico 15 mM no fue posible detectar a CtrA lo que indica que una alta concentración de ácido succínico provoca

una reducción de la cantidad de CtrA, que podría ser explicada por un control a nivel transcripcional o postranscripcional.

Por otro lado, se evaluó la presencia de CtrA en los extractos de las diferentes cepas crecidas en condición aeróbica utilizando como fuentes de carbono CA al 0.2% y ácido succínico 15 mM. La proteína CtrA fue detectada en los extractos de las cepas WS8N, AM1 y  $\Delta cckA$  solo en el medio mínimo de Sistrom modificado con CA al 0.2% como fuente de carbono, lo que es consistente con los resultados obtenidos en condiciones fotoheterotróficas, donde la alta concentración de ácido succínico ejerce un efecto negativo sobre la acumulación de CtrA. Por otro lado, a diferencia de lo observado en condición fotoheterotrófica, la cepa AM1 presentó el mayor nivel de proteína, lo que indica que en condiciones aeróbicas la acumulación de CtrA en la cepa  $\Delta cckA$  se encuentra desfavorecida. En las cepas WS8N y  $\Delta cckA$  el bajo nivel de CtrA podría deberse a que el gen se expresa a niveles basales, o a que CtrA no se puede acumular.

Es de notar que para todas las inmunodetecciones realizadas con el anticuerpo anti-CtrA, existe una segunda banda inespecífica para la proteína ligeramente menor en peso molecular. Esta banda se encuentra presente en todos los extractos celulares de todas las cepas cultivadas de *R. sphaeroides* lo que se puede explicar por el origen policlonal del anticuerpo.



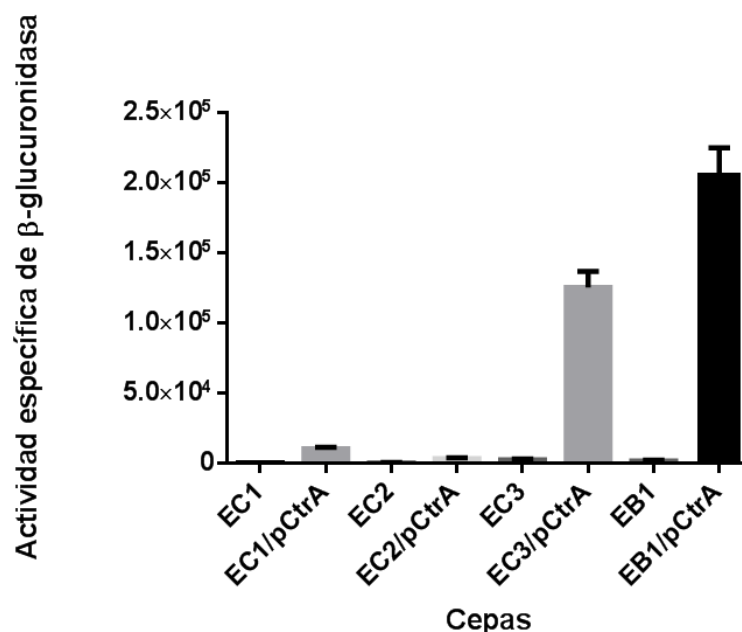
**Figura 14.** Análisis de Western blot con el anticuerpo anti-CtrA. Los extractos totales celulares se obtuvieron de cultivos en medio mínimo de Sistrom modificado con ácido succínico 15 mM, casaminoácidos al 0.2% o ácido succínico 100 μM a una  $DO_{600}$  de 0.7 (en el caso de las células crecidas con ácido succínico 100μM la  $DO_{600}$  fue de 0.3). Se muestra la cepa WS8N (cepa silvestre), SP13 (cepa mutante en *fleQ* que no tiene la mutación de ganancia de CckA que permite la expresión de los genes *fla2*), AM1 (cepa mutante en *fleQ* y mutante en *cckA<sub>L391F</sub>*, que activa la expresión de los genes *fla2*),  $\Delta cckA$  (cepa mutante en la histidin-cinasa CckA) y  $\Delta ctrA$  (cepa mutante en el regulador de respuesta CtrA). El anticuerpo primario fue utilizado a una dilución 1:5000. Los números son densidades relativas comparadas con la cepa AM1 CA 0.2% o 100 μM.

### Regulación positiva del operón *sciP-ctrA* por CtrA

Con el fin de conocer, si la proteína CtrA afecta la transcripción del operón *sciP-ctrA* se realizó la construcción  $\Delta ctrA::uidA-aadA$  (**figura 11**), que da lugar a la fusión transcripcional de *ctrA* con el alelo *uidA* (ver material y métodos),

para posteriormente ser introducida en el cromosoma de las distintas cepas de *R. sphaeroides* (WS8N, SP13, AM1 y  $\Delta cckA$ ) mediante un evento de doble recombinación homóloga.

Las cepas EC1 (WS8N,  $\Delta ctrA::uidA-aadA$ ), EC2 (SP13,  $\Delta ctrA::uidA-aadA$ ), EC3 (AM1,  $\Delta ctrA::uidA-aadA$ ) y EB1 (AM1,  $\Delta cckA::Hyg\Delta ctrA::uidA-aadA$ ) fueron seleccionadas, purificadas y cultivadas en medio mínimo de Siström modificado con CA al 0.2% como fuente de carbono en condiciones fotoheterotróficas hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm ( $DO_{600}$ ) de 0.7 de donde se obtuvieron extractos que fueron utilizados para determinar la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa, lo que permitió cuantificar de manera indirecta la actividad transcripcional del gen *ctrA* en ausencia de la proteína CtrA. Además, cada una de estas cepas fue complementada en *trans* con el alelo *ctrA* silvestre presente en el plásmido pRK415\_CtrA, el cual permite la expresión de *ctrA* a partir del promotor *lac*. Las cepas EC1/pCtrA, EC2/pCtrA, EC3/pCtrA y EB1/pCtrA fueron cultivadas en las mismas condiciones que las cepas sin plásmido para obtener extractos que fueron utilizados en los ensayos de  $\beta$ -glucuronidasa que permitieron cuantificar la actividad transcripcional del gen en ausencia y presencia de la proteína CtrA.



**Figura 15.** Comparación de la actividad transcripcional del gen *ctrA* en ausencia y presencia de la proteína CtrA en las diferentes cepas de *R. sphaeroides*. Los extractos fueron obtenidos de células crecidas con CA al 0.2% como fuente de carbono en condición fotoheterotrófica a una  $DO_{600}$  de 0.7. La barra representa el error estándar (n=3). Las actividades son expresadas como pmoles de 4-metil-umbelliferona formada por un minuto por miligramo de proteína

En la **figura 15** se muestran todas las actividades del promotor de *sciP-ctrA* medidas para este experimento. Se observa de manera general como todas las cepas con la mutación en el gen *ctrA* como son: EC1, EC2, EC3 y EB1 producen cantidades muy bajas de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa lo que es un reflejo de la expresión basal de la fusión transcripcional; sin embargo, al introducir el gen *ctrA* silvestre en las cepas EC3 y EB1 (EC3/pCtrA y EB1/pCtrA) se observó un incremento en la actividad enzimática de 50 y 90 veces, con respecto a los valores observados en las cepas parentales, estos resultados indican que CtrA regula positivamente su propia transcripción a

través del promotor *sciP-ctrA*, al menos en la condición probada. Además, se demuestra por primera vez, la ausencia de la expresión de *ctrA* en las cepas EC1/pCtrA y EC2/pCtrA, lo que implica que en el fondo genético silvestre (WS8N) y en la cepa SP13, la ausencia de CtrA (observada en los ensayos de Western blot de la **figura 14**), puede explicarse por la falta de expresión del gen. Por otro lado, se observó una alta expresión de la fusión en la cepa EB1/pCtrA, lo que correlaciona con el nivel de CtrA observado en la cepa  $\Delta cckA$  (**figura 14**), sugiriendo que CtrA activa su expresión en forma defosforilada o que en esta condición existen otras cinasas que de forma cruzada fosforilan a CtrA. Esta última interpretación permitiría asumir que en las cepas WS8N y SP13, así como en EC1/pCtrA y EC2/pCtrA, la proteína CckA estaría actuando como fosfatasa y por esta razón *ctrA* prácticamente no se expresa en dichas cepas.

#### **Actividad transcripcional del operón *sciP-ctrA* en distintas fuentes de carbono.**

Posteriormente y con el objetivo de profundizar en los efectos de las condiciones de crecimiento en la expresión del gen *ctrA* en cada fondo genético de *R. sphaeroides*, las cepas complementadas con CtrA fueron crecidas bajo condiciones fotoheterotróficas con tres diferentes fuentes de carbono: CA al 0.2% y ácido succínico 100  $\mu$ M, ya reportadas por inducir la expresión del flagelo 2, y ácido succínico 15 mM, ya reportada por reprimir la expresión del flagelo 2. También se midió la expresión del gen creciendo

a las cepas aeróbicamente con CA al 0.2% y ácido succínico 15 mM. La cuantificación se realizó a través de ensayos de  $\beta$ -glucuronidasa.

Además, con el propósito de correlacionar los resultados relativos del control transcripcional de *ctrA* con la acumulación de la proteína, también se obtuvieron extractos totales de las mismas cepas en todas las condiciones de crecimiento mencionadas que sirvieron para llevar a cabo la inmunodetección de la proteína.

En la **figura 16** se muestran todas las actividades de la  $\beta$ -glucuronidasa e inmunodetecciones de CtrA medidas para este experimento. De manera general se observa como las distintas condiciones de crecimiento, fotoheterotrófica y aeróbica, así como las fuentes de carbono aprovechadas por *R. sphaeroides* modifican la transcripción del gen *ctrA* en los diferentes fondos genéticos. En la **figura 16A** se muestran los resultados obtenidos al utilizar las fuentes de carbono CA al 0.2% y ácido succínico 15 mM en condiciones de crecimiento fotoheterotróficas. En este caso se observó un incremento en la transcripción del gen al utilizar CA como fuente de carbono en comparación con el medio adicionado con ácido succínico 15 mM donde no se detectó actividad enzimática. En CA, además se observó una reducción significativa en las cepas EC1/pCtrA y EC2/pCtrA al compararlas con EC3/pCtrA y EB1/pCtrA, siendo EC2/pCtrA la reducción más severa. En cuanto a las inmunodetecciones, en esta condición, CtrA fue detectada en las cepas EC3/pCtrA y EB1/pCtrA, sin embargo, en el caso de las cepas EC1/pCtrA y EC2/pCtrA se observaron niveles muy reducidos de CtrA.

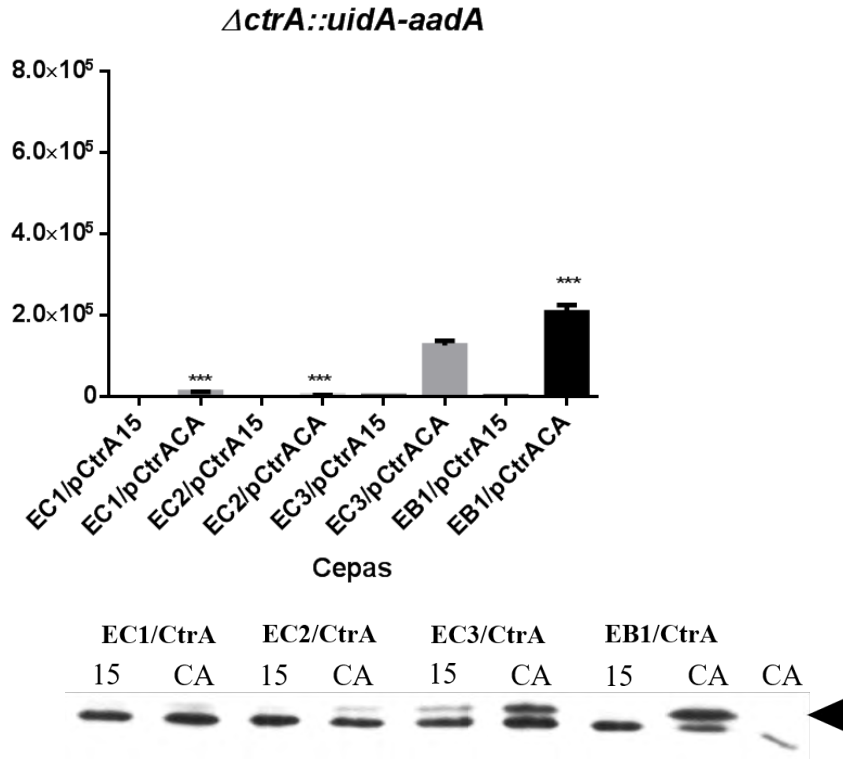
Dado que en esas cepas *ctrA* debe ser transcrito a partir del promotor *lac* del vector, la ausencia de CtrA podría ser explicada por la degradación de la proteína, quizá como resultado de la ausencia de fosforilación de CtrA ya que en estas cepas CckA podría actuar principalmente como fosfatasa.

Resultados similares fueron observados cuando los cultivos fueron crecidos en condición fotoheterotrófica utilizando como fuentes de carbono ácido succínico 15 mM o 100  $\mu$ M, donde el medio de cultivo limitante en fuente de carbono (100  $\mu$ M) promovió un incremento tanto de la transcripción del gen como la expresión de proteína (**figura 16B**). Sin embargo, en este caso la cepa EC1/pCtrA mostró niveles de transcripción y de acumulación de la proteína CtrA muy similares a los observados en la cepa EC3/pCtrA lo que sugiere, que la proteína FleQ no reprime la actividad transcripcional de *ctrA* al menos en esta condición. Además, podría especularse al respecto la existencia de mecanismos de activación de *ctrA* desencadenados por la presencia de la proteína FleQ. En esta misma condición de crecimiento (100  $\mu$ M), la cepa EB1/pCtrA expresó una cantidad significativamente mayor de  $\beta$ -glucuronidasa al compararla con la cepa EC3/pCtrA, lo cual fue consistente con la inmunodetección de la proteína y con el resultado observado en condiciones fotoheterotróficas con CA (**figura 14**). Finalmente, en la cepa EC2/pCtrA no se detectó expresión para el gen *ctrA*, consistente con la ausencia de CtrA en los ensayos de inmunodetección (**figura 16B**).



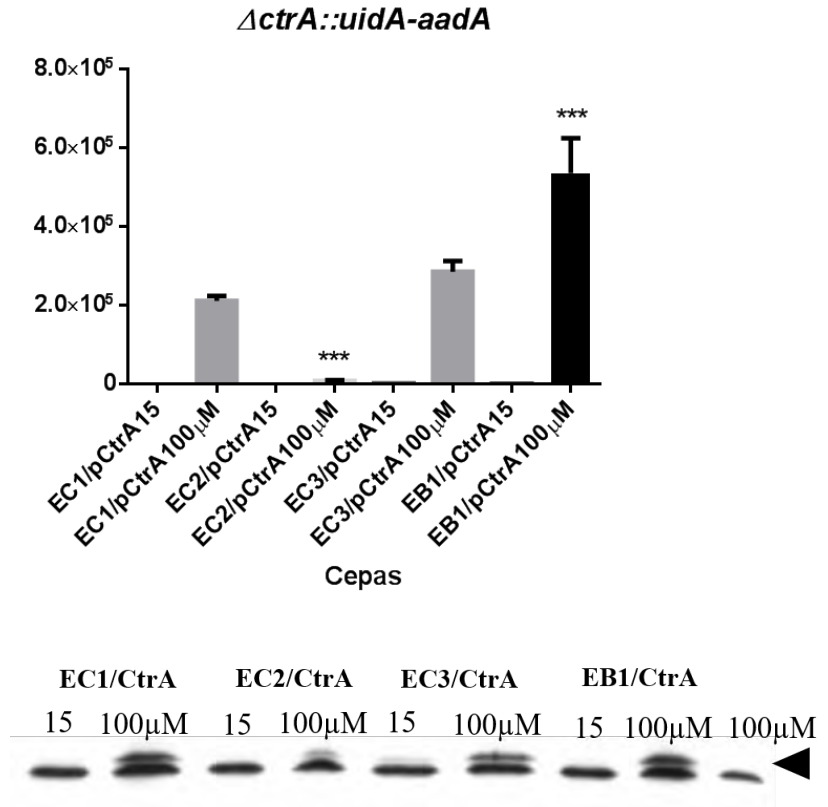
**A**

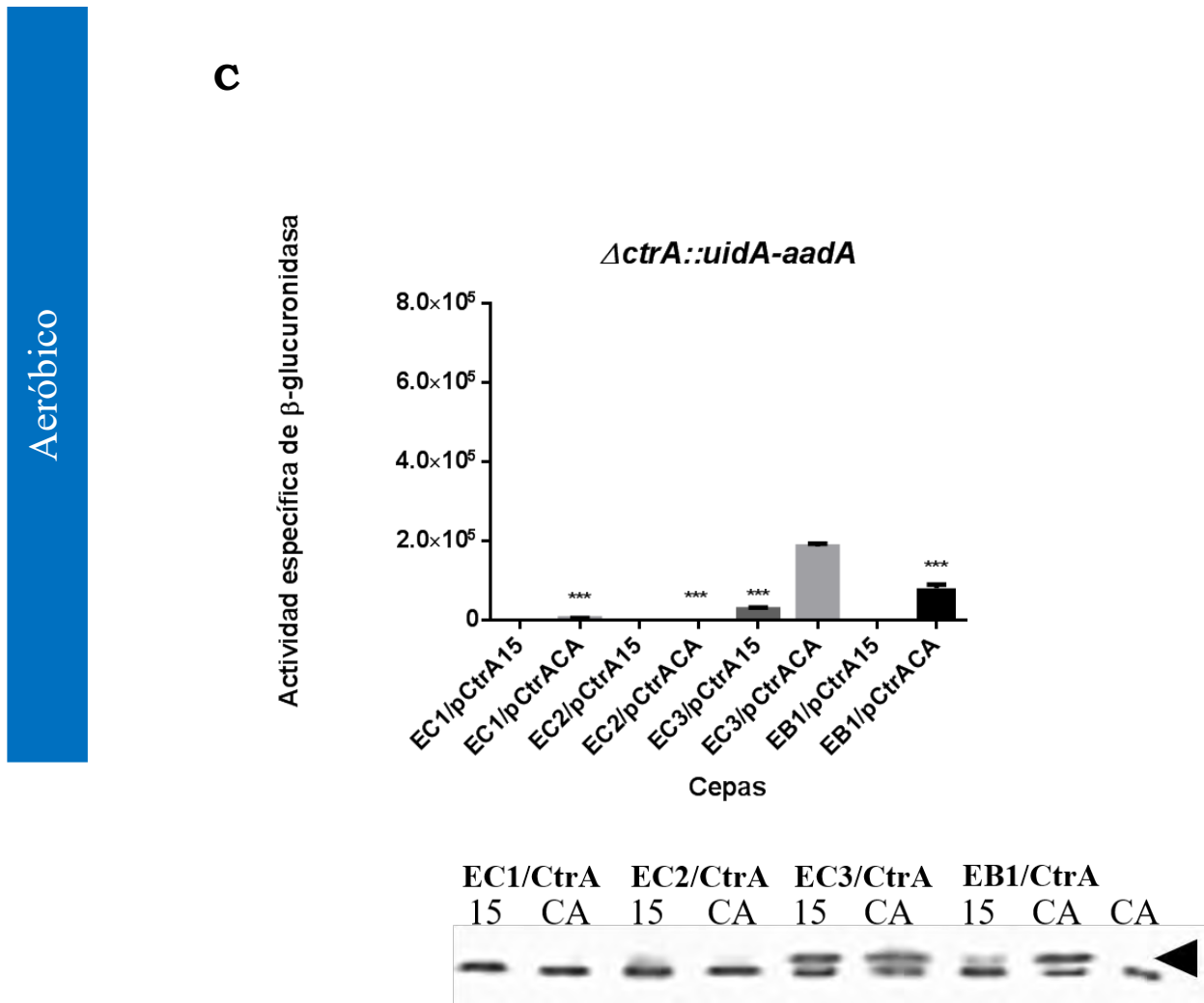
Actividad específica de  $\beta$ -glucuronidasa



**B**

Actividad específica de  $\beta$ -glucuronidasa





**Figura 16.** Comparación de la expresión de CtrA en diferentes condiciones de crecimiento en los distintos fondos genéticos de *R. sphaeroides*. **A)** Gráfica, actividad transcripcional del gen en condición carente de oxígeno, fuentes de carbono cas aminoácidos al 0.2% (CA) y 15 mM de ácido succínico (15). Inmunodetección en las mismas condiciones. **B)** Gráfica, actividad transcripcional del gen en condición carente de oxígeno, fuentes de carbono ácido succínico 100 $\mu$ M (100 $\mu$ M) y ácido succínico 15 mM (15). Inmunodetección en las mismas condiciones. **C)** Gráfica, actividad transcripcional del gen en presencia de oxígeno, fuentes de carbono cas aminoácidos al 0.2% (CA) y ácido succínico 15 mM (15) Inmunodetección en las mismas condiciones. En las gráficas, la barra representa el error estándar (n=3). Cada cepa fue comparada con AM1 CA al 0.2% o ácido succínico 100  $\mu$ M (análisis de ANOVA One-Way; Dunnett's; \*\*\*, P<0.0005). Las actividades son expresadas como pmoles de 4-metilumbelliferona formada por un minuto por miligramo de proteína

Por otro lado, al comparar la transcripción del gen *ctrA* y la expresión de la proteína en las cepas crecidas en los medios de cultivo CA al 0.2% y ácido succínico 15 mM en condición aeróbica (**figura 16C**), nuestros resultados son en general similares a lo ya observado en condiciones fotoheterotróficas, esto es, se observa una mayor expresión de *ctrA* y de la proteína cuando las células fueron crecidas en el medio de cultivo con CA al 0.2%. Sin embargo, en el caso de la cepa EC3/pCtrA la cantidad de CtrA no es muy diferente entre las dos fuentes de carbono, y además se observa una reducción en la expresión de *ctrA* en la cepa EB1/pCtrA con respecto a EC3/pCtrA, lo que no ocurre en condiciones semianaeróbicas, este último resultado indica la importancia de la concentración de oxígeno en la expresión de *ctrA* en ausencia de CckA.

### **Transcripción del gen *cckA* en presencia de CtrA**

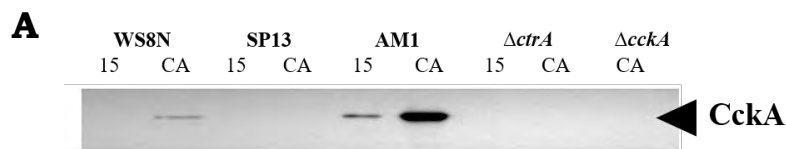
Debido a los resultados obtenidos con la cepa EB1/pCtrA que sugieren que CtrA en su estado no fosforilado podría activar la expresión de *ctrA*, y a los reportes previos en otras  $\alpha$ -proteobacterias que demuestran la participación de CtrA en la activación a nivel transcripcional de los genes que codifican para proteínas implicadas en su control (Laub *et al*, 2000; Mercer *et al*, 2010; Brilli *et al*, 2010; Francis *et al*, 2016), nosotros decidimos evaluar la participación de CtrA en la expresión de su histidin cinasa afín, CckA.

Como primer paso se evaluó la expresión de la proteína CckA, en ausencia de CtrA a través de ensayos de inmunodetección. Para ello se obtuvieron extractos totales de células crecidas en los medios de cultivo Sistrom modificado adicionado con CA al 0.2% o ácido succínico 15 mM como fuentes de carbono e incubados en condición fotoheterotrófica a DO<sub>600</sub> de 0.7.

Los resultados mostrados en la **figura 17A** revelan la ausencia de la proteína CckA en la cepa mutante en *ctrA* (derivada de la cepa AM1) en los dos medios de cultivo aquí probados. Además, fue posible detectar una posible caja de unión a CtrA a -75 pb del codón de inicio del gen *cckA* (**figura 17B**), por lo cual se continuó evaluando la participación de CtrA sobre la transcripción del gen *cckA*. Con este fin, se midió la actividad promotora de esta posible región regulatoria desde un plásmido que contenía la región río arriba del gen *cckA* fusionada transcripcionalmente a la región codificante del gen reportero *uidA* (*pcckA*) (Sánchez-Verónica, Tesis de Doctorado). Dicho plásmido fue introducido en las cepas AM1 (*AM1\_pcckA*),  $\Delta ctrA$  (derivada de AM1  $\Delta ctrA_pcckA$ ) y  $\Delta cckA$  (derivada de AM1,  $\Delta cckA_pcckA$ ) las cuales fueron crecidas en medio mínimo de Sistrom modificado con CA al 0.2%. En estas cepas se midió la actividad promotora de *cckA* de manera indirecta a través de ensayos de  $\beta$ -glucuronidasa.

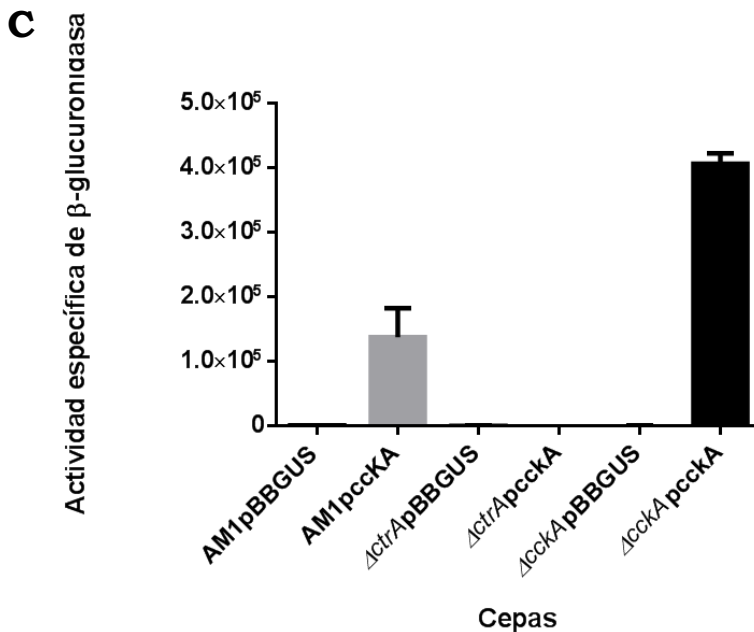
En la **figura 17C** se muestran las cuantificaciones obtenidas de este experimento, en ellas podemos observar de manera indirecta la actividad transcripcional del promotor de *cckA*.

Para las cepas AM1 y  $\Delta cckA$  se detectaron los niveles más altos de actividad, donde la cepa  $\Delta cckA$  muestra hasta tres veces mayor actividad transcripcional al compararla con AM1; dicha tendencia es similar a lo ya observado con el promotor de *ctrA*. Por otra parte, y muy importante para contestar nuestra pregunta, se observa cómo en ausencia de CtrA no hay transcripción del gen *cckA*, lo que demuestra que la ausencia de CckA en la inmunodetección se debe al control transcripcional y no a la inestabilidad de la proteína, confirmando entonces que la transcripción de *cckA* requiere de la proteína CtrA.



**B**

5'GTTCCGGGCTTTGCGAGCTGGATCCTCGCGA  
 GATTAACACAGTGC TTAACGATTTCAGGGCCGA  
 ATGTCCGCGGGGCGAATCCGGCTCGGGGATGT  
 CAGTGCACAGGCAGTCAGCAGATCTC <sup>*cckA*</sup>GTGGG  
 GGCGGCGGAAGGTCTCCGCT3'



**Figura 17. A)** Análisis de Western blot con el anticuerpo anti-CckA de extractos totales provenientes de las cepas indicadas, crecidas con cas aminoácidos al 0.2% (CA) o ácido succínico 15 mM (15) en condición fotoheterotrófica. El anticuerpo primario fue utilizado en una dilución 1: 5000. **B)** Secuencia de DNA de la región río arriba del gen *cckA*, se marca en dorado la caja de unión a CtrA putativa y en rojo el inicio de la traducción del gen **C).** Actividad promotora de la región regulatoria del gen *cckA* en ausencia y presencia de las proteínas CtrA y CckA. Los extractos fueron obtenidos de las cepas crecidas con cas aminoácidos al 0.2% como fuente de carbono en condición fotoheterotrófica. La barra representa el error estándar (n=3). Las actividades son expresadas como pmoles de 4-metil-umbelliferona formada por un minuto por miligramo de proteína

### **Transcripción de los genes *cckA* y *sciP-ctrA* en presencia de CtrAD51A**

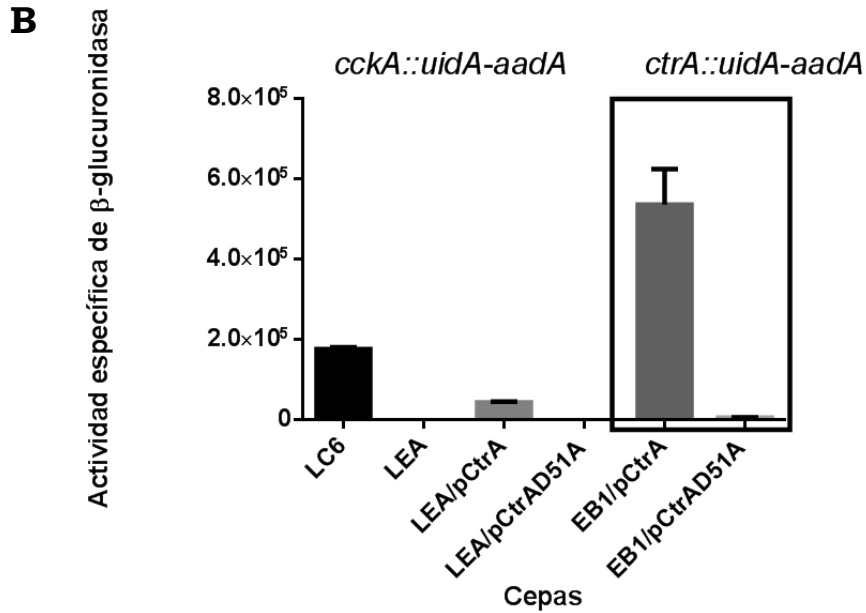
Los resultados anteriores aunados a los experimentos que demuestran la activación del promotor blanco *psciP-ctrA* en ausencia de la proteína histidin cinasa CckA nos llevaron a analizar la actividad de los promotores *pcckA* y *psciP-ctrA* en presencia del alelo *ctrAD51A*, versión de CtrA incapaz de ser fosforilada.

Para ello se determinó la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa en extractos totales obtenidos de la cepa mutante LC6 (derivada de AM1,  $\Delta cckA::uidA-aadA$ ) (Vega-Baray *et al*, 2015) y de la cepa doble mutante LEA (derivada de la AM1,  $\Delta cckA::uidA-aadA\Delta ctrA::Hyg$ ), y de las cepas LC6, LEA y EB1 llevando los plásmidos pRK\_CtrA (CtrA silvestre) o pRK\_D51A (CtrA incapaz de ser fosforilada). Para este experimento todas las cepas fueron crecidas en condiciones fotoheterotróficas en medio mínimo de Sistrom modificado con ácido succínico 100  $\mu$ M como fuente de carbono.

La **figura 18B** contiene todas las actividades transcripcionales medidas para este experimento. Se observa como la actividad transcripcional del gen *cckA* (en LC6) se pierde en ausencia de la proteína CtrA (cepa LEA) lo que confirma una vez más que la transcripción de *cckA* depende de CtrA. Además, se puede observar como esta actividad se recupera parcialmente cuando la cepa es complementada con el alelo silvestre de *ctrA* (LEA/pCtrA), en contraste con lo observado al medir la actividad transcripcional en la cepa complementada con la versión D51A de CtrA que fue incapaz de promover la expresión del reportero (LEA/pCtrAD51A). De manera semejante, los resultados obtenidos al evaluar la fusión *ctrA::uidA-aadA* demostraron una fuerte disminución de la actividad del reportero en presencia de la versión D51A (EB1/pCtrAD51A) cuando esta se compara con la versión de CtrA silvestre, es decir, aquella que puede ser fosforilada (EB1/pCtrA).

La **figura 18A** presenta la inmunodetección de la proteína CtrA en los extractos de estas cepas, confirmando la presencia de la proteína en estas muestras. No obstante, se observó una moderada pero reproducible reducción de la cantidad de CtrA en las cepas que expresan la versión no fosforilable de la proteína.





**Figura 18.A)** Análisis de Western blot con el anticuerpo anti-CtrA en extractos celulares totales provenientes de las cepas indicadas, crecidas en medio de cultivo de Sistrom modificado con ácido succínico 100  $\mu$ M. El anticuerpo primario fue utilizado en una dilución 1:5000. **B)** Actividad transcripcional del promotor de *cckA* y del operón *sciP-ctrA* en presencia de CtrAD51A. Se muestra la actividad específica de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa de las cepas LC6 (AM1 $\Delta$ *cckA::uidA-aadA*), LEA (AM1 $\Delta$ *cckA::uidA-aadA* $\Delta$ *ctrA::Hyg*), LEA+CtrA, LEA+CtrAD51A, EB+CtrA ( $\Delta$ *ctrA::uidA-aadA* $\Delta$ *cckA::Hyg*+CtrA) y EB+CtrAD51A. Extractos obtenidos de células crecidas en ácido succínico 100  $\mu$ M en condición fotoheterotrófica. La barra representa el error estándar (n=3). Las actividades son expresadas como pmoles de 4-metil-umbelliferona formada por un minuto por miligramo de proteína.

Estos resultados en conjunto indican, por una parte, el requisito de CtrA-P para llevar a cabo la activación de la transcripción de sus promotores blanco (*pcckA* y *psciP-pctrA*) y la existencia de una proteína o molécula aún no identificada capaz de fosforilar a CtrA en ausencia de CckA en *R. sphaeroides*.



### Transcripción del gen *fleQ* en presencia de CtrA

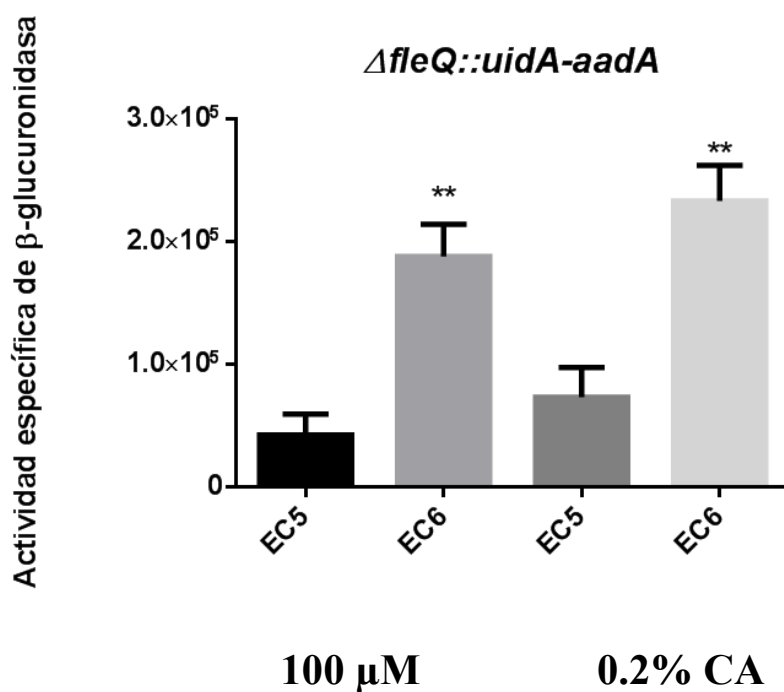
Adicionalmente para entender mejor la posible relación existente entre los sistemas flagelares 1 y 2 en *R. sphaeroides* y debido a la expresión de CtrA en presencia de la proteína FleQ demostrada en este trabajo (**figura 16B**), se decidió evaluar la actividad transcripcional del gen *fleQ* en la cepa AM1 y la cepa mutante en *ctrA* (derivada de AM1), con el fin de determinar si es través de este regulador de respuesta que el sistema flagelar 2 desempeña un papel regulatorio sobre el sistema flagelar 1. Para ello se introdujo el alelo con la fusión transcripcional *fleQ::uidA-aadA* (Poggio *et al*, 2005) en las cepas; AM1 y  $\Delta ctrA$ .

Se obtuvieron extractos totales de las cepas EC5 (AM1  $\Delta fleQ::uidA-aadA$ ) y EC6 (AM1  $\Delta fleQ::uidA-aadA\Delta ctrA::Hyg$ ) crecidas en medio mínimo de Sistrof modificado suplementado con CA al 0.2% o ácido succínico 100  $\mu$ M como fuente de carbono, que fueron sometidos a ensayos enzimáticos de  $\beta$ -glucuronidasa que permitieron cuantificar de manera indirecta la actividad transcripcional del gen *fleQ* en presencia y en ausencia de CtrA.

En la **figura 19** se muestran las actividades determinadas a partir de dichos extractos; de manera general se observa que la expresión del gen *fleQ* es modificada por la proteína reguladora de respuesta CtrA. Por un lado, se observó que en la cepa EC5 (aquella que expresa a la proteína CtrA) la actividad transcripcional del gen *fleQ* disminuyó 2.5 veces en comparación

con la cepa EC6 (cepa con mutación en el gen *ctrA*), en las dos condiciones de crecimiento aquí probadas.

En consecuencia y debido a estos resultados sugerimos que la proteína CtrA actúa como un regulador transcripcional negativo para el activador maestro *fleQ* de la cascada flagelar del sistema 1 de *R. sphaeroides*.



**Figura 19.** Actividad transcripcional del gen *fleQ::uidA-aadA*. Se muestra la actividad específica de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa de las cepas: EC5 (AM1 *fleQ::uidA-aadA*) y EC6 (*fleQ::uidA-aadA* $\Delta$ *ctrA::Hyg*) en ácido succínico 100  $\mu$ M o casaminoácidos al 0.2% como fuente de carbono. La barra representa el error estándar (n=3). Cada cepa fue comparada con EC5 0.2% C.A o 100  $\mu$ M de ácido succínico (análisis de ANOVA One-Way; Dunnett's; \*\*, P<0.005. Las actividades son expresadas como pmoles de 4-metil-umbelliferona formada por un minuto por miligramo de proteína

## Discusión

### Regulación transcripcional de *ctrA* en *R. sphaeroides*

CtrA es una proteína ampliamente conservada en el grupo de  $\alpha$ -proteobacterias (Brilli *et al*, 2010) y en algunas especies esta proteína es esencial. Tres aproximaciones experimentales han sido utilizadas principalmente para definir el regulón de CtrA, estas son: el análisis de la expresión diferencial, los experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina con anticuerpos anti-CtrA y la búsqueda de sitios potenciales de unión de CtrA. En algunos reportes resultado de las tres diferentes aproximaciones experimentales han llevado a definir los genes directa e indirectamente controlados por CtrA, en otros casos solamente se cuenta con resultados de alguna de estas estrategias metodológicas. A la fecha se considera que el control de CtrA sobre los genes flagelares y quimiotácticos se encuentra conservado entre la mayoría de las  $\alpha$ -proteobacterias; no obstante, el punto sobre el cual CtrA modula la red de expresión de estos genes varía entre las especies.

De la misma forma existe evidencia de que CtrA controla positivamente su propia síntesis; sin embargo, existen variaciones importantes en la forma en la cual esta ocurre, e incluso hay especies en donde este tipo de control no existe. Por ejemplo, en *C. crescentus* *ctrA* se expresa a partir de dos promotores, donde uno de ellos es fuertemente activado por CtrA, mientras que en *S. meliloti* (en donde CtrA también es esencial) la expresión de *ctrA*

es auto-activada solo marginalmente a pesar de la presencia de al menos cuatro sitios de unión en la región regulatoria de este gen (Pini *et al*, 2015). En *R. capsulatus* CtrA no regula su propia expresión y no modifica la expresión de *cckA* (Mercer *et al*, 2010). En la bacteria marina *Ruegeria sp.* KLH11, la expresión de *ctrA* es activada un 50% en presencia de CtrA. En este mismo estudio se determinó que la expresión de *cckA* es independiente de CtrA (Zan *et al*, 2013). Para otras especies se ha reportado la presencia de posibles sitios de unión a CtrA en la región regulatoria del gen, de ahí que se asume la existencia de un control autógeno (Bellefontaine *et al*, 2002; Brill *et al*, 2010)

Para el caso de *R. sphaeroides*, este trabajo demostró que la expresión de *ctrA* está fuertemente controlada por CtrA, ya que se observó un cambio de al menos 6 veces en el nivel de expresión del gen reportero.

Por otro lado, se determinó que CtrA es indispensable para la expresión del gen *cckA*, ya que en la cepa  $\Delta ctrA$  no fue posible detectar a la proteína CckA, y el nivel de expresión del gen reportero fue muy bajo.

Los resultados anteriores establecen un circuito de regulación en el cual CtrA regula marcadamente su propia expresión y la de *cckA*. Este tipo de arquitectura fue predicha estar presente en el orden de las Rhodobacterales (Brill *et al.* 2010), sin embargo, la modesta regulación de *ctrA* y la nula regulación de *cckA* observada en *Ruegeria sp.* y la falta de estos controles transcripcionales en *R. capsulatus* (ambas del orden de las

Rhodobacterales), contradecían el modelo propuesto. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que en *R. sphaeroides* la regulación de *ctrA* y *cckA* se apega a la propuesta de Brill et al. (2010) y sugieren que las diferencias importantes en la regulación de los genes *ctrA* y *cckA*, incluso entre los parientes más cercanos a *R. sphaeroides*, podrían ser el resultado de procesos biológicos que han divergido entre las especies (Castillo *et al.*, 2014).

Una de las proteínas que modifican la capacidad de CtrA para activar la transcripción es la proteína SciP, de la cual se sabe que se une a CtrA y provoca la represión de los genes blanco, los cuales poseen la secuencia de unión de CtrA y la secuencia de unión de SciP aledaña a ésta (Tan, *et al.*, 2010; Gora *et al.*, 2010; Gora *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2015). El gen *sciP* se encuentra conservado en una gran cantidad de bacterias, pero a la fecha su caracterización es incipiente y en *R. sphaeroides* no ha sido posible obtener resultados claros al respecto de su posible papel en la modulación de la actividad de CtrA.

En algunas especies bacterianas *sciP* se encuentra codificado río arriba de *ctrA*, como en *R. capsulatus* y *R. sphaeroides* mientras que en *C. crescentus* y *S. meliloti* *sciP* se encuentra codificado en otra región genómica (Leung *et al.*, 2013; Gora *et al.*, 2010). Independientemente del arreglo genético, en *C. crescentus* la expresión de *sciP* está controlada por CtrA (Tan, *et al.*, 2010; Gora *et al.*, 2010), y en *R. sphaeroides* nuestros resultados indican que *sciP* y *ctrA* forman un operón y por ende la expresión de *sciP* estaría coordinada

a la de *ctrA*. Dado que *SciP* es un inhibidor de la acción de *CtrA* es contraintuitivo suponer que ambas proteínas serán sintetizadas de la misma forma en el mismo momento, y en el caso de *C. crescentus* se sabe que la expresión de *sciP* es posterior a la aparición de *CtrA*, lo que, en este caso, dejaría una ventana de tiempo para que la proteína *CtrA* pueda activar todos sus genes blanco (Gora *et al.*, 2010). En el caso de *R. sphaeroides* la expresión coordinada de ambos genes en un solo transcrito podría impedir la acción de *CtrA*, a menos que otro tipo de mecanismo regulatorio estuviera presente o que *SciP* no cumpliera la misma función que en *C. crescentus*. En un esquema alternativo, en *R. capsulatus* se identificó un promotor interno en *sciP* que permite la expresión de *ctrA*, de este modo ambos genes se expresarían de forma independiente (Leung *et al.*, 2013). No obstante, en esta bacteria no se sabe si río arriba de *sciP* existe un promotor dependiente de *CtrA* que pudiera dar lugar al mensajero de ambos genes.

En resumen, la forma en la cual *CtrA* controla la expresión de los principales componentes del sistema en *R. sphaeroides* es semejante a otros esquemas regulatorios previamente reportados, pero con notables particularidades que en este caso colocan a *CtrA* como el regulador central del sistema, esto, es en ausencia de esta proteína se abate considerablemente la expresión de la cinasa de histidina *cckA* y del regulador de respuesta mismo.

Por otro lado, los resultados de este trabajo demuestran que la expresión de *ctrA*, así como la presencia de la proteína en extractos celulares totales, varía dependiendo de la disponibilidad y tipo de fuente de carbono en el medio de

cultivo (ver **figura 16**). Estos resultados son contrarios a los reportados en *R. capsulatus* en donde encuentran que la reducción de la concentración de malato 10 mM no provoca ningún cambio en la expresión de *ctrA* (Leung *et al*, 2013).

En *R. sphaeroides* ya había sido reportado que la expresión de *cckA* era reprimida por la presencia de ácidos C4-dicarboxílicos en el medio de cultivo (Vega-Baray *et al*, 2015). Nuestros resultados demuestran que *ctrA* es controlado de forma similar y dado que *ctrA* controla la expresión de *cckA*, es factible suponer que el control de los ácidos C4-dicarboxílicos pudiera ser ejercido directamente sobre *ctrA* y que el efecto sobre *cckA* sea el resultado de este control. No obstante, es sorprendente que a pesar de utilizar un plásmido que expresa *ctrA* a partir del promotor *lac* no fue posible detectar la presencia de la proteína CtrA en extractos celulares provenientes de cultivos crecidos en altas concentraciones de ácido succínico (ver **figura 16**), lo que sugiere la existencia de un mecanismo que lleva a la degradación de CtrA en estas condiciones. Dicho mecanismo podría desestabilizar a CtrA cuando CckA actúa como fosfatasa, lo que lógicamente implicaría que la versión no fosforilable de CtrA no podría haber sido acumulada por la bacteria. No obstante, fue posible detectar la presencia de esta versión mutante de CtrA en las cepas que carecen de *cckA*, por lo que la degradación de CtrA debe ser señalizada por algo más que la proteína defosforilada, quizá la presencia misma de la actividad fosfatasa de CckA.

A nivel transcripcional, entre los posibles mecanismos involucrados y no ignorados en el laboratorio se incluye la represión por catabolito generada por los ácidos C4-dicarboxílicos. Dentro del género *Rhodobacter* se ha establecido la presencia de un sistema de transporte específico para estos sustratos (Gibson *et al*, 1975), en *R. capsulatus* se ha identificado un sistema de transporte específico dependiente de proteínas (Dct) que transporta malato, succinato y fumarato como la única ruta de captación (Kelly *et al*, 2001); el sistema incluye tres genes estructurales (*dctPQM*) y dos genes regulatorios (*dctSR*) que predicen ser parte de un sistema de dos componentes donde DctS es la cinasa sensora que detecta los ácidos C4-dicarboxílicos provocando la autofosforilación en su residuo conservado de histidina para posteriormente fosforilar al regulador de respuesta DctR que se sugiere activa la transcripción del operón *dctPQM* (Hamblin *et al*, 1992; Kelly *et al*, 2001). En este momento, en el laboratorio se trabaja buscando promotores regulados por el regulador de respuesta DctR que pudieran estar involucrados en la represión directa o indirecta a nivel transcripcional de los genes *cckA* y *ctrA*.

Es sorprendente que en ausencia de *cckA* aún es posible observar el control de los ácidos C4-dicarboxílicos sobre la expresión de *ctrA*, cuyo promotor es dependiente de CtrA-P (como lo muestran los resultados de expresión del reportero al utilizar la versión CtrAD51A) (**figura 18**), lo cual requeriría no solo de la estabilización de CtrA en presencia de casaminoácidos o 100  $\mu$ M



ácido succínico, sino también de la fosforilación de CtrA por alguna otra cinasa o metabolito con función de fosfodonador.

De ser así, existiría un mecanismo que degrada a CtrA en presencia de ácidos C4-dicarboxílicos y otro que permite la fosforilación de ésta en condiciones permisivas en ausencia de *cckA*. Aunque podría considerarse un solo mecanismo, el hecho de que en la cepa AM1, en la cual CckA fosforila a CtrA y aun así ésta es degradada en condiciones de alta concentración de succínico arguye en contra de esta posibilidad.

Debido a la probable fosforilación de CtrA en ausencia de CckA, es necesario considerar la participación bifuncional de la histidin-cinasa CckA en el sistema de *R. sphaeroides*. Ya se sabe que para *S. melonis* las actividades de cinasa y de fosfatasa deben coordinarse adecuadamente para el comportamiento normal de la célula, la pérdida de la actividad de fosfatasa tiene como consecuencia una alta actividad de CtrA que da lugar a fenotipos deteriorados de motilidad y ciclo celular (Francez *et al*, 2015).

Por el momento, nosotros no evaluamos ni la participación de la proteína que pudiera estar involucrada con la activación de CtrA en ausencia de CckA, o las implicaciones de las actividades cinasa/fosfatasa CckA. Sin embargo, el papel de CckA como fosfatasa parece ser evidente en las cepas EC1/pCtrA y EC2/pCtrA en las cuales a pesar de expresar a *ctrA* a partir del promotor presente en el plásmido no fue posible detectar a CtrA en los ensayos de Western blot, mientras que en otras cepas como EB1/pCtrA la

presencia de CtrA es alta, y dado que ésta y EC2/pCtrA se diferencian esencialmente por la presencia de CckA en esta última, esto nos lleva a suponer que la poca CckA presente en WS8, SP13, EC1/pCtrA y EC2/pCtrA debe actuar como fosfatasa y es en esta situación en la cual CtrA no puede ser acumulada. Sería interesante explorar la posibilidad de que la actividad fosfatasa de CckA pudiera activar la vía de degradación de este regulador de respuesta.

### **La transcripción del gen *fleQ* es regulado negativamente por CtrA**

Previamente, los resultados obtenidos en el laboratorio sugerían que la expresión del sistema flagelar 1 provocaba la represión del sistema flagelar 2 mediante un mecanismo molecular desconocido (Vega *et al*, 2015). Nuestros resultados muestran que es posible detectar CtrA y CckA en extractos totales de la cepa WS8N (cepa silvestre) pero no en la cepa SP13, es decir  $\Delta fleQ$ , lo que es contrario al modelo planteado en el laboratorio. En este caso, los resultados sugieren que la presencia del activador maestro del sistema Fla1, favorece la presencia de las proteínas regulatorias CckA y CtrA en un estado basal. De acuerdo con lo anterior, nuestros resultados muestran que la expresión de *ctrA* es ligeramente mayor en la cepa WS8N que en la cepa  $\Delta fleQ$ , sin embargo, dado que FleQ es un activador transcripcional del factor  $\sigma^{54}$ , sería necesario que *ctrA* o *cckA* tuvieran un promotor dependiente de este factor sigma. La búsqueda *in silico* de la

secuencia consenso reconocida por  $\sigma^{54}$  río arriba de estos genes no mostró ningún blanco convincente, por lo que es poco probable que exista una regulación directa.

Con el fin de obtener resultados adicionales al respecto de la posible interrelación entre ambos sistemas flagelares, en este trabajo también se determinó que la expresión de *fleQ* disminuye aproximadamente 2.5 veces en presencia de CtrA (**figura 19**), lo que sugiere que la activación del sistema flagelar 2 podría llevar a la inhibición de Fla1. De acuerdo con esta posibilidad, en el laboratorio se ha identificado, mediante análisis *in silico*, la secuencia consenso de unión a CtrA en la región regulatoria de *fleQ* (**figura 20**) (Hernández-Valle J., Tesis de Maestría en proceso en el laboratorio). Dicho sitio se ubica en la región correspondiente a la posible caja -10 del promotor de *fleQ* (Flores, 2014).

La posible regulación entre los sistemas flagelares 1 y 2 ha sido poco estudiada, debido principalmente a que se desconocen las condiciones bajo las cuales se activa la expresión de los genes del flagelo 2 de forma natural, y a la fecha el flagelo 2 ha sido estudiado en mutantes constitutivas de CckA, lo cual dificulta la investigación de los pasos correspondientes a la activación del sistema.



## Conclusiones

En *R. sphaeroides*:

- Los genes *sciP* y *ctrA* forman un operón que es transcrito en un mismo RNA mensajero.
- El operón *sciP-ctrA* es regulado positivamente por CtrA a nivel transcripcional.
- La transcripción del gen *ctrA* es inducida por el crecimiento en cas aminoácidos y en bajas concentraciones de ácido succínico y reprimida por altas concentraciones de ácido succínico como fuente de carbono.
- La estabilidad de la proteína CtrA es regulada por las condiciones de cultivo y por el estado de CckA.
- La transcripción del gen *cckA* depende de la proteína CtrA.
- La activación transcripcional de los promotores blanco es mediada por CtrA-P.
- En ausencia de CckA, durante el crecimiento fotoheterotrófico, CtrA es fosforilada por alguna cinasa inespecífica o por algún metabolito.
- La proteína CtrA reprime la expresión de FleQ a nivel transcripcional.

## Perspectivas

- Aislar mutantes puntuales de los posibles sitios de unión a CtrA, aquí mencionados, presentes en las regiones regulatorias de *sciP*, *ctrA*, *cckA* y *fleQ* que pudieran aportar información para la caracterización del sitio de unión de CtrA en *R. sphaeroides*.
- Realizar ensayos de Northern blot utilizando sondas para los transcritos de los genes *sciP* y *ctrA* con el fin de explorar posibles modificaciones post-transcripcionales.
- Identificar la molécula o proteína encargada de fosforilar a CtrA en ausencia de la proteína CckA en *R. sphaeroides*.
- Realizar ensayos de fosforilación de la proteína CtrA y de la vía del sistema de dos componentes CckA-ChpT-CtrA, que comprueben la conexión entre las proteínas.
- Identificar la vía que lleva a CtrA a ser degradada.

## Referencias

- Anderson, P *et al.* (2000). FlbT, the post-transcriptional regulator of flagellin synthesis in *Caulobacter crescentus*, interacts with the 5' untranslated region of flagellin mRNA. *Mol. Microbiol.* 38 41-52.
- Atkinson, S *et al.* (2008). Functional interplay between the *Yersinia pseudotuberculosis* YpsRI and YtbRI quorum sensing systems modulates

swimming motility by controlling expression of *flhD* and *fliA*. *Mol. Microbiol.* 69, 137-151.

- Ausubel, F *et al* (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons. New York.
- Bamg, I *et al.* (2002). Autoinduction of the *ompR* response regulator by acid shock and control of the *Salmonella enterica* acid tolerance response. *Mol Microbiology*. 44 (5):1235-50.
- Barnett, L *et al.* (2001). A homolog of the CtrA Cell Cycle Regulator is Present and Essential in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 183. No. 10 pp.3204-3210.
- Belas R *et al.* (2014). Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends Microbiol* 22:517–527.
- Bellefontaine, A *et al.* (2002). Plasticity of transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*. *Molecular Microbiology*. Vol. 43 No. 4 pp 945-960.
- Biondi, E *et al.* (2006). Regulation of the bacterial cell cycle by an integrated genetic circuit. *Nature* 444:899-904.
- Bird, T *et al.* (2011). A CtrA homolog affects swarming motility and encystment in *Rhodospirillum rubrum*. *Arch.Microbiol.* 193:451-459.
- Brun, Y *et al.* (1992). A temporally controlled  $\sigma$ -factor is required for polar morphogenesis and normal cell division in *Caulobacter*. *Genes Dev.* 6, 2395-2408.

- Buelow, D *et al.* (2010). Three (and more) component regulatory systems-auxiliary regulators of bacterial histidine kinases. *Micro Review. Molecular Microbiology*. 75 (3), 547-566.
- Claret, L. *et al* (2002). Interaction o the atypical prokaryotic transcription activator FlhD2C2 with early promoters of the flagellar gene hierarchy. *J. Mol. Biol* 321, 185-199.
- Claret, L., and Hughes, C. (2000a) Functions of the subunits in the FlhD2C2 transcriptional master regulator of bacterial flagellum biogenesis and swarming. *J Mol Biol* **303**: 467–478.
- Curtis, P *et al.* (2010). Getting in the Loop: Regulation of Development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 74. No. 1: 13-41.
- Domian I *et al.* (1999). Feedback control of master bacterial cell-cycle regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6648-6653.
- Domian, I *et al.* (1997). Cell type-specific phosphorylation and proteolysis of a transcriptional regulator controls the G1-to-S transition in a bacterial cell cycle. *Cell* 90:415-424.
- Duerig, A *et al.* (2009). Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *GENES DEVELOPMENT* 23:93-104.
- Dutton, R *et al.* (2005). Linking structural assembly to gene expression: a novel mechanism for regulating the activity of a sigma54 transcription factor. *Mol. Microbiol* 58, 743-757.



- Fabienne, F *et al.* (2008). Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nature Reviews Microbiology*. Volumen 6 455-465.
- Francez, A *et al.* (2015). The branched CcsA/CckA-ChpT-CtrA phosphorelay of *Sphingomonas melonis* controls motility and biofilm formation. *Molecular Microbiology* 97 (1), 47 -63
- Francis, N *et al.* (2016). CtrA controls cell division and membrane composition of the pathogen *Brucella abortus*. *Molecular Microbiology* 00(00), 00-00.
- Frye, J *et al.* (2006). Identifivation of new flagellar genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 188, 2233-2243.
- Fumess, R *et al.* (1997). Negative feedback from *Proteus* class II flagellum export defect to the *flhDC* master operon controlling cell division and flagellum assembly. *J. Bacteriol* 179: 5585-5588.
- Gao, R *et al.* (2015). Temporal hierarchy of gene expression mediated by transcription factor binding affinity and activation dynamics. *MBio* 6:e00686-16
- Gillen, K *et al.* (1993). Transcription from two promoters and autoregulation contribute to the control of expression of the *Salmonella typhimurium* flagellar regulatory gene *flgM*. *J. Bacteriol.* 175, 7006-7015.
- Girard, L *et al.* (2000). Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL-fixK* cascade. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 1283-1292.

- Gora K *et al* (2013). Regulated proteolysis of transcription factor complex is critical to cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology*. 87 (6), 1277-1289
- Gora, K *et al* (2010). A Cell-Type Specific Protein-Protein Interaction Modulates Transcriptional Activity of Master Regulator in *Caulobacter crescentus*. *Cell*. Vol. 39. Pp. 455-467.
- Groisman, E *et al*. (2016). Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 70:103-124
- Hatt, J *et al*. (2008). Characterization of novel gene *wosA*, regulating FlhDC expression in *Proteus mirabilis*. *J. Bacteriol.* 190, 1946-1955.
- Hengge, R *et al*. (2008). The two-component network and the general stress sigma factor RpoS ( $\sigma^S$ ) in *Escherichia coli*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 631: 40-53.
- Hernandez-Valle, J *et al*. (2017). The master regulators of the Fla1 and Fla 2 flagella of *Rhodobacter sphaeroides* control the expression of their cognate CheY proteins. *J Bacteriol.* Vol 7.
- Holtzendorff, J *et al*. (2004). Oscillating global regulators control the genetic circuit driving a bacterial cell cycle. *Science* 304: 983-987.
- Hughes, K *et al*. (1993). Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* 262, 1277-1280.
- Jenal, U *et al*. (1998). An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *EMBO J.* 17, 5658-5669.
- Joyce, E *et al*. (2012). Swarming motility and the control of master regulators of flagella biosynthesis. *Molecular Microbiology*. 83 (1), 14-23.
- Keen, N *et al*. (1988). Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* 70: 191-197.

- Kutsukake, K *et al.* (1990). Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 172, 741-747
- Kutsukake, K *et al.* (1997). Autogenous and global control of the flagellar master operon , *flhD*, in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* 254, 440-448.
- Lang, A *et al.* (2002). A bacterial signal transduction system controls genetic exchange and motility. *J. Bacteriol.* 184:913-918
- Laub, M *et al.* (2002). Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell-cycle. *Proc Natl Acad. Sci. USA.* Vol 99 pp. 4632-4637
- Leung, M *et al.* (2013). Transcriptional regulation of the *Rhodobacter capsulatus* response regulator CtrA. *Microbiology*, 159, 96-106.
- Li, C *et al.* (1993). Adverse conditions which cause lack of flagella in *E. coli*. *J. Bacteriol.* 175, 2229-2235.
- Licht, S *et al.* (2008). Resolving individual steps in the operation of ATP-dependent proteolytic molecular machines: from conformational changes to substrate translocation and processivity. *Biochemistry*, 47, 3595-3605.
- Liu, X., and Matsumura, P. (1994) The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J Bacteriol* **176**: 7345–7351.
- Llewellyn, M *et al.* (2005). The conserved *flaF* gene has a critical role in couplin flagellin translation and assembly in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol.* 57. 1127-1142.
- Mackenzie, C *et al.* (2007). Post-genomic adventures with *Rhodobacter sphaeroides*. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 283-307.

- Macnab *et al.*, How Bacteria Assemble Flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* Vol 57 pp. 77-100
- Mann, T *et al.* (2015). A cell cycle kinase with tandem sensory PAS domains integrates cell fate cues. *Nature Communications* DOI:10.1038/ncomms11454.
- Martin, B *et al.* (2010). Expression and maintenance of ComD-ComE, the two- component signal-transduction system that controls competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 75 (6): 1513-28.
- Mercer, R *et al.* (2010). Loss of the Response Regulator CtrA Cause Pleiotropic Effects on Gene Expression but Does Not Affect Growth Phase Regulation in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology.* Vol 193, No. 11 pp 2701-2710
- Merino, S *et al.* (2006). Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. *FEMS Microbiol Lett.* 127-135.
- Merino, S *et al.* (2015). The polar and lateral flagella from *Plesiomonas shigelloides* are glycosylated with legionaminic acid. *Frontiers in Microbiology.* 6:649. pp
- Metcalf, W *et al.* (1993). Construction of new  $\beta$ -glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement. *Gene* 129: 17-25.
- Minagawa, S *et al.* (2003). Identification and molecular characterization of the Mg<sup>2+</sup> stimulon of *Escherichia coli*. *JB.* 185 (13): 3396-702
- Mohr, C *et al.* (1998). A membrane- associated protein, FliX, is required for an early step in *Caulobacter* flagellar assembly. *J. Bacteriol.* 180, 2175-2185.

- Mora, J *et al.* (2015). Structural characterization of the Fla2 flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* 197:2859-2866.
- Muir, R *et al.* (2001). Regulation of late flagellar gene transcription and cell division by flagellum assembly in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* 41, 117-130.
- Ohnishi, K *et al.* (1990). Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* 221,139-147.
- Ouimet, M *et al.* (2000). Analysis of a cell-cycle promoter bound by a response regulator. *J. Mol. Biol.* 302, 761-775.
- Ozaki, L *et al.* (2015). Cyclic di-GMP acts as a cell cycle oscillator to drive chromosome replication. *NATURE.* Vol 523: 236-252.
- Panis, G *et al.* (2015). Versatility of global transcriptional regulators in alpha-Proteobacteria: from essential cell cycle control to ancillary functions. *FEMS Microbiology* 39: 120-133
- Pini, F *et al.* (2015). Cell Cycle Control by the Master Regulator CtrA in *Sinorhizobium meliloti*. *PLoS Genet* 11(5): e100532.
- Poggio, S *et al.* (2005). The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding protein. *Molecular Microbiology.* Vol 58 (4): 969-983.
- Poggio, S *et al.* (2007). A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexist with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal Bacteriology*, Vol. 189: 3208-3216.
- Pruss, B *et al.* (2001). FlhD/FlhC-regulated promoters analyzed by gene array and *lacZ* gene fusions. *FEMS Microbiol. Lett.* 197, 91-97

- Quandt, J *et al.* (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram negative bacteria. *Gene* 127:15-21.
- Quon, K *et al.* (1996). Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* 84, 83-93.
- Ramakrishnan, G *et al.* (1990). FlbD of *Caulobacter crescentus* is a homologue of the NtrC (NRI) protein and activates  $\sigma^{54}$ -dependent flagellar gene promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2369-2373.
- Reisenauer A *et al.* (2002). DNA methylation affects the cell cycle transcription of the CtrA global regulator in *Caulobacter*. *EMBO J* 21:4969-4977.
- Reisenauer, A *et al.* (1999). The CtrA response regulator of the CtrA global regulator in *Caulobacter*. *EMBO J.* 21, 4969-4977.
- Reisenauer, A *et al.* (2002). DNA methylation affects the cell cycle transcription of the CtrA global regulator in *Caulobacter*. *EMBO J.* 21, 4969-4977.
- Shi, W *et al.* (1993). Mechanism of adverse conditions causing lack of flagella in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175, 2236-2240.
- Shin, S *et al.* (1995). Modulation of flagellar expression in *Escherichia coli* by acetil phosphate and the osmoregulatory OmpR. *J. Bacteriol.* 177, 4696-4702.
- Shu, C *et al.* (2002). ANTAR: an RNA-binding domain in transcription antitermination regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* 27:3-5
- Siam, R *et al.* (2003). Gutamate at the phosphorylation site of response regulator CtrA provides essential activities without increasing DNA binding. *Nucleic Acids Res.* 31:1775-1779.

- Smith, T *et al.* (2009). Deciphering Bacterial Flagellar Gene Regulatory Networks in the Genomic Era. *Advances in Applied Microbiology*. Vol 67. Burlington: Academic Press. Pp 257-295.
- Soutourina, *et al* O. (1999). Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: Role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. *J. Bacteriol.* 181, 7500-7508. WG,
- Soutourina, O. (2002) Regulation of bacterial motility in response to low pH in *Escherichia coli*: The role of H-NS protein. *Microbiology* 148, 1543-1551.
- Sperandio, V *et al.* (2002). Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): A novel two- component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* 43, 809-821.
- Tan, M *et al* (2010). An essential transcriptional factor SciP enhances robustness of *Caulobacter* cell cycle regulation. *PNAS*. Vol. 107.No. 44 18985-18990.
- Tan, M *et al.* (2010). An essential transcription factor, SciP, enhances robustness of *Caulobacter* cell cycle regulation. *PNAS*. Vol 107, No. 44 pp18985-18990.
- Taylor, J *et al.* (2009). Mutations that Alter RcdA Surface Residues Decouple Protein Localization and CtrA Proteolysis in *Caulobacter crescentus*. *J.Mol.Biol.* 394, 46-60.
- Tomoyasu, T *et al.* (2003). Turnover of FlhD and FlhC, master regulator proteins for *Salmonella* flagellum biogenesis, by the ATP-dependet ClpXP protease. *Mol. Microbiol.* 48, 443-452.

- Tsokos, C *et al.* (2011). A dynamic complex of signaling proteins uses polar localization to regulate cell fate asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Dev. Cell* 20: 329-341.
- Vega-Baray, B *et al.* (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. *J Bacteriol* 197:833-847
- Wang, S *et al.* (2006) Structure of the *Escherichia coli* FlhDC complex, a prokaryotic heteromeric regulator of transcription. *J Mol Biol* **355**: 798–808.
- Wei, B *et al.* (2001). Positive regulation of motility and flhDC expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 40, 245-256.
- Wu, J *et al.* (1998). An essential, multicomponent signal transduction pathway required for cell cycle regulation in *Caulobacter*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1443-1448.
- Xue, *et al* (2015). A delicate Nanoscale motor made by nature- The Bacterial Flagellar Motor. *Adv. Sci.* 2, 1500129
- Zan, *et al* (2013). The CckA-ChpT-CtrA Phosphorelay System Is Regulated by Quorum Sensing and Controls Flagellar Motility in the Marine Sponge Symbiont *Ruegeria* sp. KLH11. *PLoS ONE*. Volumen 8(6)
- Zhou, B *et al.* (2015). The Global Regulatory Architecture of Transcription during the *Caulobacter* Cell Cycle. *PLoS Genet* 11(1): e1004831.
- Zwir, I *et al.* (2012). The promoter architectural landscape of the *Salmonella* PhoP regulon. *Mol. Microbiol.* 84:463-485.
- Zwir, I *et al.* (2014). Bacterial nucleoid-associated protein uncouples transcription levels from transcription timing. *MBio* 5:e01485-14.