UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR

EL PAPEL DEL FACTOR SIGMA AlgU EN LA LOCOMOCION Y DIFERENCIACION CELULAR DE *Azotobacter vinelandii*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

RENATO LEON RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: Dra. E. GUADALUPE ESPIN OCAMPO

CUERNAVACA, MORELOS. 2009

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

El presente trabajo se realizo en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología, UNAM. Bajo la dirección del siguiente comité tutoral:
Dra. Rosa Laura Camarena Mejía
Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo (tutor principal)
Dr. Guillermo Gosset Lagarda
El autor fue becado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 113974) y contó con un apoyo para el proyecto de investigación por PAEP-UNAM (2003 clave-203352)

DEDICATORIAS.

A mis niños:
Leticia, Tonatiuh, Alexis, Michelle, Cellin, Alan, Edahi, Diana, el Ángel que viene y los que vendrán. Porque además de representar felicidad y esperanza, significan retos, para que en el futuro, los podamos (mi familia) mencionar con orgullo.

A Dulce, por todo lo que me brinda y por hacerme partícipe directo, del reto antes mencionado.

A mis padres y hermanos, por su apoyo, cariño y confianza. Gracias por todo lo que me han brindado.

A mi familia, por el apoyo que me brindaron.

A mi familia ”adoptiva” (González-Caballero), porque que ha contado con su amistad, casi desde que llegue a este lugar y porque en varios años, me compartieron su casa.

A mis amigos, que afortunadamente, tengo mas de uno. Gracias por las cosas que hemos vivido y por su amistad.

AGRADECIMIENTOS.

A las Dras. Guadalupe Espín y Gloria Soberón, por el apoyo, la orientación, los estímulos y confianza que me brindaron, durante el inicio (GS) y finalización (GE), de mi formación en la investigación.

A mi comité tutoral, por sus criticas e ideas en desarrollo del proyecto de doctorado. En especial a la Dra. Laura Camarena, como conocedora del tema sus criticas y aportaciones fueron mayores.

A mi jurado para el de grado, por la revisiones y comentarios hechas al presente trabajo.

A las M. en C. Josefina Guzmán y Biol. Soledad Moreno, por su apoyo en la generación de mutantes y en los experimentos de PCR tiempo real.

A la I. B. Nashbly Rosas, por su confianza y paciencia para ser su instructor, en su etapa inicial dentro de la investigación.

A los académicos, estudiantes y administrativos del laboratorio, que en mi estancia, directa o indirectamente contribuyeron en el desarrollo de mis proyectos. Sobre todo a Eduardo Juárez, Pablo Juárez y la Srita Rosalba González, porque procuran tener en orden y limpio, tanto el material como el laboratorio, para que nuestro trabajo sea mas grato.

A la Dra. Guadalupe Zavala y Biol. Rebeca Nájera, por su apoyo en la microscopia electrónica de transmisión.

Al Dr. Paúl Gaytan, Ing. Santiago Becerra y Ing. Eugenio López por la síntesis de oligos

A Ing. Arturo Ocadiz, M. en T. I. Juan Manuel Hurtado y Alma L. Martínez, por su apoyo en las cuestiones de computo.

A la Biol. Miryam Ortiz, por la liofilización de las cepas.

A las personas que contribuyeron a concretar este objetivo.

A las personas que me ayudaron en los tramites, para estar al corriente en mi situación laboral, esto incluye, dirigentes sindicales y autoridades de la UNAM.

Al “escuadrón de la muerte”, por esas grandes convivencias, espero que mi membresía este vigente.

INDICE

I	RESUMEN	1
II	INTRODUCCIÓN	2
2.1	Locomoción en bacterias	2
2.2	Estructuras para la locomoción en bacterias	3
2.2.1	Flagelo	3
2.3	El flagelo esta presente en los tres dominios biológicos (Arquea, Bacteria y Eucaria)	5
2.3.1	Filamento	5
2.3.2	Mecanismo de acción	6
2.3.3	Fuentes de energía	6
2.4	Distribución y tipos de flagelo en bacterias	6
2.5	Componentes del flagelo en bacterias	7
2.6	Proteínas involucradas en el ensamblaje y funcionamiento en bacterias	8
2.7	Sistemas que se requieren para que una bacteria tenga locomoción mediante el flagelo	9
2.8	Regulación genética de la biogénesis del flagelo en bacterias	11
2.8.1	Regulación genética de genes flagelares en enterobacterias como *E. coli* y *Salmonella*	12
2.8.2	Regulación del operón *flhDC*	13
2.8.3	Regulación genética de los genes flagelares en *P. aeruginosa*	14
2.8.4	Regulación del gen maestro del sistema flagelar de *P. aeruginosa*	16
2.9	Generalidades de *A. vinelandii*	18
2.9.1	Ciclo de vida de *A. vinelandii*	19
2.10	Regulación genética de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*	20
2.11	La separación del factor σ^E de su anti-sigma RseA es modulado por proteasas	22
2.11.1	Separación del factor σ^E de su anti-sigma MucA en *P. aeruginosa*	24
III	ANTECEDENTES	27
IV	HIPÓTESIS	27
V	OBJETIVOS	28
VI	MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1	Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo	29
6.2	Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	30
6.3	Condiciones de crecimiento de las cepas de *A. vinelandii* y *E. coli*	30
6.4	Ensayos de nado	30
6.5	Microscopía electrónica	30
6.6	Manipulación de ácidos nucleicos	30
6.7	RT-PCR y RT-PCR cuantitativo (PCR tiempo real)	31
6.8	Clonación de los genes *fleQ* y *flhDC* de *A. vinelandii*	32
6.9	Mutación de los genes *fleQ*, *flhC* y *cydR* de *A. vinelandii*	32
6.10	Transferir las mutaciones de los genes *fleQ*, *flhC* y *cydR* al genoma de *A. vinelandii*	33
6.11	Construcción de los plásmidos pLRGm y pLRGm-DC	34
6.12	Northern blot	34

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN 36
7.1 Documentar el efecto de σ^E en la locomoción de *A. vinelandii* 36
7.1.1 *A. vinelandii* presenta "swimming" solo en medios mínimos 36
7.1.2 El factor σ^E regula negativamente el nado en *A. vinelandii* 36
7.2 Genes involucrados en la biogénesis y funcionamiento del flagelo en *A. vinelandii* 38
7.2.1 En el genoma de *A. vinelandii* existen los genes necesarios para la biogénesis y funcionamiento del flagelo 38
7.2.2 En *A. vinelandii* existen genes de dos sistemas maestros diferentes que inician la expresión de genes flagelares: *flhD-flhC* (*E. coli*) y *fleQ-fleN* (*P. aeruginosa*) 39
7.2.3 Las zonas de regulación de los genes flagelares de *A. vinelandii* presentan secuencias conservadas para la unión de los factores σ^{70}, σ^{28} y el activador $FlhD_4C_2$ 41
7.3 Análisis la expresión de genes flagelares de *A. vinelandii* 43
7.3.1 La cepa UW 136 de *A. vinelandii* carece de nado por la ausencia flagelos 43
7.3.2 Los genes flagelares *fleQ*, *fleN*, *flhC*, *fliA* y *fliC* se transcriben en *A. vinelandii* 44
7.4 Mutación de genes flagelares de interés para comprobar su participación en la biogénesis del flagelo en *A. vinelandii* 45
7.4.1 La expresión de genes flagelares en *A. vinelandii* es modulado por el sistema FlhD-FlhC y no por FleQ-FleN 45
7.4.2 Los genes *flhDC* de *A. vinelandii* complementan el fenotipo de nado de la mutante en *flhC* y forman un operón 47
7.4.3 En las zonas de regulación de los genes flagelares no presentan promotores dependientes de σ^{54} y el NH_4 inhibe el nado en *A vinelandii*. 48
7.5 Posible mecanismo por el cual el factor σ^E (AlgU) regula la expresión de los genes flagelares en *A. vinelandii* 49
7.5.1 El factor σ^E afecta la expresión del operón *flhDC* en *A. vinelandii* 49
7.5.2 En la región de regulación del operón *flhDC* de *A. vinelandii* se presentan las secuencias consenso para los factores σ^{32}, σ^{70} y el represor CydR (Fnr) 50
7.5.3 El factor σ^E (AlgU) regula la expresión del gen *cydR* de *A. vinelandii* 52
7.5.4 CydR regula negativamente el nado en *A. vinelandii* 53

VIII CONCLUSIONES 56

IX PERSPECTIVAS 56

REFERENCIAS 57

I. RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una bacteria que fija nitrógeno, presenta flagelos peritricos y forma quistes resistentes a la desecación. Al entrar en enquistamiento deja de fijar nitrógeno, pierde sus flagelos, y produce, entre otras cosas, alginato, alquilresorcinoles (ARS) y poli β-hidroxibutirato (PHB), que son polímeros de interés industrial. Por su participación en la formación del quiste y su importancia económica, se ha estudiado la regulación genética de la biosíntesis del alginato en *A. vinelandii*. Se identifico el operón *algUmucABCD*, el gen *algU* codifica para el factor σ^E (AlgU), que se requiere en la transcripción de los genes *algC* y *algD*, ambos genes codifican para enzimas que participan en la síntesis de alginato, mientras que las proteínas MucA, MucB, MucC y MucD modulan de manera negativa la actividad de σ^E, siendo MucA un anti-sigma. Por otra parte, en observaciones preliminares al microscopio óptico, se notó que σ^E también afecta la locomoción de *A. vinelandii* y al parecer lo hace de manera negativa. El objetivo de este trabajo fue determinar como el factor σ^E modula la locomoción de *A. vinelandii*.

En *Escherichia coli*, para iniciar la expresión de genes flagelares se requiere del activador transcripcional FlhDC junto con σ^{70}. En *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria relacionada filogenéticamente a *A. vinelandii*, el que inicia la expresión de genes flagelares es FleQ y σ^{54}, FleQ es regulado negativamente por FleN. Lo primero que se documentó en este trabajo, fue que el efecto negativo de σ^E sobre la locomoción de *A. vinelandii*, es por la represión de la generación del flagelo. Después mediante alineamientos del tipo tblastn, se identificaron alrededor de 60 genes flagelares en *A. vinelandii*. Encontramos que, a pesar de que contiene los homólogos a *flhDC*, y a *fleN-fleQ*, sólo el sistema FlhDC es el que inicia la expresión de los genes flagelares en *A. vinelandii*. Los genes *flhDC* forman un operón y su expresión es afectada negativamente por σ^E. Mediante un análisis en *silico*, de la región de regulación del operón *flhDC*, se encontró unas secuencias consenso para la unión de FnR. FnR es homóloga a CRP y puede actuar como un represor en *E. coli*. En *A. vinelandii* existe un homólogo a FnR que es CydR, CydR reprime la transcripción de los genes *cydAB*, que codifican para el citocromo *bd*, este citocromo es importante en la fijación de nitrógeno en crecimiento aeróbico. Las secuencias de unión de CydR que están en la región de regulación del operón *flhDC* son muy similares a las que están en la zona de regulación de los genes *cydAB*. Por su parte el gen *cydR*, presenta secuencias consenso de promotores dependientes de σ^E, además el factor σ^E tiene un efecto positivo en la transcripción de *cydR*, por otra parte la mutante en *cydR*, presenta mayor nado que la silvestre. Esto sugiere que CydR es el intermediario de σ^E para reprimir el nado de *A. vinelandii*. Con estos datos y los que existen en la literatura proponemos una cascada de regulación negativa por parte de σ^E en la generación del flagelo y la fijación de nitrógeno al entrar al enquistamiento en *A. vinelandii*, donde σ^E esta por encima de CydR, el cual a su vez actúa como represor de la expresión de los operones *cydAB* y *flhDC*.

II. INTRODUCIÓN

2.1 LOCOMOCIÓN EN BACTERIAS.

En la naturaleza, los organismos que presentan locomoción, tienen una ventaja evolutiva, porque les permite esquivar las condiciones adversas y dirigirse hacia condiciones más favorables para su propagación. El mundo microbiano no es la excepción. Los procariontes han desarrollado una gran variedad de mecanismos con los que se desplazan a través de medios líquidos o sobre superficies húmedas. Estos mecanismos de locomoción son el "swimming", "swarming", "gliding", "twiching" o "floating" [Jarrel y McBride 2008]. La locomoción puede involucrar apéndices de superficie, como el flagelo, el Pili y la "pierna" en *Mycoplasma*. Las estructuras internas como el citoesqueleto y vesículas de gas, están involucradas en algún tipo de locomoción, mientras que el mecanismo de algunos otros tipos de movimientos aun se desconocen [Jarrel y McBride 2008]. Independientemente del mecanismo que empleen para el movimiento, muchos microorganismos que tienen locomoción, usan un complejo sistema sensorial que controla sus movimientos en respuesta a un estimulo, el cual le permite migrar a ambientes mejores [Jarrel y McBride 2008]. Anteriormente, Henrichsen en 1972 reporto una clasificación de los tipos de locomoción en bacterias, en base al análisis durante un cuarto de siglo, de cientos de cepas de 40 especies que pertenecen a 18 géneros de bacterias, los diferentes tipos de locomoción que describió son el "swiming", "swarming", "twiching motility", "gliding", "sliding" y "darting", pero en los tres últimos, el conocimiento sobre los mecanismos que emplean, es casi nulo.

El flagelo lo utilizan las bacterias para realizar movimientos conocidos como "swiming" y "swarming".

"Swimming" (nado), es el desplazamiento en forma individual y al azar en medios líquidos con baja viscosidad, generando una forma de halo (fig. 1A) [Henrichsen, 1972], en el laboratorio se obtiene en medios con concentraciones de agar < 0.3 %.

Figura 1. Tipos de locomoción mediada por flagelo en bacterias. A) "Swimming" (nado), se da en medios semilíquidos, las células se mueven individualmente y al azar, formando un halo. B) "Swarming" se da en superficies semisólidas las células se mueven colectivamente y en forma coordinada, generando una especie de ramificaciones.

"Swarming" (enjambrado), es el desplazamiento de células en grupo (colonial) y de manera coordinada para cruzar superficies semisólidas, observándose en muchas especies un fenotipo como ramificaciones (fig. 1B) [Henrichsen, 1972], en el laboratorio se da en medios con agar > 0.4 %. En el "swarming" además de flagelos, se

requiere de agentes humectantes, para lubricar y disminuir la tensión superficial, como suelen ser los biosurfactantes (Sharma y Anand 2002). Algunas especies de bacterias que poseen un solo flagelo, para el "swarming" se hiperflagelan y se alargan las células, este proceso de diferenciación celular se conoce como células "swarming" [Fraser y Hughes 1999].

"Twitching motility", este tipo de locomoción se describió por primera ves en *Acinetobacter calcoaceticus* por Lautrop en 1961 y en 1965 le dio este nombre. Para este tipo de movimiento se requiere del pili tipo IV, el cual se extiende, se fija en la superficie, después se contrae, este tipo de locomoción, es el principal para colonizar rápidamente nuevas superficies donde existen muchos nutrimentos [Mattick 2002]. El "twitching motility" es un movimiento colonial del tipo "gliding", y las bacterias patógenas, lo emplean en la colonización de sus hospederos como plantas y animales, también lo usan en la formación de "biofilms" y de cuerpos fructíferos como es el caso de *Mycoplasma* [Mattick 2002].

2.2 ESTRUTURAS PARA LA LOCOMOCIÓN EN BACTERIAS.

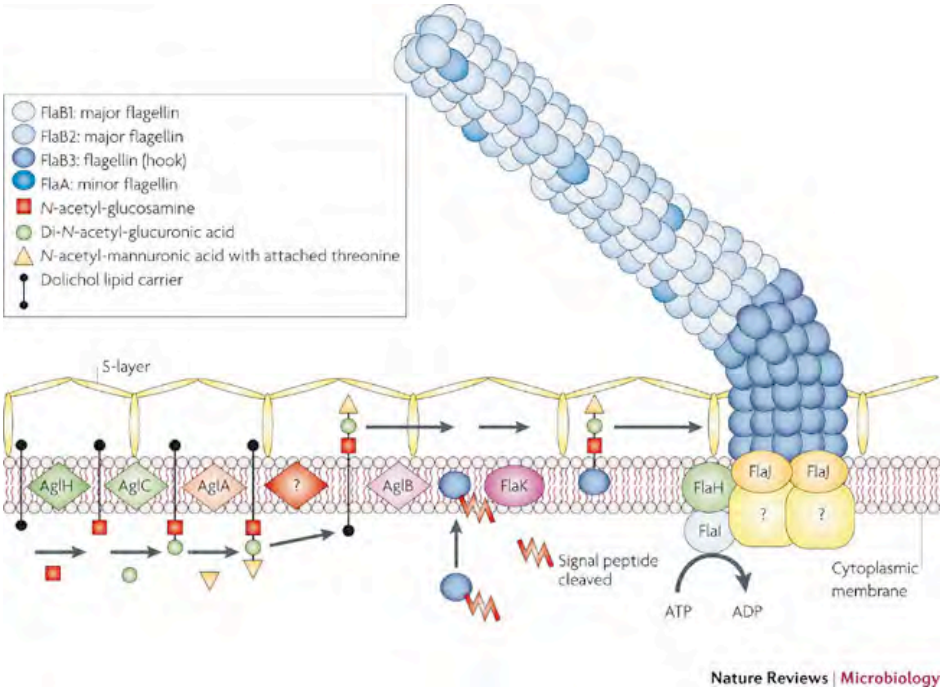
El pili (del latín cabello), conocido también como fimbria (del latín fleco), se observa generalmente en bacterias Gram-negativas, mientras que en Gram-positivas es escaso. El pili tipo IV, es una estructura que usan las bacterias para el "twitching motility", el pili se implanta en la membrana celular. Para la generación y funcionamiento del pili, en *P. aeruginosa*, se requieren de al menos 40 genes [Mattick 2002]. Otra de las estructuras que usan las bacterias para su locomoción, es el flagelo. En este trabajo nos enfocaremos a esta fascinante nanomáquina biológica.

2.2.1 Flagelo.

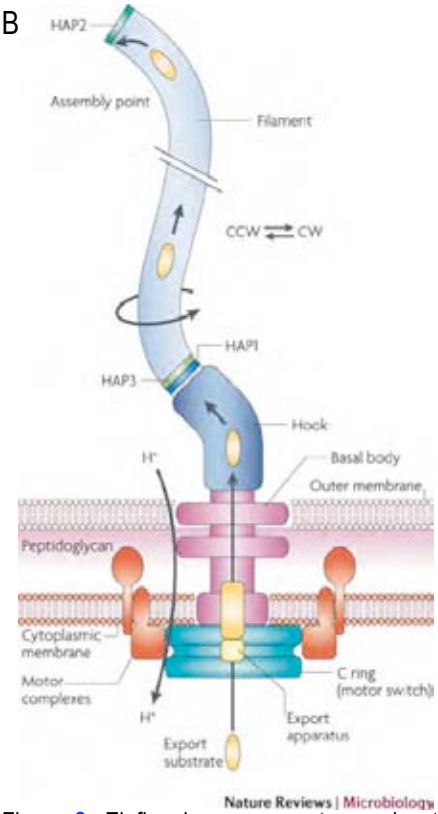
El flagelo bacteriano, es el mas estudiado de todas las estructuras de locomoción en procariontes [Macnab 2004; Macnab 2003; Aldridge y Hughes 2002]. Más del 80 % de las especies de bacterias conocidas poseen esta estructura, incluidos varios Archeae flagelados [Moens y Vanderleyden, 1996; Thomas *et al*., 2001]. Es usado para el "swimming" (nado), en ambientes acuosos y la velocidad que alcanzan con estas estructuras puede variar mucho entre especies, ejemplos: *Bacillus licheniformis* 21.4 μm/seg, *Sporosarcina ureae* 28.1 μm/seg, *P. aeruginosa* 55.8 μm/seg, *Thiospirillum jenense* 86.5 μm/seg [Ordal 1985; Vaituzis *et al*., 1969]. *E. coli* nada a un promedio de 25-35 μm/seg [Lowe *et al*., 1987], *A. vinelandii* alcanza los 74μm/seg [Haneline *et al*., 1991]. *Bdellovibrio bacteriovorus* puede alcanzar 160 μm/seg [Lambert *et al*., 2006]. Es sorprendente la velocidad que adquiere *B. bacteriovorus*, a pesar de que su flagelo tiene una cubierta (forro) membranosa [Thomashow y Rittenberg, 1985; Seidler y Starr 1968].

En la comparación a escala, de la velocidad de las bacterias con animales, como los grandes felinos, incluso con vehículos diseñados por el hombre como los "monoplaza", generalmente la velocidad de las bacterias es con gran sorpresa mayor. Por ejemplo, hay bacterias que alcanzan a nadar a una velocidad 0.00017 km/h, mientras que el Guepardo (*Acinonyx jabatus*) puede alcanzar una velocidad máxima de 110 Km/h, aparentemente el Guepardo es mas veloz pero, esa velocidad solo significa que se desplaza 25 longitudes de cuerpo/segundo, mientras que las bacterias pueden desplazarse a 60 longitudes de célula/segundo. Cuando se toman en cuenta los tamaños, observamos que las bacterias son extraordinariamente mas rápidas, a pesar de que las comparaciones no son equitativas, porque los depredadores y los autos, su desplazamiento es terrestre, mientras que las bacterias lo hacen en medios acuosos, donde el medio ofrece mayor resistencia.

A



B



C

Arreglo "9+2"

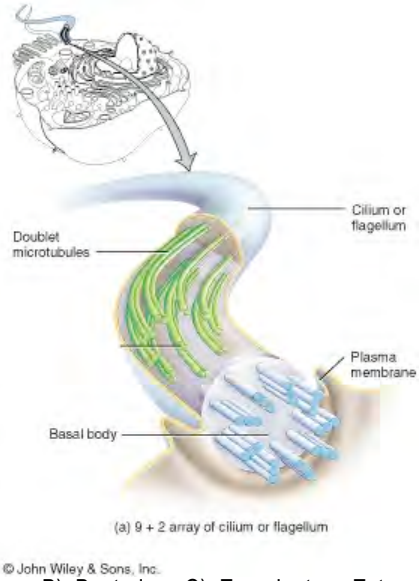


Figura 2. El flagelo se encuentra en los tres dominios biológicos: A) arqueas, B) Bacterias, C) Eucariontes. Esta estructura es común en los tres dominios biológicos, pero su estructura y funcionamiento es diferente en cada dominio. Imágenes tomadas de Jarrel y McBride 2008 (A y B).

Además de tener propiedades de locomoción, el flagelo bacteriano juega un papel crucial en la adhesión, formación de biopelículas ("biofilms") y colonización, como son los casos de *P. aeruginosa* [Stanley, 1983], *E. coli* [Pratt y Kotler, 1998], *Vibrio cholerae* [Gardel y Mekalanos, 1996], *Salmonella typhimurium* [Ciacci-Woolwine *et al*., 1998] y *Helicobacter pylori* [Eaton *et al*., 1996]. En microorganismos patógenos, la locomoción generalmente es considerado como un factor de virulencia, esencial para la colonización del organismo hospedero u órgano blanco [Ottemann y Millar, 1997; Josenhans y Suerbaum, 2002]. Sin embargo, el filamento flagelar tiene una fuerte propiedad antigénica en animales y vegetales hospederos [Hayashi *et al*., 2001; Dangl, 2001; Smith y Ozinsky, 2002].

2.3 El flagelo está presente en los tres dominios biológicos (Arquea, Bacteria y Eucaria).

El flagelo es un apéndice móvil, en forma de látigo, que generalmente es usado para la locomoción, esta estructura no es exclusivo de bacterias, esta presente en los tres dominios de los seres vivos: Arquea, Bacteria y Eucaria (fig. 2). A pesar de que el flagelo se encuentra en los tres dominios biológicos, presenta diferente estructura, funcionamiento y origen evolutivo en cada grupo. Solo el flagelo de Bacterias Gram-negativas y Gram-positivas es esencialmente idéntico, excepto que el flagelo del primer grupo de bacterias atraviesa la segunda membrana (externa), membrana que en las Gram-positivas esta ausente. El flagelo de arqueas es el menos estudiado de los tres dominios biológicos, por lo que hasta la década de los 80 del siglo XX se pensaba que era homólogo con el de bacterias [Cavalier-Smith 1987]. Sin embargo, estudios de los siguientes 10 años, pusieron de manifiesto diferencias para considerarlos como un caso clásico de evolución convergente. Las principales diferencias del flagelo en estos tres grupos se mencionan a continuación:

2.3.1 Filamento

El filamento flagelar de bacteria es hueco, en promedio tienen 20 nm de diámetro, esta constituido de subunidades de una sola proteína, conocida como flagelina. Al ensamblarse las subunidades de flagelina pasan por el hueco y se van depositando distalmente. Las flagelinas carecen de péptido señal y son secretadas por el sistema de secreción flagelar tipo III. La glicosilación de flagelinas es rara, los casos que se conocen son de la forma O-glicosilados [Logan 2006].

En arquea, el filamento tiene 10-12 nm de grosor [Thomas *et al*., 2001], esta constituido por flagelinas pero, son distintas a las de bacterias. Las flagelinas de arqueas tienen un péptido señal, similar al del pili tipo IV de bacterias [Faguy *et al*., 1994]. Las flagelinas de arqueas son procesadas por la preflagelina peptidasa FlaK/PibD, un homólogo de la prepilina peptidasa tipo IV de bacteria [Bardy y Jarrell 2002; Albers *et al*., 2003; Bardy y Jarrell 2003]. Otras proteínas que son esenciales para el flagelo arqueal tienen homología con el sistema del pili tipo IV, como la ATPasa (FlaI) y una proteína conservada de membrana (FlaJ) [Ng *et al*., 2006]. En arqueas, no se han encontrado genes homólogos a los de bacterias, involucrados en la estructura o ensambleaje del flagelo [Faguy y Jarrell 1999; Nutsch *et al*., 2005]. El interior del flagelo de arqueas forma estructuras homólogas a los del pili tipo IV, carece del hueco por donde pueda pasar los monómeros de flagelina [Cohen-Krausz y Trachtenberg 2002; Cohen-Krausz y Trachtenberg 2008]. La falta de un canal central y las similitudes al pili tipo IV, se propone que el flagelo de arqueas crece por la base [Jarrell *et al*., 1996; Jarrell *et al*., 2007]. En el arquea *Methanococcus maripaludis*, mutantes en *flaB3* no generan la estructura similar al gancho, pero producen filamentos [Chaban *et al*., 2007]. Esto puede ser posible si las

proteínas del filamento se agregan antes que los componentes del gancho, de ser así, la forma de ensamblar el flagelo en arqueas, es diferente el de bacterias. Las flagelinas de arqueas son altamente N-glicosiladas [Lechner y Wieland 1989; Sumper 1987].
El filamento de eucarionte es mas grueso que los anteriores, con un diámetro de 200 nm, está formado por mas de un centenar de proteínas diferentes (200), su núcleo es un cilindro constituido de nueve pares de microtúbulos que rodean a dos pares centrales (fig. 2), este arreglo se conoce como "9+2" [Mitchell 2006], y se denomina axonema. El núcleo se encuentra cubierto por la membrana plasmática, para que el interior del flagelo sea accesible al citoplasma de la célula. En la base del flagelo se encuentra un cuerpo basal (también conocido como bleferoblasto o cinetosoma), que es el centro de organización de los microtúbulos flagelares.

2.3.2 Mecanismo de acción.
El flagelo de bacterias funciona por un mecanismo de rotación que genera torca [Berg 1974; Silverman y Simon 1974], la rotación se da por un motor que esta en la base del flagelo y puede girar en sentido (CW; "clockwise") o en contra (CCW; "counterclockwise") de las manecillas del reloj [Silverman y Simon 1974], para ello posee un interruptor. El flagelo eucarionte se mueve en forma de látigo, es decir bate.

2.3.3 Fuente de energía.
La fuente de energía para la rotación del flagelo bacteriano, es un gradiente transmembranal de protones (H^+) o de iones Na^+ en bacterias alcalófilas [Manson *et al*., 1977]. Mientras que los flagelos de arqueas se propone que son impulsados por ATP. El flagelo eucarionte es impulsado por ATP.

2.4 Distribución y tipos de flagelo en bacterias. El arreglo del flagelo sobre la célula difiere de especie a especie, y parece estar relacionado con los ambientes específicos en el cual viven las células [Joys, 1988; Wilson y Beveridge, 1993]. El patrón de flagelación (tipos de disposición de flagelos; fig. 3), es de interés en la determinación taxonómica, ya que es característico de cada especie. Estos patrones son:
1) Monótrica en bacterias que tienen un solo flagelo en posición polar o subpolar (fig. 3a), ejemplo: *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Idiomarina loihiensis* y *Caulobacter crescentus*.

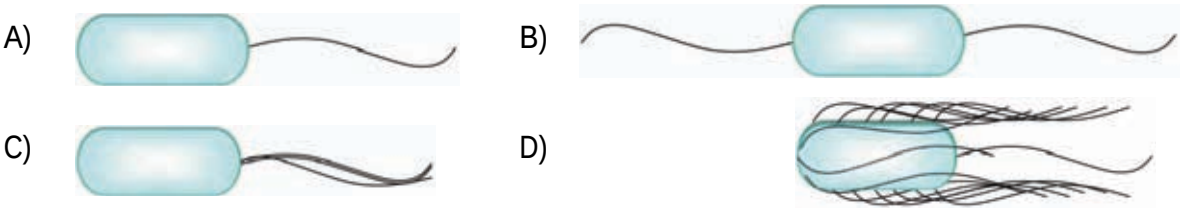


Figura 3. Patrones de la distribución de flagelos en Bacterias. A) Polar, B) Anfitrica, C) Lofotrica, D) Peritrica o lateral.

2) Anfítrica en bacterias que posee un flagelo en ambos polos (fig. 3b). Ejemplo, *Spirillum ostrae*.
3) Lofótrica en bacterias que tienen dos o más flagelos formando un penacho, normalmente en un polo, pero también puede ser en puntos opuestos (fig. 3c), ejemplo: *Vibrio fischeri*, *Ectothiorhodospira moblis* y *Spirillum volutans* la cual tiene 80 flagelos en el penacho.
4) Perítrica o Lateral en bacterias que tienen los flagelos repartidos por toda la superficie (fig. 4d; ejemplo: *E. coli* que posee 10

flagelos, mientras que *Proteus mirabilis* posee cientos, dando aspecto muy denso a la disposición de éstos. También existen flagelos dispuestos en posición lateral agrupados en penachos como en *Selenomonas*.

5) Periplásmicos, estos flagelos se encuentran localizados en el espacio periplásmico, como es el caso de las espiroquetas (*Borrelia*, *Treponema* y *Leptospira*). La rotación de estos flagelos causan un movimiento a toda la célula y se mueva hacia delante como un sacacorcho. En estas bacterias el flagelo no solo le sirve para la locomoción, el flagelo también funciona como un citoesqueleto que le da forma a la célula, en mutantes que carecen de flagelo además de no moverse tienen una morfología distinta a las células silvestres [Wolgemuth *et al*., 2006]

6) Algunas bacterias tienen sus filamentos cubiertos por una "funda", la composición de esta cubierta puede ser membranosa, como en *Bdellovibrio bacteriovorus* [Thomashow y Rittenberg, 1985], *Vibrio cholerae*, *V. Parahaemolyticus*, y *Helicobacter* [Geis *et al*., 1989] o proteica como en el caso de las espiroquetas.

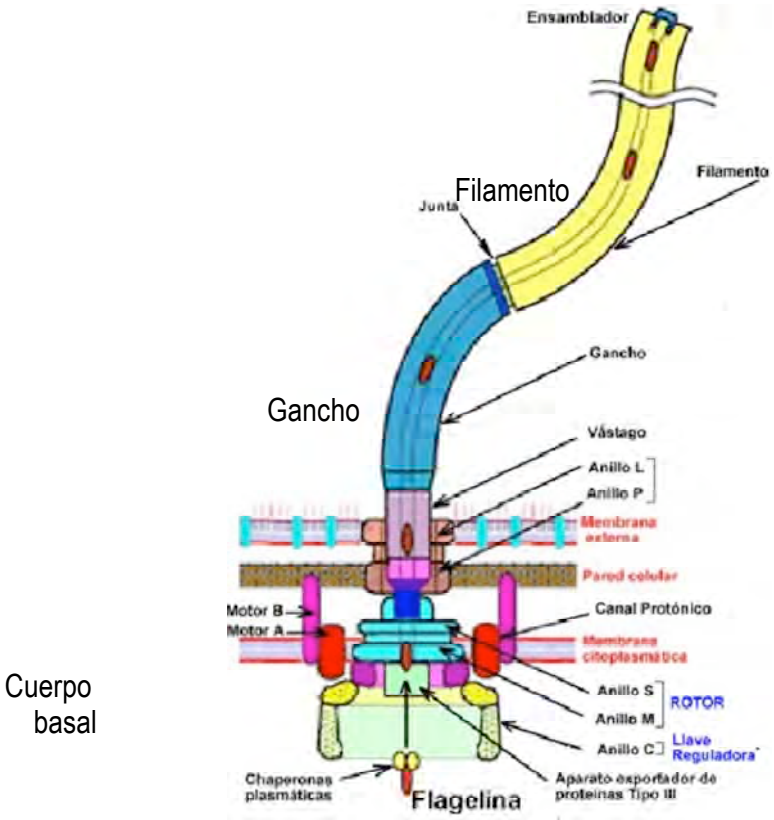


Figura 4. Componentes del flagelo de Bacterias. El flagelo esta constituido de tres principales subestructuras, dos externas a la célula que son el filamento y el gancho, la tercera estructura se denomina el cuerpo basal y esta embebida en la(s) membrana(s).

2.5 Componentes del flagelo en bacterias.

El flagelo de bacterias esta formado por tres subestructuras o componentes (fig. 4), de los cuales el filamento y el gancho son estructuras externas a la célula, mientras que el cuerpo basal está embebido en las membranas celulares. El filamento es una estructura helicoidal que funciona como

propela para impulsar a la bacteria. El gancho, es una estructura corta, curvada (o recta como en el caso de *Rhodobacter sphaeroides*) y flexible, funciona como un adaptador universal [Samatey *et al*., 2004], en un extremo une al filamento y por el otro al eje (fig. 4). El cuerpo basal contiene al motor, esta subestructura está conformada por un tubo cilíndrico o eje, con cuatro anillos (L, P, MS y C; fig. 4) [DeRosier 1998]. Los anillos son: dos externos denominados L (en el plano de los lipopolisacáridos de la membrana externa) y P (en el plano de los peptidoglucanos), estos anillos están ausentes en bacterias Gram-positivas, el anillo interior conocido como MS, se ubica por encima y dentro de la membrana citoplásmica [Jarrel y McBride 2008]. El anillo C (citoplásmico) se prolonga al citoplasma y esta conformado por tres proteínas: FliG, FliM y FliN, las cuales se requieren para la rotación y el control de la dirección de la rotación del flagelo [Jarrell y McBride 2008]. Conectados al cuerpo basal se localizan varias proteínas importantes para la función del motor y para el sentido del giro [Macnab 1996]. La dirección de la rotación del flagelo es controlada por un sistema de transducción de señales que monitorea los cambios ambientales [Jarrel y McBride 2008].

2.6 Proteínas involucradas en el ensamblaje del flagelo en bacterias.

Para el ensamblaje del flagelo en bacterias, participan varias proteínas diferentes (fig. 5). Sin embargo, algunos componentes están constituidos por varias subunidades de una sola proteína, como el filamento, el cual está formado por miles de subunidades de la proteína FliC (flagelina; fig. 5), el filamento funciona como propela para impulsar a la bacteria. La proteína FliD es como una tapa del filamento (fig. 5) y es necesaria para el adecuado ensamblaje de las subunidades de flagelina.

El gancho (codo), está formado por decenas de subunidades de una sola proteína, de FlgE. Entre al gancho y el filamento existen proteínas que funcionan como adaptadores o proteínas asociadas al gancho (HAPs: *h*ook *a*ssiated *p*roteins) estas son FlgK (HAP1) y FlgL (HAP3), FliD también es una HAP (HAP2). El gancho permite que se transmita la fuerza de rotación o torca al filamento en varias direcciones. En el cuerpo basal, el eje, en su parte proximal, está compuesto por FlgB, FlgC, FlgF y FliE, la parte distal se conforma por copias de FlgG; con respecto a los anillos, el MS esta constituido por FliF, este anillo forma parte del rotor del motor flagelar, donde se genera la torca. Los anillos P y L se crean por monómeros de FlgI y FlgH respectivamente, los anillos L y P forman un cilindro generando un espacio, para permitir la rotación del eje sin fricción. Esta estructura funciona como una flecha conductora que se une al rotor y que se encarga de transmitir la torca, generada por el motor hacia el gancho y filamento, por lo que, el anillo MS, el eje, el gancho y el filamento constituyen una sola pieza de rotación, mientras que los anillos L y P forman la parte estacionaria o estator.

El motor flagelar consiste de cinco proteínas: MotA y MotB se localizan en la membrana celular rodeando al anillo MS, funcionan como un estator y conducen el paso de protones para dirigir la rotación flagelar; las proteínas FliG, FliM y FliN, controlan el sentido del giro del motor. MotB está unido físicamente a la capa de peptidoglicanos mediante un dominio de unión al peptidoglicano y de este manera fija a el estator en su lugar, mientras que MotA interactúa directamente con el C-terminal de FliG y forma un anillo de moléculas de FliG. Datos bioquímicos sugieren que el paso de protones a través de los canales de MotA y MotB causa un cambio conformacional en MotA (el poder de la remada o palada), el cual empuja a FliG y gira al rotor [Kojima y Blair 2001]. [Blair 2003]. Los motores flagelares de las bacterias son increíblemente rápidos, con reportes de velocidades superiores a 18,000 y 100,000 rpm para motores impulsados con H^+ y Na^+

respectivamente [Chen y Berg 2000; Magariyama *et al*., 1994].

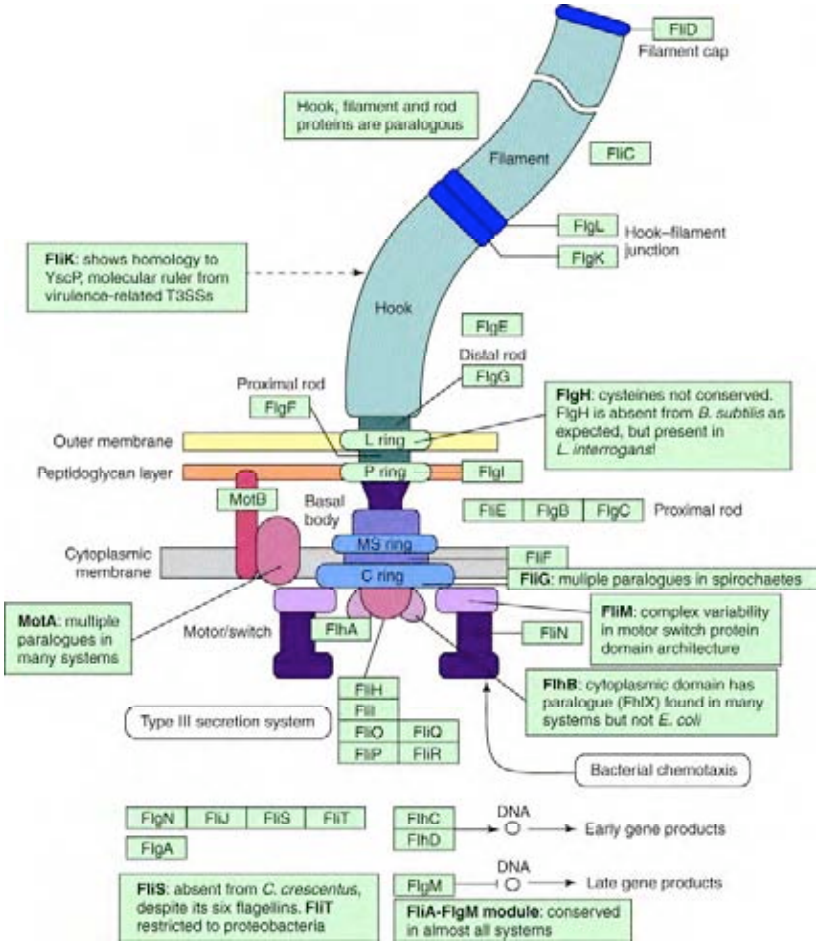


Figura 5. Proteínas involucrados en el ensamble del flagelo de bacterias. Tomado de Pallen *et. al*. 2005.

En el ensamble del flagelo las proteínas de exportación salen por su propio sistema de secreción (del tipo III) y las proteínas que se conoce que participan en este aparato exportador son: FlhA, FlhB, FliF, FliH, FliI, FliJ, FliO, FliP, FliQ, y FliR, de estas, siete son proteínas de membrana (FlhA, FlhB, FliF, FliO, FliP, FliQ, FliR) y estan localizadas dentro de el cuerpo basal del flagelo [Fan *et al*., 1997; Minamino y Macnab 1991]. Las otras tres son proteínas solubles y conforman el complejo de la ATPasa: FliI es la ATPasa que dirige la exportación, FliH es un regulador negativo de la ATPasa [Chevance y Hughes 2008], y FliJ es la chaperona general de secreción flagelar [Minamino y Macnab 1991]. Las proteínas FlgI, y FlgE funcionan como las tapas del eje (cuerpo basal) y gancho respectivamente, mientras que FliK controla longitud del gancho [Muramoto *et al*., 1999].

2.7 Sistemas que se requieren para que una bacteria tenga locomoción mediante el flagelo.

Para que una bacteria se pueda desplazar con la ayuda de un flagelo, además de esta estructura, se requiere de otros sistemas (fig. 6). Por ejemplo la célula necesita de elementos que monitoreen la(s) señal(es) del medio (como gradientes químicos),

posteriormente que esta(s) señal(s) se transmita(n) a través de la célula hasta que llegue a la base del flagelo, para que este rote y dirija la bacteria hacia el estímulo si le favorece o la aleje si le perjudica. En bacterias entéricas, el rotor tiene tres estados: giro en sentido contrario a las manecillas del reloj, en sentido a las manecillas del reloj y breves pausas. El flagelo per se, gira en sentido contrario a las manecillas del reloj, lo que provoca que nade en línea recta, pero de vez en cuando el motor gira a favor de las manecillas del reloj, se producen breves pausas, lo que hace que la célula este dando vueltas y su desplazamiento es casi nulo, este ultimo movimiento se conoce como "tumbling". En la presencia de un estimulo la bacteria nada casi en línea recta y en la ausencia de este su nado es con dirección aleatoria (tumbling).

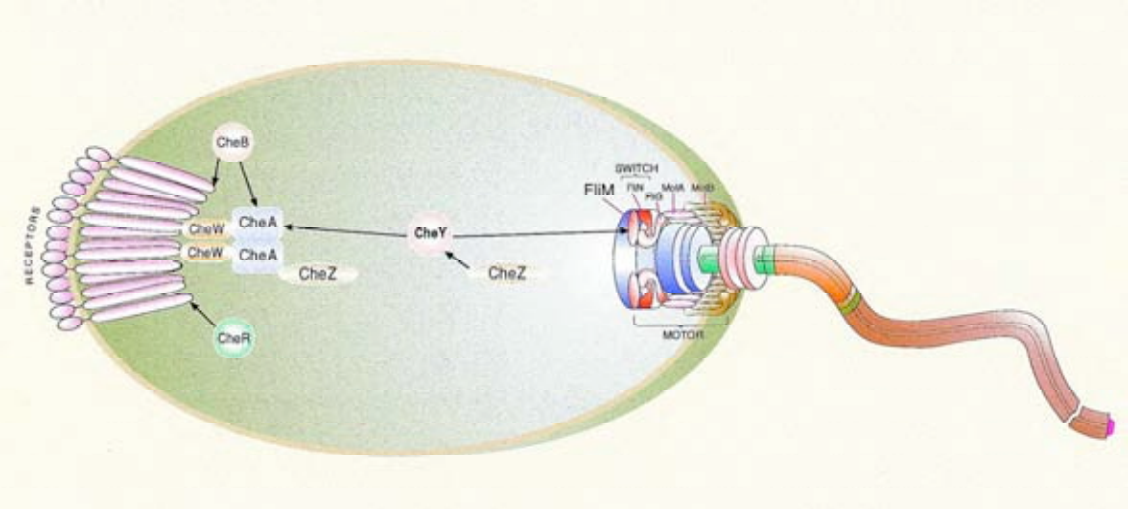


Figura 6. Sistemas que se requieren para la locomoción de una bacteria mediante el Flagelo. El estimulo es detectado por receptores que se encuentran en la membrana, posteriormente ese estimulo se transmite a través de la célula mediante las proteínas Che, estas transmiten el estimulo hasta el interruptor del flagelo que controla el sentido del giro. Tomado de Bren y Eisenbach 2000.

Los estímulos son detectados por receptores transmembranales (fig. 6), conocidos como proteínas quimiotácticas que aceptan grupos metilo (MCPs: *m*ethyl accepting *c*hemotaxis *p*roteins), las cuales varían en las moléculas que detectan. Estos receptores pueden unir atrayentes o repelentes directa o indirectamente. Las señales de estos receptores son transmitidas a través de la membrana plasmática hacia el citoplasma, y en el citoplasma la señal se lleva hasta el control del sentido de giro del flagelo. Las proteínas Che son las encargadas de transmitir esta señal. CheA es una histidina cinasa que cuando se une simultáneamente a un receptor activado y CheW, se autofosforila en un residuo de histidina e inmediatamente transfiere el fosfato a un residuo de aspártico de CheY. La fosforilación de CheY, activa a la proteína que su une al motor flagelar (FliM), causando que gire en el sentido de las manecillas del reloj y hace "tumbling". CheZ inactiva a CheY desfosforilandola. Los estímulos que percibe la célula para dirigir su nado se conocen como taxis y se clasifican en:

Quimiotaxis, cuando reaccionan a estímulos químicos y se dirigen al lugar (o al extremo opuesto) donde se encuentra la sustancia. Las bacterias con esta taxia poseen quimiorreceptores sensibles a la sustancia que la origina.

Aerotaxis, cuando se dirigen al lugar con la concentración de oxigeno adecuada a su metabolismo.
Fototaxis, se presenta en las bacterias autotróficas que dependen de la luz para la obtención de energía.
Magnetotaxis, es la capacidad de muchas bacterias de orientarse en un campo magnético y nadar en la dirección de las líneas de campo, las bacterias con esta propiedad contienen hierro en forma de oxido de hierro ferromagnético o magnetita (mezcla de hierro II y III, Fe_3O_4) y se encuentra en forma de gránulos (magnetosomas), cerca del anclaje de los flagelo.

2.8 REGULACIÓN GENÉTICA DE LA BIOGÉNESIS DEL FLAGELO EN BACTERIAS.

La locomoción mediante el flagelo y la quimiotaxis ofrece a las bacterias una gran ventaja evolutiva, pero esta maquinaria de locomoción demanda una gran cantidad de energía de la célula, por ejemplo en *E. coli* se requiere de aproximadamente 2 % de la energía biosintetica [Macnab 1987], por lo tanto, no es una sorpresa, que la expresión de las proteínas, que participan en la generación y funcionamiento del flagelo en bacterias, sea un proceso altamente regulado tanto a nivel transcripcional como postranscripcional, incluso la regulación también está modulada por la división y/o diferenciación celular [Hughes *et al*., 1993; Karlinsey *et al*., 1998]. Hasta principios de esta década solo se conocía algunos aspectos de la regulación de la expresión de los genes flagelares en *E. coli* y *S. thiphimurium*, pero con el paso de los años de esta decada, se han publicado datos acerca de la regulación de la locomoción en bacterias con flagelos polares y laterales. Sin embargo, el mecanismo del control de la locomoción por factores ambientales y por algunas proteínas de regulación es aún desconocido, pero los datos experimentales recientes sugieren que los genes que codifican para los reguladores maestros ubicados en el primer nivel de la cascada, son el blanco principal de muchos factores ambientales (fig. 7). Este mecanismo puede requerir alteraciones en la topología del DNA en sus regiones de regulación. Finalmente, muestran algunas diferencias entre los flagelados polares y laterales, pero las cascadas de regulación funcionan de manera muy similar, incluyendo la organización jerárquica.
En bacterias entéricas como *E. coli* y *S. thiphimurium*, la jerarquía de genes flagelares tiene tres niveles (fig. 7 y 8) y todos los genes son expresados por factores sigma pertenecientes a la familia de σ^{70} [Aldridge y Hughes, 2002]. En bacterias no entéricas se ha observado que por lo general participan sigmas de la familia σ^{70} y σ^{54}, para expresar los genes flagelares. El primer gen que se expresa en estas bacterias es el gen maestro y casi siempre lo transcribe σ^{70}, el producto del gen maestro en la mayoría de las ocasiones es un activador transcripcional que actúa junto con σ^{54} para continuar con la expresión de los genes flagelares (fig. 7 y 9), como es el caso de *P. aeruginosa* [Dasgupta *et al*., 2003], *C. crescentus* [Brun y Shapiro 1992] *V. cholerae* [Klose y Mekalanos 1998], *Rhodobacter sphaeroides* [Poggio *et al*., 2005], *Helicobacter pylory* [Spohn y Scarlato 1999]. Pero los últimos genes en ser expresados, incluyendo el gen de la flagelina, los del motor, los de quimiotaxis y los receptores, son transcritos de promotores dependientes de σ^{28} [Ritchings *et al*., 1995; Milcamps *et al*., 1996; Spohn y Scarlato, 1999; Dasgupta *et al*., 2003; Millikan y Ruby, 2003; MaKarter, 2004; Poggio *et al*., 2005].

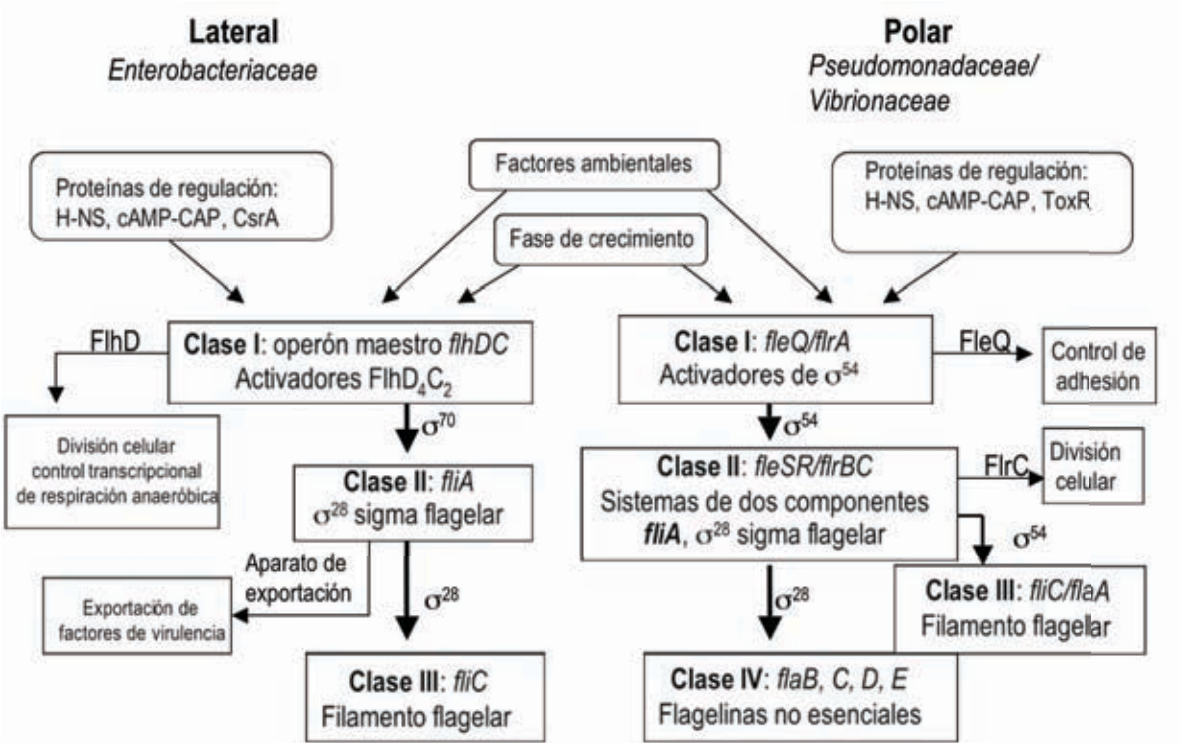


Figura 7. Elementos que regulan a los genes flagelares en bacterias con flagelos polares y peritricos (laterales). Tomado de Soutourina y Bertin 2003.

2.8.1 Regulación genética de genes flagelares en enterobacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. En bacterias Gram-negativas, la jerarquía de la regulación de los genes flagelares se caracterizo primero en microorganismos con flagelos peritricos (laterales), tales como *E. coli* y *S typhimurium* [Komeda 1982; Komeda 1986; Kutsukake *et al*., 1990]. Estas bacterias tienen cerca de 50 genes para la biogénesis y funcionamiento de sus flagelos, están organizados en 15 y 17 operones respectivamente [Komeda *et al*., 1980; Kutsukake *et al*., 1988; Macnab, 1996], los cuales se expresan y regulan en un orden jerárquico de tres niveles (fig. 8) [Macnab, 1996].

El primer nivel solo incluye el operón bicistronico *flhDC*, el cual codifica a las proteínas FlhD y FlhC, que funcionan como activadores transcripcionales de los operones de segundo nivel (fig. 8), para este fin, se tenia la propuesta que FlhC y FlhD conformaban heterotetrameros ($FlhD_2C_2$) [Liu y Matsumura 1994; Yanagihara, 1999], pero Wang y colaboradores 2006, al determinar la estructura cristalográfica del complejo FlhDC (3.0 A°) en *E. coli*, observaron que forman heterohexameros, constituido de cuatro subunidades de FlhD y dos de FlhC ($FlhD_4C_2$). $FlhD_4C_2$ actúa en conjunto con σ^{70} para activar la expresión de los genes de la clase II. Por análisis de "footprinting" no se identifico una secuencia consenso para la unión de $FlhD_4C_2$ en los promotores flagelares de *E. coli* [Liu y Matsumara 1994], pero un estudio sobre la unión de $FlhD_4C_2$ a los promotores flagelares de la clase II de *P. mirabilis* combinados con análisis de varias secuencias de las regiones de los promotores de la clase II de *E. coli* y *S. typhimurium* [Claret y Hughes 2002] identificaron un palindrome imperfecto constituido de dos invertidas repetidas de 17-18 pb (TNAA(C/T)G(C/G) $N_{2/3}$ AAATA (A/G)CG) separadas por un espacio de 10-11pb. El segundo nivel incluye la mayor

parte de los genes que codifican para las proteínas estructurales del cuerpo basal, del sistema de secreción tipo III y del gen *fliA* que codifica para el factor sigma flagelar (σ^{28} o FliA). FliA participa en la expresión de operones del tercer nivel (fig. 8) [Ohnishi *et al*., 1990]. En el tercer nivel se encuentran los genes que codifican para los componentes finales y las proteínas que se requieren para que sea funcional el flagelo, los genes son *fliC*, el cual codifica para la flagelina, componente del filamento, los operones que codifican para las proteínas de quimiotaxis (*che*), las proteínas del motor (*mot*), y los receptores transmembranales (*tar*) [Aldridge *et al*., 2002]. Los operones de la clase III son regulados positivamente por σ^{28} y negativamente por FlgM. FlgM es un factor anti--σ^{28} [Kutsukake *et al*., 1994; Ohnishi *et al*., 1992]. El factor anti-σ^{28} es retenido dentro de la célula hasta que el cuerpo basal y el gancho flagelar se terminan de ensamblar [Chadsey *et al*., 1998; Hughes *et al*., 1993; Karlinsey *et al*., 1998]. Al mismo tiempo que la proteína FlgM es exportada se activa σ^{28} y se inicia la transcripción de los genes de la clase III. En estos organismos, se ha visto que para activarse la transcripción de los genes del nivel 3, dependen de la expresión de los genes del primer y segundo nivel, si alguno de los genes de los dos primeros niveles, expresa proteínas no funcionales, la transcripción de los genes del nivel tres no se realiza.

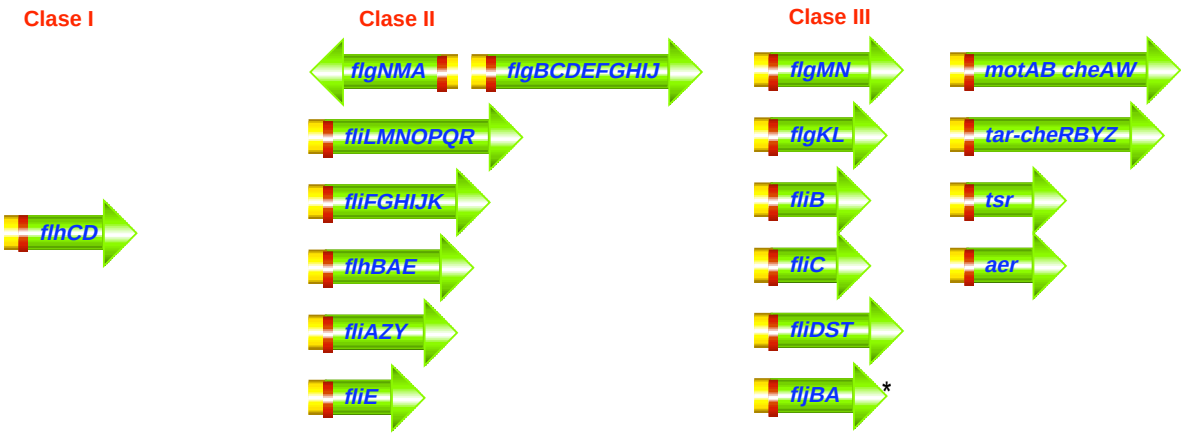


Figura 8. Genes involucrados en la biogénesis y funcionamiento del flagelo en *E. coli* y *S. typhimurium*. Existen aproximadamente 50 genes flagelares formando 15 y 17 operones en cada uno, se clasifican en tres niveles de acuerdo al orden de su expresión. El primer nivel lo conforman los genes maestros *flhDC*. El segundo nivel esta constituido por genes del cuerpo basal, los genes de regulación *fliA* y *flgM*, entre otros, *fliA* codifica para el sigma flagelar (σ^{28}), FlgM es su antisigma. El tercer nivel lo forman los genes que se requieren al final de la generación del flagelo, como *fliC* (flagelina), *motAB* (proteínas motoras) y los genes de los sistemas de transducción de señales (*che*) [Macnab, 1996; Aldridge y Hughes, 2002].
*Genes solo de *S. typhimurium*.

2.8.2 Regulación del operón *flhDC*.

La expresión del operón *flhDC*, es controlado por numerosas señales ambientales, como pueden ser, temperatura, osmolaridad y pH [Li *et al*., 1993; Shi *et al*., 1993; Soutourina *et al*., 2002] y por proteínas de regulación global como H-NS y el complejo CAP-AMPc (catabolite gene activator protein) [Bertin *et al*., 1994; Soutourina *et al*.,1999]. El factor σ^{70} también modula la expresión de este operón y lo hace de manera positiva (fig. 8 y 9). Sin embargo, la estabilidad de su RNAm es controlado por CsrA, un regulador de unión a RNA (fig. 9) [Romeo 1998; Wei *et al*., 2001]. Por su parte la actividad de FlhDC puede ser

inhibida por una proteína flagelar como FliT [Yamamoto y Kutsukake 2006].

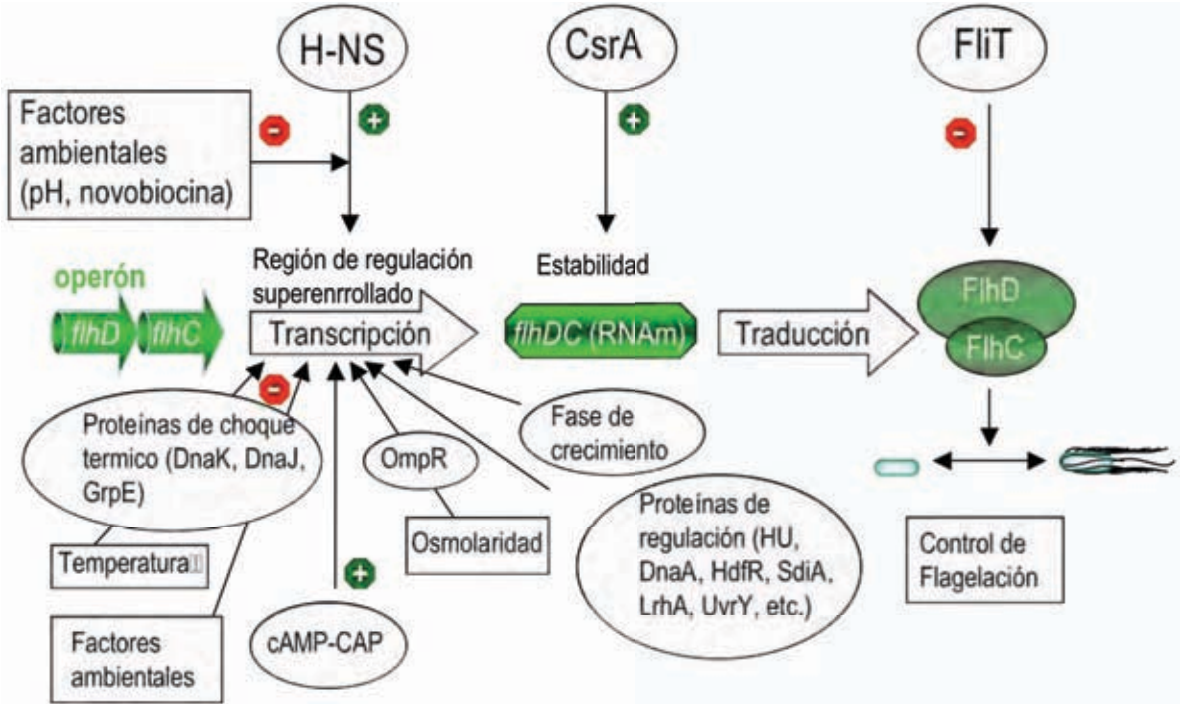


Figura 9. Elementos que regulan la expresión de los genes maestros del sistema flagelar en enterobacterias. Tomado de Soutourina y Bertin 2003.

2.8.3 Regulación genética de los genes flagelares en *Pseudomonas aeruginosa*.

P. aeruginosa presenta un solo flagelo (polar), existen 53 genes divididos en 18 operones para la generación y funcionamiento de esta estructura, estos genes se encuentran agrupados en tres regiones de su genoma, y se transcriben en un circuito de regulación de cuatro grupos (fig. 10) [Dasgupta *et al.,* 2003], la transcripción de estos genes es modulada por varias proteínas de regulación como FleR, FleS, FleQ, FleN, Vfr, AmrZ (AlgZ), FliA (σ^{28}), σ^{54} y AlgU (σ^{E}).

En la cascada ortequestada de regulación de genes flagelares en *P. aeruginosa*, el gen *fleQ* representa la clase 1 (fig. 10). El gen *fleQ* codifica para la proteína FleQ, que es un activador transcripcional, perteneciente a la familia NtrC/NifA. FleQ actúa junto con el factor σ^{54} para transcribir a los genes flagelares de clase 2 (fig. 11 y 12a) [Arora *et al*., 1997, Dasgupta *et al*., 2003, Jito *et al*., 2002]. En la clase 2 hay genes que codifican para las proteínas del cuerpo basal, así como los genes de regulación *fleSR* (fig. 10). Por "footprinting" se ha demostrado que FleQ se une a regiones promotoras de los operones que encabezan los genes flagelares *flhA*, *fliE*, *fleS* y *fliL* (pertenecen a la clase 2), pero no hay secuencias conservadas claras para la unión de FleQ en estos promotores [Jyot *et al*., 2002], y la activación de la transcripción de estos genes la realiza de dos formas: 1) en los genes *fleSR*, lo hace de manera típica como actúan los activadores de σ^{54}, es decir a distancia y con un doblamiento en el DNA, para el doblamiento del DNA se postula la participación del factor de integración del hospedero (IHF; *i*ntegration *h*ost *f*actor), la propuesta se hace por la presencia de secuencias consenso para la unión de esta factor en la región de regulación de los genes *fleRS* (fig. 11a). 2) La activación de los genes *flhA*, *fliE* y *fliL* la realiza de una forma poco

ortodoxa, porque el sitio de unión de FleQ está cerca y hacia abajo del promotor dependiente de σ^{54}, por lo que no requiere del doblamiento del DNA (fig. 11b), por lo tanto, la activación de genes flagelares en *P. aeruginosa*, por parte de FleQ, parece ser de dos formas [Jyot *et al*., 2002].

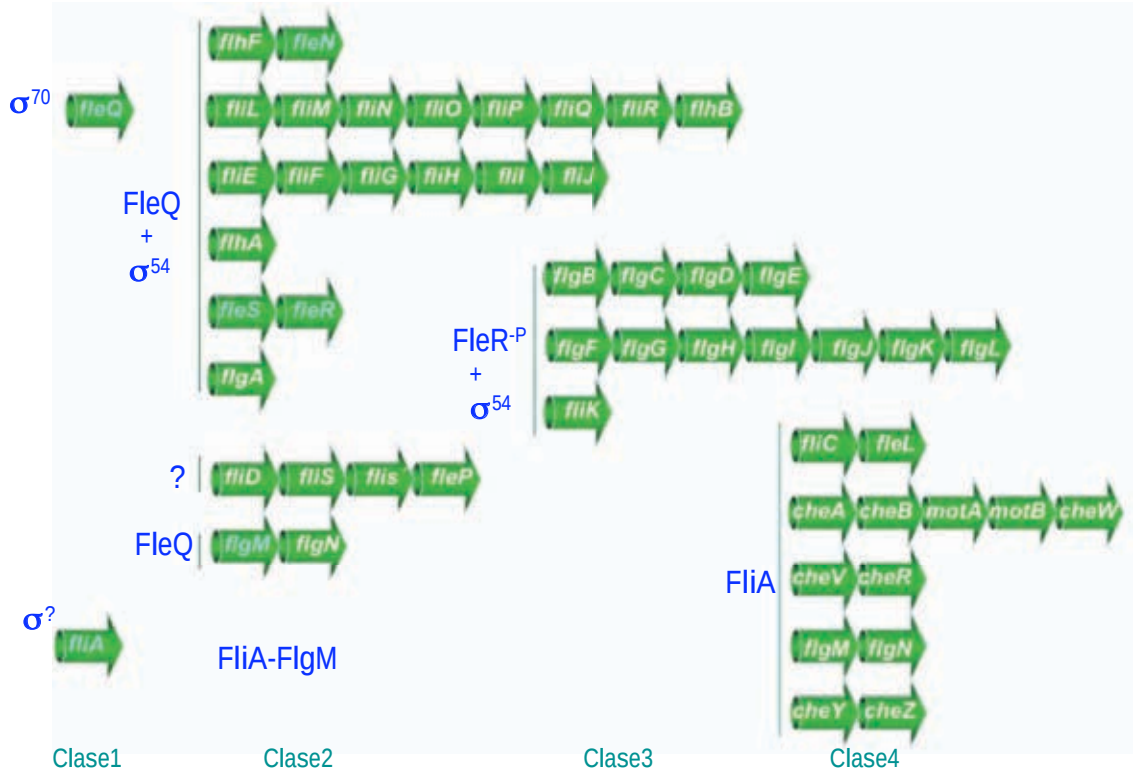


Figura 10. Genes involucrados en la biogénesis y funcionamiento del flagelo en *P. aeruginosa*. Existen 53 genes divididos en 18 operones formando cuatro clases. Clase 1 conformado por el gen maestro *fleQ* y *fliA*. Clase 2 constituido por varios genes entre los que se encuentra *fleN* (anti-FleQ), flgM (anti-FliA), genes del cuerpo basal, y *fleRS* (sistema de dos componentes), donde FleR y σ^{54} se requieren para transcribir genes de la clase3. Clase 4 esta constituida por genes que su transcripción dependen de σ^{28} [Dasgupta, *et. al*., 2003].

Los genes de la clase 3 codifican para proteínas del resto del cuerpo basal y del sistema de secreción, para la transcripción de estos genes, intervienen los productos de los genes *fleRS* que se transcribieron en la clase 2 (fig. 10).

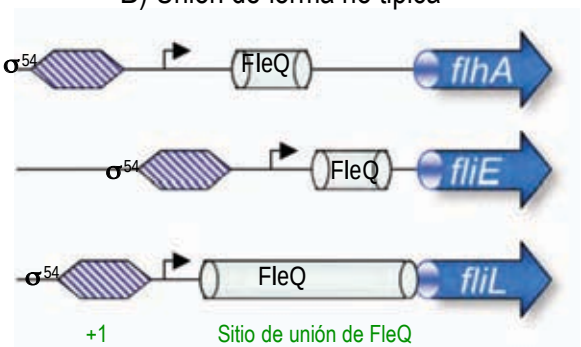
Las proteínas FleR y FleS, pertenecen al sistema de regulación de dos componentes donde FleS es la cinasa y FleR el regulador de respuesta [Ritchings *et al*., 1995], FleR actúa junto con σ^{54} para activar la transcripción de los genes de la clase 3 (fig. 10). Para el caso del gen *fliA* se sabe que se transcribe en la clase 1 (fig. 10), pero no se conoce nada sobre su regulación transcripcional. Aunque *fliA* se transcribe en la clase 1, su producto (σ^{28} o FliA) se encuentra inactivado por su antisigma FlgM, cuando se requiere de la actividad de σ^{28}, el anti-sigma FlgM se separa de σ^{28} y es expulsado por el aparato de secreción flagelar, de esta forma σ^{28} es funcional.

Finalmente la expresión de los genes de la clase 4 dependen del factor σ^{28}, en este grupo están los genes cuyos productos se requieren para terminar de generar el flagelo, como la flagelina (*fliC*) y de las proteínas que permiten el funcionamiento de esta estructura, como son los genes *mot*, che y *tsr* (fig. 10).

A) Unión de forma típica

Gen	Sitio de union de FleQ	-24	σ54	-12	+1
fleSR	ACAGCCTACTAACTGTC $(N)_{40}$	AGGCACGGGTATTGC	$(N)_{12}$	G	$(N)_{41}$ ATG

B) Unión de forma no típica



Gen	-24	σ54	-12	+1	Sitio de unión de FleQ
flhA	TGGAACGGTTCCTGC $(N)_{13}$	A	$(N)_{8}$	CCGGCGTCAAAAGTTTGTT	$(N)_{45}$ GTG
flhE	TGGCACCCTTGTTGC $(N)_{13}$	A	$(N)_{18}$	AAAAGCCGCGGCTGTT	$(N)_{12}$ ATG
fliL	TGGCACAACCCTTGC $(N)_{6}$	C	$(N)_{5}$	AAACCCTTCATTTGACGCTATAGCGACGGATTTTTGGCATGG	

Figura 11. La unión de FleQ en los promotores de genes flagelares de *P. aeruginosa* se da de dos formas, una de manera típica, como en el operón *fleRS*, donde se une a distancia y por arriba del promotor σ54, el doblamiento del DNA para la interacción entre FleQ y σ54 se propone que lo hace IHF (A). En los operones encabezados por *flhA*, *flhE* y *fliL*, FleQ se une cerca y por abajo del promotor σ54, la unión de FleQ en estos genes, es de una manera atípica para un activador transcripcional de σ54 (B) [Arora *et. al*., 1997; Jyot *et. al*., 2002].

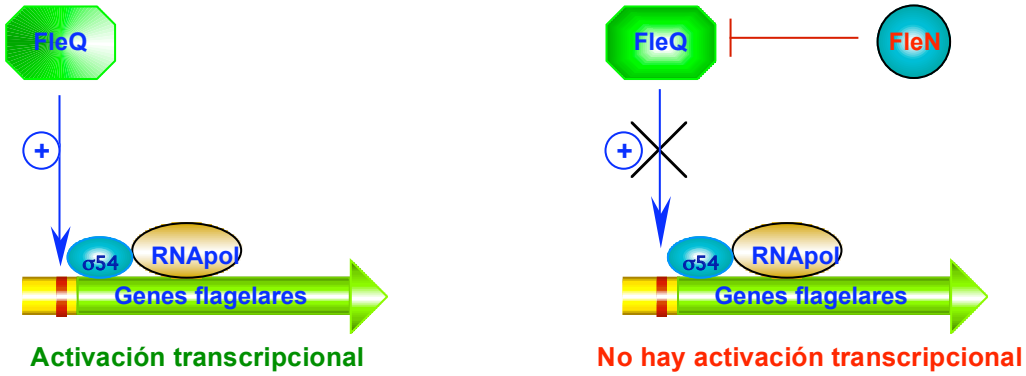
2.8.4 Regulación del gen maestro del sistema flagelar de *P. aeruginosa*.

La expresión del gen *fleQ* de *P. aeruginosa*, puede ser regulada a nivel transcripcional y postraduccional. A nivel postraduccional la actividad del regulador maestro FleQ es modulada por la proteína FleN, la cual actúa como un anti-activador a través de la interacción directa proteína-proteína (fig. 12a) [Dasgupta y Ramphal 2001]. Mutaciones en *fleN* ocasiona que la célula tenga un mayor numero de flagelos, pero el mayor numero de flagelos afecta de distinta manera al nado en las diferentes cepas de *Pseudomonas*, por ejemplo en las cepas PAK y PAO1, al mutar *fleN* se abate el nado, como si la célula no coordinara los flagelos y no hay un desplazamiento neto [Dasgupta *et al*., 2000], mientras que en la cepa W51D la velocidad de nado es mayor que la silvestre [Campos-García *et al*., 2000].

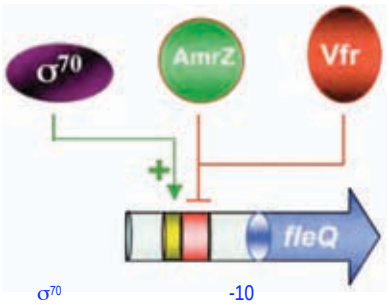
En la regulación transcripcional del gen *fleQ* intervienen el factor σ70, Vfr y AmrZ (fig. 12b). El factor σ70 activa la transcripción del gen *fleQ* de *P. aeruginosa* [Dasgupta *et al*., 2002], mientras que las proteínas Vfr y AmrZ reprimen su transcripción. La proteína Vfr ("*v*irulence *f*actor *r*egulador") de *P. aeruginosa*, es homóloga a CRP de *E. coli*. Vfr actúa como un activador transcripcional en genes como *lasR* [Albus *et al*., 1997], *regA* y *toxA* [Wes *et al*., 1994], la proteína LasR esta involucrada en el sistema de regulación conocido como "quórum sensing", mientras que RegA es un regulador positivo para la transcripción del gen *toxA*, que codifica para la exotoxina A (una ADP-ribosil transferasa), considerada como un factor de virulencia de *P. aeruginosa*. Sin embargo, Vfr regula al gen *fleQ* de manera negativa, uniéndose en la secuencia AATTGACTAATC GTTCACATTTG [Dasgupta *et al*., 2002], esta secuencia se

traslapa con la región -10 del promotor dependiente de σ^{70} (fig. 12b). AmrZ es otro regulador que reprime la transcripción del gen *fleQ* (fig. 12b) [Tart *et al*., 2005; Tart *et al*., 2006].

A)



B)



-35 σ^{70} -10

GGAAACAGCA AAAAAAACAC GCCATAAAAT TGACTAATCG TTCACATTTG ACTT $(N)_{99}$ ATG

Sitio de unión a Vfr

Figura 12. Regulación de la transcripción y actividad de FleQ de *P. aeruginosa*. A) FleQ junto con σ^{54} expresan los genes flagelares pero, FleQ es inactivado cuando interactúa con FleN [Arora *et al*., 1997; Dasgupta y Ramphal 2001]. B) En la transcripción de *fleQ*, el factor σ^{70} lo regula de manera positiva, mientras que AmrZ y Vfr la reprimen [Ramsey *et al*., 2005; Tart *et al*,. 2005; Baynham *et al*., 2006; Tart *et al*,. 2006]

AmrZ es una proteína de unión a DNA de la familia listón-hélice-hélice ("ribbon-helix-helix"), es homóloga a los represores Mnt del bacteriófago P22 y a Arc de *S. typhimurium* [Raumann *et al*., 1994]. AmrZ de *P. aeruginosa* originalmente fue identificada como AlgZ, esta proteína se une a 280 pb por arriba del promotor de *algD* [Baynham y Wozniak 1996], el gen *algD* encabeza el operón de los genes involucrados en la síntesis de alginato [Wozniak y Ohman 1994], AlgZ (AmrZ) es un activador transcripcional esencial de los genes estructurales del alginato [Baynham *et al*., 1999]. Posteriormente se observó que AlgZ (AmrZ), también regula de manera positiva la expresión del gen *pilA* [Baynham *et al*., 2006], *pilA* codifica para la proteína que conforma el pilitipo IV, estructura involucrada en el "Twitching motility", al observar que AlgZ modula los genes involucrados en la síntesis de alginato y en la locomoción, la renombraron como AmrZ ("alginate and motility regulador Z") [Baynham *et al*., 2006]. La proteína AmrZ además de regular los genes antes mencionados, autorregula su propia expresión pero, de manera negativa (fig. 13). Se han identificado las secuencias de unión de AmrZ en su propio promotor [Ramsey *et al*., 2005], y en el promotor de *algD* [Baynham y Wozniak 1996], con ello se ha deducido la secuencia de unión para a

AmrZ, siendo aG GCCATTACCAGCC, esta secuencia no se encuentra en el promotor de *fleQ*, pero por geles de retardamiento se ha observado que AmrZ se une en la zona de regulación de *fleQ* [Tart *et al*., 2006]. Aunque falta por conocer la secuencia de unión de AmrZ en el promotor de *fleQ*, AmrZ evita la expresión de los genes del sistema flagelar de *P. aeruginosa*, al reprimir la expresión de *fleQ*.

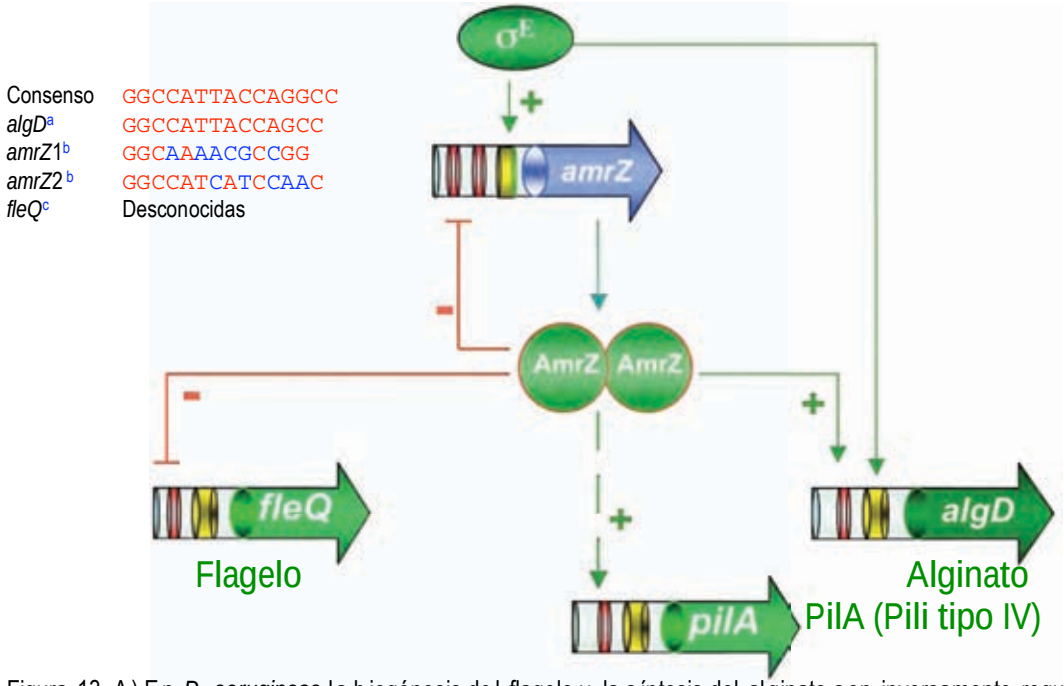


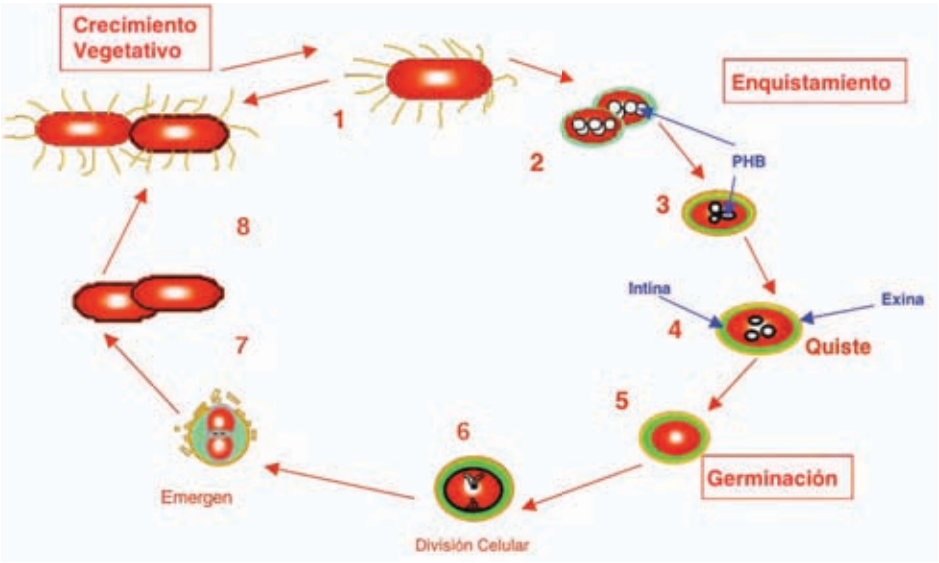
Figura 13. A) En *P. aeruginosa* la biogénesis del flagelo y la síntesis del alginato son inversamente regulados por el factor σ^E y AmrZ. Los genes estructurales del alginato (encabezados por *algD*) son regulados positivamente por σ^E y AmrZ, pero AmrZ tiene un papel dual y puede reprimir su propia transcripción y la de *fleQ* el regulador muestro flagelar. σ^E también activa la transcripción del gen *amrZ* y AmrZ modula de manera positiva la expresión de *pilA* [[a]Baynham y Wozniak 1996; Baynham *et al*., 2006; [b]Ramsey *et al*., 2005; [c]Tart *et al*., 2006].

En *P. aeruginosa* el factor σ^E (AlgU; σ^{22}; AlgT), activa la transcripción de los genes estructurales del alginato, lo hace a partir del promotor *algD*, y al igual que AmrZ es un elemento esencial para activar la transcripción de estos genes. El factor σ^E también está involucrado en la modulación de la expresión del gen *fleQ* [Tart *et al*., 2005], pero esto lo hace de manera indirecta a través de AmrZ (fig. 13). La transcripción del gen de *amrZ* se realiza a partir de un promotor que depende del factor σ^E [Wozniak *et al*., 2003], después la proteína AmrZ se une en el promotor de *algD* y *fleQ*, al primero lo regula de manera positiva y al segundo de manera negativa, de esta forma el factor σ^E regula inversamente la síntesis de alginato y la generación de flagelo en *P. aeruginosa*.

2.9 GENERALIDADES DE *A. vinelandii*.

A. vinelandii es una bacteria Gram-negativa, pertenece al grupo de γ-proteobacterias, vive de manera libre en el suelo, fija nitrógeno en condiciones aerobias [Kennedy y Toukdurian, 1987], y forma quistes resistentes a la desecación. Es un organismo poliploide, en medio rico durante la fase estacionaria llega a tener 80 o más copias de su genoma [Nagpal, *et al*., 1989; Manna y Das, 1993; Maldonado, *et al*., 1994], el cual es de 5,034,073 pb. Produce polímeros como el alginato, el poli-β-hidroxibutirato (PHB) y

lípidos fenólicos conocidos como alquilresorcinoles (ARS). Estos polímeros son de interés económico, el alginato es utilizado como agente gelificante y viscosificante en diferentes industrias como la de alimentos, el PHB puede utilizarse para elaborar plásticos biodegradables [Lin y Sadoff 1968]. Los alquilresorcinoles (ARS) tienen propiedades de antimicrobianos y antiparasiticos [Kozubek y Tyman 1999]. El PHB lo producen varias especies de bacterias, mientras que el alginato solo lo producen bacterias que pertenecen a los géneros de *Azotobacter* y *Pseudomonas*.



Ciclo de vida de *A. vinelandii*. 1 Fase de crecimiento vegetativo, presenta flagelos peritricos. 2 Inicio del enquistamiento, pierde sus flagelos, sufre una división, engruesa sus paredes y acumula PHB. 3 Formación de la exina e intina. 4 Quiste maduro. 5 Proceso de germinación. 6 Division celular. 7 Emergen dos células por quiste. 8 Primera división celular después de la germinación, produce flagelos. Sadof 1975.

2.9.1 Ciclo de vida de *A. vinelandii*.

El ciclo de vida de este organismo presenta una fase vegetativa y una fase latente en forma de quiste. En la fase vegetativa las células son ovoides de 2 x 5 μm, presentan locomoción por medio de flagelos peritricos, cuando se dividen tienen forma de "cacahuate" [Wilson y Knight, 1952]. En la fase de quiste las células son esféricas y su volumen se reduce casi a la mitad de la célula vegetativa (1.5 x 2.0 μm). La formación del quiste dura aproximadamente cinco días [Winogradsky, 1938; Wyss *et al*., 1961; Tchan, 1962], para entrar a esta fase las células dejan de fijar nitrógeno, pierden la locomoción y tienen una división, adquiriendo una forma esférica [Sadoff, 1975], hay una acumulación de poli-β-hidroxibutirato (PHB), se forma una capsula de dos capas alrededor de la célula, llamadas intina (capa interna) y exina (capa externa), ambas cubiertas están compuestas principalmente de alginato, lípidos y proteínas [Winogradski, 1938]. En el enquistamiento los fosfolípidos de las membranas son reemplazados por lípidos fenólicos (ARS) y alquilpironas (otro tipo de lípidos), incluso los ARS son un componente mayoritario de la exina, pero en la intina están prácticamente ausentes [Reusch y Sadoff, 1979; Reusch y Sadoff, 1981; Reusch y Sadoff, 1983]. Con este proceso de diferenciación celular (quiste), las células pueden permanecer en el suelo en estado de latencia por largos periodos, hasta que se vuelvan a dar las condiciones favorables para su propagación [Lin y Sadoff, 1968]. En la

germinación de los quistes, pierden gradualmente la cápsula por el hinchamiento del cuerpo central, ocupando el volumen de la intina [Loperfido y Sadoff, 1973], después sufren una división, las células crecen dentro de la exina hasta que fracturan la capa externa de la cápsula, al final emergen dos células sin locomoción por cada quiste, en la primera división después de la germinación recobran su locomoción (generan flagelos) [Sadoff, 1975].

2.10 REGULACIÓN GENÉTICA DE LA BIOSÍNTESIS DEL ALGINATO EN *A. vinelandii*.

Por su importancia económica y por su participación en la formación del quiste de *A. vinelandii*, en nuestro grupo nos interesamos por el estudio de la regulación genética de la biosíntesis del alginato en esta bacteria. En estudios previos se identificaron genes cuyos productos están involucrados en la regulación o síntesis del alginato, como es el caso del operón *algUmucABCD* (fig. 14), el producto de estos genes participan en la regulación de los genes estructurales del alginato, el gen *algU* codifica para un factor sigma, denominado σ^E (AlgU) [Martínez-Salazar, *et al.,* 1996], mientras que los productos de los genes *mucABCD* modulan de manera negativa la actividad del factor σ^E, siendo MucA un anti-sigma [Martínez-Salazar, *et al.,* 1996, Núñez *et al*., 2000].

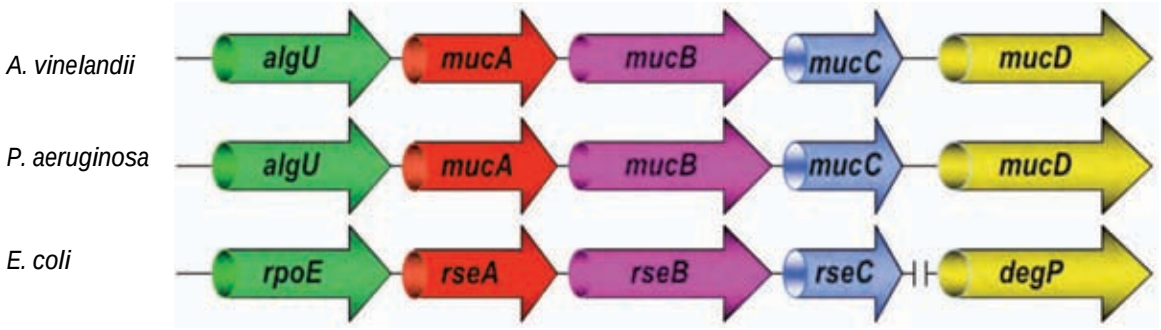


Figura 14. El operón *algUmucABCD* de *A vinelandii* y sus homólogos en *E. coli* y *P. aeruginosa*.

El factor σ^E se requiere para el inicio de la transcripción de los genes *algC* [Gaona *et al*., 2004] y *algD* [Campos *et al.,* 1996]. Aunque en *algD*, su promotor, no presenta secuencias consenso para el factor σ^E, se propone que lo regula de manera indirecta (fig. 15). Los genes *algC* y *algD* codifican para enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de alginato, por lo tanto mutaciones en el gen *mucA* de *A. vinelandii* aumentan la producción de alginato [Núñez *et al*., 2000]. El factor σ^E es esencial para la formación de quistes en *A. vinelandii*, independientemente de su papel en la regulación de la síntesis del alginato [Moreno *et al*., 1998]. Existen otras bacterias como *E. coli* y *P. aeruginosa* que también presentan los genes homólogos a *algUmucABCD* (fig. 14). En *P. aeruginosa* también forman un operón y tienen los mismos nombres. En *E. coli* contiene cuatro de los cinco genes en forma de operón (*rpoE*, *rseABC*), y *htrA* el homólogo a *mucD* se encuentra separado de este operón(fig. 14). En *E. coli*, el gen que codifica para el factor σ^E es *rpoE*, mientras que *rseA*, *rseB* y *rseC* son los homólogos a *mucA*, *mucB* y *mucC*. Por métodos experimentales y bioinformáticos también se ha visto que ortólogos del factor σ^E se encuentran ampliamente distribuidos en muchas bacterias, particularmente en el grupo de las γ-protobacterias [Rowley *et al*., 2006]. El factor σ^E y sus homólogos son considerados como miembros de una subfamilia de factores sigma alternativos que

generalmente regulan las funciones del estrés extracitoplásmico (ECF; "*e*xtra*c*itoplasmic *f*untion"), a través de controlar la expresión de genes cuyos productos actúan fuera del citoplasma [Lonetto *et al*., 1994; Missiakas y Reina 1998; Helmann 2002]. Estos sigmas están relacionados con la familia de σ^{70} que presentan las siguientes características: 1) de las cuatro regiones conservadas que tienen los miembros de la familia σ^{70}, la región 3 y gran parte de la región 1 generalmente están ausentes, a esto se debe su tamaño pequeño (entre 20-30 KDa). 2) Los promotores activados por los sigmas de este subgrupo son muy similares (tabla I), especialmente en la región -35 con el motivo GAACTT conservado [Lonetto *et al*., 1994]. 3) su actividad se regula generalmente por factores antisigma específicos, codificados por genes ubicados hacia abajo del gen que codifica para el factor sigma [Missiakas y Raina 1998], como es el caso de las tres especies que aquí se mencionan (fig. 14).

Tabla I. Promotores dependientes del factor σ^E en bacterias Gram-negativas

	-35		-10	+1	
Consenso	**GAACTT**	16/17pb	**TCTGA**		Referencia
A. vinelandii					
algU P1	**GAACTT** TTGCTTAATACCCATG		**TCAAT** GAAAAC	**A**	Núñez *et al*., 2000.
algC	**GAACTC** CGCGCCGTCCCGGCCA		**TCCAA** TCTGGCG	**G**	Gaona *et al*., 2004.
P. aeruginosa					
algU P1	**GAACTT** TTGCAAGAAGCCCCGAG		**TCTAT** CTTGGC	**A**	Schurr *et al*., 1995.
algU P3	**GAACTT** TCTTAGACGCATCGGT		**TCCAA** AGCAGG	**A**	Schurr *et al*., 1995.
rpoH	**GAACTT** ATACACCCGCTTGCAG		**TCAGA** TATCCG	**A**	5
algD	**GAACTT** CCCTCCGCAGAGAAAAC		**TCCTA** TCACC	**G**	4
algR	**GCACTT** TTCGGGCCTAAAGCGAG		**TCTCA** GCGTC	**G**	5
amrZ	**GAACGG** CTAGCGGAAATCGTGG		**TCATA** GGCCC	**G**	Wozniat, *et al*., 2003.
E. coli					
rpoE	**GAACTT** TACAAAAACGAGACAC		**TCTAA** CCCTTT	**G**	Ericsson *et al*., 1987.
htrA	**GAACTT** CAGGCTATAAAACGAA		**TCTGA** AGAAC	**A**	Ericsson y Gross 1989.
rpoH	**GAACTT** GTGGATAAAATCACGG		**TCTGA** TAAAAC	**A**	Ericsson y Gross 1989.

Para el caso de *E. coli*, σ^E es un sigma esencial para el crecimiento en laboratorio [De las Peñas *et al*., 1997], mientras que para *A. vinelandii* y *P. aeruginosa*, como ya se ha mencionado se requiere para transcribir los genes estructurales del alginato. Por otra parte, σ^E en *E. coli* y *P. aeruginosa*, también esta involucrado en la expresión de sistemas para dar respuesta a diferentes tipos de estrés, como el de salinidad, temperatura y oxidativo [Missiakas y Raina 1998; Martin *et al*., 1994]. En *A. vinelandii* σ^E también esta involucrado en la respuesta al estrés oxidativo [Martínez-Salazar *et al*., 1996]. En *E. coli* y *P. aeruginosa*, se ha demostrado que RseB (MucB) es una proteína periplásmica, mientras que RseA (MucA) es una proteína de membrana interna con un dominio en el periplásma que interactúa con RseB (MucB) y otro dominio en el citoplasma que se une al factor σ^E y funciona como un factor antisigma [De las Peñas, *et al*., 1997, Missiakas, *et al.,* 1997; Xie, *et al.,* 1996]. En estas bacterias cuando no se requiere de la actividad del factor σ^E, éste se encuentra unido al antisigma RseA (MucA), formando un complejo proteico con RseB (MucB), pero cuando se requiere de la actividad del factor

σ^E, este es liberado de RseA (MucA) por una cascada de proteasas, conocida como regulación de proteolisis intramenbrana (Rip; "*r*egulated *i*ntramembrane *p*roteolysis") [Ades 2004]. Este mecanismo de regulación, es ampliamente distribuido en procariontes y eucariontes, se usa para cruzar señales a través de una membrana, en donde una proteasa recibe una señal de un lado de la membrana y con cortes secuenciales en proteínas integrales de membrana, se liberan efectores solubles al lado opuesto de la membrana [Brown *et al*., 2000]. En el caso de mamíferos, la regulación de proteolisis intramembrana, se emplea para apagar señales del citoplasma, a algunos reguladores transcripcionales en el núcleo, para modular la expresión de genes.

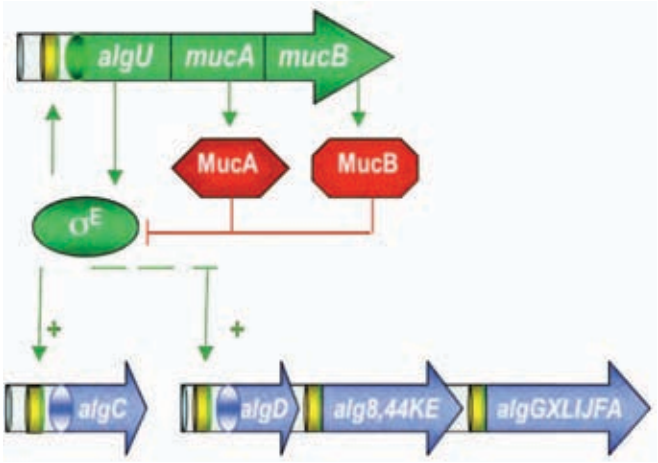


Figura 15. Regulación de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*. El factor σ^E se requiere para transcribir a los genes estructurales del alginato *algC* y *algD*. La actividad de σ^E es modulada negativamente por MucA y MucB.

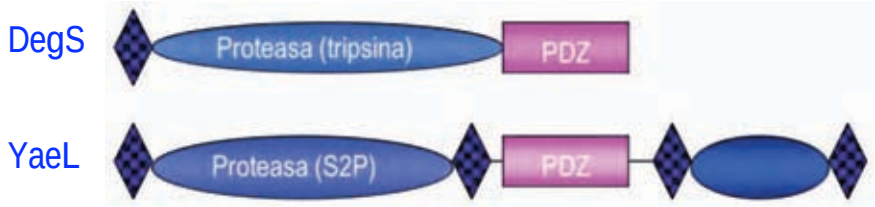


Figura 16. Proteasas involucradas en la separación σ^E de su antisigma en *E.coli*. DegS una proteasa de periplasma, de la familia serin proteasas HtrA, YaeL es una metaloproteasa de Zinc citoplásmica. Los rombos representan las regiones transmembranales para anclar la proteasa a la membrana. Tomada de Walsh et al., 2003.

2.11 LA SEPARACIÓN DEL FACTOR σ^E DE SU ANTI-SIGMA RseA EN *E. coli* ES MODULADO POR PROTEASAS.

En *E. coli*, se tiene bien caracterizado que el factor σ^E responde a una a una gran variedad de cambios ambientales, los cuales pueden ocasionar un estrés en la envoltura de la célula, es pecialmente en el de splegamiento de porinas de membrana externa. Para liberar al factor σ^E de RseA esta involucrada una cascada de proteasas, entre ellas DegS y YaeL/RseP (fig. 16), ambas están ancladas en la membrana interna (fig. 17), pero sus sitios catalíticos estan en diferentes regiones de la célula [Clausen *et al*., 2002; Kanehara *et al*., 2001].

DegS es una proteasa de periplasma, anclada a la membrana interna, pertenece a la familia serin proteasas HtrA [Clausen *et al*., 2002]. DegS tiene los dominios de unión a la

membrana, el sitio catalítico (proteasa) y PDZ (fig. 16), el dominio PDZ al igual que el sitio catalítico se encuentran en el periplasma (fig. 17) [Walsh *et al*., 2003; Wilken *et al*., 2004]. YaeL es una metaloproteasa de Zinc citoplásmica, embebida en la membrana interna (fig. 17), tiene dos dominios PDZ, uno de ellos en el periplasma [Kanehara *et al*., 2001; Kanehara *et al*., 2002; Kanehara *et al*., 2003; Koide *et al*., 2007].

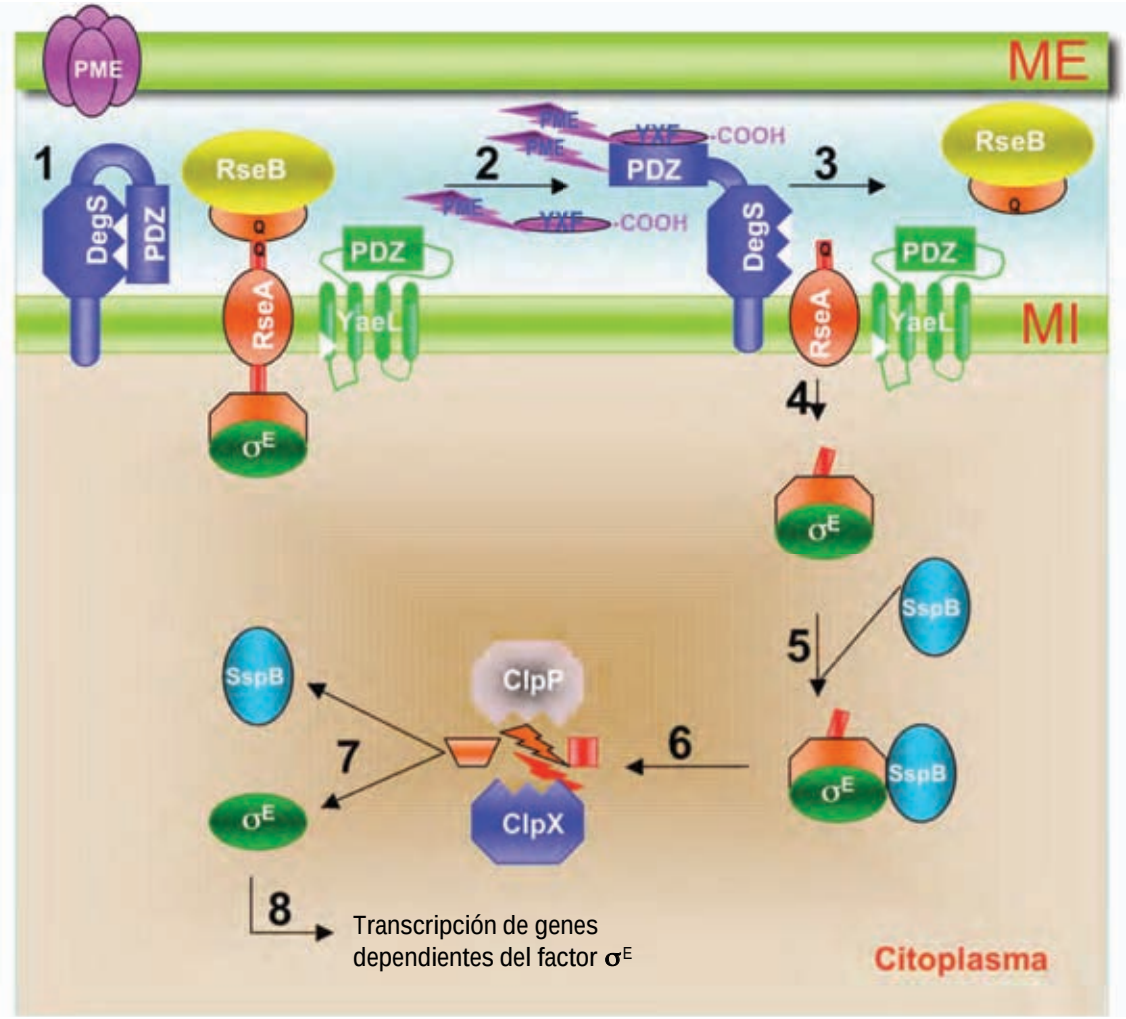


Figura 17. La liberación del factor σ^E de su anti-sigma, es regulado por una cascada de proteasas, la señal que induce esta liberación, es la presencia de proteínas de membrana externa (PME) mal plegadas, en el periplasma. En la ausencia de PME mal plegadas, DegS es inactivo y RseB interactúa con RseA (1). DegS, RseB, la región de glutaminas (Q) de RseA y el dominio de PDZ de YaeL, inhiben a YaeL, por lo tanto σ^E se encuentra unido a RseA (1). En presencia de PME mal plegadas, el dominio PDZ de DegS interactúa con un motivo del C-terminal de las PME (2), esto activa a DegS para que corte a RseA en la región del periplasma (3). El primer corte de RseA, induce a la proteasa YaeL a generar un segundo corte a RseA (4), liberando así, el complejo de inhibición σ^E-RseA en el citoplasma, al cual se le une SspB (5), para dirigir este complejo a las proteasas ClpX y ClpP (6). ClpXP degrada únicamente la porción de RseA, generando la liberación del factor σ^E (7). Posteriormente σ^E se une a la RNA polimerasa para transcribir genes que dependen de el (8). ME (Membrana externa), MI (Membrana interna). Tomado de Rowley *et. al*., 2006.

El proceso para liberar el factor σ^E de su antisigma, inicia cuando en el periplasma existe una señal, generada por la acumulación de proteínas de membrana externa (OMPs; *o*uter-*m*embrane proteins) mal plegadas o inmaduras, estas proteínas exponen su secuencia consenso YXF del C-terminal que interactúan con el dominio PDZ de DegS (fig. 17). La interacción del C-terminal de las OMPs con el dominio PDZ de DegS, ocasiona que se libere la inhibición alostérica de DegS, para activar su dominio catalítico de proteasa [Sohn *et al*., 2007], en consecuencia DegS corta a RseA en el periplaspla (entre V148-S149), en una región de glutaminas (Q) (fig. 17) [Walsh *et al*., 2003]. El corte que realiza DegS sobre RseA, induce a que RseA sufra un segundo por parte de la proteasa YaeL/RseP (fig. 17) [Mecsas *et al*., 1993; Ades *et al*., 1999; Alba *et al*., 2001; Alba *et al*., 2002; Kanehara *et al*., 2002; Kanehara *et al*., 2003]. El corte que hace YaeL sobre RseA, libera el complejo RseA-σ^E en el citoplasma, posteriormente se une la proteína SspB al complejo RseA-σ^E, para dirigirlo a proteasas dependientes de ATP, como ClpP y ClpX para terminar de degradar a RseA y liberar el factor σ^E. Posteriormente σ^E transcribe los genes que dependen de el (fig. 17), como los genes que codifican para chaperonas periplasmicas, proteasas y enzimas de biosíntesis [Alba y Gross, 2004; Chaba *et al*., 2007; Flynn *et al*., 2004; Rowley *et al*., 2006].

2.11.2 Separación del factor σ^E de su anti-sigma MucA en *P. aeruginosa*

En *P. aeruginosa*, una forma de separar a σ^E de MucA, es por la pérdida de función de este último. En aislados clínicos de pacientes con fibrosis quistica, las cepas de *P. aeruginosa* son muy mucoides por la sobreproducción de alginato, en el laboratorio también se obtienen espontáneamente fenotipos mucoides, el fenotipo mucoide se debe principalmente a la perdida de función del anti-σ^E (MucA) y/o MucB. La perdida de función de MucA y MucB es porque los genes que lo codifican (*mucAB*) tiene regiones con alta frecuencia de mutación ("hots spots"), principalmente en *mucA*, las mutaciones en *mucA* generan la perdida de fragmentos en el C-terminal, en consecuencia MucA es inestable y no puede inactivar a σ^E, por lo tanto σ^E tiene una alta actividad provocando la sobreproducción de alginato [Anthony *et al*., 2002; Boucher *et al*., 1997]. La degradación de las formas truncas de MucA lo realizan las proteasas ClpXP y ClpP2 [Qiu *et al*., 2008]. En *P. aeruginosa* existe otra vía para separar al factor σ^E (AlgU) de su antisigma MucA, el mecanismo es similar al de *E. coli*, donde también participan proteasas y OMPs, [Wood *et al*., 2006; Qiu *et al*., 2007]. La diferencia que existe, es en la secuencia de los tres aminoácidos del C-terminal de las proteínas de membrana externa (OMPs) que interactúan con el dominio PDZ de la primer proteasa. Las proteasas de *P. aeruginosa* son AlgW, que es homóloga a DegS, y MucP una metaloproteasa homóloga a YaeL/RseP. En *P. aeruginosa*, las OMPs mal plegadas en el periplasma, como MucE, interactúan a través de tres aminoácidos (WVF) del C-terminal con el dominio PDZ de AlgW, activando así a esta proteasa, posteriormente el segundo corte de MucA (del lado del citoplasma) lo realiza MucP [Qiu *et al*., 2007]. Para degradar el fragmento de MucA que se libera en el citoplasma, posiblemente lo realicen las proteasas ClpXP y ClpP2, dado que son las que degradan los formas truncas de MucA [Qiu *et al*., 2008], esta es la segunda forma de liberar al factor σ^E de su anti-sigma en *P. aeruginosa*.

En *A. vinelandii*, el mecanismo para liberar al factor σ^E de su antisigma MucA, posiblemente sea muy similar al de *E. coli* y *P. aeruginosa*. Esta propuesta es porque, *A. vinelandii* presenta los homólogos a las proteasas DegS y YaeL y tienen un alto porcentaje de identidad (fig. 18 y 19), en si, este sistema

para liberar los homólogos a σ^E, puede estar conservado en varias bacterias que tienen este sigma de estrés extracitoplasmico y los homólogos a las proteasas DegS y YaeL. En *A. vinelandii*, la proteasa homóloga a DegS, aquí la denominamos proteasa1 (Prot1), presenta 75 y 40 % de identidad con AlgW de *P. aeruginosa* (PAO1), y DegS de *E. coli*. Por su parte la proteasa homóloga a YaeL, que aquí se menciona como proteasa2 (Prot2), tiene 77 y 46 % de identidad con MucP y YaeL, de *P. aeruginosa* (PAO1) y *E. coli* respectivamente. Los mas altos porcentajes de identidad y similitud de las proteasas de *A. vinelandii*, las presenta con sus homólogas de *P. aeruginosa*. Aunque *A. vinelandii* no tiene el homólogo a OmpC de *E. coli*, ni a MucE de *P. aeruginosa*, seguramente tiene otras proteínas de membrana externa (OMPs) y alguna(s) de ellas pudiera(n) activar a la primer proteasa, para liberar el factor σ^E de MucA.

```
DegS        MF--VKLL-R SVAIGLIVGA ILLVAMPSLR SL-----NPL STPQFDSTDE 42
AlgW        MPKALRFLGW PVLVGVLLAL LIIQRNPELV GLPRQEVHVE QAPLLSRLQE 50
Prot1       MLKALRFLGW PLAVGVLLAL LIIQRYPEWV GLPRQLADEQ QLSRSILAPQ 50
Consensus   M.KALRFLGW PVAVGVLLAL LIIQR.PELV GLPRQ..... Q.P......E 50

DegS        TPASYNLAVR RAAPAVVNVY NRGLNTNSHN QL-------- --------EI 76
AlgW        GPVSYANAVS RAAPAVANLY TTKMVSKPSH PLFDDPMFRR FFGDNLPQQK 100
Prot1       GPVSYANAVS SAAPAVANLY TTKVVKKSNQ PLFDDPLLQQ YFGNSLPSQR 100
Consensus   GPVSYANAVS RAAPAVANLY TTK.V.KS.. PLFDDP.... .FG..LP.Q. 100

DegS        R---TLGSGV IMDQRGYIIT NKHVINDADQ IIVALQDGRV FEALLVGSDS 123
AlgW        RMESSLGSAV IMSAEGYLLT NNHVTAGADQ IIVALRDGRE TIAQLVGSDP 150
Prot1       RLESSLGSAV IMRRDGYLLT NNHVTAGADQ IVVALRDGRE VLARVIGNDS 150
Consensus   R.ESSLGSAV IM...GYLLT NNHVTAGADQ IIVALRDGRE ..A.LVGSDS 150

DegS        LTDLAVLKIN ATGGLPTIPI NARRVPHIGD VVLAIGNPYN LGQTITQGII 173
AlgW        ETDLAVLKID -LKNLPAMTL GRSDGIRTGD VCLAIGNPFG VGQTVTMGII 199
Prot1       ETDLAVLKID -LDELPVMHL GRSDSIRIGD VALAIGNPFG VGQTVTMGII 199
Consensus   ETDLAVLKID -L..LP.M.L GRSD.IRIGD V.LAIGNPFG VGQTVTMGII 200

DegS        SATGRIGLNP TGRQNFLQTD ASINHGNSGG ALVNSLGELM GINTLSFDKS 223
AlgW        SATGRNQLGL NTYEDFIQTD AAINPGNSGG ALVDAAGNLI GINTAIFSKS 249
Prot1       SATGRNQLGL NTYEDFIQTD AAINPGNSGG ALIDANGYLI GINTAIFSKS 249
Consensus   SATGRNQLGL NTYEDFIQTD AAINPGNSGG ALVDA.G.LI GINTAIFSKS 250

DegS        NDGETPEGIG FAIPFQLATK IMDKLIRDGR VIRGYIGIGG REIAPLHAQG 273
AlgW        -GG--SQGIG FAIPTKLALE VMQSIIEHGQ VIRGWLGVEV KALTPELAES 296
Prot1       -GG--SQGIG FAIPAKLALE VMEEIIKHGQ VIRGWLGLEV QPLTKELAES 296
Consensus   -GG--SQGIG FAIP.KLALE VM..II.HGQ VIRGWLG.EV ..LTPELAES 300

DegS        GGIDQLQGIV VNEVSPDGPA ANAGIQVNDL IISVDNKPAI SALETMDQVA 323
AlgW        LGLGETAGIV VAGVYRDGPA ARGGLLPGDV ILTIDKQEAS DGRRSMNQVA 346
Prot1       FGLEGRPGIV VAGIYRDGPA QRAGLQPGDL IVSIDGQPAT DGRHAMNQVA 346
Consensus   .GL....GIV VAGVYRDGPA ARAGLQPGDL I.SID.QPA. DGR..MNQVA 350

DegS        EIRPGSVIPV VVMRDDKQLT L--QVTIQEY PATN------ ---        355
AlgW        RTRPGQKISI VVLRNGQKVN LTAEVGLRPP PAPAPQQKQN GGE        389
Prot1       QTRPGETIEI EVLRNGQALT LSAEIGLRPP PTAVQQP--- ---        383
Consensus   .TRPG..I.I VVLRNGQ.LT L.AEVGLRPP PA...Q.--- ---        393
```

Figura 18. Alineamiento de la proteasa 1 (Prot1) de *A. vinelandii* con sus homólogas DegS (*E. coli*) y AlgW (*P. aeruginosa*), presenta 75 y 40 % de identidad con AlgW y DegS respectivamente.

```
YaeL        M--------- ---------- ---------- --------LS FLWDLASFIV  13
MucP        ---------- ---------- ---------- --------MS ALYMIVGTLV  12
Prot2       MAEGGHAPSG RGEDSPACSG PPHRDLRPAS WSPDRRSSMN ALYMIIGTLI  50
Consensus   M--------- ---------- ---------- --------MS ALYMI.GTLV  50

YaeL        ALGVLITVHE FGHFWVARRC GVRVERFSIG FGKALWRRTD KLGTEYVIAL  63
MucP        ALGVLVTFHE FGHFWVARRC GVKVLRFSVG FGTPLVRWHD RHGTEFVVAA  62
Prot2       ALGVLVTFHE FGHFWVARRC GVKVLRFSIG FGMPLLRWHD RQGTEFVIAA  100
Consensus   ALGVLVTFHE FGHFWVARRC GVKVLRFSIG FG.PL.RWHD R.GTEFVIAA  100

YaeL        IPLGGYVKML DERAEPVVPE LRHHAFNNKS VGQRAAIIAA GPVANFIFAI  113
MucP        IPLGGYVKML DEREAEVPAH LLEQSFNRKT VRQRIAIVAA GPIANFLLAI  112
Prot2       IPLGGYVKML DEREGEVPPA LLDRTFNRQG VRRRIAIVAA GPAANFLLAL  150
Consensus   IPLGGYVKML DERE.EVPP. LL...FNRK. VRQRIAIVAA GP.ANFLLAI  150

YaeL        FAYWLVFIIG VPGVRPVVGE IAANSIAAEA QIAPGTELKA VDGIETPDWD  163
MucP        LFFWVVALLG SQQVRPVIGS VAPESLAAQA GLEAGQELLA VDGEPVTGWN  162
Prot2       LFFWVLAMLG SQQLRPVIGA VEAGSPAAVA GIQAGEEVLA VDGEETSGWA  200
Consensus   LFFWVVA.LG SQQVRPVIG. VAA.S.AA.A GI.AG.ELLA VDGEET.GW.  200

YaeL        AVRLQLVDKI GDEST-TITV APFGSDQRRD VKLDLRHWAF EPDKEDPVSS  212
MucP        GVNLQLVRRL GESGTLEVRV QEKGSNVDST HQVRLDGWLK GEDNPDPIAS  212
Prot2       AVNLQMIRRL GETGTLEVTV REAGSSVTAR RHLVIRDWLE GVDEPDPIAS  250
Consensus   AVNLQLVRRL GE.GTLEVTV .E.GS.V... ..L.LR.WL. G.D.PDPIAS  250

YaeL        LGIRPRGPQI EPVLENVQPN SAASKAGLQA GDRIVKVDGQ PLTQWVTFVM  262
MucP        LGIRPWRPAL PPVLAELDPK GPAQAAGLKL GDRLQSIDGI AVDDWQQVVD  262
Prot2       LGIRPWRPAL PPVLAQLDPK GPAQAAGLRG GDRLLALDGE PLDDWQRVVE  300
Consensus   LGIRPWRPAL PPVLA.LDPK GPAQAAGL.. GDRL...DG. PLDDWQ.VV.  300

YaeL        LVRDNPGKSL ALEIERQGSP LSLALIPESK PGNGKAIGFV GIEPKVIPLP  312
MucP        SVRARPGQRV QLKVLRDGEV LDVALELAVR GEGKARSGYM GAGVAGTEWP  312
Prot2       RVRARPGARV VFLLERDGQR IERPVELAAR GEGEARSGYL GAGVETVEWP  350
Consensus   .VRARPG.RV .L..ERDG.. L..ALELA.R GEG.ARSGY. GAGV...EWP  350

YaeL        DEYKVVRQYG PFNAIVEATD KTWQLMKLTV SMLGKLITGD VKLNNLSGPI  362
MucP        AEMLREVSYG PLEAVGQALS RTWTMSLLTL DSIKKMLLGE LSVKNLSGPI  362
Prot2       PEMLREVRYG PLEAVGEALR RTWSMSVLTL DSLRKMLFGE LSVKNLSGPI  400
Consensus   .EMLREV.YG PLEAVGEAL. RTW.MS.LTL DSL.KML.GE LSVKNLSGPI  400

YaeL        SIAKGAGMTA ELGVVYYLPF LALISVNLGI INLFPLPVLD GGHLLFLVIE  412
MucP        TIAKVAGASA QSGVGDFLNF LAYLSISLGV LNLLPIPVLD GGHLLFYLVE  412
Prot2       TIAKVAGASV QSGVGDFLNF LAYLSISLGV LNLLPIPVLD GGHLLFYFVE  450
Consensus   TIAKVAGASA QSGVGDFLNF LAYLSISLGV LNLLPIPVLD GGHLLFY.VE  450

YaeL        KIKGGPVSER VQDFCYRIGS ILLVLLMGLA LFNDFSRL               450
MucP        WVRGRPLSER VQAWGMQIGI SLVVGVMLLA LVNDLSRL               450
Prot2       WARGRPLSER VQAWGMQIGI SLVVGVMLLA LVNDLSRL               488
Consensus   W.RGRPLSER VQAWGMQIGI SLVVGVMLLA LVNDLSRL               488
```

Figura 19. Alineamiento de la proteasa2 de *A. vinelandii* con sus homólogas YaeL (*E. coli*) y MucP (*P. aeruginosa*), presenta 77 y 46 % de identidad con YaeL y MucP respectivamente.

III. ANTECEDENTES

Al estar estudiando el papel del factor σ^E en la síntesis de alginato y enquistamiento en *A. vinelandii*, se descubrió que σ^E, también modula la locomoción. En observaciones preliminares al microscopio óptico, se notó que la mutante *algU* (σ^E), presenta locomoción, aún después de ser inducida al enquistamiento. Por su parte la mutante *mucA* (anti-σ^E), es inmóvil en crecimiento vegetativo. La cepa silvestre presenta locomoción en estado vegetativo y al entrar al enquistamiento es inmóvil. La mutante *algU* no produce alginato y no se enquista [Moreno *et al*., 1998], por su parte la mutante *mucA* incrementa la producción de alginato [Núñez *et al*., 2000]. Los resultados preliminares con respecto al movimiento indicaban que, en *A. vinelandii*, uno de los múltiples elementos que pueden estar regulando la locomoción, es el factor σ^E. Si al mutar el gen *algU*, las células tienen locomoción aún después de inducir el proceso de enquistamiento y por otra parte, al mutar el gen *mucA* se observa que las células vegetativas no tienen locomoción, esto sugería que en *A. vinelandii* el factor σ^E regula negativamente el movimiento.

IV. HIPÓTESIS

En *A. vinelandii*, el posible mecanismo por el cual el factor σ^E puede estar regulando negativamente la locomoción, es mediante la activación de la transcripción de un gen cuyo producto (represor o anti-activador) pudiera estar regulando negativamente la expresión de genes involucrados en la biogénesis y/o ensamble de los componentes del flagelo (fig. 20). La otra posibilidad es que el factor σ^E se este uniendo directamente en las regiones de regulación de algún gen flagelar y que reprima su expresión, aunque esta última posibilidad es poco probable porque el factor σ^E es un miembro de la familia σ^{70} y hasta ahora no se conoce que un factor sigma de esta clase, pueda reprimir la expresión de un gen. El factor σ^{54} es el único sigma que se ha demostrado que puede tener una función dual (activador y represor) [Boucher *et al*., 2000], el factor σ^{54} es un elemento estructural y funcionalmente diferente a los miembros de la familia de σ^{70}.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el efecto del factor sigma AlgU (σ^E) en la locomoción de células vegetativas y al entrar al proceso de diferenciación celular de *A. vinelandii*.

Objetivos particulares:

1.- Documentar el efecto del factor σ^E en la locomoción de *A. vinelandii* .

a) Realizar ensayos de nado.
b) Determinar la presencia de flagelos (microscopia electrónica).

2.- Identificar genes homólogos a los genes flagelares descritos en otras bacterias en el genoma de *A. vinelandii*.

3.- Analizar la expresión de algunos genes flagelares que se encuentran en el genoma de *A. vinelandii*, y determinar el efecto del factor σ^E sobre su transcripción

4.- Mutar genes flagelares de interés para comprobar su participación en la biogénesis del flagelo en *A. vinelandii*.

5.- Proponer un mecanismo por el cual el factor σ^E reprime la locomoción en *A. vinelandii*.

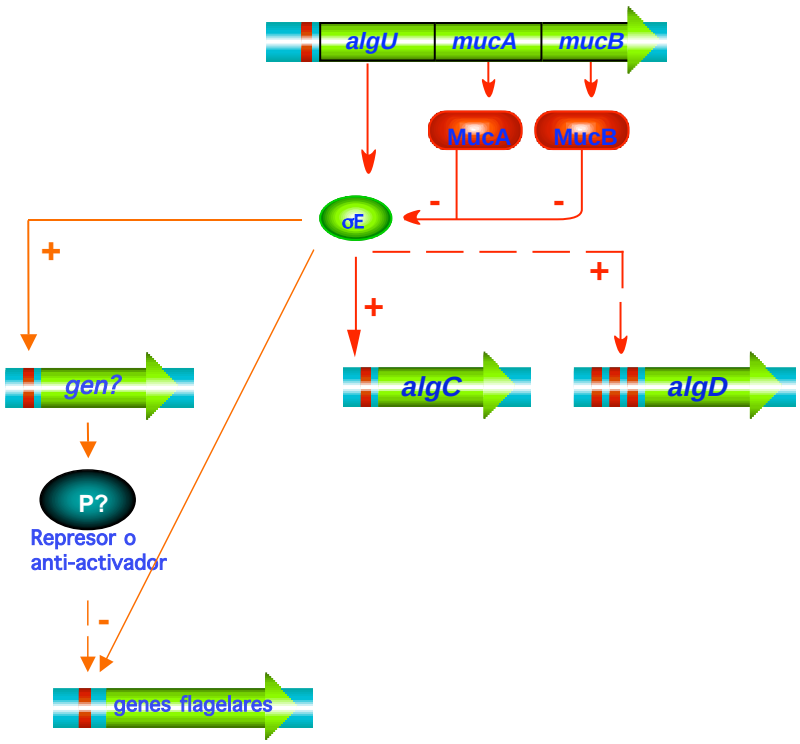


Figura 20. Mecanismo por el cual el factor σ^E (AlgU) puede estar regulando inversamente la síntesis de alginato y la locomoción en *A. vinelandii*. El factor σ^E regula positivamente la síntesis de alginato (*algC* y *algD*) pero, también puede estar regulando de manera negativa la locomoción, mediante la transcripción de un gen (gen?) que codifica para un represor o un anti-activador(P?), si P? es un represor posiblemente se une a la región de regulación de algún gen flagelar, si es un anti-activador estaría secuestrando un activador involucrado en la expresión de genes flagelares y de esta manera por cualquiera de las dos vías σ^E estaría reprimiendo el movimiento en *A. vinelandii*. La otra posibilidad, pero poco probable, es que el factor σ^E reprima directamente a un gen flagelar.

VI. MATERIALES Y METODOS

6.1 Tabla II. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Cepas	Características relevantes	Fuente o referencia
A. vinelandii		
AEIV	Cepa Silvestre. Nal^r. Mucoide.	Colección
UW 136	Mutante natural en *algU*. Rif^r, Nal^r. No mucoide	
SW	UW 136 con *algU*$^+$ cointegrado. Rif^r, Nal^r. Mucoide	Moreno
JWA	SW *mucA*::Gm en la orientación no polar. Gm^r, Nal^r. Mucoide.	Este trabajo
ATCC 9046	Cepa Silvestre. Nal^r. Mucoide.	Colección
SMU 88	ATCC 9046 *algU*::ΩKm. Km^r, Nal^r. No mucoide	Moreno *et al*., 1998
JRA4	ATCC 9046 *mucA*::Gm en la orientación no polar. Gm^r, Nal^r. Mucoide.	Núñez *et al*., 2000
SRA4	ATCC 9046 *mucA*::Km en la orientación no polar. Gm^r, Nal^r. Mucoide.	Este trabajo
JM3	ATCC 9046 *gacA*::Gm. Gm^r, Nal^r. Mucoide.	Castañeda *et al*., 2001
CN10	ATCC 9046 *rpoN*::Gm. Gm^r, Nal^r. Mucoide.	Gama-Castro *et al*., 2001
AQ 20	ATCC 9046 *fleQ*::Gm, en la orientación no polar. Gm^r, Nal^r. Mucoide.	Este trabajo
AQ 21	ATCC 9046 *fleQ*::Gm, en la orientación polar. Gm^r, Nal^r. Mucoide.	Este trabajo
AC 30	ATCC 9046 *flhC*::Tc, en la orientación no polar. Tc^r, Nal^r. Mucoide.	Este trabajo
AC 31	ATCC 9046 *flhC*::Tc, en la orientación polar. Tc^r, Nal^r. Mucoide	Este trabajo
AC 30/Gm	UC 30 complementada con el plásmido pLRGm. Gm^r, Km^r, Nal^r. No mucoide.	Este trabajo
AC 30/DC	UC 30 complementada con el plásmido pLRGm-DC. Gm^r, Km^r, Nal^r. No mucoide.	Este trabajo
ATCR	ATCC 9046 *cydR*::*gusA*::Gm. Gm^r, Nal^r. Mucoide.	Este trabajo
AACR	ATCC 9046 *mucA*::Km, *cydR*::*gusA*::Gm. Gm^r, Nal^r. Mucoide.	Este trabajo
E. coli		
DH5α	*sup*E44 Δ*lacU169 hsdR*17 *recA*1 endA1 *gyrA*96 *thi*-1 RelA1	
Plásmidos		
pMOS*Blue*	Plásmido usado para clonar los productos de PCR. Amp^r.	Amersham
pJB3Km1	Plásmido usado para complementar en *trans* a *A. vinelandii*.	Blatny *et. al*., 1997
pRK2013	Plásmido usado para hacer cruzas triparentales en *A. vinelandii*.	Hedges y Baumberg. 1973
pHP45Ω-Tc	Plásmido usado para obtener el casete de Tc^r.	Fellay *et al*., 1987
pBSL141	Plásmido usado para obtener el casete de Gm^r.	Alexeyev *et al*., 1995
pMS40	Plásmido usado para obtener el gen de *gusA* y Gm^r.	Peralta-Gil *et al*., 2002
pLRQ	pMOS*Blue* con el PCR (2.1-kb) del gen *fleQ* de *A. vinelandii*.	Este trabajo
pLRQ30	Derivado del pLRQ con la interrupción del gen *fleQ*::Gm en la orientación no polar.	Este trabajo
pLRQ31	Derivado del pLRQ con la interrupción del gen *fleQ*::Gm en la orientación polar.	Este trabajo
pLRDC	pMOS*Blue* con el PCR (1.6-kb) de los genes *flhCD* de *A. vinelandii*.	Este trabajo
pLRDC50	Derivado del pLRDC con la interrupción del gen *flhC*::Tc en la orientación no polar.	Este trabajo
pLRDC51	Derivado del pLRDC con la interrupción del gen *flhC*::Tc en la orientación polar	Este trabajo
pMUC	pMOS*Blue* con el PCR (0.9-kb) del gen *mucA* de *A. vinelandii*.	Este trabajo
pSRA4	Derivido del pMUC con la interrupción del gen *mucA*::Km en la orientación no polar.	Este trabajo
pLRGm	Derivado del pJB3Km1 reemplazando el marcador de Km (*Hind* III-*BamH* I), por el de Gm que proviene del pBSL141.	Este trabajo
pJBDC	Derivado del pJB3Km1 reemplazando el gen de Km (*Hind* III-*BamH* I), por los genes *flhDC* de *A. vinelandii* que se obtuvieron del plásmido pLRDC.	Este trabajo
pLRGm-DC	Derivado del pJBDC con el casete de Gm (obtenido del PBSL141), que se clono el sitio *Bam* HI.	Este trabajo
pCYDR	pMOS*Blue* con el gen *cydR* interrumpido con el gen *gusA* y el casete de Gm, introducidos en el sitio *Cla* I.	Moreno

6.2 Tabla III. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

PCR			
*fleQ*a	TTA TGC CTT GCT GGG GTT GC	*fleQ*1	CGA CGA GCA ATA CCT GGC
*fleQ*b	TTC ACC CGT TCG TAG GCA TC	*fleQ*-TR2	TTG TAG GAG GGT GGT GCC
*flhDC*1	AAT GCT TCC CAG GCG AGA TC	*flhC*1	GTG CTG GAA ACC GAG ACC
*flhDC*2	GAC AAC GAT GAG ACC CAG AG	*flhC*2	CGC CAG CAA CTC GAT CTC
mucA-1U	GAA ATC GAG GCC ACT GTG	*fliA*1	ACG CCC TGT CAC GCT ACG
mucA-1L	CAA CCA ATT CTG CGC ATC	*fliA*2	ACC GCC TGG CTG TGC AAC
*Gm*U1	GAT ATC GAC CCA AGT ACC	*fliC*.RT1	GCC CGT CAT CAA TAC CAA CA
cydR-IT	CCG AAC CGA AAG CAT CAC CC	*fliC*.RT2	TCA GGT CTT CGG AGG AGT TG
RT-PCR		RT-PCR tiempo real	
cydR-RTA	GCC TTG TGC CTA CCG ATT TC	*flhDC*-TR1	GAA CAT CCA TTC CTC GCT GT
cydR-RTB	GGA AAT GGT TGG CGG AGA AG	*flhDC*-TR2	ATA GAG CCG GAA AGC CTT GA
*fleN*a	CGA GGC ATG AAT GTG GAA GC	*cydR*-TRa	GGC TGT CGA GAC CGT ATC C
*fleN*b	AGG GAC TGG TCA CAA TAG GC	*cydR*-TR2	AGA TGA AAG CCG GTG ATC TG

Los oligonucleótidos que se utilizaron en este trabajo, fueron diseñados usando la secuencia del genoma de *A. vinelandii* OP y el programa "oligo 4", posteriormente fueron sintetizados en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM.

6.3 Condiciones de crecimiento de las cepas de *A. vinelandii* y *E. coli*.

Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio LB a 37º C por 12 hrs. Las cepas de *A. vinelandii* se crecieron en medio Burk-Sacarosa (BS), CM, B-OH y PY a 30º C por 48 hrs., cuando se crecieron en medio líquido, el medio ocupaba 1/5 del volumen total del matraz y se incubo en agitación a 250 rpm. El medio BS tiene la siguiente composición (g/L): sacarosa 0.2, K_2HPO_4 0.8, KH_2PO_4 0.2, Na_2SO_4 0.183, $MgCl_2.6H_2O$ 0.16, $FeSO_4.7H_2O$ 0.005, $Na_2MoO_4.2H_20$ 0.0002, $CaCl_2.2H_2O$ 0.073. Los medios CM y B-OH son similares al BS, solo que el CM carece de fierro y molibdeno, mientras que el B-OH contiene 0.2 % de n-butanol en lugar de sacarosa. El medio PY contiene (g/L): Bacto peptona 5.0 y extracto de levadura 3.0. Los antibióticos usados para *E. coli* y *A. vinelandii* (µg/ml) fueron: Ampicilina (Amp) 200.0 : 0.0; Kanamicina (Km) 0.0 : 5.0; Tetraciclina (Tc) 20.0 : 15.0, Gentamicina (Gm) 12.0 : 1.5 en caja y 0.25 en matraz.

6.4 Ensayos de nado.

Para los ensayos de nado, las cepas de *A. vinelandii* se crecieron en BS liquido en fase exponencial, posteriormente con un palillo estéril se transfirieron a cajas de BS, CM, PY o B-OH con 0.3 y 0.5 % de agar para determinar "swimming", 0.7 y 0.9 % de agar para determinar "swarming", las cajas fueron incubadas de 36 a 48 hrs, a 30º C. Cuando se requirió de transferir las células a cajas de B-OH, las células se lavaron previamente con $MgSO_4$ 10.0 mM.

6.5 Microscopía electrónica.

Para la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM; "*T*ransmission *E*lectron *M*icroscopy"), las células se crecieron en BS a una densidad óptica de 0.4-0.8 a 600 nm. La microscopía se realizo como se describe previamente por Gaona *et al*., 2004.

6.6 Manipulación de ácidos nucleicos.

Los protocolos usados en la purificación, electroforesis y modificación de ácidos nucleicos, así como la hibridación tipo Southern y transformación de *E. coli* se

realizaron conforme a lo descrito por Sambrook *et al* 1989.

6.7 RT-PCR y RT-PCR Cuantitativo (PCR tiempo real)

Para los RT-PCR las células se crecieron en BS a una densidad óptica de 0.4-0.8 a 600 nm, la extracción de RNA total se hizo como lo describe Barry *et al*., 1992. Para eliminar la contaminación de DNA en las muestras de RNA, fueron tratadas con DNAsa I (Amersham), la DNAsa I se removió con una extracción de fenol/cloroformo. La integridad del RNA se confirmo por electroforesis en gel de agarosa con 1.3 % de formaldehído. Posteriormente las muestras de RNA se usaron para realizar los RT-PCR con el estuche "SuperScript III one-step RT-PCR with platinum Taq" (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para confirmar que las muestras de RNA no estaban contaminadas con DNA se realizaron PCR sin transcriptasa reversa. Los oligos que se emplearon fueron *fleN*a y *fleN*b para *fleN*; *fleQ*1 y *fleQ*-TR2 para *fleQ*; *flhC*1 y *flhC*2 para *flhC*; *fliA*1 y *fliA*2 para *fliA*; *fliC*.RT1 y *fliC*.RT2 para *fliC*.

RT-PCR Cuantitativo (PCR tiempo real). Este protocolo se realizo como se reporta en Noguez *et al*., 2008. Para la extracción de RNA se hizo de células que se crecieron en medio BS liquido durante10 horas (fase exponencial) para el caso de *flhC* y a 37 horas para *cydR*. Los oligos que se emplearon fueron *flhDC*-TR1 y *flhDC*-TR2 para *flhC*; *cydR*-TRa y *cydR*-TR2 para *cydR*.

6.8 Clonación de los genes *fleQ* y *flhDC* de *A. vinelandii*.

Los genes *fleQ*, y *flhDC* de *A. vinelandii* se amplificaron por PCR, usando como molde el DNA genómico de la cepa ATCC 9046 y los siguientes oligonucleótidos: *fleQ*a y *fleQ*b para el gen *fleQ*; *flhDC*1-*flhDC*2 para *flhDC*. El tamaño de los productos de PCR fueron de 2157 pb para *fleQ* y 1667 pb para *flhDC*. Las bandas de PCR fueron clonados en el vector pMOS*Blue* (2887 pb) generándose los plásmidos pLRQ (*fleQ*; 5044 pb) y pLRDC (*flhDC*; 4554 pb) (datos no mostrados).

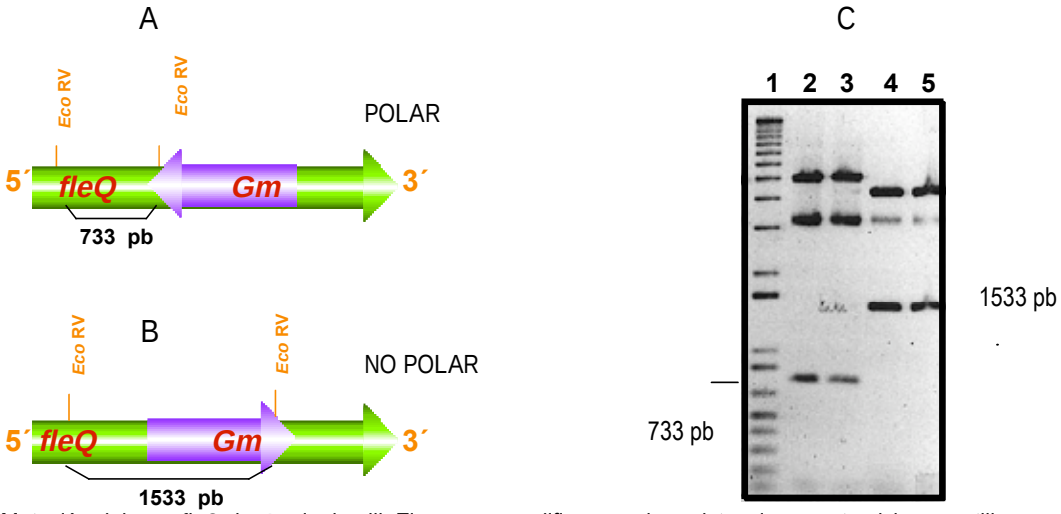


Figura 21. Mutación del gen *fleQ* de *A. vinelandii*. El gen que codifica para la resistencia a gentamicina se utilizo para interrumpir el gen *fleQ* de *A. vinelandii*, en los sitios *Xho*I. Al caer el gen de gentamicina en sentido opuesto a la transcripción del gen *fleQ* genera una mutación polar, originando el plásmido pLRQ31 (A), que al digerirlo con la enzima *Eco* RV produce una banda de 733 pb (carril 2 y 3; panel C). Al caer el gen de gentamicina en el sentido de la transcripción del gen *fleQ* ocasiona una mutación no polar, generando el plásmido pLRQ30 (B) y al digerirlo con *Eco*RV libera una banda de 1533 pb (carriles 4 y 5; panel C). C) Gel de electroforesis de las digestiones de los plásmidos pLRQ30 (carril 2 y 3) y pLRQ31 (carril 4 y 5) con la enzima *Eco* RV, carril 1 marcador de peso molecular (1 Kb plus DNA ladder).

6.9 Mutación de los genes *fleQ*, *flhC* y *cydR* de *A. vinelandii*.

La mutación de los genes *fleQ*, *flhC* y *cydR* de *A. vinelandii*, se hizo interrumpiéndolos con "cassettes" que codifican para la resistencia a antibióticos. Los "cassettes" están flanqueados con señales de terminación de la transcripción del gen 32, del bacteriófago TD4 [Prentki y Krisch 1984], pero estas señales, no son funcionales en *A. vinelandii*, solo existe un efecto polar, cuando el "cassette" cae en sentido opuesto al sentido de la transcripción del gen de interés, esto se ha demostrado tanto a nivel de ARN como de proteína [Mejía-Ruiz, *et al*., 1997 a y b; Mouncey, *et al*., 1995]. Para interrumpir el gen *fleQ*, se digirió el plásmido pLRQ con *Xho*I, con esta enzima además de interrumpir el gen, le quito un fragmento de 138 pb, el cual fue reemplazado por el gen de gentamicina (800 pb)), que se obtuvo con *Xho* I del plásmido pBSL141 [Alexeyev *et al*, 1995], generándose así las construcciones pLRQ30 (no polar, fig. 21b) y pLRQ31 (polar, fig. 21a). Para interrumpir el gen *flhC* se hizo con el gen de tetraciclina (2000 pb), este último gen se aisló con *Sma* I del plásmido pHP45-Tc [Fellay *et al*, 1987], y se clono en el sitio *Stu* I del plásmido pLRDC generando los plásmidos pLRDC50 (no polar, fig. 22b) y pLRDC51 (polar, fig. 22a). Para el caso del gen *cydR*, en nuestro laboratorio se tenia el plásmido pCYDR, este se origino al clonar en el plásmido pMOS*Blue* un producto de PCR de 1171 pb que porta el gen de *cydR* de *A. vinelandii*, para realizar el PCR se uso como molde el DNA de la cepa ATCC 9046, después de clonar el gen *cydR* en el plásmido pMOS*Blue*, se interrumpió en el sitio *Cla* I donde se le ligo el gen *gusA* (β-glucoronidasa) y el gen que codifica para la resistencia a gentamicina (0.8 Kb), que se obtuvieron con la enzima *Cla* I del plásmido pMS40 [Peralta-Gíl *et al*., 2002], generándose así el plásmido pCYDR.

Los sitios de restricción de los genes *fleQ*, *flhC* y *cydR* de *A. vinelandii*, se obtuvieron con el programa "Gene works".

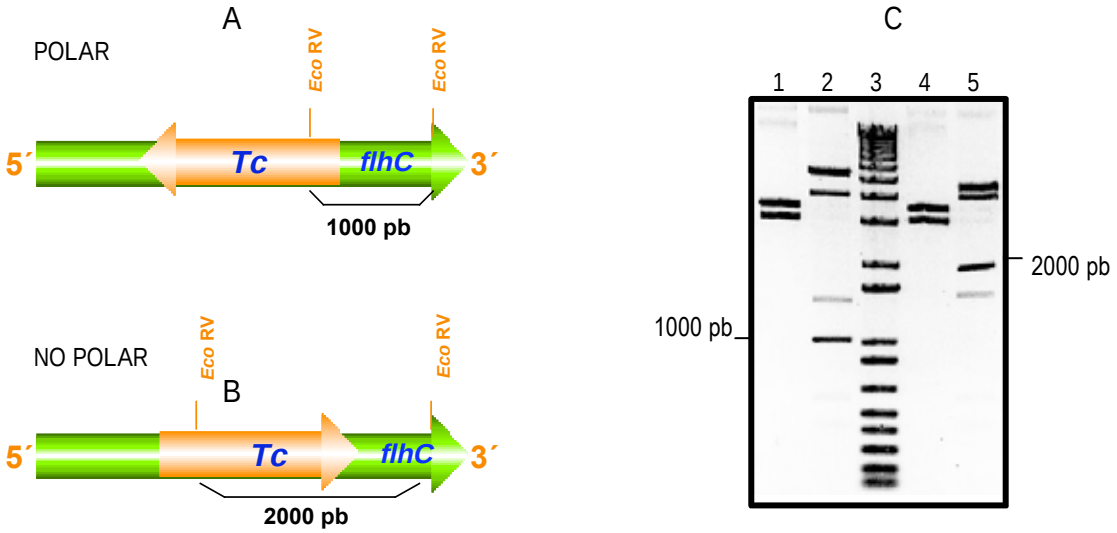


Figura 22. Mutación del gen *flhC* de *A. vinelandii*. El gen que codifica para la resistencia a tetraciclina se utilizo para interrumpir el gen *flhC* de *A. vinelandii*, en el sitio *Stu*I. Al caer el gen de tetraciclina en sentido opuesto a la transcripción del gen *flhC* produce una mutación polar, generando el plásmido pLRDC51 (A), al digerir este plásmido con la enzima *Eco* RV origina una banda de 1000 pb (carril2; panel C). Al caer el gen de tetraciclina en el sentido de la transcripción del gen *flhC* provoca una mutación no polar, produciendo el plásmido pLRDC50 (B), al digerir esta construcción con la enzima *Eco* RV, libera una banda de 2000 pb (carril 5; panel C). C) Gel de electroforesis de los plásmidos pLRDC50 (carril 5) y pLRDC51 (carril 2) digeridos con la enzima *Eco* RV, carril 3 marcador de peso molecular (1 Kb plus DNA ladder)

6.10 Transferir las mutaciones de los genes *fleQ*, *flhC* y *cydR* al genoma de *A. vinelandii*.

La transferencia de las mutaciones de los genes *fleQ*, *flhC* y *cydR* al genoma de *A. vinelandii*, se realizo transformando células competentes de esta bacteria, con los plásmidos que tienen las mutaciones de los genes *fleQ*, *flhC* y *cydR* de acuerdo al protocolo reportado por [Bali *et al*., 1992], estos plásmidos no se pueden replicar en *A. vinelandii*. Los plásmidos pLRQ30 y pLRQ31 se usaron para generar las cepas AQ20 (no polar) y AQ21 (polar) con la mutación en *fleQ*, la confirmación de la mutación del gen *fleQ* al genoma de *A. vinelandii*, se hizo por un análisis de hibridación de tipo "Southern blot" (dato no mostrado). Los plásmidos pLRDC 50 y pLRDC51 se emplearon para mutar el gen *flhC* generando las cepas AC30 (no polar) y AC31 polar), la confirmación de las mutantes también se hizo por "Southern blot" (dato no mostrado). Finalmente el plásmido pCYDR, se utilizo para generar la mutación del gen *cydR* en el genoma de *A. vinelandii*. El interés fue mutar a la cepa ATCC 9046 y a la mutante *mucA*, como la mutante en *mucA* (JAR4) que veníamos trabajando, tiene interrumpido el gen *mucA* con el gen de resistencia a gentamicina, el mismo que se uso para interrumpir al gen *cydR*, se genero otra mutante en *mucA* con el gen de resistencia a kanamicina. En el plásmido pMOS*Blue*, se clono un producto de PCR de 910 pb que contiene al gen *mucA* de *A. vinelandii*, generando el plásmido pMUC, para el PCR se uso como molde el DNA total de la cepa ATCC 9046 y los oligos mucA-1U y mucA-1L.

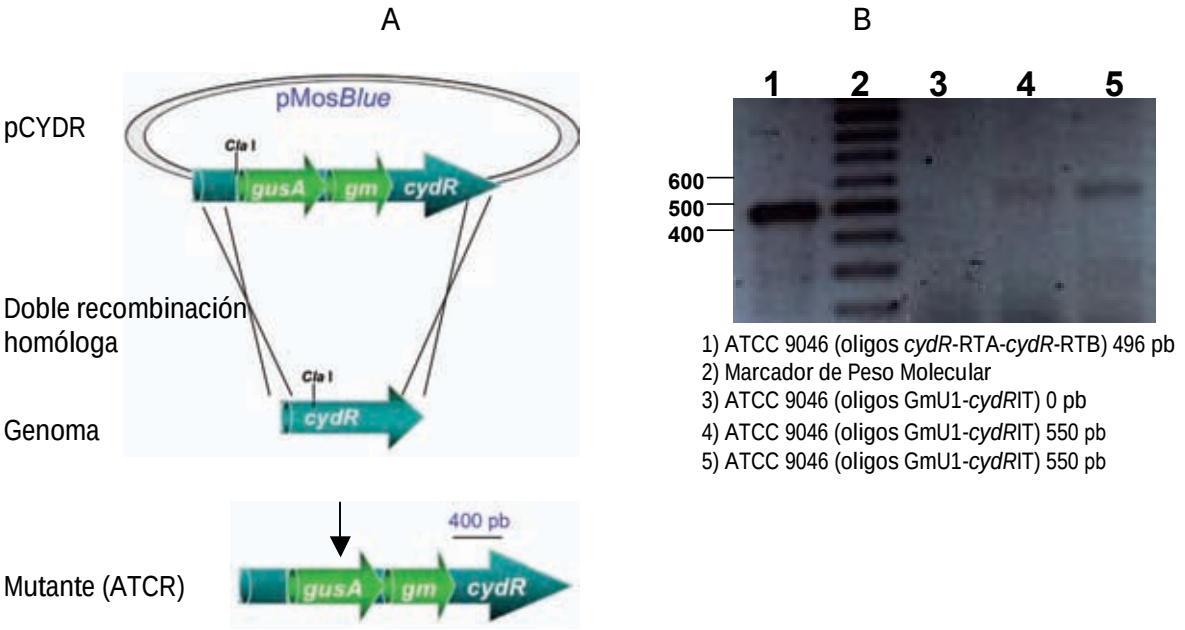


Figura 23. Mutación del gen *cydR* de *A. vinelandii*. A) Plásmido pCYDR derivado del pMOS*Blue* con el gen *cydR* interrumpido en el sitio *Cla* I, con los genes *gusA* y *gm*, este plásmido se utilizo para mutar al gen *cydR* en el genoma de *A. vinelandii* a través de un evento de doble recombinación homóloga. B) Electroforesis de los productos de PCR del gen *cydR* Silvestre y mutado en diferentes cepas de *A. vinelandii*.

Posteriormente en el sitio de *Xho* I se le inserto el gen de kanamicina que se obtuvo con *Xho* I del Plásmido pBSL99 [Alexeyev *et al*., 1995], generando el plásmido pSRA4, este plásmido se utilizo para transferir la mutación del gen *mucA* al genoma de *A.*

vinelandii, esta cepa se le llamo SRA4, la mutación se confirmo por PCR (dato no mostrado).

En la selección para obtener la mutante de *cydR* en la cepa ATCC 9046, se obtuvieron colonias que presentaron un mal crecimiento, para comprobar que se tenia la mutación del gen *cydR* se hizo por PCR de colonia, usando los oligos GmU1, que se une en el "cassette" de gm en la región 3´ y el oligo *cydR*-IT, que alinea en la región cadificante de *cydR* abarcando de 62-82 pb después del sitio *Cla* I, con estos oligos obtenemos una banda de 550 pb y como podemos ver en la figura 23, en la mutante *cydR* derivada de la ATCC 9046 esta la banda esperada. La mutante mutante *cydR*$^{-}$ en la cepa ATCC 9046 se le denomino ATCR. Por su parte la mutación del gen *cydR* en la cepa SRA4 no fue posible obtenerla después de dos eventos independientes de transformación.

6.11 Construcción de los plásmidos pLRGm y pLRGm-DC.

El plásmido pJB3Km1 [Blatny *et al*., 1997], que se puede replicar en *A. vinelandii*, fue digerido con *Hind* III y *Bam* HI (1 Kb del gen de resistencia a kanamicina), y se le clonaron los genes *flhDC* con su promotor de *A. vinelandii* (1.6 Kb), que se obtuvieron con las enzimas *Hind* III y *Bam* HI del plásmido pLRDC, generándose así el plásmido pJBDC de 6660 pb (fig. 24a). Posteriormente el plásmido pJBDC fue digerido con *Bam* HI para introducirle el gen de resistencia a gentamicina (0.8 Kb), que se obtuvo con *Bam* HI del plásmido pBSL141 [Alexeyev *et al* 1985] generándose así el plásmido pLRGm-DC con 7460 pb (fig. 24a).

El plásmido pLRGm (5800 pb; 24b), se genero a partir del plásmido pJB3Km1 al cual se le reemplazo el gen de resistencia a kanamicina por el gen de resistencia a gentamicina (800 pb), que se obtuvo del plásmido pBSL141, ambos plásmidos de digirieron con *Hind* III y *Bam* HI.

Los plásmidos pLRGm y pLRGm-DC se transfirieron por separado a la cepa AC 30 de *A. vinelandii*, mediante una cruza triparental, utilizando al plásmido de ayuda pRK2013 como lo describe [Kennedy *et al*., 1986].

6.12 Northern blot.

Para la extracción del RNA total, las células se crecieron en medio BS liquido y se colectaron a las 8 hrs (fase logarítmica) para el Northern blot de *flhC*, y a las 37 hrs para el caso de *cydR*. Las células se lavaron con $MgSO_4$ 10 mM, la extracción de RNA total se hizo como lo describe Kawano, *et al*., 2002, y fue cuantificado en el espectrofotómetro a 260 nm. Para el análisis de Northern blot se puso 10 mg de RNA de cada muestra por carril. Los fragmentos de DNA que se usaron como sondas se obtuvieron por PCR, para el gen *flhC* se amplifico una región interna de 456 pb, usando los oligonucleótidos *flhC*1 y *flhC*2 (tabla 2), como molde se empleo el plásmido pLRDC. Para el caso de *cydR* se amplifico una región interna de 496 pb, usando los oligos *cydR*-RTA y *cydR*-RTB (tabla 2), y el plásmido pMCYDR como molde.

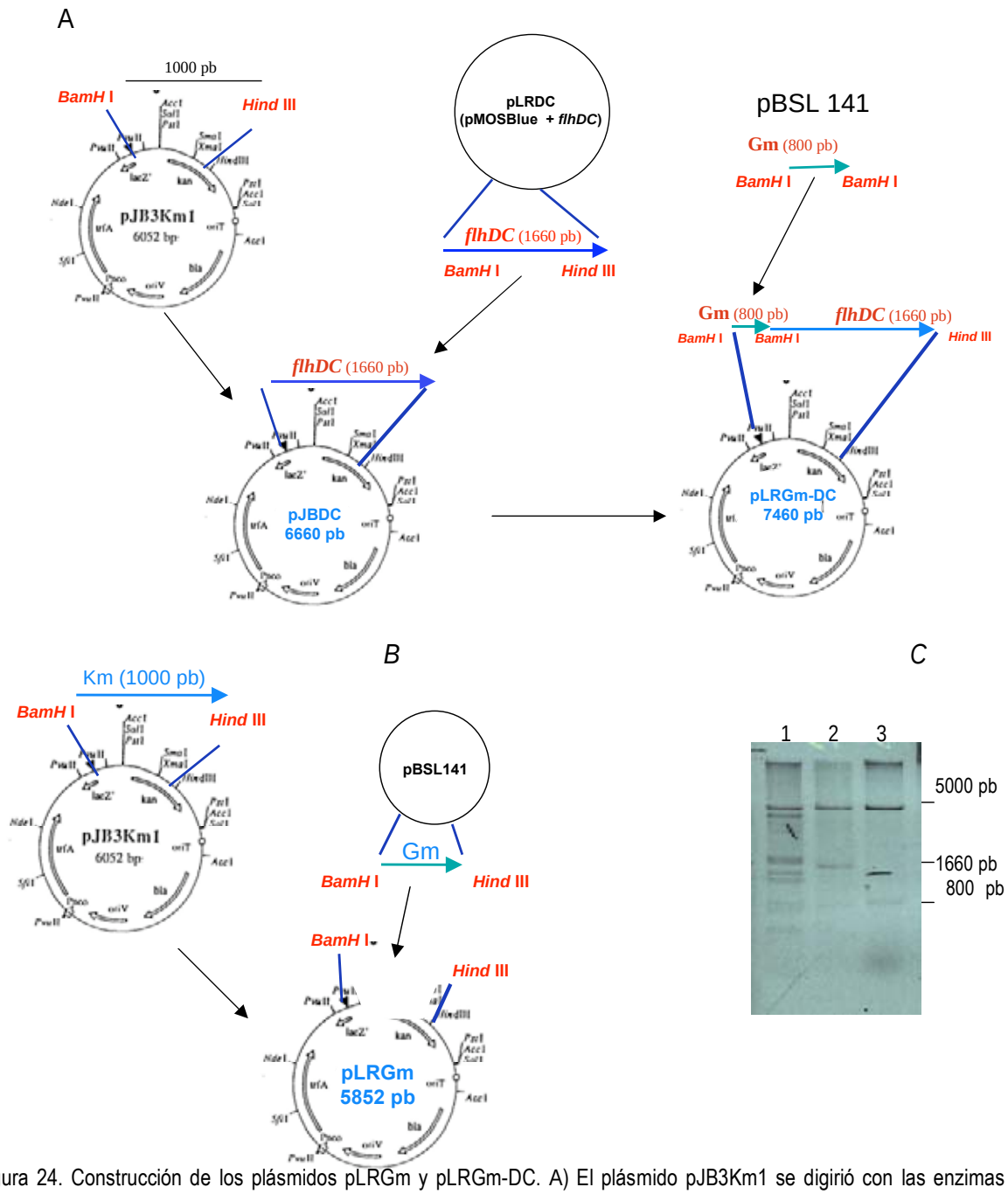


Figura 24. Construcción de los plásmidos pLRGm y pLRGm-DC. A) El plásmido pJB3Km1 se digirió con las enzimas *Bam* HI y *Hind* III para reemplazar el gen de resistencia a kanamicina (1 Kb) con los genes *flhDC* de *A. vinelandii* (1.6 Kb) que se obtuvieron del plásmido pLRDC con las mismas enzimas de restricción, generándose el plásmido pJBDC de 6.6 Kb. El gen de resistencia a gentamicina (0.8 Kb) se obtuvo con una digestión con *Bam* HI del plásmido pBSL141, posteriormente se ligo en el plásmido pJBDC que previamente fue digerido *Bam* HI, el plásmido resultante fue el pLRGm-DC de 7.4 Kb. B) El plásmido pLRGm (5.8 Kb) se obtuvo al reemplazar el gen de kanamicina (1 Kb) del plásmido pJB3Km1 por el gen de gentamicina (0.8 Kb) que se obtuvo del plásmido pBSL141, ambos plásmidos se digirieron con las enzimas de restricción *Hind* III-*Bam* HI. C) Electroforesis de los plásmidos pLRGm-DC (carril 2) y pLRGm (carril 3), digeridos con *Hind* III-*Bam* HI, carril 1 λ-*Hind* III marcador de peso molecular.

7.1 DOCUMENTAR EL EFECTO DEL FACTOR σ^E EN LA LOCOMOCIÓN DE *A.vinelandii*

7.1.1 *A. vinelandii* presenta "swimming" solo en medios mínimos.

En la bacteria *A. vinelandii* se conoce que tiene flagelos perítricos y existe un solo trabajo sobre quimiotaxis en esta bacteria, Haneline y colaboradores 1991, observaron que el gluconato, manosa, glucosa, sacarosa entre otros funcionan como atrayentes, mientras que la xilosa y galactosa actúan como repelentes, también determinaron que *A. vinelandii*, puede alcanzar velocidades de 74 μm/seg, estos datos se obtuvieron en columnas con los distintos compuestos y agar al 0.13 %, pero no se determinó si presenta locomoción en cajas ("swimming" y/o "swarming"), tampoco se conoce en que condiciones se activa y en cuales se inhibe. Por otra parte también se desconoce que genes están involucrados en la biogénesis y funcionamiento del flagelo en esta bacteria, ni que decir de la regulación de estos genes. Para estudiar el efecto del factor σ^E en la locomoción de *A. vinelandii*, primero se determinó si presenta "swimming" y/o "swarming" en cajas y en que condiciones se presentan.

Para determinar el "swimming" y "swarming" se utilizo la cepa ATCC 9046 (Silvestre). Los medios que se emplearon, son los que generalmente se usan en nuestro laboratorio para crecer a *A. vinelandii*, que son los siguientes: medios mínimos Burk-Sacarosa (BS) y CM; medio rico (PY); y el medio que induce al enquistamiento Burk-Butanol (B-OH). A estos medios se les adicionó agar en las siguientes concentraciones: 0.3 y 0.5 % para determinar "swimming" y 0.7 y 0.9 % para determinar el "swarming". Los resultados muestran que el "swimming" estuvo ausente en el medio PY (tabla IV), mientras que en los medios BS y CM al 0.3% de agar si se presentan (tabla IV), por lo tanto el "swimming" en *A. vinelandii* se da en medios mínimos con concentraciones de agar al 0.3 %. Una posibilidad del porque la bacteria que estudiamos no presenta "swimming" en el medio PY, puede ser porque hay un componente del medio que inhibe el movimiento de la bacteria o como tiene los nutrimentos disponibles, no requiere desplazarse, mientras que en el medio mínimo tiene que moverse hacia donde esta su fuente de carbono. Por su parte el "swarming" no se detecto en ninguna de los condiciones que probamos (tabla IV). A partir de este momento para la prueba de "swimming" la vamos a referir como nado.

Tabla IV. Determinación de "Swimming" y/o "Swarming" en *A. vinelandii*.

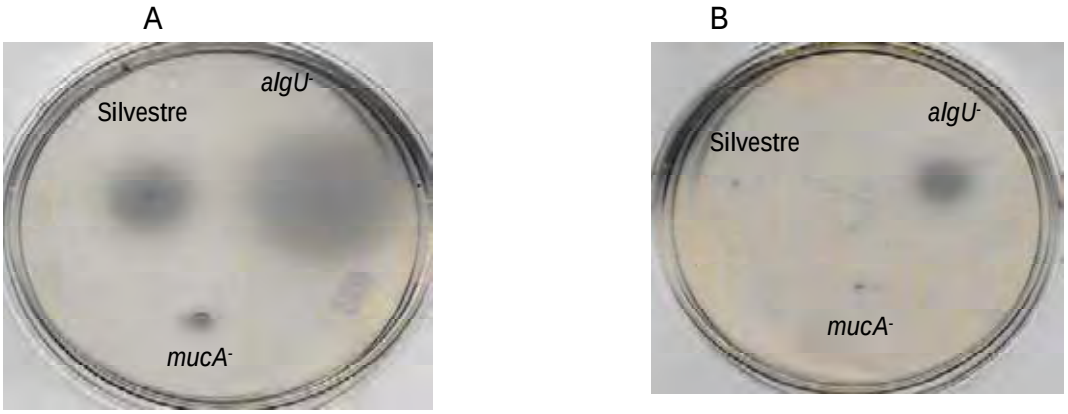
Medio	"Swimming"		"Swarming"	
Agar (%)	0.3	0.5	0.7	0.9
Burk-Sacarosa (BS)				
Sacarosa al 1 %	+	-	-	-
Sacarosa al 2 %	+	-	-	-
CM				
Sacarosa al 1 %	+	-	-	-
Sacarosa al 2 %	+	-	-	-
PY				
Sin sacarosa	+	-	-	-
Sacarosa al 1 %	+	-	-	-
Sacarosa al 2 %	+	-	-	-

7.1.2 El factor σ^E regula negativamente el nado en *A. vinelandii*.

Una vez que se determinó en que condiciones se da el nado, se procedió a analizar el efecto de σ^E en este evento. Se usaron las cepas ATCC 9046; SMU 88 la cual tiene mutado el gen *algU* que codifica para el factor σ^E; JRA4 que tiene inactivado el gen *mucA* que codifica para el anti-σ^E, ambas mutantes son derivadas de la cepa ATCC 9046. Los resultados son muy interesantes, como se

puede observar en el ensayo de nado en el medio BS (crecimiento vegetativo, fig. 25 A), la mutante *algU* (SMU 88) presenta un halo de locomoción mayor que la silvestre (ATCC 9046), mientras que en la mutante *mucA* (JRA4) no presenta nado. Las células de las cepas que se utilizaron en el ensayo de nado, se observaron en el microscopio electrónico (fig. 25 C), y lo que observamos es que, la cepa silvestre al igual que la mutante en *algU* presentan flagelos, mientras que la mutante *mucA* (la cual no presento nado) carece de ellos.

En un ensayo de nado en el medio Burk-Butanol (B-OH), el cual induce el enquistamiento se observó que la cepa SMU88 sigue presentando nado (menor que en crecimiento vegetativo), mientras que la cepa silvestre lo pierde en este medio, por su parte la cepa JRA4 también careció de nado en este medio (fig. 25 B).



C

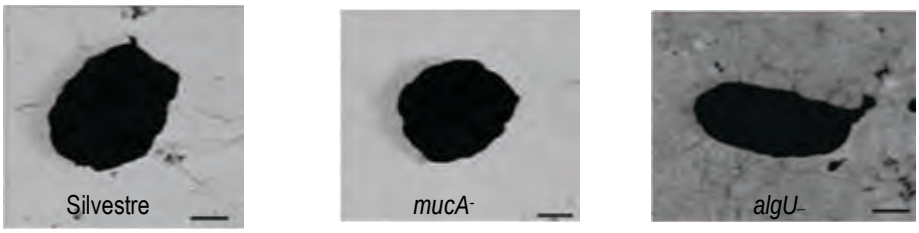


Figura 25. Ensayos de nado y microscopía electrónica de diferentes cepas de *A. vinelandii*. A) Nado en medio de crecimiento vegetativo (BS). B) Nado en medio de inducción al enquistamiento (B-OH), ambos con 0.3 % de agar. C) Microscopía electrónica de las células vegetativas (BS), de las cepas utilizadas en los ensayos de nado; ATCC 9046 (silvestre), JRA4 (*mucA*-) y SMU 88 (*algU*-). La barra representa 1 μm.

Estos datos apoyan la hipótesis de que en *A. vinelandii* el factor σ^E inhibe la locomoción porque en las cajas de nado, en el medio BS la mutante que carece del factor σ^E (*algU*-, SMU 88), nada mas que la silvestre y la mutante que no tiene el antisigma para σ^E (*mucA*-, JRA4) carece de nado, por otra parte en el medio B-OH, la cepa SMU 88 sigue presentando nado mientras que la silvestre no lo presenta en esta condición al igual que la mutante JRA4. Además en el ensayo de nado en B-OH, estamos corroborando lo que ya había descrito Sadoff (1975), que cuando esta bacteria inicia el proceso de enquistamiento pierde sus flagelos, en consecuencia también pierde su locomoción. La regulación negativa del nado por parte del factor σ^E puede ser mediante la represión de la generación del

flagelo porque en la microscopía electrónica las células de la cepa JRA4 que no nadó, no se le observan flagelos mientras que las células de la cepa SMU 88 si los presenta. Los datos que se obtuvieron en este punto nos indican que:

1.- En *A. vinelandii* el "swarming" esta ausente en las condiciones que nosotros probamos.

2.- *A. vinelandii* presenta nado ("swimming") en medios mínimos y en el medio PY (rico) no se presenta.

3.- Las cepas SMU 88 (*algU*$^-$) y silvestre presentan flagelos, por su parte la mutante JRA4 (*mucA*$^-$; sin movimiento) carece de flagelos.

4.- En *A. vinelandii* el factor σ^E inhibe la locomoción mediante la represión de la generación del flagelo.

7.2 GENES INVOLUCRADOS EN LA BIOGÉNESIS Y FUNCIONAMIENTO DEL FLAGELO EN *A. vinelandii*.

7.2.1 En el genoma de *A. vinelandii* existen los genes necesarios para la biogénesis y funcionamiento del flagelo.

Una vez analizado que en *A. vienelandii*, el factor σ^E tiene un efecto negativo en el nado, a través de la represión de la generación del flagelo, lo siguiente fue determinar como el factor σ^E afecta la expresión de los genes flagelares, para esto lo primero que se necesita saber es, cuantos y cuales son los genes flagelares en esta bacteria. Cuando se inicio este trabajo, el sistema flagelar de *E. coli*, era el único sistema que se tenia bien estudiado, se sabia que existen alrededor de 50 genes para la generación y funcionamiento del flagelo [Macnab 1996; Kutsukake 1997; Kutsukake *et al*., 1988], estos genes se clasifican en tres clases de acuerdo al orden de su expresión, y el operón *flhDC* es el que inicia la expresión de estos genes (fig. 8). Por su parte en *P. aeruginosa* se conocía muy poco de su sistema flagelar, lo que se conocía es que los genes maestros, eran diferentes estructural y funcionalmente a los de *E. coli*. También se había determinado que el producto de los genes *fleR* y *fleS* de *P. aeruginosa*, codifican para un sistema de dos componentes, que participaban en la expresión de genes flagelares [Ritchings *et al*., 1995], por abajo de FleQ. Aunque se tenían caracterizados varios genes flagelares en *P. aeruginosa*, no se conocía como estaba ordenada la jerarquía de la expresión de estos, ni como era la regulación de la expresión del gen maestro *fleQ*, actualmente se ha elucidado mucho de estos puntos (ver introducción). Utilizamos los productos de los genes flagelares de *E. coli* y *P. aeruginosa*, para buscar los ortólogos de *A. vinelandii*, los de *E. coli*, porque como ya se ha mencionado, es el sistema más estudiado y los de *P. aeruginosa* porque es una bacteria que esta relacionada filogenéticamente con *Azotobacter* [Reiders *et al*., 2004].

Los alineamientos del tipo tblasn (blast de proteína contra nucleótidos), se realizaron utilizando el algoritmo que esta en la pagina Web donde se reportaron las primeras secuencias del genoma de *A. vinelandii* OP (http://www.azotobacter.org/blast.html).

Los resultados de estos alineamientos nos permitió identificar aproximadamente 60 genes flagelares en el genoma de *A. vinelandii*, los productos de estos genes son los necesarios para orquestar el ensamblaje y funcionamiento de un flagelo (tabla V). Los genes flagelares de *A. vinelandii*, a excepción de *fleQ* y *fleN*, se encuentran agrupados en tres regiones de su genoma (fig. 26), el grupo mas grande (39,717 pb) contiene 43 genes, mientras que los otros dos tienen 13 y 4 genes respectivamente (fig. 26). En *A. vinelandii* los genes *fleN* y *fleQ*, se encuentran separados entre ellos y de los demás genes flagelares (fig. 26). Los productos de los genes flagelares de *A. vinelandii*, la mayoría presenta homología con *E. coli* y *P. aeruginosa*, solo unos cuantos presentan homologia únicamente con *E coli* o *P. aeruginosa*, la diferencia de proteínas

flagelares que existen en estas tres bacterias se muestran en la tabla VI.

7.2.2 En *A. vinelandii* existen genes de dos sistemas maestros diferentes que inician la expresión de genes flagelares: *flhD-flhC* (*E. coli*) y *fleQ-fleN* (*P. aeruginosa*)

En la búsqueda de genes flagelares en el genoma de *A. vinelandii*, además de encontrar los genes necesarios para la biogénesis y funcionamiento de esta estructura, también se encontraron los genes cuyos productos pudieran iniciar la expresión de la cascada de genes flagelares, pero en este punto, existió un hallazgo muy interesante, se encontró los homólogos a *flhD*, *flhC*, *fleQ* y *fleN* (fig. 26). El producto de los genes homólogos a *flhDC* son los que inician la expresión de genes flagelares en *E. coli* [Macnab, 1996], mientras que el producto del homólogo a *fleQ* hace lo mismo en *P. aeruginosa* [Arora *et al*., 1997] y *fleN* codifica para una proteína que modula la actividad de FleQ [Dasgupta y Ramphal, 2001].

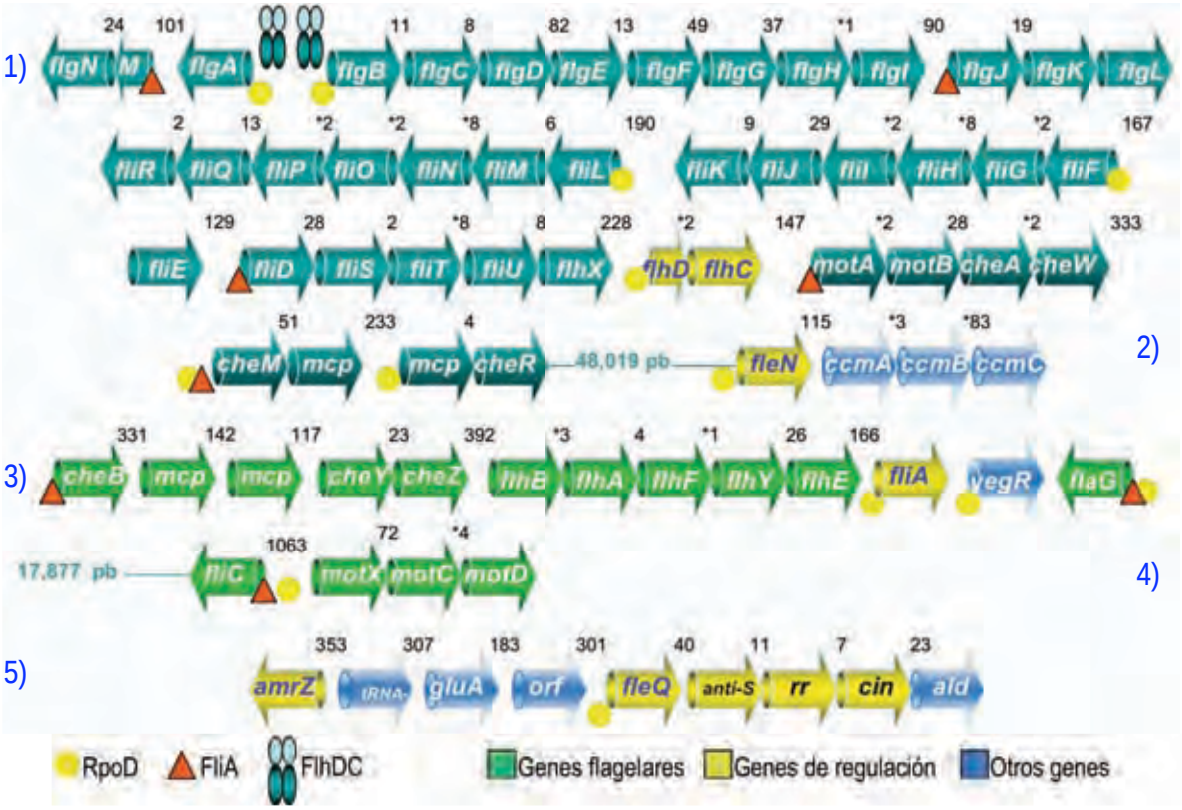


Figura 26. Genes flagelares en el genoma de *A. vinelandii*. Existen alrededor de 60 genes flagelares en *A. vinelandii* agrupados en cinco regiones del genoma. Región 1, contiene el mayor numero de genes flagelares (43), están en ambos sentidos, en los extremos están *flgN* y *cheR*. Región 2, ubicada a 48 kb de la región 1, contiene únicamente a *fleN*. Región 3, conformada por 12 genes flagelares en las dos direcciones, flanqueados por *cheB* y *flaG*. Región 4, localizada a 17.8 kb de la región 3, tiene el gen *fliC* y de manera divergente los genes *motX*, *motC* y *motD*. Región 5 constituida solo por el gen *fleQ*.

Los números arriba de los genes indican las bases entre uno y otro gen, los que tienen asterisco (*) significa bases traslapadas.

Tabla V. Genes flagelares ubicados en el genoma de *A. vinelandii*.

Gen	Función
flgA	Anillo P (componente del ensamble)
flgB	Cuerpo basal varilla
flgC	Cuerpo basal varilla
flgD	Capucha del gancho
flgE	Gancho
flgF	Cuerpo basal varilla
flgG	Cuerpo basal varilla
flgH	Anillo L Cuerpo basal
flgI	Anillo P Cuerpo basal
flgJ	Muramidase especifica de flagelo
flgK	Unión del gancho-filamento
flgL	Unión del gancho-filamento
flgM	Anti-σ^{28}
flgN	Inicio del ensamble del filamento. Sistema de secreción de tipo III (chaperona)
fliA	Sigma flagelar (σ^{28})
fliB	flagelina
fliC	flagelina
fliD	Capucha del filamento
fliE	Adaptador anillo MS/varilla*
fliF	Anillo MS
fliG	Interruptor/motor, anillo C MS *
fliH	Sistema de secreción del tipo III Regulador negativo de FliI*
fliI	ATPasa. Sistema de secreción del tipo III*
fliJ	Exportación de proteínas de gancho (chapero)
fliK	Control de longitud de gancho
fliL	asociado al cuerpo basal
fliM	Interruptor del motor*
fliN	Interruptor del motor*
fliO	Aparato de exportación flagelar tipo III*

Gen	Función
fliP	Aparato de exportación flagelar tipo III*
fliQ	Aparato de exportación flagelar tipo III*
fliR	Aparato de exportación flagelar tipo III*
fliS	Elongación de filamento*
fliT	Chaperona de FliD y Regulador negativo de FlhDC (Ec)
flhA	Aparato de exportación flagelar tipo III*
flhB	Aparato de exportación flagelar tipo III*
flhC	Activador transcripcional (junto con σ^{70})
flhD	Activador transcripcional (junto con σ^{70})
flhE	Proteína flagelar
flhF	Determinación del sitio para el flagelo polar*
flaG	Control de longitud de filamento
motA	Motor
motB	Motor
motC	Motor
motD	Motor
cheA	Quimiotaxis
cheB	Quimiotaxis
cheR	Quimiotaxis
cheV	Quimiotaxis
cheW	Quimiotaxis
cheY	Quimiotaxis
cheZ	Quimiotaxis
fleQ	Activador transcripcional (s^{54})
fleN	Anti-FleQ

Tabla VI. Genes flagelares que no están presentes en *E. coli* (*Ec*), *A. venelandii* (*Av*) y *P. aeruginosa* (*Pa*).

Gen	*E c*	*A v*	*P a*	Función
flhDC	si	si	-	Activadores transcripcionales (junto con σ^{70})
fleQ	-	si	si	Activador transcripcional (σ^{54})
fleN	-	si	si	Anti-FleQ
fliT	si	si	-	Chaperona de FliD y Regulador negativo de FlhDC (Ec)
flhE	si	-	-	Proteína flagelar
flhF	-	-	si	Determinación del sitio para el flagelo polar*
flaG	-	si	si	Control de longitud de filamento
motCD	-	si	si	Motor
cheV	-	-	si	Quimiotaxis
fleR	-	-	si	Proteínas de regulación del sistema dos componentes
fleS	-	-	si	Cinasa (sistema de dos componentes)
flhX	-	si	-	Parálogo del dominio citoplasmático de FlhB
flhY	-	si	-	Desconocida
fliU	-	si	-	Desconocida
motX	-	si	-	Desconocida

En el genoma de *P. aeruginosa*, no están presentes los genes homólogos a *flhDC*, de igual manera, en el genoma de *E. coli*, no se encuentran los genes homólogos a *fleQ* y *fleN*. Actualmente no hay reporte alguno en el cual se indique que una bacteria presente dos sistemas "de genes maestros" diferentes, por lo que *A. vinelandii*, es el primer caso donde

se descubre la presencia de genes homólogos que codifican para dos sistemas diferentes de reguladores maestros, involucrados en el inicio de la expresión de genes flagelares. El arreglo físico en el genoma, de los genes maestros del sistema flagelar en bacterias que poseen flagelos, generalmente se encuentran flanqueados por otros genes flagelares, por ejemplo *flhDC* en *E. coli* y *S. typhimurium*, o el caso de *fleQ-fleN* en algunas *Pseudomonas*. En *A. vinelandii*, los genes *flhDC* también se encuentran flanqueados por genes flagelares (fig. 26), mientras que los genes *fleQ* y *fleN* están en zonas donde no existen genes flagelares (fig. 26), *fleN* está flanqueado por genes que están involucrados en la síntesis de grupos hemo (fig. 26), por su parte *fleQ* esta en una región donde hay genes que codifican para posibles reguladores, 4 genes hacia arriba de *fleQ* esta el ortólogo a *amrZ* de *P. aeruginosa*, mientras que hacia abajo de *fleQ*, esta un posible anti-anti-sigma, después un par de proteínas que pertenecen al sistema de regulación de dos componentes (fig. 26).

7.2.3 Las zonas de regulación de los genes flagelares de *A. vinelandii* presentan secuencias conservadas para la unión de los factores σ^{70}, σ^{28} y el activador $FlhD_4C_2$. Identificados y localizados los genes flagelares en el genoma de *A. vinelandii*, lo siguiente que se realizo, fue un análisis de las regiones intergénicas para buscar secuencias conservadas donde se unen los factores σ^{70} (RpoD), σ^{28} (FliA), σ^{E} (AlgU) y el heterohexamero $FlhD_4C_2$. Para buscar posibles promotores dependientes de σ^{70}, en las zonas de regulación de los genes flagelares de *A. vinelandii*, se uso un programa que predice promotores dependientes de σ^{70} en bacterias con un 80% de eficacia (www.softberry.com). Por su parte la identificación de posibles promotores dependientes de σ^{28}, σ^{E} y los sitios de unión de $FlhD_4C_2$, en los genes flagelares de *A. vinelandii*, se hizo por inspección ocular (a "ojo"), buscando las secuencias canónicas de DNA para la unión de estos elementos de regulación, las cuales son: para σ^{E}, GAACTT $(N)_{16-17}$ TCTgA; para σ^{28}, CTAA $(N)_{15}$ GCCGATAG; y para $FlhD_4C_2$ AATGGCAG AAATAGCG $(N)_{10-12}$ CGCTAT TTCTGCCATT. Después de analizar las regiones intergénicas de los genes flagelares de *A. vinelandii*, no se encontraron posibles promotores dependientes del factor σ^{E}, este resultado nos comenzaba a sugerir que en *A. vinelandii*, el factor σ^{E} no puede regular directamente la expresión de genes estructurales y/o genes de regulación del sistema flagelar. Sin embargo, si se encontraron secuencias conservadas para los factores sigma σ^{70} y σ^{28} (tabla VII). Para el factor σ^{70} son doce los posibles operones que estaría modulando (tabla VII), entre los cuales incluyen a los genes *flhDC*, *fleN* y *fleQ*. Por su parte el factor σ^{28}, son ocho los posibles operones que puede estar regulando (tabla VII), estos operones que presentan las secuencias consenso para la unión de FliA, contienen genes ortólogos que en otros sistemas generalmente se expresan al final de la cascada del sistema flagelar y también dependen de σ^{28} (clase 3 en *E. coli*, clase 4 en *P. aeruginosa*). El operón *cheM-mcp-mcp-cheR* y el gen *flaG* presentan secuencias consenso para ambos promotores (σ^{70} y σ^{28}). También se localizaron secuencias canónicas de DNA, para la unión del activador transcripcional $FlhD_4C_2$, estas se ubican en las zonas de regulación de lo genes flagelares *flgA* y *flgB*, genes que se encuentran de manera divergente (fig. 26), y cada uno posee su propia secuencia para la posible interacción con $FlhD_4C_2$, además una parte de estas secuencias se traslapan con las regiones -35 de posibles promotores dependientes de σ^{70} (tabla VII). Los genes *flgA* y *flgB*, en *P. mirabilis*, *S. typhimurium* y *E. coli*, están al inicio de sus operones y también son activados por $FlhD_4C_2$ junto con σ^{70},

también tienen un traslape entre las secuencias de unión a $FlhD_4C_2$ y σ^{70} [Claret y Hughes 2002; Kutsukake e Ide 1995; Stafford *et al*., 2005]. Las conclusiones hasta aquí son:

1.- En *A. vinelandii* existen aproximadamente 61 genes flagelares, los necesarios para el ensamblaje y funcionamiento de un flagelo.

2.- *A. vinelandii* presenta en su genoma los genes homólogos a dos sistemas maestros diferentes (*fleQ-fleN* y *flhDC*), siendo el primer reporte de una bacteria que presenta dos sistemas maestros para el posible inicio de la expresión de genes flagelares.

3.- En los genes flagelares de *A. vinelandii*, no hay promotores dependientes del factor σ^E.

4.- Los genes flagelares de *A. vinelandii* contienen secuencias conservadas para promotores dependientes de σ^{70}, σ^{28} y para la unión al activador $FlhD_4C_2$.

Tabla VII. Posibles promotores de los genes flagelares de *A. vinelandii*.

	-35		-10	
Consenso de σ^{70}	TTGACA	16-18bp	TATAAT	
PfleQ	CTATCG	AGCGGCTGACATCCTTTG	TAGAAT	$(N)_{234}$ ATG
P2flhDC	TTCACG	ATTTACGTGCCAACCATT	TCTAAC	$(N)_{72}$ ATG
P1flhDC (yo)	ATGATA	AAGTTCAAAAAATGATGC	TCGAAA	$(N)_{126}$ ATG
PfliA	CTTTCA	GGTTTCTGCCGCAAGGT	GAGAAT	$(N)_{93}$ ATG
PcheM-mcp	TTGCCA	GGACCGGCTGCGAAGG	TCTCAT	$(N)_{115}$ ATG
PflaG	TTGACA	TACGCCTTCACTTCGT	TAAAAC	$(N)_{290}$ ATG
PyegR	TGGACG	AGCTGATCCAGGCCGG	TACCAT	$(N)_{220}$ ATG
fleQ (yo)	TCGAGC	GGCTGACATCCTTTG*15	TAGAAT	$(N)_{34}$ ATG
PfliFGHIJK	TTTAGG	CACAGGGCCGCCCCG*15	GATAAT	$(N)_{126}$ GTG
PflgA	TTGTCC	CGGCGCCGGACTCCC*15	TAGAAT	$(N)_{29}$ ATG
PflgB	TTGCCC	CGAAAGGCATGCTGT*15	TACTTT	$(N)_{35}$ ATG
PfliLMNOPQR	TCGGAC	CCGAGCCCCCATCGG*15	CATACT	$(N)_{44}$ ATG
Porf-motCD	TTGGCC	TGCTCACGTTCGCA*14	TAGAAT	$(N)_{98}$ ATG
PfleN	TGGCTT	GCTGGCGTGTGGT*13	TATGCT	$(N)_{50}$ ATG
Consenso de σ^{28} (FliA)	CTAAA	15 bp	GCCGATAA	
PflgNM	CTCAA	GTTTGTCCATGGAGG	GCCGATAG	$(N)_{33}$ GTG
PfliC	CTAAA	GCTCCCACGCCCGCC	GCCGATAG	$(N)_{99}$ ATG
PfliDSTorfflhX	CTAAA	GTCCTGGTCGGCGAG	GCCGATAT	$(N)_{83}$ ATG
PmotAB-cheA-cheW	CTCAA	GCCGAGTTCATTCCT	GCCGATAT	$(N)_{34}$ GTG
PcheM-mcp	CTCAA	GTTCGTCCACCATTT	GCCGATAA	$(N)_{88}$ ATG
PcheB-(mcp)$_2$-cheYZ	CTAAA	GTTCGACGCCGATCG	GCCGATAT	$(N)_{55}$ ATG
PflgJKL	CTCAA	GTCCCGGCCGCCGCG	GCCGATAA	$(N)_{30}$ ATG
PflaG	CTCAA	GTTTCCACCCCCCCA	TCCGATAA	$(N)_{34}$ ATG

Consenso de $FlhD_4C_2$

			-35		-10
	AATGGCAGAAATAGCG	$(N)_{10-12}$	CGCTATTTCTGCCATTGACA	16-18bp	TATAAT
PflgB	AAAGGGTGGAATTGCTTGGTAATGCGA		GCCTGTTTCCGCCTTTGCCCCGAAAGGCATGCTGTTACTTT		
PflgA	AAAGGCGGAAACAGGCTCGCATTTACCAAGCAATTCCACCCTTTTGTCCCGGCGCCGGACTCCCTAGAAT				

7.3 ANALIZAR LA EXPRESIÓN DE GENES FLAGELARES DE *A. vinelandii*.

7.3.1 La cepa UW 136 de *A. vinelandii* carece de nado por la ausencia flagelos.

Se eligieron algunos de los genes flagelares que se encuentran en el genoma de *A. vinelandii*, para determinar si se están expresando. Los genes que se analizaron son los homólogos a los que se encuentran en los diferentes niveles de expresión de bacterias entéricas (*E. coli* y *S. typhimurium*) y *P. aeruginosa*, los cuales son: *fleQ*, *fleN*, *flhC*, *fliA* y *fliC*. En *P. aeruginosa*, el producto de los genes *fleQ* y *fleN* modulan la expresión de genes flagelares, siendo FleQ un activador transcripcional (fig. 12a) [Arora *et al*., 1997] y FleN inhibe la actividad de FleQ (fig. 12a) [Dasgupta y Ramphal, 2001]. Las proteínas codificadas por el operón *flhC flhD*, son necesarias para activar la biogénesis del flagelo en *E. coli* y *S. typhimurium* (fig. 8) [Macnab, 1996]. El gen *fliA*, codifica para el factor σ^{28} (sigma flagelar) [Starnbach y Lory 1992], el cual se requiere para seguir expresando genes flagelares una vez activada la cascada en bacterias entéricas y *P. aeruginosa*. Por último, el gen *fliC*, codifica para la flagelina y generalmente es de los genes que se expresan al final de los genes flagelares (*P. aeruginosa*, fig. 8; y bacterias entéricas, fig. 10) [Dasgupta *et al*., 2003, Macnab, 1996].

Para analizar la expresión de los genes flagelares *fleQ, fleN, flhC, fliA* y *fliC* de *A. vinelandii* así como la continuación del proyecto se decidió hacerlo con la cepa UW 136, porque es una cepa derivada de la OP y la cepa OP es la que se utilizo para secuenciar el genoma de *A. vinelandii*, la cepa OP también es conocida como UW, CA o ATCC 13705. La cepa UW 136 es una mutante natural que tiene inactivado el gen *algU*, por unas secuencias de inserción IS [Martínez-Salazar *et al*., 1996]. En nuestro laboratorio, para otros estudios, se genero la cepa SW la cual es una derivada de la UW 136, con el gen *algU*$^{+}$ funcional [Moreno datos no publicados], en este trabajo se transfirió la mutación del gen *mucA* a la cepa SW, generando la cepa JWA (datos no mostrados), de esta manera se generaron las cepas equivalentes a las derivadas de la ATCC 9046 (SMU 88, *algU* ; JRA4, *mucA*$^{-}$). Al generar la cepa JWA se realizaron los ensayos de nado para tener los datos que ya se habían obtenido en la cepa ATCC 9046.

En nuestros resultados del ensayo de nado observamos que la cepa mutante en *mucA* (JWA) no nada (fig. 27A), similar a lo que se obtuvo en la cepa JRA4 (Fig. 27A), pero, sorprendentemente notamos que las cepas SW y UW 136 no nadan (fig. 27A), estos últimos datos no eran los esperados, porque la cepa UW 136 tiene inactivado el gen *algU*, en consecuencia carece del factor σ^{E}, por lo tanto se esperaba un comportamiento similar a la cepa SMU 88 (*algU*$^{-}$ derivada de la ATCC 9046) y en la cepa SW se pretendía obtener el fenotipo semejante a la ATCC 9046. Las células de estas cepas se analizaron por microscopia electrónica, para determinar si la inmovilidad era porque sus flagelos no son funcionales o porque carecen de ellos. Los resultados de la microscopía electrónica se muestran en la figura 27B, como se puede observar las tres cepas carecen de flagelo, por lo tanto la cepa UW 136 y en consecuencia las cepas derivadas de esta, son inmóviles por la falta de flagelo, nosotros desconocemos la(s) causa(s) por la cual la cepa UW 136 dejo de generar el flagelo. La cepa UW 136 como ya se menciono es derivada de la OP (UW o CA). En el manual de Bergey´s 2001, se describe a la cepa OP como una bacteria que tiene locomoción, por otra parte, la cepa OP es la que se uso para los estudios de quimiotaxis [Haneline *et al*., 1991]. En lo referente a la cepa UW 136, es ampliamente utilizada para el estudiar la biología molecular de la fijación de nitrógeno, pero no hay reportes sobre la perdida de su locomoción. Estos datos nos muestran el poco o nulo estudio sobre la locomoción de

esta bacteria. Al observar que la cepa UW 136 no presentó locomoción, nos regresamos a trabajar en la cepa ATCC 9046 y sus mutantes isogénicas.

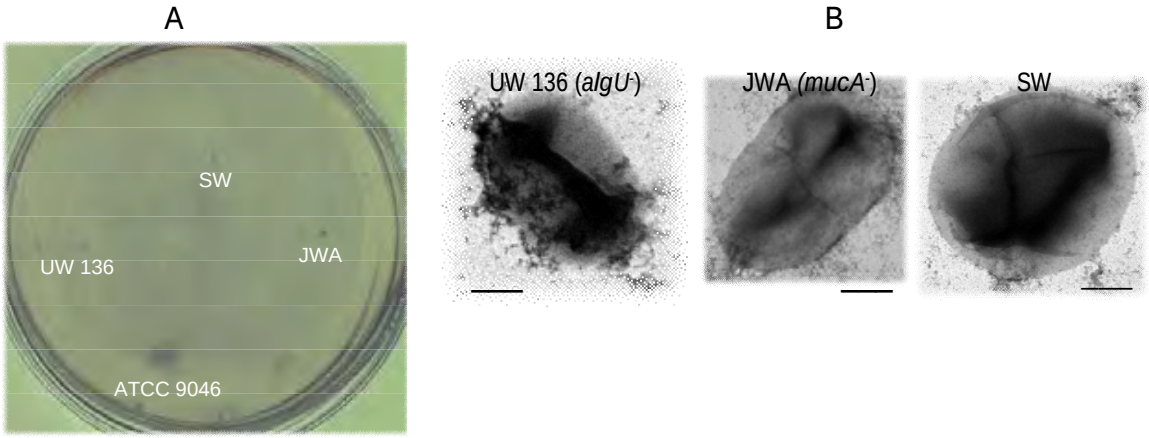


Figura 27. Ensayo de nado y microscopía electrónica de *A. vinelandii* de la cepa UW 136 y sus mutantes isogénicas. A) Nado en medio BS con 0.3 % de agar. B) Microscopía electrónica de las células empleadas en el ensayo de nado. Las cepas que se usaron fueron la UW 136 (*algU*-), SW (UW 136, *algU*+) y JWA (SW, *mucA*-). La barra representa 1 μm.

7.3.2 Los genes flagelares *fleQ*, *fleN*, *flhC*, *fliA* y *fliC* se transcriben en *A. vinelandii*.

El análisis de la expresión de los genes flagelares de *A. vinelandii* se hizo mediante ensayos de RT-PCR, usando RNA total de células vegetativas en fase exponencial (10 hrs), de las cepas ATCC 9046 (silvestre) y SMU88 (*algU*-).

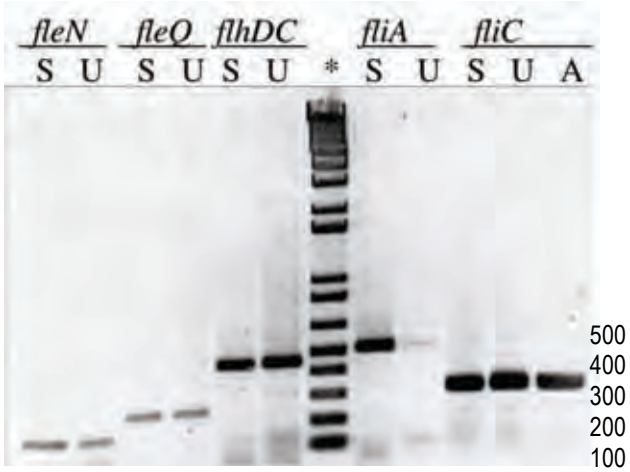


Figura 28. Análisis de expresión de los genes flagelares de *A. vinelandii*. El estudio de la expresión de los genes flagelares se hizo por RT-PCR, los tamaños esperados de los fragmentos son los siguientes: *fleN*-169 pb (carril 1 y 2), *fleQ*-255 pb (carril 3 y 4), *flhC*-456 pb (carril 5 y 6), *fliA*-514 pb (8 y 9), *fliC*-323 pb (carril 10-12).
*Marcador de peso molecular-"1 Kb plus DNA ladder" (carril 7). Cepas ATCC 9046 (S), SMU 88 (U) y JRA4 (A).

Los resultados de este experimento nos mostraron que los genes que desencadenan la expresión de genes flagelares en *P. aeruginosa* y *E. coli* (*fleQ-fleN*, *flhD-flhC*), se transcriben en ambas cepas de *A. vinelandii* (fig. 28), al igual que los genes *fliA*, y *fliC*. Por otra parte en la cepa JRA4 (cepa que no nada; *mucA*$^-$), solo analizamos la expresión del gen *fliC* y también se transcribe (fig. 28), aunque detectamos transcrito del gen *fliC* en la cepa JRA4 (*mucA*) desconocemos si se genera la proteína FliC. Con excepción del gen *fliA*, estos datos no muestran diferencias en la expresión de genes flagelares entre las cepas ATCC 9046 y SMU88, ni en la expresión de *fliC* (en las tres cepas).

Los resultados de RT-PCR, nos muestra que en *A. vinelandii*, los genes flagelares que elegimos se están expresando pero, como no son cuantitativos estos resultados, no nos proporcionan información si el factor σ^E modula la expresión de estos genes, para determinar esto se tendría que realizar fusiones transcripcionales con un gen reportero y cuantificar su expresión en los diferentes fondos genéticos o analizar el problema usando la técnica de RT-PCR tiempo real que es cuantitativo. Por otra parte los resultados de estos experimentos no nos permiten saber si se requiere de uno o de ambos sistemas maestros para iniciar la expresión de genes flagelares en *A. vinelandii*, para contestar esta última interrogante se procedió a mutar genes de ambos sistemas. En esta parte concluimos que:

1.- La cepa UW 136 de *A vinelandii*, carece de nado y de flagelos.

2.- En células vegetativas de *A. vinelandii*, se están expresando los genes flagelares *fleQ*, *fleN, flhC*, *fliA* y *fliC*.

3.- Con análisis de RT-PCR se desconoce si en *A. vinelandii* se requiere de uno o ambos sistemas maestros para iniciar la expresión de genes flagelares.

7.4 MUTACIÓN DE GENES FLAGELARES DE INTERÉS PARA COMPROBAR SU PARTICIPACIÓN EN LA BIOGÉNESIS DEL FLAGELO EN *A. vinelandii*.

7.4.1 La expresión de genes flagelares en *A. vinelandii* es modulado por el sistema FlhD-FlhC y no por FleQ-FleN.

Para determinar cuál de los dos sistemas maestros se requiere para el inicio de la expresión de los genes flagelares en *A. vinelandii*, se procedió a mutar un gen de cada sistema. En el sistema homólogo a *P. aeruginosa* se inactivo el gen *fleQ*, quitándole un fragmento interno de 138pb que se obtiene con *Xho* I y se reemplazo con un "cassette" de resistencia a gentamicina, esto sirvió para generar las mutantes AQ20 (no polar) y AQ21 (polar; véase materiales y métodos), mientras que en el sistema ortólogo a *flhDC*, se muto el gen *flhC*, introduciendo en el sitio *Stu* I, un gen que codifica para la resistencia a tetraciclina, con esto se generaron posteriormente las cepas AC30 (no polar) y AC31 (polar; véase materiales y métodos). El ensayo de nado de las mutantes en *fleQ* de *A. vinelandii*, se hizo en medio de crecimiento vegetativo (BS), el resultado nos mostró que ambas mutantes siguen nadando, el tamaño del halo es muy similar a la cepa parental (fig. 29A). Por otra parte, en los resultados de microscopia electrónica de las mutantes en *fleQ* (fig. 29B), no se aprecian diferencias en el numero de flagelos de estas con respecto a la cepa parental (fig. 29B). Si FleQ participara en la regulación de genes flagelares en *A. vinelandii*, al mutar este gen, el numero de flagelos y/o el nado de estas mutantes tendría que disminuir o abatirse. Sin embargo, estos datos nos muestran que en *A. vinelandii*, FleQ no controla la expresión de genes flagelares, al menos en las condiciones que estudiamos aquí, que es el estado vegetativo.

En las mutantes en *flhC* de *A. vinelandii*, el ensayo de nado también se hizo en medio BS. En el resultado se puede apreciar que las cepas AC30 y AC31 no nadan en agar suave

(fig. 30A), además en la microscopía electrónica de estas mutantes, se observa que las células carecen de flagelo (fig. 30B). En otras bacterias donde la expresión de genes flagelares, también es modulada por FlhDC, se ha demostrado que estas proteínas para que puedan activar la transcripción de genes flagelares, se requiere que formen heteromultimeros ($FlhD_4C_2$), si falta una de estas proteínas, no se pueden expresar los genes flagelares. El activador transcripcional ($FlhD_4C_2$) actúa junto con el factor σ^{70} para iniciar la expresión de genes flagelares. Estos resultados nos muestran que el sistema maestro que inicia la expresión de la cascada de genes flagelares en *A. vinelandii* es FlhD-FlhC.

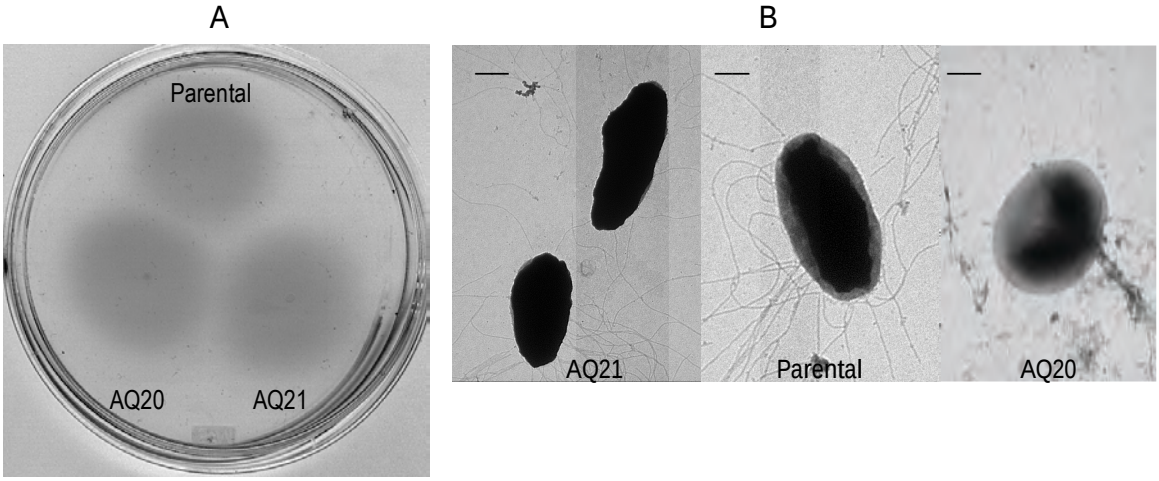


Figura 29. Ensayo de nado y microscopía electrónica de las mutantes en *fleQ* de *A. vinelandii*. A) Placa del ensayo de nado de la cepa parental y las mutantes en *fleQ*, AQ20 (*fleQ*::Gm no polar), AQ21 (*fleQ*::Gm polar), en medio BS con 0.3 % de agar. B) Microscopía electrónica de las mutantes en *fleQ* de *A. vinelandii*. La barra representa 1 μm.

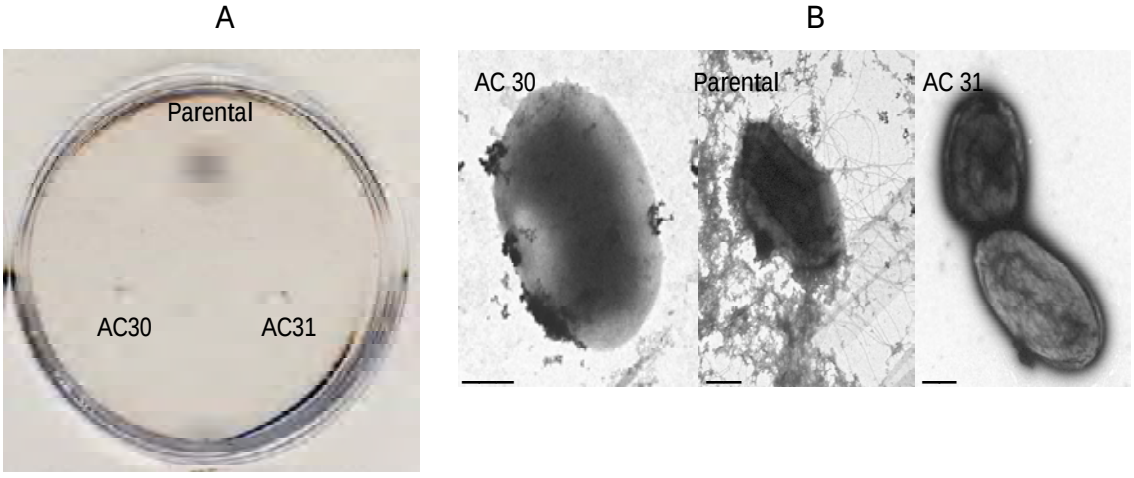


Figura 30. Ensayo de nado y microscopía electrónica de las mutantes en *flhC* de *A. vinelandii*. A) Placa del ensayo de nado de la cepa parental y las mutantes en *flhC*, AC30 (*flhC*::Tc no polar), AC31 (*flhC*::Tc polar), en medio BS con 0.3 % de agar. B) Microscopía electrónica de las mutantes en *flhC* de *A. vinelandii*. La barra representa 1 μm.

7.4.2 Los genes *flhDC* de *A. vinelandii* complementan el fenotipo de nado de la mutante en *flhC* y forman un operón.

Los genes *flhD* y *flhC* de *A. vinelandii* pueden estar formando un operón, estos genes se encuentran sobrelapados por dos nucleótidos entre el codón de paro de FlhD y el codón de inicio de FlhC, en los extremos de estos genes hay regiones intergénicas. Hacia arriba de *flhDC*, hay un espacio de 228 pares de bases entre el codón de paro de FlhX y el codón de inicio de *flhD*, además 74 nucleótidos antes del codón de inicio de FlhD hay unas secuencias consenso de un posible promotor dependiente del factor σ^{70} (tabla VII), por el otro lado, entre el codón de paro de FlhC y el codón de inicio de MotA existe una región de 147 bases y 34 nucleótidos antes del codón de inicio de MotA existen las secuencias de un posible promotor dependiente del factor sigma σ^{28}, (FliA; tabla VII), esto nos sugiere que los genes *flhDC* se están expresando en forma de operón bicistrónico y podrían depender del factor σ^{70} para el inicio de su transcripción. Para verificar que la pérdida de nado en las mutantes en *flhC* fue causado únicamente por la ausencia de la proteína FlhC, y para confirmar que el operón *flhDC* de *A. vinelandii* es funcional, se transfirieron por cruza triparental, los plásmidos pLRGm y PLRGm-DC a la cepa AC30, generándo las cepas AC30/Gm y AC30/DC respectivamente. En los ensayos de nado de estas cepas se observa que la cepa AC30/DC recupera el nado (fig. 31), mientras que la cepa AC30/Gm sigue inmóvil (fig. 31). La cepa AC30/DC contiene el plásmido pLRGm-DC el cual porta los genes *flhDC* con su secuencia promotora, por su parte la cepa AC30/Gm porta únicamente el vector donde fue clonado el operón *flhDC*, con estos datos podemos decir que la inmovilidad de la cepa AC30 se debe a la falta de la proteína FlhC y aunque en esta cepa se produce FlhD, no es suficiente para iniciar la transcripción de los genes flagelares, indicando que también funciona como un heteromultímero como ya se tiene reportado para otras especies. Por otra parte al complementar con el plásmido pLRGm-DC y reestablecer el fenotipo de nado en la cepa AC 30, estamos aportando evidencias de que los genes *flhDC* son funcionales y se transcriben como un operón bicistrónico.

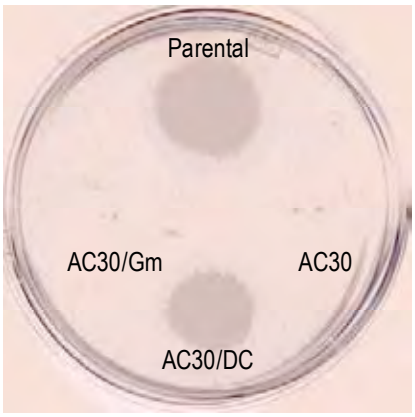


Figura 31. Complementación de la cepa AC 30 con los genes *flhDC* de *A. vinelandii*. Placa del ensayo de nado de las cepas: parental, AC 30 (*flhC*$^{-}$), AC 30/Gm (vector donde se clonaron los genes *flhDC*) y AC 30/DC (AC 30 complementada con los genes *flhDC* de *A. vinelandii* con su propio promotor), en medio BS con 0.3% de agar.

7.4.3 En las zonas de regulación de los genes flagelares no presentan promotores dependientes de σ^{54} y el NH_4 inhibe el nado en *A vinelandii*.

La hipótesis de que en *A. vinelandii*, en alguna fase de su ciclo de vida, la expresión de genes flagelares también pudiera ser regulada por el sistema FleQ-FleN, es porque está relacionada filogenéticamente con *P. aeruginosa* [Reiders *et al*., 2004], y FleQ es el regulador positivo de la biogénesis del flagelo en esta última bacteria, mientras que FleN es un regulador negativo de FleQ. Además el porcentaje de identidad de FleQ y FleN entre *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* es de 64 % y 71 % respectivamente, por lo que existía la pregunta si el sistema FleQ-FleN de *A. vinelandii* puede estar modulando la expresión de genes flagelares en condiciones distintas al crecimiento vegetativo (por ejemplo al germinar los quistes). En *P. aeruginosa* y *Rhodobacter sphaeroides*, se ha observado que el activador transcripcional FleQ (de la familia NtrC), actúa en conjunto con σ^{54} para expresar los genes flagelares [Totten *et al*, 1990; Jyot *et al*, 2002; Poggio *et al*, 2002]. Aunque no hay una clara secuencia consenso para la unión de FleQ, en los genes flagelares de estas bacterias, sin embargo, si se conocen las secuencias consenso de promotores dependientes de σ^{54}, las cuales son YTGGCACGr NNN TTG CW, se inspeccionaron ocularmente las secuencias de las regiones intergénicas de los genes flagelares de *A. vinelandii*, para buscar posibles promotores dependientes de σ^{54}.

En el resultado de este análisis, no se encontró ningún promotor de esta naturaleza. Como ya se ha mencionado, en bacterias donde el regulador maestro del sistema flagelar es FleQ, también se requiere del factor σ^{54}, en consecuencia cuando se muta el gen que codifica para el factor σ^{54}, las células carecen de nado, tal como sucede en *P. aeruginosa* [Totten *et al*, 1990; Jyot *et al*, 2002] y *Rhodobacter sphaeroides*, aunque en esta última bacteria hay cuatro copias del gen que codifica para este sigma, solo la copia que se localiza hacia abajo del gen *fliC* (*rpoN2*), es la encargada de activar la transcripción de los genes flagelares y no puede ser substituida por los otros activadores [Poggio *et al*, 2002]. En nuestro laboratorio se tiene la mutante en σ^{54} (*rpoN*$^{-}$) [Gama-Castro *et al*., 2001], por lo que se procedió a hacer un ensayo de nado de esta mutante, esta cepa no puede fijar nitrógeno, por lo que se tiene que crecer en un medio suplementado con amonio (NH_4). Los ensayos de nado se hicieron en medio CM suplementado con NH_4Cl 10mM. En el resultado del ensayo de nado se observa que la mutante en *rpoN* de *A. vinelandii*, no nada y que la cepa silvestre (ATCC 9046) tampoco nada (fig. 32). Este experimento nos muestra que la ausencia del nado en la mutante *rpoN*, no es por la falta de actividad del factor σ^{54} exclusivamente, la ausencia de nado es por la presencia del amonio, porque tanto la cepa *rpoN*$^{-}$ como la silvestre carecen de nado en presencia de este compuesto. Estos datos sugieren que, en *A vinelandii*, el nado puede ser inhibido por el NH_4. Si en *A. vinelandii* al mutar el gen *fleQ*, no afecta parcial o totalmente el nado, ni el numero de flagelos. Si no se encontraron posibles promotores dependientes de σ^{54} en las regiones intergénicas de los genes flagelares. Además de que los genes *fleQ* y *fleN* se encuentran en un contexto donde no hay genes flagelares, nos sugiere que en *A. vinelandii*, los genes flagelares no pueden ser modulados (al menos directamente) por el sistema FleQ-FleN en ninguna fase del ciclo de vida de esta bacteria, sólo el sistema maestro $FlhD_4C_2$ estaría regulando la expresión de los genes flagelares. Es importante mencionar que los genes *fleQ* y *fleN* de *A. vinalandii*, codifican para proteínas funcionales, esto se determino al expresarlos de manera ectopica en *P. aeruginosa*. Al sobreexpresar el gen *fleQ* de *A. vinelandii*, en la cepa PAO1 de *P.*

aeruginosa, los halos de nado son mayores y la mayoría de las células presentaron más de un flagelo, comparados con el control (PAO1) [Rosas, 2008]. Por otra parte, la sobreexpresión de FleN de *A. vinelandii*, en la PAO1 de *P. aeruginosa*, tiene un efecto parcial en la inhibición del nado y generación de flagelo [Rosas, 2008]. Si los genes *fleQ* y *fleN* de *A. vinelandii* generan proteínas funcionales y no están regulando genes flagelares, seria interesante investigar: ¿Qué gen(es) regula el sistema FleQ-FleN en esta bacteria?. Conclusiones en esta parte:

1) En *A. vinelandii* el sistema maestro que inicia la transcripción de genes flagelares es FlhDC y no FleQ.
2) Los genes *flhDC* de *A. vinelandii*, forman un operón.
3) Los genes *fleQ* y *fleN* de *A. vinelandii*, afectan el nado y la biogénesis del flagelo en *P. aeruginosa*.
4) El NH_4 reprime el nado en *A. vinelandii*.

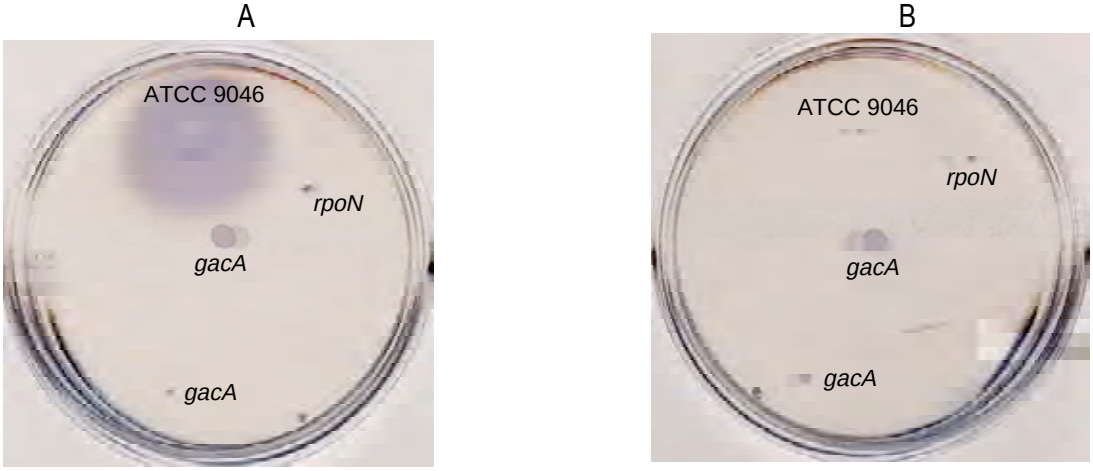


Figura 32. Efecto de la mutación de *rpoN* en el nado de *A. vinelandii*. Ensayo de nado en medio CM con (A) y sin (B) NH_4Cl 10 mM de las mutantes en *rpoN* y *gacA*, así como de la cepa parenta.

7.5 POSIBLE MECANISMO POR EL CUAL EL FACTOR σ^E (AlgU) REGULA LA EXPRESIÓN DE LOS GENES FLAGELARES EN *A. vinelandii*.

7.5.1 El factor σ^E afecta la expresión del operón *flhDC* en *A. vinelandii*.

Para explorar de que manera el factor σ^E, afecta la expresión de genes flagelares en *A. vinelandii*, y una vez que se determino que FlhDC es el sistema maestro que controla la cascada de expresión de genes flagelares en esta bacteria, se procedió a analizar si el factor σ^E tiene un efecto en la expresión de los genes *flhDC*. Esto se hizo mediante un experimento de "Northern blot" con las cepas ATCC 9046, SMU 88 y JRA4, usando RNA de células que se crecieron en medio BS por 8 hrs (fase exponencial), como sonda se utilizo un fragmento interno de 456 pb del gen *flhC*. En los resultados del Northern blot, observamos una banda de alrededor de 1,100 bases en la cepa silvestre (ATCC 9046 fig. 33A, carril 1) y la mutante *algU* (SMU 88; fig. 33A, carril 2) pero, en la mutante en *mucA* (JRA4) no detectamos señal de la expresión de los genes *flhDC* (fig. 33A, carril 3). Aunque en el experimento de "Northern blot" se ve claramente un efecto negativo del factor σ^E sobre la transcripción de los genes *flhDC*, se procedió a cuantificar la expresión de *flhDC* en estas cepas mediante un experimento de RT-PCR cuantitativo (PCR tiempo real), para este experimento se uso RNA de células vegetativas colectadas a las 10 horas. Como se puede ver en la figura 33B, la expresión de *flhDC* en la cepa SMU88 es 50 % más que en la cepa parental, mientras que en la cepa

JRA4 la expresión no es significativa. Estos experimentos nos aportan evidencias de que el factor σ^E esta regulando de manera negativa la transcripción de los genes maestros del sistema flagelar (*flhDC*) de *A. vinelandii*, por que en la cepa JAR4 que carece del antisigma (la cual no nada, ni tiene flagelos), no se están expresando los genes maestros, mientras que en la mutante *algU* (que carece del factor σ^E), estos genes se expresan un 50 % mas que en la cepa silvestre. Estas dos últimas cepas tienen flagelos y nadan. Por otra parte estos resultados confirma lo que ya se había observado en los experimentos de RT-PCR, que el gen *flhC* se expresa en *A vinelandii* (fig. 28, carriles 5 y 6). Por otra parte el experimento de "Northern blot" nos confirma que los genes *flhDC* de *A vinelandii*, forman un operón bicistronico porque el tamaño del transcrito es de aproximadamente 1, 100 bases, ese tamaño corresponde a la suma de los genes *flhD* y *flhC* más la región de regulación.

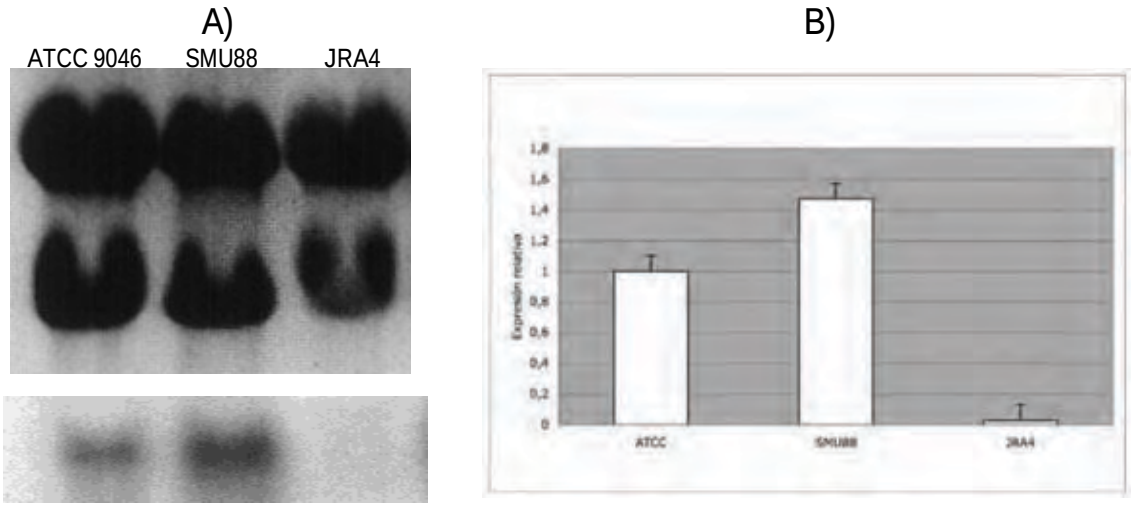


Figura 33. Efecto del factor σ^E en la expresión del gen *flhC* de *A. vinelandii*. A) Northern blot, en la parte superior se muestra el gel de la electroforesis de RNA y en la parte inferior la membrana de hibridación. B) RT-PCR cuantitativo. El RNA fue de células cultivadas en medio BS por 8 y 10 hrs respectivamente, las cepas que se usaron fue la parental (ATCC 9046) y las mutantes isogénicas *algU* (SMU88) y *mucA* (JRA4).

Después de observar que la expresión de los genes maestros *flhDC* de *A. vinelandii*, son afectados por el factor σ^E, surge la pregunta: ¿Cómo reprime el factor σ^E la expresión de los genes *flhDC* en *A. vinelandii*?. En *A. vinelandii* se encuentra el gen homólogo a *amrZ* (fig. 26), el producto de este gen tiene un 84 % de identidad con el de *P. aeruginosa*, además en la secuencia de regulación de *amrZ*, hay dos posibles promotores del factor σ^E, pero el sistema maestro de *A. vinelandii*, es FlhDC y no FleQ como en *P. aeruginosa*, por otra parte en la región de regulación de los genes *flhDC* de *A. vinelandii*, no estan presentes las secuencias de unión a AmrZ, por lo que el intermediario de la represión de los genes flagelares en *A. vinelandii*, puede ser un represor diferente a AmrZ.

7.5.2 En la región de regulación del operón *flhDC* de *A. vinelandii* se presentan las secuencias consenso para los factores σ^{32}, σ^{70} y el represor CydR (Fnr).

Para identificar los elementos que pudieran estar regulando negativamente, la expresión del operón *flhDC* y por lo tanto la biogénesis del flagelo en *A. vinelandii*, se realizo un análisis en "*silico*" de la región de regulación de este operón (228 pb). Para buscar secuencias canónicas de DNA, en el cual se

puedan unir proteínas de regulación conocidas, se empleó el programa SoftBerry (www.softberry.com).

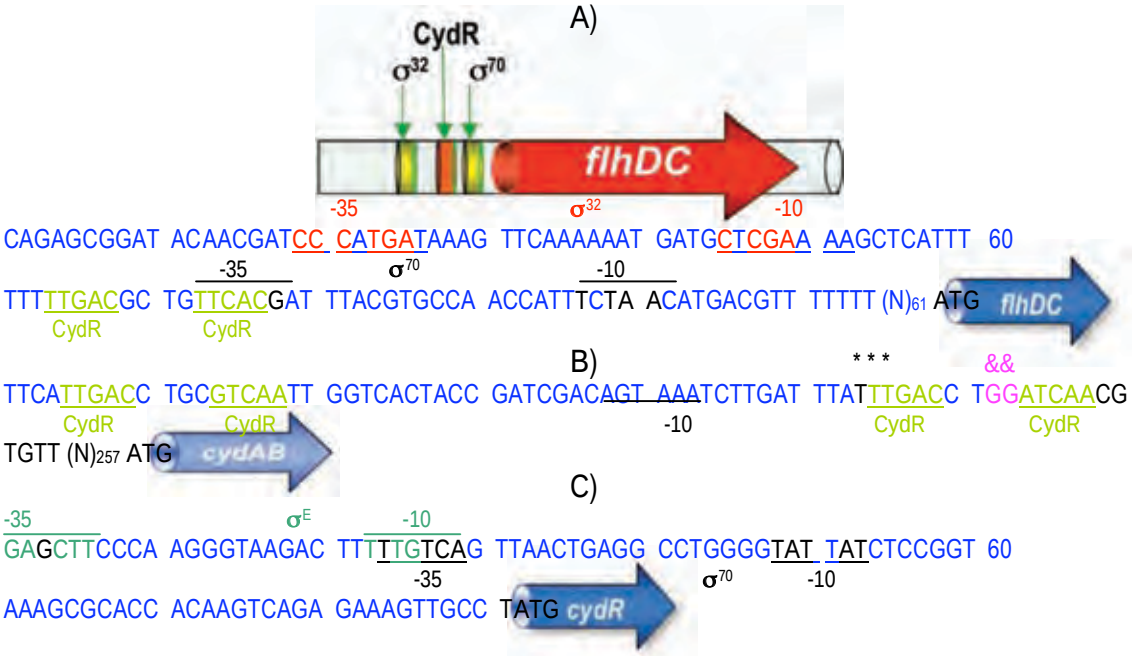


Figura 34. Elementos que pueden estar regulando al operón *flhDC* y al gen *cydR* de *A. vinelandii*. A) El operón *flhDC* de *A. vinelandii*, presenta secuencias consenso para la unión de los factores σ^{70}, σ^{32} (RpoH) y el represor FnR (CydR), datos obtenidos con el programa strawberry. B) Secuencia de la región líder del operón *cydAB* de *A. vinelandii*, mostrando los sitios de unión a CydR y los inicios de transcripción determinados por Wu *et al.*, 2000 (*) y por Moshiri *et al.*, 1991 (&). C) Secuencia de DNA de la región de regulación del gen *cydR* de *A. vinelandii*, presentando las cajas canónicas de los posibles promotores de σ^{E} y σ^{70}. Secuencias consenso: σ^{32} (RpoH) CCCTTGAA $(N)_{13/15}$ CCCGATNT, σ^{70} TTGACA $(N)_{16/18}$ TATAAT, σ^{E} GAACTT $(N)_{16/17}$ TCTGA, CydR TTGAC $(N)_4$ PuTCAA.

Sitios de pegado de CydR en genes de *A. vinelandii*:

*cydAB*1	**TTGAC** CTGC **GTCAA**
*cydAB*2	**TTGAC** CTGG **ATCAA**
flhDC	**TTGAC** GCTG **TTCAC**
Fnr (*E. coli*)	**TTGAC** $(N)_4$ **ATCAA**

El resultado de este análisis mostro que, en la zona de regulación del operón *flhDC* de *A. vinelandii*, hay secuencias consenso para la unión de las proteínas RpoH (σ^{32}) y FnR (fig. 34). De estas, la que fue candidata a reprimir este operón, fue FnR. FnR ("*f*umarate and *n*itrate *r*eduction regulator"), es homóloga a CRP, constituyendo una familia de reguladores transcripcionales conocidos como CRP-FNR, en el C-terminal tiene el motivo hélice-vuelta-hélice para la unión a DNA. Cuando crece *E. coli* en condiciones anaeróbicas, Fnr reprime la transcripción de los genes *cydAB*, que codifican para el citocromo d oxidasa. [Tseng *et al.*, 1996]. En *A. vinelandii* existe una proteína homóloga a FnR, se conoce como CydR ("*r*egulation of the *cyd* operon"). Esta proteína tiene un 53 % de identidad con FnR. El gen *cydR* de *A. vinelandii*, está a 1 000 pb hacia arriba del operón *cydAB* [Wu *et al.*, 1997], y se ha demostrado que CydR, reprime la transcripción de los genes *cydAB* como ocurre en *E. coli*. En *A. vinelandii* los genes *cydAB*, también codifican para el citocromo *bd*, el cual se necesita para la fijación de nitrógeno en crecimiento aeróbico [Wu *et al.*, 2000]. Las secuencias de unión a CydR que están en la región de regulación de los genes *cydAB* (fig.

34B), son muy similares a las que estan en la zona de regulación del operón *flhDC* (fig. 34A), incluso la caja de pegado de CydR en *flhDC* se traslapa con la región -35 de un posible promotor dependiente de σ^{70} (fig. 34A), parecido a lo que sucede en el operón *cydAB*. Aunque en el operón *cydAB*, no hay una región -35 clara para σ^{70}, pero por los inicios de transcripción que se han determinado por "primer extension" [Wu *et al.*, 2000] y por ensayos de protección de ribonucleasa [Moshiri *et al*., 1991], se deduce que las cajas de CydR están cerca del promotor (fig.134B). Por otra parte, al revisar la secuencia de la región de regulación del gen *cydR* de *A. vinelandii*, observamos que en esta región existe un posible promotor dependiente del factor σ^E (AlgU) (fig. 34C; tabla VIII). Estos datos sugieren que CydR es el intermediario del factor σ^E para reprimir la expresión del operón de los genes maestros *flhDC*. Para apoyar esta hipótesis se procedió a analizar, el papel del factor σ^E, en la expresión de *cydR* y mutar al gen *cydR* para ver su efecto en el nado de *A. vinelandii*.

Tabla VIII. Promotores dependientes del factor σ^E (AlgU) en *A. vinelandii*.

	-35		-10	+1
Consenso	**GAACTT**	16/17pb	**TCTGA** 5/6 nt	
algC[a]	**GAACTC** CGCGCCGTCCCGGCCA		**TCCAA** TCTGG	CGG(N)$_{138}$ ATG
#*algU*[b]	**GAACTT** TTGCTTAATACCCATG		**TCAATGA**	AAACA(N)$_{52}$ ATG
#*cydR*	**GAGCTT** CCCAAGGGTAAGACTT		**TTTGT**CAGTTAACTG	(N)$_{65}$ATG
amrZ P1	**CAACTG** CATGCGATTAATCGAT		**TCAGA**	(N)$_{99}$ ATG
amrZ P2	**GAACCA** CTTCAGCAAGACGAGG		**TCATA**	(N)$_{58}$ ATG

[a]Gaona *et al*., 2004; [b]Núñez *et al*., 2000

7.5.3 El factor σ^E (AlgU) regula la expresión del gen *cydR* de *A. vinelandii*.

Para determinar si el factor σ^E tiene un efecto en la expresión del gen *cydR* de *A. vinelandii*, se hizo un "Northern blot", usando RNA de células cultivadas por 37 hrs en medio BS liquido, de las cepas ATCC 9046, SMU 88 y JRA4, como sonda se utilizo una región interna de 496 pb del gen *cydR*. En los resultados de este experimento (fig. 35A), se puede observar una banda de aproximadamente 1000 bases en la cepa ATCC 9046 (Silvestre; fig. 35A, carril 1) y la JRA4 (*mucA*$^-$; fig. 35A, carril 3), mientras que la expresión de *cydR* está significativamente reducida en la cepa SMU 88 (*algU*$^-$; fig. 35A, carril 2).La cuantificación de la expresión de *cydR* en estas tres cepas se hizo por RT-PCR cuantitativo, este ensayo confirma que, en la cepa JRA4 (*mucA*$^-$) se expresa mas que en la cepa silvestre, siendo cuatro veces mayor, mientras que en la mutante en *algU* solo se expresa un 15% comparado con la cepa silvestre (fig 35B). Tanto las secuencias del posible promotor dependiente del factor σ^E en la región de regulación del gen *cydR*, como estos resultados, sugieren que, el factor σ^E modula la expresión del gen *cydR* de *A. vinelandii*. Si en *A. vinelandii*, el factor σ^E regula positivamente la expresión de *cydR* y en la región promotora del operón *flhDC* hay unas secuencias de unión a CydR, nosotros proponemos que al mutar el gen *cydR* en la cepa silvestre, el halo de nado aumente, posiblemente al mismo nivel o mas que la cepa SMU 88, por su parte la mutación del gen *cydR* en la mutante en *mucA*, se espera que recupere el fenotipo de nado.

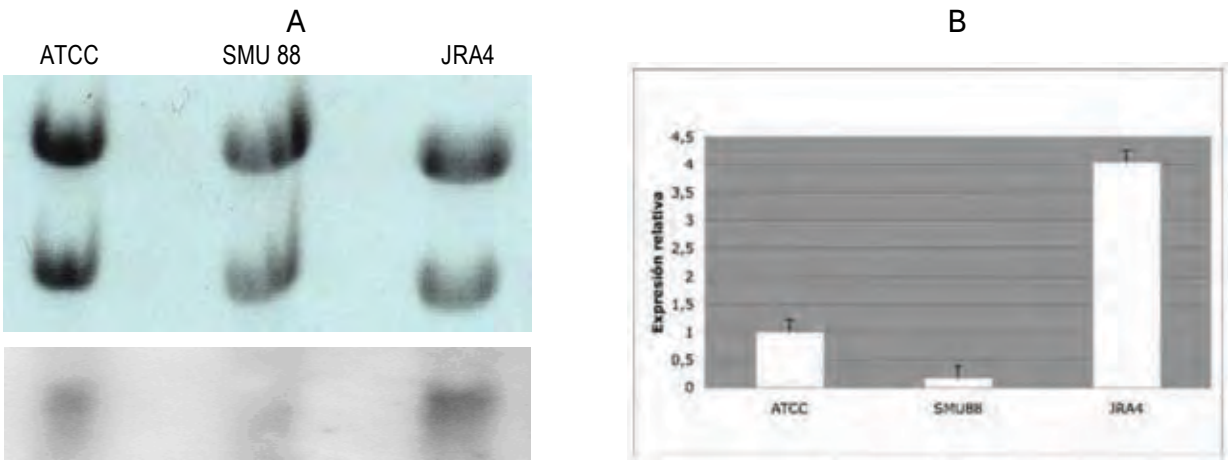


Figura 35. Efecto del factor σ^E en la expresión del gen *cydR* de *A. vinelandii*. A) "Northern blot", en la parte superior se muestra el gel de electroforesis del RNA y en la parte inferior la membrana de hibridación. B) RT-PCR cuantitativo. El RNA fue de células cultivadas en medio BS por 37 hrs en ambos experimentos, las cepas que se usaron fueron la parental (ATCC 9046) y las mutantes en σ^E (SMU88) y en el anti-σ^E (JRA4).

7.5.4 CydR regula negativamente el nado en *A. vinelandii*.

En nuestro laboratorio, ya se había inactivado el gen *cydR* de *A. vinelandii*, con el gen de la β-glucoronidasa y el gen de resistencia a gentamicina (fig. 23), por lo que utilizamos esta construcción (plásmido pCYDR), para mutar el gen *cydR* en la cepa ATCC 9046 y en la mutante *mucA*, a través de un evento de doble recombinación homóloga. Para la mutante *mucA* (JAR4), que se venia trabajando, tenia interrumpido el gen *mucA*, con el gen de resistencia a gentamicina, el mismo que se uso para interrumpir al gen *cydR*, por lo que se genero otra mutante en *mucA*, con el gen de resistencia a kanamicina, generando la cepa SRA4 (véase materiales y métodos). La cepa que obtuvimos con la mutación en el gen *cydR* derivada de la ATCC 9046 de *A. vinelandii* la nombramos ATCR (fig. 23), esta mutante crece muy poco en medio BS. Sin embargo, la mutante de *cydR* en la cepa SRA4 no se logro obtener, debido posiblemente a que la doble mutación (*mucA* y *cydR*), no es viable.

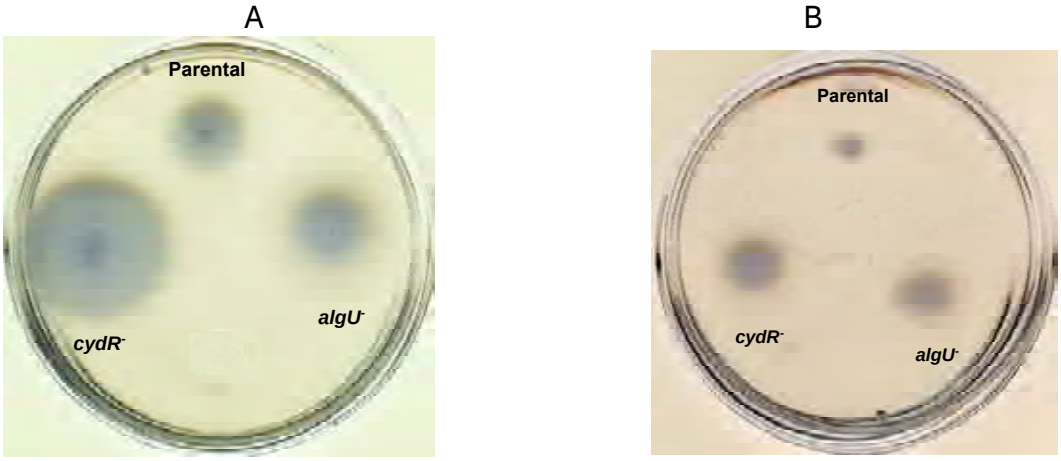


Figura 35. Efecto de la mutación del gen *cydR* en el nado de *A. vinelandii*. Ensayo de nado de la cepa parental y sus mutantes isogénicas ATR (*cydR*-) y SMU 88 (*algU*-), en el medio: vegetativo BS (A) y de inducción al enquistamiento Burk-Butanol (B), ambos medios con 0.3 % de agar.

En los resultados del ensayo de nado podemos observar que, la cepa ATCR (*cydR*-), tiene un halo de nado mayor que la cepa silvestre, siendo similar al de la cepa SMU 88 (Fig. 36A). En el medio de enquistamiento (B-OH), la mutante en *cydR* sigue presentando nado al igual que la cepa SMU 88, mientras que la cepa silvestre (ATCC 9046) como ya se ha demostrado, en este medio lo pierde (Fig. 36B).

Estos datos nos muestran que CydR tiene un efecto negativo sobre el nado de *A. vinelandii*. La presencia de secuencias consenso para la unión de CydR en el operón *flhDC*, la existencia de un posible promotor de σ^E en el gen *cydR*, y por otra parte, el efecto positivo de σ^E en la expresión de *cydR* y negativo en el operón *flhDC*; además el efecto negativo de CydR sobre el nado, son datos que sugieren que en *A. vinelandii*, el factor σ^E transcribe al gen *cydR*, después la proteína CydR va y se une a la región de regulación del operón *flhDC*, evitando así, que se transcriba el operón *flhDC*, en consecuencia esta bacteria carece de nado (fig. 37).

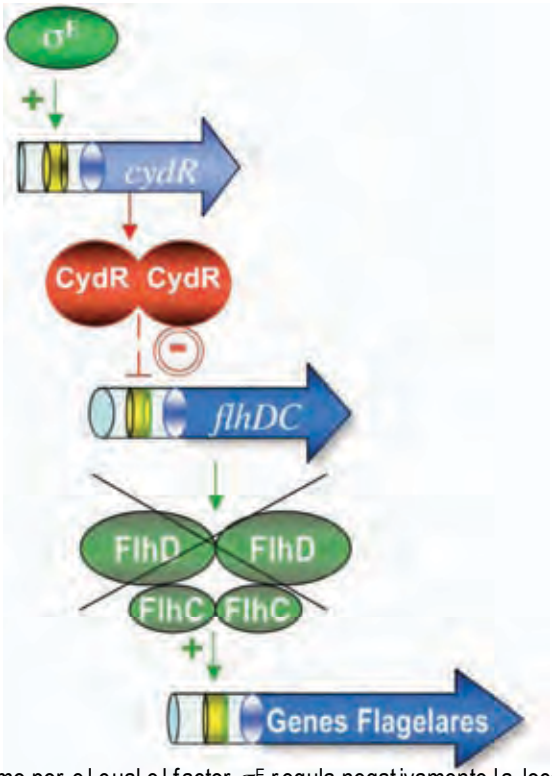


Figura 37. Propuesta del mecanismo por el cual el factor σ^E regula negativamente la locomoción de *A. vinelandii*. El factor σ^E participa en la activación de la transcripción del gen *cydR*, después CydR se une en la región de regulación del operón *flhDC*, evitando así la transcripción de los genes maestros del sistema flagelar de esta bacteria.

La perdida del flagelo y de la capacidad para la fijación de nitrógeno que se observa en la inducción del enquistamiento [Sadoff 1975; Hitchins y Sadoff 1973], ahora puede ser explicado a nivel molecular, esto se debe al efecto negativo de CydR sobre la expresión de los genes *cydAB* y *flhDC*. Los datos de este trabajo y de los que existen en la literatura, indican la presencia de una cascada de regulación, donde σ^E (AlgU) está por encima de CydR, el cual a su vez actúa como represor de la expresión de *flhDC*. Un modelo de la cascada de regulación de AlgU-CydR para el control de la síntesis de

alginato, la biogénesis del flagelo, respiración y fijación de nitrógeno en el proceso de enquistamiento de *A. vinelandii* se muestra en la figura 38. Además de estas dos bacterias en *S. enterica* también se regula inversamente la síntesis de exopolisacaridos y la locomoción. En *S. enterica* el gen *igaA*, codifica para un regulador pleiotropico que controla de manera positiva al operón *flhDC* e inhibe la expresión de los genes *wca* involucrados en la síntesis de acido colánico [Cano *et al*., 2002]. Mutaciones en *igaA* activa los genes del sistema de regulación de dos componentes (RscB-RscC), el cual a su vez reprime la expresión del operón *flhDC*, y desreprime los genes *wca*, generando células mucoides y no móviles. Aquí también se muestra que otro elemento que está regulando la locomoción en *A. vinelandii*, es GacA, un regulador global. GacA es un regulador de respuesta que pertenece a un sistema de dos componentes [Castañeda *et al*., 2001]. GacA modula de manera positiva la locomoción de *A. vinelandii* (fig. 32), aunque desconocemos el mecanismo por el cual lo hace. GacA y sus ortólogos, uno de los primeros eventos que han regulado en su historia evolutiva, es la locomoción, posteriormente fue modulando otros sistemas, como el metabolismo secundario y en el caso de bacterias patógenas, algunos agentes de virulencia [Goodier y Ahmer 2001].

El factor σ^E es un elemento en común, en la regulación de la locomoción y síntesis de alginato en *A. vinelandii* y *P. aeruginosa*, regulando de manera negativa la locomoción y positiva la síntesis de alginato, pero hay una diferencia en el intermediario que utiliza este factor sigma, para reprimir la generación de flagelo en estas bacterias, siendo CydR para *A. vinelandii* y AmrZ para *P. aeruginosa*. A su vez, los blancos que reprimen, también son diferentes, el cual es *flhDC* para *A vinelandii* y *fleQ* en *P. aeruginosa*. Estas diferencias pueden ser explicadas por la necesidad de *A. vinelandii* para coordinar la pérdida de las funciones como locomoción, alta tasa de respiración y fijación de nitrógeno que ocurren cuando se induce el enquistamiento, proceso que no presenta el genero *Pseudomonas*. Entre *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* en la síntesis de alginato, también existen diferencias en la activación de los genes estructurales por parte de σ^E, en *P. aeruginosa* σ^E requiere de AmrZ y de AlgR para activar al gen *algC* y el operón *algD* (donde estan todos los genes estructurales), AlgR es un regulador de respuesta que pertenece a un sistema de dos componentes. Por su parte en *A. vinelandii*, el factor σ^E no requiere de AlgR para activar la transcripción del gen *algC*, y al gen *algD* parece que lo transcribe indirectamente pues no contiene las secuencias consenso de este sigma.

VIII. CONCLUSIONES

1.- En *A. vinelandii* el "swarming" está ausente en las condiciones que probamos.

2.- En *A. vinelandii* el nado ("swimming") se presenta en medios mínimos pero no en medios ricos como PY.

3.- El factor σ^E inhibe la locomoción de células vegetativas y en células que se inducen al enquistamiento de *A. vinelandii*.

4.- La cepa UW 136 de *A vinelandii*, carece de flagelos y en consecuencia es no móvil.

5.- En *A. vinelandii* existen aproximadamente 61 genes flagelares, entre los cuales estan los homólogos a los reguladores maestros de *E. coli* (*flhDC*) y *P. aeruginosa* (*fleQ*).

6.- En *A. vinelandii* solo el sistema FlhDC y no FleQ es el que regula la transcripción de genes flagelares.

7.- El factor σ^E activa la transcripción del gen *cydR* en *A. vinelandii*.

8.-CydR regula negativamente la expresión de los genes *flhDC* en *A. vinelandii*.

9.- En *A. vinelandii* el nado es regulado negativamente por NH_4 y positivamente por GacA.

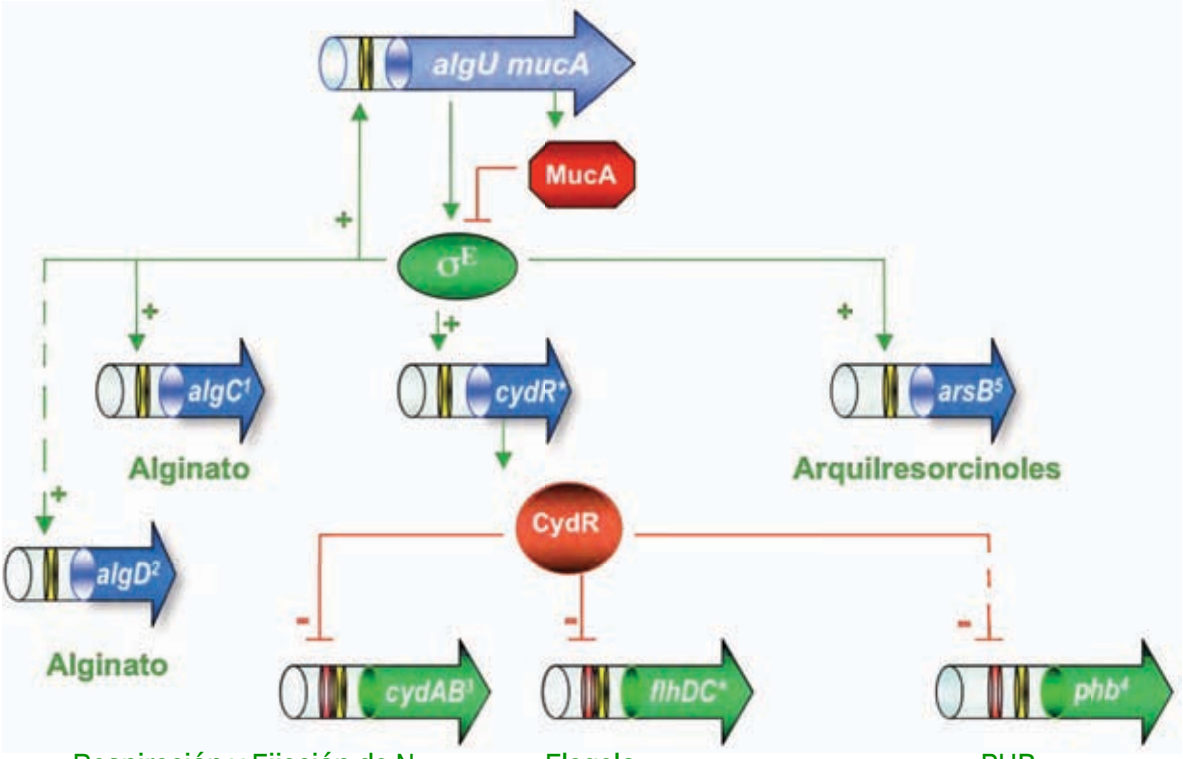


Figura 38. Sistemas que regula el factor σ^E de *A. vinelandii*. El factor σ^E regula positivamente la transcripción de los genes estructurales del alginato (*algD* y *algC*), y al gen *cydR*. A su vez CydR, regula negativamente la expresión de los operones *flhDC*, *cydAB* y la síntesis de PHB. El gen *arsB* que participa en la producción de alquilresorcinoles, tiene las secuencias consenso de un promotor dependiente del factor σ^E.

*Propuesta de este trabajo; [1]Gaona *et al*., 2004; [2]Campos *et al*., 1996; [3]Wu *et al*., 2000.; [4]Wu et al., 2001; [5]Vite 2003.

IX. PERSPECTIVAS.

1.- Confirmar que el posible promotor dependiente σ^E del gen *cydR*, sea funcional.

2.- Determinar si CydR se pega en la región de regulación del operón *flhDC*.

3.- Identificar la(s) señal(es) que modulan la actividad de AlgU.

4.- Buscar genes que sean regulados por FleQ

REFERENCIAS.

A

Ades S. E. 2004. Control of the alternative sigma factor σ^E *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol*. 7(2):157-62.

Ades S. E. Connolly L. E., Alba B. M. and Gross C. A. 1999. The *Escherichia coli* σ^E-dependent extracitoplasmic response is controlled by the regulated proteolysis o fan anti-sigma factor. *Genes Dev*. 13: 2449-61.

Alba B. M., Zhong H. J. and Gross, C. A. 2001. degS (hhoB) is an essential *Escherichia coli* gene whose indispensable function is to provide σ^E activity. *Mol Microbiol*. 40: 1323-33.

Alba, B. M. and Gross, C. A. 2004. Regulation of the *Escherichia coli* σ^E-dependent envelope stress response. *Mol Microbiol*. 52: 613–619.

Alba B M, Leeds J A, Onufryk C, Lu C Z, and Gross C A. 2002. DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev*. 16: 2156-68

Albers, S. V., Szabo, Z. & Driessen, A. J. 2003. Archaeal homolog of bacterial type IV prepilin signal peptidases with broad substrate specificity. *J. Bacteriol.* 185: 3918–3925

Albus, A. M., E. C. Pesci, L. J. Runyen-Janecky, S. E. West, and B. H. Iglewski. 1997. Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*. 179:3928-3935.

Aldridge P, and Hughes K T. 2002. Regulation of flagellar assembly. *Curr. Opin. Microbiol*. 5: 160-165.

Alexeyev M F, Shokolenko L, and Croughan T P. 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160: 63-67.

Anthony, M., Rose, B., Pegler, M. B., Elkins, M., Service, H., Thamotharampillai, K., Watson, J., Robinson, M., Bye, P. *et al*., 2002. Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the sputa of Australian adult cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2772–2778.

Arora S K, Ritchings B W, Almira E C, Lory S, and Ramphal R. 1997. A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J. Bacteriol*. 179:5574-5581.

B

Bali A., Blanco G, Hill S, and Kennedy C. 1992. Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol*. 58: 1711-1718.

Bardy, S. L. & Jarrell, K. F. 2003. Cleavage of preflagellins by an aspartic acid signal peptidase is essential for flagellation in the archaeon *Methanococcus voltae*. *Mol. Microbiol.* 50: 1339–1347.

Bardy, S. L. & Jarrell, K. F. 2002. FlaK of the archaeon *Methanococcus maripaludis* possesses preflagellin peptidase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 208: 53–59.

Barry, T., S Geary, S Hannify, C MacGearailt, M Shalloo, D Heery, F Gannon, and R Powell. 1992. Rapid mini-preparations of total RNA from bacteria. *Nucleic Acids Res*. 20: 4940.

Baynham, P. J., and D. J. Wozniak. 1996. Identification and characterization of AlgZ, an AlgT-dependent DNA binding protein required for *Pseudomonas aeruginosa algD* transcription. *Mol. Microbiol*. 22: 97-108.

Baynham PJ, Brown AL, Hall LL, Wozniak DJ.1999. *Pseudomonas aeruginosa* AlgZ, a ribbon-helix-helix DNA-binding protein, is essential for alginate synthesis and algD transcriptional activation. *Mol Microbiol*. 33(5): 1069-80.

Baynham, P. J., D. M. Ramsey, B. V. Gvozdyev, E. M. Cordonnier, and D. J. Wozniak. 2006. The *Pseudomonas aeruginosa* ribbon-helix-helix DNA-binding protein AlgZ (AmrZ) controls twitching motility and biogenesis of type IV pili. *J. Bacteriol*. 188: 132-140.

Berg H. C. 1974. Dynamic properties of bacterial flagellar motors. Nature *249*: 77-79.

Bertin P., Terao E., Lee E H., Lejeune et al., 1994. The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli. J Bacteriol*. 176(17):5537-40.

Blair D. F. 2003. Flagellar movement driven by proton translocation. *FEBS Lett.* 545: 86–95.

Blatny, J. M., T Brautaset, HC Winther-Larsen, K Haugan and S Valla. 1997. Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl. Environ. Microbiol*. 63: 370-379.

Boucher, J. C., M. J. Schurr, and V. Deretic. 2000. Dual regulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* and sigma factor antagonism. *Mol. Microbiol*. 36: 341-351.

Boucher, J. C., Yu, H., Mudd, M. H. & Deretic, V. 1997. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of *muc* mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. *Infect. Immun.* 65: 3838–3846.
Bren A. and Eisenbach. 2000. How signals are Heard during bacterial chomostaxis: protein-protein interactions in sensory signal propagation. *J. Bacteriol*. 182: 6865-6873.
Brown M. S. Ye J., Rawson R. B and Goldstein J. L. 2000. Regulated intra-membrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans, *Cell* 100: 391–398
Brun, Y.V, Shapiro, L. 1992. A temporally controlled σ-factor is required for polar morphogenesis and normal cell division in *Caulobacter. Genes Dev*. 6: 2395–240.

C
Campos-Garcia J. Najera R., Camarena L. and Soberón-Chavez G. 2000. The *Pseudomonas aeruginosa motR* gene involved in regulation of bacterial motility. *FEMS Microbiol. Lett*. 184:57-62.
Campos, M.-E., J. M. Martínez-Salazar, L. Lloret, S. Moreno, C. Núñez, G. Espín, and G. Soberón-Chávez. 1996. Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol*. 178: 1793-1799.
Cano D. A., Domínguez-Bernal G., Tierrez A., García-Del Portillo F., Casadesús J. 2002. Regulation of capsule synthesis and cell motility in *Salmonella enterica* by the essential *gene igaA*. *Genetics* 162: 1513-23.
Castañeda, M., J. Sánchez, S. Moreno, C. Núñez, and G. Espín. 2001. The global regulators GacA and σ^S form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol*. 183: 6787-6793.
Cavalier-Smith T. 1987. "The origin of eukaryotic and archaebacterial cells". *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 503:17-54.
Cezairliyan, B. O. and R. T. Sauer. 2007. Inhibition of regulated proteolysis by RseB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(10): 3771-6.
Chaba, R., Grigorova, I.L., Flynn, J.M., Baker, T.A., and Gross, C.A. 2007. Design principles of the proteolytic cascade governing the sigmaE-mediated envelope stress response in *Escherichia coli*: keys to graded, buffered, and rapid signal transduction. *Genes Dev*. 21: 124–136.
Chaban, B. Ng S. Y., Kanbe M., Saltzman I., Nimmo G., Aizawa S. and Jarrell K. F. 2007. Systematic deletion analyses of the *fla* genes in the flagella operon identify several genes essential for proper assembly and function of flagella in the archaeon, *Methanococcus maripaludis*. *Mol. Microbiol.* 66: 596–609.
Chadsey MS, Karlinsey JE, Hughes KT. 1998. The flagellar anti-sigma factor FlgM actively dissociates *Salmonella typhimurium* sigma28 RNA polymerase holoenzyme. *Genes Dev*. 12(19):3123-36.
Chen, X. & Berg, H. C. 2000. Torque-speed relationship of the flagellar rotary motor of *Escherichia coli*. *Biophys. J.* 78: 1036–1041.
Chevance F. F. and Hughes K. T. 2008. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat. Rev. Microbiol*. 6: 455-465.
Ciacci-Woolwine, F, Blomfield, I.C, Richardson, S.H, Mizel, S.B. 1998. *Salmonella* flagellin induces tumor necrosis factor alfa in a human promocytic cell line. *Infect. Immun*. 6: 1127–1134.
Claret, L. and C. Hughes. 2002. Interaction of the atypical prokaryotic transcription activator $FlhD_2C_2$ with early promoters of the flagellar gene hierarchy. *J Mol Biol*. 321: 185-199.
Clarke, M.B. and V. Sperandio. 2005. Transcriptional regulation of *flhDC* by QseBC and sigma (FliA) in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 57: 1734-1749.
Clausen, T., Southan, C., and Ehrmann, M. 2002. The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell*. 10: 443–455.
Cohen-Krausz, S. & Trachtenberg, S. 2002. The structure of the archeabacterial flagellar filament of the extreme halophile *Halobacterium salinarum* R1M1 and its relation to eubacterial flagellar filaments and type IV pili. *J. Mol. Biol.* 321: 383–395.
Cohen-Krausz, S. & Trachtenberg, S. 2008. The flagellar filament structure of the extreme acidothermophile *Sulfolobus shibatae* B12 suggests that archaeabacterial flagella have a unique and common symmetry and design. *J. Mol. Biol.* 375: 1113–1124.

D
Dasgupta, N., S. K. Arora, and R. Ramphal. 2000. *fleN*, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*. 182: 357-364.
Dasgupta, N., and R. Ramphal. 2001. Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*. 183: 6636-6644.

Dasgupta, N., E. P. Ferrell, K. J. Kanack, S. E. West, and R. Ramphal. 2002. *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is σ^{70} dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J. Bacteriol*. 184: 5240-5250.
Dasgupta, N., M. C. Wolfgang, A. L. Goodman, S. K. Arora, J. Jyot, S. Lory, and R. Ramphal. 2003. A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol*. 50: 809-824.
De Las Peñas, L. Connolly, and C A Gross. 1997. SigmaE is an essential sigma factor in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 179: 6862-6864.
DeRosier. 1998. The turn of the screw: the bacterial flagellar motor. *Cell* 93: 17-20.

E
Eaton, K.A, Suerbaum, S, Josenhans, C, Krakowka, S. 1996. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect. Immun*. 64. 2445–2448.
Erickson, J.W. & Gross, C.A. 1989. Identification of the σE subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase; a second alternate σ factor involved in high temperature gene expression. *Genes Dev*. 3: 1462–1471.

F
Faguy, D. M., Jarrell, K. F., Kuzio, J. & Kalmokoff, M. L. 1994. Molecular analysis of archael flagellins: similarity to the type IV pilin-transport superfamily widespread in bacteria. *Can. J. Microbiol.* 40: 67–71.
Faguy, D. M. & Jarrell, K. F. 1999. A twisted tale: the origin and evolution of motility and chemotaxis in prokaryotes. *Microbiology* 145: 279–281.
Fan, F., Ohnishi, K., Francis, N. R. & Macnab, R. M. 1997. The FliP and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*, putative components of the type III flagellar export apparatus, are located in the flagellar basal body. *Mol. Microbiol.* 26: 1035–1046.
Fellay, R., J. Frey, and H. Krisch. 1987. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis. *Gene* 52: 147-154.
Flynn J. M., Levchenko I., Sauer R. T. and Baker T. A. 2004. Modulating substrate choice: the SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation. *Genes & Dev*. 18: 2292-2301.
Fraser G M. and C. Hughes. 1999. Swarming motility. *Curr. Opin. Microbiol*. 2: 630-635.

G
Gama-Castro S, Nuñez C, Segura D, Moreno S, Guzmán J, Espín G. 2001. *Azotobacter vinelandii* aldehyde dehydrogenase regulated by σ^{54}: role in alcohol catabolism and encystment. *J. Bacteriol*. 183: 6169-6174.
Gaona G, Nunez C, Goldberg JB, Linford AS, Najera R, Castaneda M, Guzman J, Espin G, Soberon-Chavez G. 2004. Characterization of the *Azotobacter vinelandii algC* gene involved in alginate and lipopolysaccharide production. *FEMS Microbiol Lett*. 238: 199-206.
Gardel C. L and Mekalanos J. J. 1996. Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. *Infect. Immun*. 64: 2246–2255.
Geis G, Leying H, Suerbaum S, Mai U, Opferkuch W. 1989. Ultraestructure and chemical análisis of *Campylobacter pylory* flagella. *J Clin Microbiol*. 27: 436-41.
Goodier R. I. and Ahmer B. M. 2001. SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol*. 183: 2249-58.

H
Haneline S., Connelly C. J. and Melton T. 1999. Chemotactic Behavior *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Environ. Microbiol*. 57: 825-829
Harshey, R.M. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol*. 57: 249-273.
Hasselblatt, H., Kurzbauer, R., Wilken, C., Krojer, T., Sawa, J., Kurt, J., et al. 2007. Regulation of the sigmaE stress response by DegS: how the PDZ domain keeps the protease inactive in the resting state and allows integration of different OMP-derived stress signals upon folding stress. *Genes Dev*. 21: 2659–2670.
Hayashi, F, Smith, K.D, Ozinsky, A, Hawn, T.R, Yi, E.C, Goodlett, D.R, Eng, J.K, Akira, S, Underhill, D.M, Aderem, A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099–1103.
Helmann J. D. 2002. The extracytoplasmic funtion (ECP) sigma factors. *Adv Microb Physiol*. 46: 47-110.
Henrichsen, J. 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev*. 36: 478-503.
Hughes KT, Gillen KL, Semon MJ, Karlinsey JE. 1993. Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* 262(5137):1277-80.

I
J
Jarrell, K. F., Bayley, D. P. & Kostyukova, A. S. 1996. The archaeal flagellum: a unique motility structure. *J. Bacteriol.* 178: 5057–5064.
Jarrell, K. F., Ng, S. Y. & Chaban. 2007. B. in *Archaea: Molecular and Cellular Biology* (ed. Cavicchioli, R.) 385–410 (ASM, Washington DC, 2007).
Jarrel K. F., and McBride M. J. 2008. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat. Rev. Microbiol*. 6: 466-476.
Josenhans C, Suerbaum S. 2002. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol*. 291(8):605-14.
Joys T. M. 1988. The flagellar filament protein. *Can J Microbiol*. 34: 452-8.
Jyot, J., N. Dasgupta, and R. Ramphal. 2002. FleQ, the major flagellar gene regulator in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to enhancer sites located either upstream or atypically downstream of the RpoN binding site. *J. Bacteriol*. 184: 5251-5260

K
Kanehara, K., Akiyama, Y., and Ito, K. 2001. Characterization of the yaeL gene product and its S2P-protease motifs in *Escherichia coli*. *Gene* 281: 71–79.
Kanehara K, Ito K, Akiyama Y. 2002. YaeL (EcfE) activates the sigma(E) pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti-sigma(E), RseA. *Genes Dev.* 16: 2147-55.
Kanehara K, Ito K, Akiyama Y. 2003. YaeL proteolysis of RseA is controlled by the PDZ domain of YaeL and a Gln-rich region of RseA. *EMBO J.* 22: 6389-98.
Karlinsey JE, Tsui HC, Winkler ME, Hughes KT. 1998. Flk couples flgM translation to flagellar ring assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol*. 180(20):5384-97.
Kawano M, Oshima T, Kasai H, Mori H. 2002. Molecular characterization of long direct repeat (LDR) sequences expressing a stable mRNA encoding for a 35-amino-acid cell-killing peptide and a *cis*-encoded small antisense RNA in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*. 45: 333-349.
Kennedy C, Toukdarian A. 1987. Genetics of azotobacters: applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. *Annu Rev Microbiol*. 41: 227-58.
Klose, K.E, Mekalanos, J.J. 1998. Distinct roles of an alternative sigma factor during free-swimming and colonizing phases of the *Vibrio cholerae* pathogenic cycle. *Mol. Microbiol*. 28: 501–520.
Koide, K., Maegawa, S., Ito, K., and Akiyama, Y. 2007. Environment of the active site region of RseP, an *Escherichia coli* regulated intramembrane proteolysis protease, assessed by site-directed cysteine alkylation. *J Biol Chem*. 282: 4553–4560.
Kojima, S. & Blair, D. F. 2001. Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor. *Biochemistry* 40: 13041–13050.
Komeda, Y. 1982. Fusions of flagellar operons to lactose genes on a Mu lac bacteriophage. *J. Bacteriol*. 150: 16–26.
Komeda, Y. 1986. Transcriptional control of flagellar genes in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol*. 168: 1315–1318.
Kozubek A. y Tyman J. 1999. Resorcinolic lipds, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. *Chem. Rev*. 99: 1-26.
Kutsukake, K., Y. Ohya, S. Yamaguchi, and T. Iino. 1988. Operon structure of flagellar genes in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet*. 214: 11-15.
Kutsukake, K, Ohya, Y, Iino, T. 1990. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium. J. Bacteriol*. 172: 741–747.
Kutsukake, K. 1997. Autogenous and global control of the flagellar master operon, *flhD*, in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet*. 254: 440-448.

L
Lambert, C. *et al*. 2006. Characterizing the flagellar filament and the role of motility in bacterial prey-penetration by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Mol. Microbiol.* 60: 274–286.
Lautrop H. 1961. *Bacterium anitratum* transferred to the genus *Cytophaga. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl*. 11: 107-108.
Lautrop H. 1965. Glidin motility in bacteri as a taxonomic criterion. *Publ. Fac. Sci. Univ. J. E. Purkyne. Ser. K*. 35: 322-327-
Lechner, J. & Wieland, F. 1989. Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 173–194.

Li, C, Louise, C.J, Shi, W, Adler, J. 1993. Adverse conditions which cause lack of flagella in *Escherichia coli. J. Bacteriol*. 175: 2229–2235.
Lin, T.Y. and H. L. Sadoff. 1968. encystament and polymer production by *Azotobacter vinelandii* in the presence of b – hidroxybutyrae. *J. Bacteriol*. 95: 2336-2343.
Liu, M. Y., G. Gui, B. Wei, J. F. Preston III, L. Oakford, U. Yuksel, D. P. Giedroc, and T. Romeo.1997 . The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*. 272: 17502-17510.
Liu, X., and P. Matsumura. 1994. The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J. Bacteriol*. 176: 7345-7351.
Logan, S. M. 2006. Flagellar glycosylation ¿a new component of the motility repertoire? *Microbiology* 152: 1249–1262.
Lonetto M.A ., Brown K. L., Rudd K. E., Buttner M. J. 1994. Analysis of the *Streptomyces coelicolor* sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 91:7573-7.
Loperfido, B., and H.L. Sadoff. 1973. Germination of *Azotobacter vinellandii* cysts:sequence of macromolecular synthesis and nitrogen fixation. *J. Bacteriol*. 113: 841-846.
Lowe, G., Meister, M. & Berg, H. C. 1987. Rapid rotation of flagellar bundles in swimming bacteria. *Nature* 325: 637–640.

M

Macnab, R. M. 1987. Flagella, p. 70-83. *In* F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D.C.
Macnab, R. M. 1996. Flagella and motility, p. 123-145. *In* F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed., vol. 1. ASM Press, Washington, D.C.
Macnab, R. M. 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 77–100.
Macnab, R.M. 2004. Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim. Biophys. Acta* 1694: 207–217.
Magariyama, Y S. Sugiyama, K. Muramoto, Y. Maekawa, I. Kawagishi, Y. Imae, S. Kudo. 1994. Very fast flagellar rotation. *Nature* 371: 752.
Maldonado R, Jiménez J, Casadesús J. 1994. Changes of ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *J. Bacteriol*. 176: 3911-9.
Manna A C and Das H K. 1993. Determination of the size of the *Azotobacter vinelandii* chromosome. *Mol. Gen. Genet*. 241(5-6):719-22.
Manson M. D., Tedesco P., Berg H.C., Harold F.M., Van der Drift C. 1977. A protonmotive force drives bacterial flagella. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74: 3060-4.
Martin DW, Schurr MJ, Yu H, Deretic V. 1994. Análisis of promoters controlled by the putative sigma factor AlgU regulating conversión to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*: relationship to sigma E and stress response. *J. Bacteriol*. 176: 6688-96.
Martínez-Salazar, J., S. Moreno, R. Nájera, J. C. Boucher, G. Espín, G. Soberón-Chávez, and V. Deretic. 1996. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC, and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. *J. Bacteriol*. 178: 1800-1808.
Mattick J. S. 2002. Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol*. 56: 289-314.
McCarter, L.L.. 2004. Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 7: 18-29.
Mecsas, J., Rouviere, P.E., Erickson, J.W., Donohue, T.J., and Gross, C.A. 1993. The activity of sigma E, an *Escherichia co*li heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev*. 7: 2618–2628.
Mejía-Ruíz, H., J. Guzmán, S. Moreno, G. Soberón-Chávez, and G. Espín. 1997a. The *Azotobacter vinelandii alg8* and *alg44* genes are essential for alginate synthesis, and they constitute an *algD* independent operon. *Gene* 199: 271-277.
Mejía-Ruíz, H., S. Moreno, J. Guzmán, R. Nájera, R. León, G. Soberón-Chávez, and G. Espín. 1997b. Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii algK* mutant. *FEMS Microbiol. Lett*. 156: 101-106.
Milcamps A, Van Dommelen A, Stigter J, Vanderleyden J, de Bruijn FJ. 1996. The *Azospirillum brasilense rpoN* gene is involved in nitrogen fixation, nitrate assimilation, ammonium uptake, and flagellar biosynthesis. *Can J Microbiol*. 42(5):467-78.
Millikan D.S. and E.G. Ruby. 2003. FlrA, a sigma54-dependent transcriptional activator in *Vibrio fischeri*, is required for motility and symbiotic light-organ colonization. *J Bacteriol*. 185: 3547-3557.

Minamino, T. & Macnab, R. M. 1999. Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J. Bacteriol.* 181, 1388–1394.
Missiakas, D., Mayer, M.P., Lemaire, M., Georgopoulos, C., and Raina, S. 1997. Modulation of the *Escherichia coli* sigmaE (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. *Mol Microbiol*. 24: 355–371.
Missiakas, D. and Raina, S. 1998. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol Microbiol*. 28: 1059–1066.
Mitchell D. R. 2006. Theevolution of eukaryotic cilia and flagella as motile and sensory organelles. en *Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton: Origins and Evolution*, editado por Gáspár Jékely, Eurekah.com,
Moens S, Vanderleyden J. 1996. Functions of bacterial flagella. *Crit Rev Microbiol*. 22: 67-100.
Moreno, S., R. Nájera, J. Guzmán, G. Soberón-Chávez, and G. Espín. 1998. Role of alternative factor AlgU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol*. 180: 2766-2769.
Muramoto K, Makishima S, Aizawa S. and Macnab R. M. 1999. Effect of hook subunit concentration on assembly and control of length of the flagellar hook of *Salmonella*. *J. Bacteriol*. 181: 5808-13.

N
Nagpal P, Jafri S, Reddy M A, Das H K. 1989. Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol*. 171: 3133-8. Erratum in: *J. Bacteriol* 1989. 171: 6395.
Ng, S. Y., Chaban, B. & Jarrell, K. F. 2006. Archaeal flagella, bacterial flagella and type IV pili: a comparison of genes and posttranslational modifications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 11: 167–191.
Núñez C, León R, Guzmán J, Espín G, and Soberón-Chávez G. 2000. Role of *Azotobacter vinelandii mucA* and *mucC* gene products in alginate production. *J. Bacteriol.* 182: 6550–6556.
Nutsch, T., Oesterhelt, D., Gilles, E. D. & Marwan, W. 2005. A quantitative model of the switch cycle of an archaeal flagellar motor and its sensory control. *Biophys. J.* 89: 2307–2323.

Ñ
O
Ordal G. W. 1985. Bacterial chemotaxis: biochemistry of behavior in a single cell. *Crit. Rev. Microbiol*. 12: 95-130
Ottemann, K.M, Miller, J.F. 1997. Roles for motility in bacteria-host interactions. *Mol. Microbiol*. 24: 1109–1117.
Ohnishi K, Kutsukake K, Suzuki H, Lino T. 1992. A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*: an antisigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, sigma F. *Mol Microbiol*. 6: 3149-57.

P
Pallen MJ, C. W. Penn and R. R. Chaudhuri. 2005. Bacterial Flagellar diversity in the post-genomic era. *Trends Microbiol* 13:143-149.
Peralta-Gil, M., D. Segura, J. Guzmán, L. Servín-González, and G. Espín. 2002. Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly-β-hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon Is driven by two overlapping promoters and Is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J. Bacteriol*. 184: 5672-5677.
Poggio, S., A. Osorio, G. Dreyfus and L. Camarena. 2005. The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins. *Mol. Microbiol*. 58: 969-983.
Poggio S, Osorio A., Dreyfus G, and Camarena L. 2002. The four different sigma (54) factors of *Rhodobacter sphaeroides* are not functionally interchangeable. *Mol. Microbiol.* 46: 75-85.
Pratt, L. A, Kotler, R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol*. 30: 285–293
Prentki P, and Krisch H M.1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene*. 29: 303-313.

Q
Qiu, D., Eisinger, V. M., Head N. E., Pier G. B. & Yu, H. D. 2008. ClpXP porteases positively regulate alginate overexpression and mucoid conversión in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 154: 2119-2130.
Qiu, D., Eisinger, V. M., Rowen, D. W. & Yu, H. D. 2007. Regulated proteolysis controls mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104: 8107–8112.

R
Ramsey, D. M., P. Baynham, and D. J. Wozniak. 2005. Binding of *Pseudomonas aeruginosa* AlgZ to sites upstream of the *algZ* promoter leads to repression of transcription. *J. Bacteriol*. 187: 4430-4443.

Raumann, B.E., Rould, M.A., Pabo, C.O., Sauer, R.T. 1994b. DNA recognition by β-sheets in the Arc repressor–operator crystal structure. *Nature* 367: 754–757.
Rediers H, Vanderleyden J, De Mot R. 2004. *Azotobacter vinelandii*: a *Pseudomonas* in disguise? *Microbiology*.150: 1117-1119.
Reusch, R. N., and H. L. Sadoff. 1979. 5-n-Alkylresorcinols from encysting *Azotobacter vinelandii*: isolation and characterization. *J. Bacteriol*. 139: 448-53.
Reusch, R. N., and H. L. Sadoff. 1981. Lipid metabolism during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol*. 145: 889-95.
Reusch, R. N., and H. L. Sadoff. 1983. Novel lipid components of the *Azotobacter vinelandii* cyst membrane. *Nature*. 302: 268-70
Rhodius, V.A., Suh, W.C., Nonaka, G., West, J., and Gross, C.A. 2006. Conserved and variable functions of the sigma E stress response in related genomes. *PLoS Biol*. 4: e2.
Ritchings, B. W., E. C. Almira, S. Lory, and R. Ramphal. 1995. Cloning and phenotypic characterization of *fleS* and *fleR*, new response regulators of *Pseudomonas aeruginosa* which regulate motility and adhesion to mucin. *Infect. Immun*. 63: 4868-4876.
Romeo, T. 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol. Microbiol*. 29: 1321-1330.
Rosas G. N. S. 2008. Determinar si los genes *fleQ* y *fleN* de *A. vinelandii* son funcionales en *P. aeruginosa*. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Superior de Misantla.
Rowley G., Spector M., Kormanec and Roberts M. 2006. Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol*. 5: 383-94

S
Samatey, F. A. Matsunami H, Imada K, Nagashima S, Shaikh TR, Thomas DR, Chen JZ, Derosier DJ, Kitao A, Namba K. 2004. Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. *Nature* 431: 1062–1068.
Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
Sadoff H. L. 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol Rev*. 39: 516-539.
Schurr, M. J., Yu, H., Boucher, J. C., Hibler, N. S. & Deretic, V. 1995. Multiple promoters and induction by heat shock of the gene encoding the alternative sigma factor AlgU (σ^E) which controls mucoidy in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacterial.* 177: 5670–5679.
Seidler R. J. and Starr M. P. 1968. Structure of the flagellum of Bdellovibrio bacteriovorus. *J. Bacterial.* 1968: 1952–5.
Sharma, M., and S. K. Anand. 2002. Swarming: a coordinated bacterial activity. *Curr. Sci*. 83: 707-715.
Shi, W, Li, C, Louise, C, Adler, J. 1993. Mechanism of adverse conditions causing lack of flagella in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 2236–2240.
Silverman M and Simon M. 1974. Characterization of *Escherichia coli* flagellar mutants that are insensitive to catabolite repression. *J. Bacteriol*. 120: 1196-203.
Smith, K.D, Ozinsky, A. 2002. Toll-like receptor-5 and the innate immune response to bacterial flagellin. Curr. Top. *Microbiol. Immunol*. 270: 93–108.
Sohn, J., Grant, R.A., and Sauer, R.T. 2007. Allosteric activation of DegS, a stress sensor PDZ protease. *Cell*. 131: 572–583.
Soutourina, O., A. Kolb, E. Krin, C. Laurent-Winter, S. Rimsky, A. Danchin, and P. Bertin. 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.
Soutourina, O.A, Krin, E, Laurent-Winter, C, Hommais, F, Danchin, A, Bertin, P.N. 2002. Regulation of bacterial motility in response to low pH in *Escherichia coli*: the role of H-NS protein. *Microbiology* 148: 1543–1551.
Soutourina, O. A. and P.N. Bertin. 2003. Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 27: 505-523.
Spohn, G., and V. Scarlato. 1999. Motility of *Helicobacter pylori* is co-coordinately regulated by the transcriptional activator FlgR, an NtrC homolog. *J. Bacteriol*. 181: 593-599.
Stanley, P. M. 1983. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Can. J. Microbiol*. 29: 1493–1499.
Starnbach, M. N., and S. Lory. 1992. The *fliA* (*rpoF*) gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes alternative sigma factor required for flagellin synthesis. *Mol. Microbiol*. 6:459-469.
Sumper, M. 1987. Halobacterial glycoprotein biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 906: 69–79.

T
Tchan Y T., A Birch-Andersen and H L Jensen. 1962. The ultra structure of vegetative cells and cysts of *Azotobacter chroococcum. Arch, Microbiol*. 43: 50-66.
Tart A H, Blanks M J and Wozniak D J. 2006. The AlgT-dependent transcriptional regulator AmrZ (AlgZ) inhibits flagellum biosíntesis in mucoid, nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *J. Bacteriol* 188: 6483-6489.
Tart, A. H., M. C. Wolfgang, and D. J. Wozniak. 2005. The alternative sigma factor AlgT represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibition expression of *fleQ*. *J. Bacteriol*. 187: 7955-7962.
Thomas N. A., Bardy, S. L. & Jarrell, K. F. 2001. The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure. *FEMS Microbiol. Rev*. 25: 147–174.
Thomashow L.S. and Rittenberg S. C. 1985. Isolation adn composition of sheathed flagella from *Bdellovidrio bacteriovorus* 109J. *J. Bacteriol*. 163: 1047-54.
Totten, P. A., J. C. Lara, and S. Lory. 1990. The *rpoN* gene product of *Pseudomonas aeruginosa* is required for expression of diverse genes, including the flagellin gene. *J. Bacteriol*. 172: 389-396.
Tseng, C-P., Albrecht J and Gunsalus R P. 1996. Effect of microaerophilic cell growth conditions on expresión of the aerobic (*cyoABCDE* and *cydAB*) and Anaerobic (*narGHJI*, *frdABCD*, and *dmsABC*) respiratory pathway genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 178: 1094-1098.

U
V
Vaituzis Z. And R. N. Doetsch. 1969. Motility traces: technique for quantitative study of bacterial movement. *Appl. Microbiol*. 17: 584-588.
Vela, G. R. 1974. Survival of *Azotobacter* in dry soil. *Appl. Microbiol*. 28: 77-79.
Vite O. 2003. Identificación y caracterización de genes involucrados en la sinntesis de lípidos Alquilrecorcinoles en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biologicas, UAEM.

W
Wang S., Fleming RT, Westbrook EM, Matsumura P and McKay DB. 2006. Structure of the *Escherichia coli* FlhDC complex, a prokaryotic heteromeric regulator of transcription. *J. Mol. Biol*. 355:798-808.
Walsh NP, Alba BM, Bose B, Gross CA, Sauer RT. 2003. OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell* 113: 61-71.
Wei, B. L., A. M. Brun-Zinkernagel, J. W. Simecka, B. M. Pruss, P. Babitzke, and T. Romeo. 2001. Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*. 40: 245-256.
West, S. E. H., A. K. Sample, and L. J. Runyen-Janecky. 1994. The *vfr* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. J. Bacteriol. 176:7532-7542.
Wilken C, Kitzing K, Kurzbauer R, Ehrmann M, Clausen T. 2004. Crystal structure of the DegS stress sensor: How a PDZ domain recognizes misfolded protein and activates a protease. *Cell*. 117(4):483-94.
Wilson D. R. and T. J. Beveridge. 1993. Bacterial flagellar filaments and their component flagellins. *Can. J. Microbiol*. 39: 451-72
Wilson, P.W., and S.G. Knieght. 1952. Experiment in bacterial physiology. Burgess publishing Co., Minneapolis.
Winograsdkg, S. 1938. Sur la morphologie et l´ecologie des *Azotobacter. Ann Inst. Pasteur Parrs*. 60: 351-400.
Wolgemuth C. W., Charon N. W., Goldstein S. F., and Goldstein R. E. 2006. The flagellar cytoskeleton of the spirochetes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*. 11: 221-7.
Wood, L. F., Leech, A. J. & Ohman, D. E. 2006. Cell wall-inhibitory antibiotics activate the alginate biosynthesis operon in *Pseudomonas aeruginosa*: roles of σ^{22} (AlgT) and the AlgW and Prc proteases. *Mol. Microbiol.* 62: 412–426.
Wozniak D. J and Ohman D E. 1994. Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* genes *algR*, *algB*, and *algD* reveals a hierarchy of alginate gene expression which is modulated by *algT*. *J Bacteriol*. 176: 6007-14.
Wozniak, D. J., A. B. Sprinkle, and P. J. Baynham. 2003. Control of *Pseudomonas aeruginosa algZ* expression by the alternative sigma factor AlgT. *J. Bacteriol*. 185: 7297-7300.

Wu G., S. Hill, M. J. Kelly, G. Sawers and R. K. Poole. 1997. The *cydR* gene product, required for regulation of cytochrome bd expresión in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii*, is an Fnr-like protein. *Microbiology* 143: 2197-207.
Wu, G., H. Cruz-Ramos, S. Hill, J. Green, G. Sawers and R. K. Poole. 2000. Regulation of cytochrome bd expresión in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii* by CydR (Fnr). *J Biol. Chem*. 275: 4679-4686.
Wu, G., A. J. Moir, G. Sawers, S. Hill, and R. K. Poole. 2001. Biosynthesis of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) is controlled by CydR (Fnr) in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii. FEMS Microbiol Lett*. 194: 215-20.
Wyss O., Neumann M G. and Socolofsky D. 1961. Development and germination of the *Azotobacter* cyst. *J. Biophys. Biochem. Cytol*. 10: 555-565.

X
Xie Z D., Hershberger, C. D., Shankar, S., Ye, R. W., and A.M. Chakrabarty. 1996. Sigma factor-anti-sigma factor interaction in alginate synthesis: inhibition of AlgT by MucA. *J. Bacteriol.* 178: 4990-4996.

Y
Yamamoto, S. & Kutsukake, K. 2006. FliT acts as an anti-$FlhD_2C_2$ factor in the transcriptional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 188: 6703–6708.
Yanagihara, S., S. Iyoda, K. Ohnishi, T. Iino, and K. Kutsukake. 1999. Structure and transcriptional control of the flagellar master operon of *Salmonella typhimurium*. *Genes Genet. Syst*. 74: 105-111

Z

≪paper no. mic2008/017665 charlesworth ref: mic2008/017665≫
Biochemistry and Molecular Biology
OpenAccess
Microbiology (2008), **154**, 000–000 DOI 10.1099/mic.0.2008/017665-0

flhDC, but not *fleQ*, regulates flagella biogenesis in *Azotobacter vinelandii*, and is under AlgU and CydR negative control

Renato León and Guadalupe Espín

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

Correspondence
Guadalupe Espín
espin@ibt.unam.mx

Received 15 February 2008
Revised 12 March 2008
Accepted 13 March 2008

Azotobacter vinelandii is a nitrogen-fixing soil bacterium that undergoes differentiation to form cysts resistant to desiccation. Upon encystment, this bacterium becomes non-motile. As in enteric bacteria, motility in *A. vinelandii* occurs through the use of peritrichous flagella. *Pseudomonas aeruginosa*, a phylogenetically close relative of *A. vinelandii*, possesses a single polar flagellum. The FlhDC proteins are the master regulators of flagella and motility in enterobacteria, whereas FleQ is the master regulator in *P. aeruginosa*, and it is under AlgU (sigmaE) negative control. At present, nothing is known about the organization and expression of flagella genes in *A. vinelandii*. Here, we identified the flagella gene cluster of this bacterium. Homologues of the master regulatory genes *flhDC* and *fleQ* are present in *A. vinelandii*. Inactivation of *flhDC*, but not *fleQ*, impaired flagella biogenesis and motility. We present evidence indicating that a negative effect of the AlgU sigma factor on *flhDC* expression causes loss of motility in *A. vinelandii*, and that CydR (a homologue of Fnr) is under AlgU control, and has a negative effect on *flhDC* expression. Taken together, these results suggest the existence of a cascade consisting of AlgU and CydR that negatively controls expression of *flhDC*; the results also suggest that the block in flagella synthesis under encystment conditions centres on *flhDC* repression by the AlgU–CydR cascade.

INTRODUCTION

Azotobacter vinelandii, a Gram-negative bacterium belonging to the gamma subdivision of proteobacteria, is closely related to bacteria of the genus *Pseudomonas* (Rediers *et al.*, 2004), and undergoes a differentiation process to form cysts resistant to desiccation. In *A. vinelandii*, motility occurs through the use of peritrichous flagella. When induced for encystment, this bacterium becomes non-motile (Sadoff, 1975). To the best of our knowledge, studies on the genes involved in motility in this organism have not been carried out. Genes involved in the biogenesis and function of flagella have been extensively studied in *Escherichia coli* and *Salmonella*, where motility also occurs by peritrichous flagella. In those bacteria, flagella and motility genes comprise a large and complex regulon, with more than 50 genes organized in at least 17 operons (Macnab, 1996). The flagella operons are classified into three hierarchical transcriptional classes, where the class 1 *flhDC* operon is the master regulator of flagella and motility (for a review see Aldridge & Hughes, 2002). FlhDC proteins are activators of the class 2 genes, which include those encoding proteins involved in the formation of the hook basal body, the flagella sigma factor FliA, and its anti-sigma factor FlgM. FliA is necessary to activate transcription of the class 3 genes, and these include *fliC*, which encodes the structural component of the filament, the flagellin. Transcription of *flhDC* is initiated at six start sites, and its regulation is very complex (Clarke & Sperandio, 2005; Francez-Charlot *et al.*, 2003; Kutsukake, 1997; Soutourina *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2001; Yanagihara *et al.*, 1999).

In *Pseudomonas aeruginosa*, motility occurs through the use of a single polar flagellum. Flagella genes are clustered in three regions of the chromosome. Transcription of the flagella genes requires a number of regulatory proteins, including FleQ (Arora *et al.*, 1997) and the two-component system FleSR (Ritchings *et al.*, 1995), acting in a four-tiered transcriptional regulatory circuit (Dasgupta *et al.*, 2003). The master regulator FleQ, an NtrC-like transcriptional activator, belongs to the top tier of the flagella hierarchy, and is required to activate all other flagella genes, with the exception of *fliA* (Arora *et al.*, 1997; Dasgupta *et al.*, 2003; Jyot *et al.*, 2002). The anti-activator protein FleN negatively controls the activity of FleQ (Dasgupta & Ramphal, 2001).

Abbreviation: qRT-PCR, quantitative RT-PCR..... is available with the online version of this paper.

Tables of *A. vinelandii* flagellar and motility genes, and consensus sequences recognized by FliA and RpoD sigma factors present upstream of *A. vinelandii* flagellar genes are available with the online version of this paper.

In *P. aeruginosa* and *A. vinelandii*, the alternative sigma factor AlgU (also named AlgT) controls alginate biosynthesis. The mechanism by which AlgU exerts this control is well understood (Martínez-Salazar *et al.*, 1996; Núñez *et al.*, 2000; Ramsey & Wosniak, 2005). The anti-sigma proteins MucA and MucB negatively control AlgU activity (Mathee *et al.*, 1997; Schurr *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1996). External stresses affecting the folding of periplasmic proteins initiate the cleavage of MucA, and the release of AlgU (Qiu *et al.*, 2007) In *P. aeruginosa*, this sigma factor is required to activate the alginate biosynthesis operon (Martin *et al.*, 1993; Wozniak & Ohman, 1994). In *A. vinelandii*, AlgU is required for activation of the alginate biosynthesis genes *algD* and *algC* (Campos *et al.*, 1996; Gaona *et al.*, 2004). Thus, in both *P. aeruginosa* and *A. vinelandii,* mutations inactivating *algU* abrogate alginate synthesis (Moreno *et al.*, 1998), whereas mutations in *mucA* produce an alginate-overproducing phenotype (Martin *et al.*, 1993; Núñez *et al.*, 2000).

In *P. aeruginosa*, AlgU activity has a negative effect on flagellum synthesis (Garrett *et al.*, 1999). Tart *et al.* (2005) showed that the flagella regulon is significantly downregulated in the presence of AlgU, and that increased expression of *fleQ* reverses the AlgU-mediated inhibition, and thus they concluded that AlgU inhibits expression of FleQ. The mechanism of this inhibition has been shown to be indirect, and it acts by promoting the expression of the transcriptional regulator AmrZ (AlgZ), which interacts directly with the *fleQ* promoter as a repressor (Tart *et al.*, 2006).

When vegetative motile cells of *A. vinelandii* are induced for encystment, they lose motility (Sadoff, 1975). We show here that this loss is caused by the activity of the sigma factor AlgU. Thus, similar to the findings for *P. aeruginosa*, we found a negative effect of AlgU on motility and flagella synthesis.

The organization and expression of flagella genes in *A. vinelandii* are unknown. A search of the *A. vinelandii* genome for the flagella regulon was carried out in this study, and revealed the presence of homologues of *flhDC* and *fleQ,* which are the master regulators in *E. coli* and *Pseudomonas*, respectively. Inactivation of these genes indicated that *flhDC*, but not *fleQ*, is required for flagella biogenesis and motility in *A. vinelandii*. We also show that AlgU and CydR have a negative effect on *flhDC* expression.

METHODS

Microbiological procedures. The bacterial strains and plasmids used in this work are shown in Table 1. *A. vinelandii* was grown at 30 °C in Burk's nitrogen-free salts (Kennedy *et al.*, 1986), supplemented with either sucrose at 2 % (BS medium), or 0.2 % *n*-butanol (BB encystment medium). *E. coli* DH5α was grown on Luria–Bertani (LB) medium (Miller, 1972) at 37 °C. Antibiotic concentrations used for *A. vinelandii* and *E. coli*, respectively, were as follows: ampicillin, not used and 200 μg ml^{-1}; gentamicin, 1.5 and 10 μg ml^{-1}; kanamycin 6 μg ml^{-1} and not used; tetracycline, 15 and 20 μg ml^{-1}. Triparental matings were carried out as reported by Kennedy *et al.* (1986). *A. vinelandii* transformation was carried out as described by Page & von Tigerstrom (1978), as modified by Bali *et al.* (1992).

DNA techniques. DNA isolation, cloning, Southern blotting, and nick translation procedures, were carried out as described by Sambrook *et al.* (1989).

Cloning of *flhDC, fleQ, mucA* and *cydR* genes. The *A. vinelandii* *fleQ* and *flhDC* genes were amplified by PCR using ATCC 9046 chromosomal DNA as a template and the following oligonucleotides: *fleQ*, upper primer 5′-TTATGCCTTGCTGGGGTTGC-3; *fleQ*, lower primer 5′-TTCACCCGTTCGTAGGCATC-3′; *flhDC*, upper primer 5′-AATGCTTCCCAGGCGAGATC-3′; and *flhDC*, lower primer 5′-GACAACGATGAGACC CAGAG-3′. For *mucA* and *cydR*, oligonucleotides mucA-1U 5′-GAAATCGAGGCCACTGTG-3′, mucA-1L 5′-CAACCAATTCTGCGCATC-3′, cydRf 5′-GTTCGTTCGATCTGCA-TGC-3′ and cydRr 5′-TTACTGGAAGCGGACATGCG-3′ were used. Primers were designed on the basis of the OP strain draft genome sequence available at http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi. The resulting 2157 (*fleQ*), 1667 (*flhDC*), 910 (*mucA*) and 1173 (*cydR*) bp PCR products were cloned in pMOS*Blue*, producing plasmids pLRQ, pLRDC, pMUC and pMCYDR, respectively (Table 1). Restriction mapping and partial sequencing confirmed the identity of the inserts (data not shown).

Construction of *fleQ*::Gm, *flhC*::Tc, *mucA*::Km and *cydR*::Gm mutations. Plasmid pLRQ was digested with *Xho*I to eliminate a 230 bp *Xho*I internal *fleQ* fragment. The 0.8 kb *Xho*I fragment containing a gentamicin-resistance cassette isolated from plasmid pBSL141 (Alexeyev *et al.*, 1995) was ligated into the pLRQ *Xho*I-digested plasmid. Plasmid pLRQ30, containing the *fleQ*::Gm mutation was isolated. For inactivation of the *flhC* gene, a 2.0 kb *Sma*I fragment, containing a tetracycline-resistance cassette isolated from plasmid pHP45Ω-Tc (Fellay *et al.*, 1987), was inserted into the *Stu*I site within gene *flhC* in plasmid pLRDC. Plasmid pLRDC50 containing the *flhC*::Tc insertion was isolated. A kanamycin-resistance cassette from plasmid pBSL99 (Alexeyev *et al.*, 1995) was introduced into the *Xho*I site of *mucA* in plasmid pMUC, producing plasmid pSRA4. For inactivation of *cydR*, a 3.0 kb *Cla*I fragment, containing a gentamicin-resistance cassette from plasmid pMS40 (Peralta-Gíl *et al.*, 2002), was introduced into the *Cla*I site present within *cydR* in pMCYDR, producing plasmid pMCYDR-Gm

Plasmids pLRQ30 and pLRDC50, which are unable to replicate in *A. vinelandii*, were used to introduce the *fleQ*::Tc and *flhC*::Gm mutations into strain ATCC 9046. Transformants were selected using the corresponding antibiotic, and confirmed by Southern blot analysis to carry the desired mutations (data not shown). Plasmid pSRA4 was transformed into strain ATCC 9046 to generate strain SRA4. The presence of the *mucA*::Km mutation in strain SRA4 was confirmed by PCR analysis. Plasmid pMCYDR-Gm was introduced into strains ATCC 9046 and SRA4. A gentamicin-resistant transformant derived from ATCC 9046 was isolated, and named ATCR. No gentamicin transformants derived from strain SRA4 were obtained in three different experiments. The *cydR*::Gm gene replacement in ATCR was confirmed by PCR analysis (data not shown).

Construction of plasmid pLRGm-DC. Plasmid pJB3Km1 (Blatny *et al.*, 1997), which was able to replicate in *A. vinelandii,* was digested with *Hin*dIII and *Bam*HI restriction enzymes to remove a 1 kb fragment that included the kanamycin-resistance gene. This fragment was replaced by a 1.6 kb *Bam*HI–*Hin*dIII fragment containing the *flhDC* genes, including their promoter sequences. A 0.8 kb *Bam*HI fragment encoding the gentamicin-resistance gene was introduced into the plasmid to produce plasmid pLRGm-DC, which was transferred by conjugation into strain AC30 in a triparental mating using plasmid pRK2013.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this work

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
A. vinelandii		
ATCC 9046	Wild-type	ATCC
SMU88	ATCC 9046 with an *algU*::Km mutation	Moreno *et al.* (1998)
JRA4	ATCC 9046 with *mucA*::Gm mutation	Núñez *et al.* (2000)
SRA4	ATCC 9046 with a *mucA*::Km mutation	This work
AQ 20	ATCC 9046 with a *fleQ*::Gm mutation	This work
AC 30	ATCC 9046 with a *flhC*::Tc mutation	This work
ATCR	ATCC 9046 with a *cydR*::Gm mutation	This work
E. coli		
DH5α	*supE44 lacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1*	Gibco-BRL
Plasmids		
pMOS*Blue*	Plasmid used for cloning PCR products	Amersham
pLRQ	pMOS*Blue* derivative carrying a 2.1 kb DNA fragment containing *A. vinelandii fleQ* gene amplified by PCR	This work
pLRDC	pMOS*Blue* derivative carrying a 1.6 kb DNA fragment containing *A. vinelandii flhCD* genes amplified by PCR	This work
pLRQ30	pLRQ derivative containing a *fleQ*::Gm mutation	This work
pLRDC50	pLRDC derivative containing a *flhC*::Tc mutation	This work
pMUC	pMOS*Blue* derivative carrying a 0.91 kb DNA fragment containing *A. vinelandii mucA* gene amplified by PCR	This work
pSRA4	pMUC derivative containing a *mucA*::Km mutation	This work
pMCYDR	pMOS*Blue* derivative carrying a 1.17 kb DNA fragment containing *A. vinelandii cydR* gene amplified by PCR	This work
pMCYDR-Gm	pCYDR derivative containing a *cydR*::Gm mutation	This work
pJB3Km1		Blatny *et al.* (1997)
pRK2013		Hedges & Baumberg (1973)
pHP45Ω-Tc	Source of the Tc^r cassette	Fellay *et al.* (1987)
pBSL141	Source of the Gm^r cassette	Alexeyev *et al.* (1995)
pBSL99	Source of the Km^r cassette	Alexeyev *et al.* (1995)
pSM40	Source of the Gm^r cassette	Peralta-Gíl *et al.* (2002)
pLRGm-DC	pJB3Km1 derivative carrying a 1.6 kb DNA fragment containing *A. vinelandii flhCD* genes and the Gm^{rh} gene from pBSL14	This work

Motility assay. To test the motility of *A. vinelandii*, bacterial strains were grown on BS medium at 30 °C until exponential phase. Samples of the cells were then transferred to BS or BB encystment medium, containing 0.3 % agar. These plates were incubated at 30 °C for 36 or 48 h.

Electron microscopy. Transmission electron microscopy to visualize flagella was carried out as previously reported (Gaona *et al.*, 2004)

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR). qRT-PCR was performed as reported (Noguez *et al.*, 2008). For RNA extraction, the cultures were grown in BS liquid medium. Cells were collected at the exponential phase of growth for *flhC*, and at 37 h for *cydR*. The sequences of the primers used for the qRT-PCR assays were: for *cydR*, 5′-GGC TGTCGAGACCGTATCC-3′ and 5′-ATTCGACGGGATTGAGAATG -3′; for *flhDC*, 5′-GAACATCCATTCCTCGCTGT-3′ and 5′-ATAG-AGCCGGAAAGCCTTGA-3′.

RESULTS

AlgU activity causes loss of flagella in *A.vinelandii*

In *P. aeruginosa*, AlgU has a negative effect on transcription of the flagella regulon by downregulating *fleQ*. To determine whether AlgU affected flagella synthesis in *A. vinelandii*, we performed motility assays in BS medium for strains ATCC 9046, SMU88 (*algU* mutant derivative of ATCC 9046) and JRA4, a derivative carrying a *mucA* mutation that results in high AlgU activity (Núñez *et al.*, 2000). As shown in Fig. 1(a), the *mucA* mutant strain was non-motile, as indicated by the absence of a motility zone. In contrast, the *algU* mutant produced a motility zone larger than that produced by the wild-type strain. When observed under the light microscope, cells of the wild-type strain ATCC 9046 growing on BB encystment medium were non-motile. Therefore, swimming assays were also performed in BB encystment medium for the wild-type, and the *mucA* and *algU* mutants (Fig. 1b). No swimming was observed for the wild-type and *mucA* strains, whereas the *algU* mutant produced a swimming zone. Using transmission electron microscopy, we examined the *mucA* and *algU* strains harvested from cultures growing exponentially on BS medium to determine the presence of flagella. In agreement with the swimming phenotype, no flagella were present for the *mucA* strain, whereas the *algU*

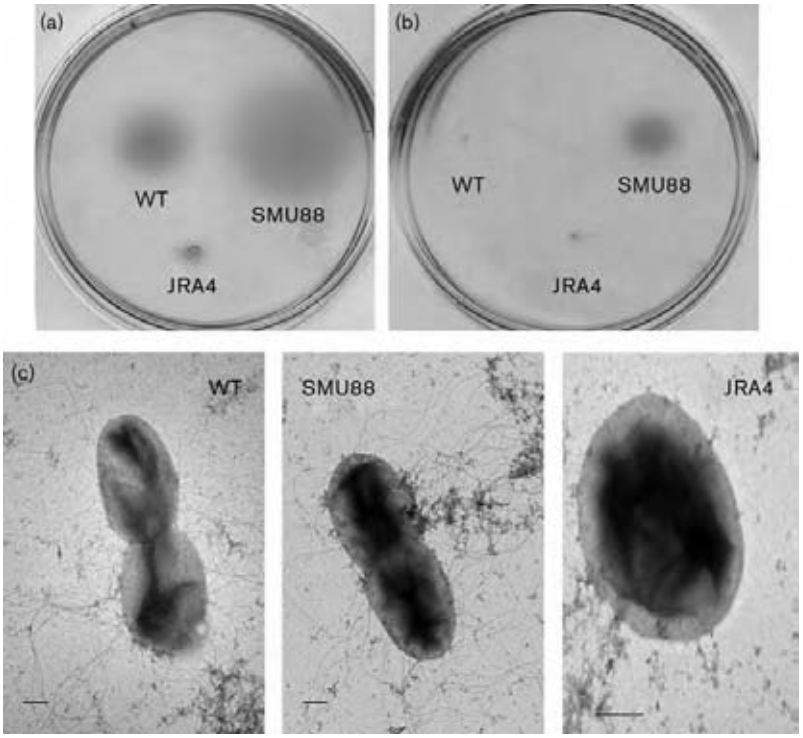


Fig. 1. Motility phenotype of *algU* and *mucA* mutants. Swimming assays of *A. vinelandii* wild-type strain ATCC 9046 (WT), *algU* mutant SMU88, and *mucA* mutant JRA4, carried out on motility agar plates with BS medium (a) and BB encystment medium (b). (c) Electron micrographs of negatively stained preparations of strains ATCC 9046, SMU88 and JRA4. Bars, 1.0 μm. Cells for transmission electron microscopy were harvested from cultures growing exponentially on BS medium.

mutant, similar to the wild-type, produced numerous flagella (Fig. 1c).

Flagella and motility genes found in the *A. vinelandii* genome

The flagella gene system of *E. coli* is one of the best studied, and is composed of over 50 genes for flagella assembly and function (Kutsukake & Nambu, 2000; Macnab, 1996). In order to identify *A. vinelandii* genes involved in flagella biogenesis and motility, and the possible targets for the AlgU-negative effect, we carried out an *in silico* analysis to search the draft genome sequence of *A. vinelandii* OP for genes homologous to bacterial flagella and motility genes. The *A. vinelandii* genome sequence data were obtained from http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi. Putative flagella and motility genes were identified by TBLASTN searches using *E. coli* genes. Because of to the close phylogenetic relationship between *Azotobacter* and *Pseudomonas* species (Rediers *et al.*, 2004), we also used *P. aeruginosa* genes in the analysis.

Three regions containing putative flagella and motility genes were identified in the *A. vinelandii* genome. These genes and the putative proteins they encode are listed in supplementary Table S1 (available with the online version of this paper). The genes include homologues of the *flhDC* master regulators in *E. coli*, and the *Pseudomonas* master regulator *fleQ* and its anti-activator *fleN*. In contrast to *Pseudomonas* spp., where these genes are present in the neighbourhoods of other flagella genes, the *A. vinelandii* *fleQ* and *fleN* genes are not linked to flagella genes. A representation of the regions, as well as the position and orientation of these genes in the *A. vinelandii* genome, is presented in Fig. 2. Region 1 consists of 39 717 bp, and contains 42 genes. Region 2 harbours four genes, including *fliC*, and region 3 consists of 12 genes.

A BLAST search of *A. vinelandii* FlhDC proteins revealed the absence of homologues in *Pseudomonas* spp.. A summary of flagella genes present or absent in *A. vinelandii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* is presented in supplementary Table S2 (available with the online version of this paper). Most *A. vinelandii* flagella genes showed the highest identity to genes from *Chromohalobacter salexigens* and *Cupriavidus necator* (Table S1). *Chr. salexigens* is a gamma proteobacterium that is closely related to *Pseudomonas* spp. and *E. coli*. Motility in *Chromohalobacter* occurs by means of peritrichous flagella (Holt *et al.*, 1994).

We also carried out a search for AlgU-, RpoD- and FliA-recognized consensus sequences within intergenic sequences of flagella genes larger than 80 nt. For putative RpoD (sigma 70)-recognized promoters, we used BPROM (http://www.softberry.com/berry.phtml), which is a program for the prediction of bacterial RpoD promoters that has an accuracy of about 80 %. The search for putative FliA and AlgU promoters was carried out by ocular inspection. The results are presented in supplementary Table S3 (available with the online version of this paper) and Fig. 2. The AlgU GAACTT-16/17 bp-TCTgA-recognized sequence (Gaona *et al.*, 2004) was not identified. The FliA-recognized sequence CTAA-15 bp-GCCGATAG was found

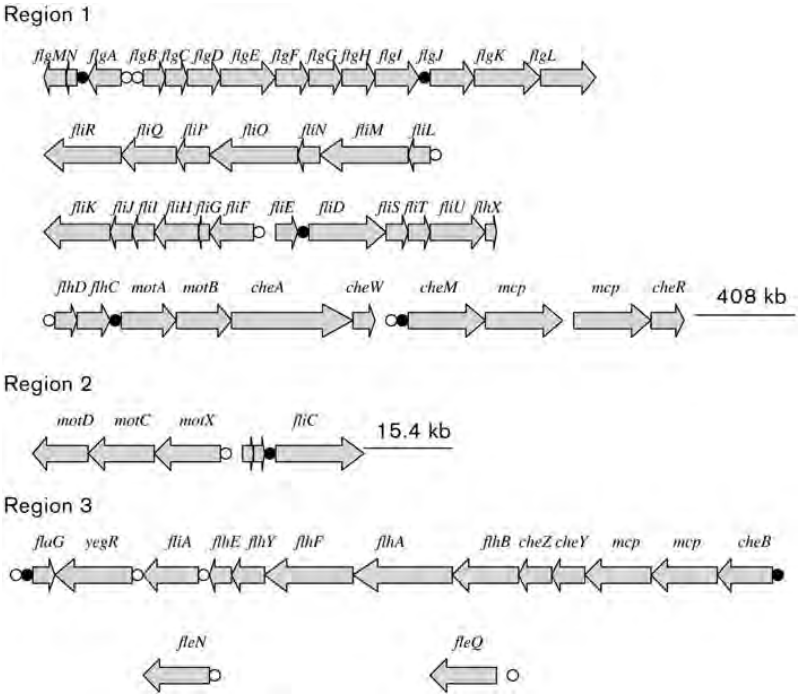


Fig. 2. Schematic representation of the *A. vinelandii* flagellar and motility regulon. Filled and open circles represent the presence of FliA- and RpoD-recognized consensus sequences, respectively. Genes in region 1 are contiguous. In region 2, *motD* is located 408 kb downstream of *cheR*. The *fliC* gene in region 2 is separated from *flaG* by 15.3 kb. *fleQ* and *fleN* are not linked to flagella genes.

upstream of eight putative operons. Twelve genes, including the master operon *flhDC*, were found to possess putative RpoD promoters The putative *cheM–mcp–mcp–cheR* operon, and the *flaG* gene, were found to possess both FliA and RpoD consensus sequences.

Inactivation of the *flhDC* genes, but not *fleQ*, impairs motility

In contrast to *E. coli* and *Pseudomonas* spp., *A. vinelandii* was found to possess *flhDC* and *fleQ* regulatory genes. To determine the functionality of the *flhDC* and *fleQ* homologues, which are located in the top hierarchy of flagella gene regulation in *E. coli* and *P. aeruginosa*, respectively, we constructed, as described in Methods, strain AC30 carrying a *flhC*::*Tc* mutation, and strain AQ20 carrying a *fleQ*::Gm mutation. The AC30 and AQ20 mutants were tested for their swimming phenotype. As shown in Fig. 3(a), inactivation of *flhC* completely inhibited motility. In contrast, the mutant carrying the *fleQ* mutation showed a motility phenotype similar to the wild-type strain. Electron microscopy revealed the absence of flagella in the *flhC* mutant, but not in the *fleQ* mutant (Fig. 3b). These results indicate that *flhDC* positively controls flagella synthesis and motility in *A. vinelandii*.

Motility is restored by complementation with the *flhDC* genes

The *flhD* and *flhC* genes overlap by 1 nt, and they are separated from the downstream *motAB* genes by an intergenic region containing a consensus FliA-recognized sequence (Fig. 2, Supplementary Table S3), thus the *flhDC* genes appear to constitute a bicistronic operon, and the *flhC* mutation was not expected to affect *motAB* transcription. To confirm that the swimming defect in strain AC30 was caused by the lack of the FlhC protein, and not by polar effects on downstream genes, and to confirm functionality of the *flhDC* genes, plasmid pLRGm-DC, containing only the *flhDC* genes including the promoter sequences, was introduced into strain AC30 by conjugation. The resultant strain AC30/pLRGm-DC showed a swimming phenotype similar to that of the wild-type strain (Fig. 3a).

Effect of AlgU on expression of *flhDC*

To determine whether AlgU affected flagella synthesis by downregulation of the master operon *flhDC*, we carried out qRT-PCR analysis to quantify the levels of *flhDC* mRNA in cells of mutant SMU88 lacking AlgU activity, and in the *mucA* mutant JRA4, in which the absence of the anti-AlgU protein MucA results in high AlgU activity (Núñez *et al.*, 2000) (Fig. 4). RNA was isolated from cultures of the *A. vinelandii* strains grown exponentially on BS medium. In the SMU88 *algU* mutant strain, *flhDC* mRNA was 40 % higher than in the wild-type. In contrast, *flhDC* mRNA levels were very low in the non-motile *mucA* strain JRA4. Based on these results, we conclude that the expression of the master *flhDC* operon is under the negative control of AlgU, although this control might not be direct.

CydR is under AlgU control, and is likely to be a repressor of *flhDC* expression

We inspected the 228 nt *flhDC* promoter region for the presence of putative binding sites for known regulators. *A.*

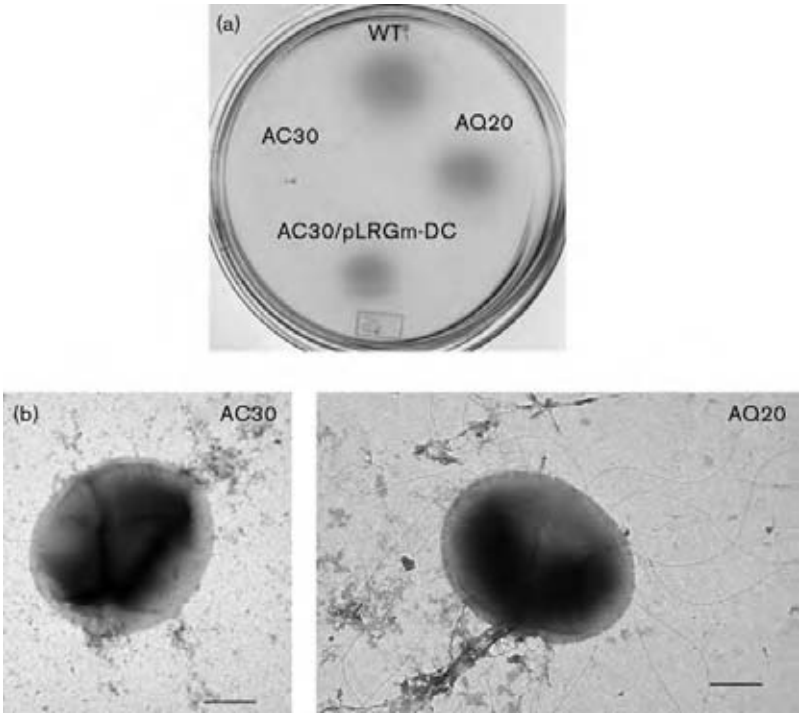


Fig. 3. Motility phenotype of *flhC* and *fleQ* mutants. (a) Swimming plate assay carried out in BS medium for: ATCC 9046 (WT), *flhC* mutant AC30, *fleQ* mutant AQ20, and AC30/pLRGm-DC. (b) Electron micrographs of AC30 and FleQ mutants. Bars, 1.0 μm.

vinelandii CydR is an Fnr homologue that represses transcription of the oxidase genes *cydAB* by binding at the CydR boxes located in the *cydAB* promoter region (Wu *et al.*, 2000). A sequence highly similar to the CydR boxes is present in the *flhDC* promoter region, and it overlaps the putative –35 sequence (Fig. 5). The presence of a putative CydR box within the *flhDC* putative promoter led us to hypothesize that CydR might mediate repression of *flhDC* by AlgU. In order to determine whether *cydR* transcription was dependent on AlgU, we carried out qRT-PCR analysis to determine the levels of *cydR* mRNA in cells of the wild-type, the *algU* mutant SMU88, and the *mucA* mutant JR4. RNA was isolated from cultures of the *A. vinelandii* strains grown on BS medium. As shown in Fig. 4(b), in the *algU* mutant strain, the *cydR* mRNA level is significantly reduced compared to the wild-type, whereas the levels in the *mucA* mutant are threefold higher, indicating that AlgU is indeed required for CydR expression. Based on this result, and on the presence of CydR boxes in the *flhD* promoter, inactivation of *cydR* was expected to produce a hyper-motility phenotype similar to that of the *algU* mutant, and to restore the motility phenotype in the *mucA* mutant. We constructed, as described in Methods, strain ATCR, which is an ATCC 9046 derivative carrying a *cydR* mutation. Strain ATCR grew very poorly on Burk's medium (data not shown), but produced a motility zone larger than that produced by the *algU* mutant (Fig. 5c). The swimming of ATCR on BB encystment medium was similar to that of the *algU* mutant (Fig. 5d). Efforts to construct a *mucA–cydR*

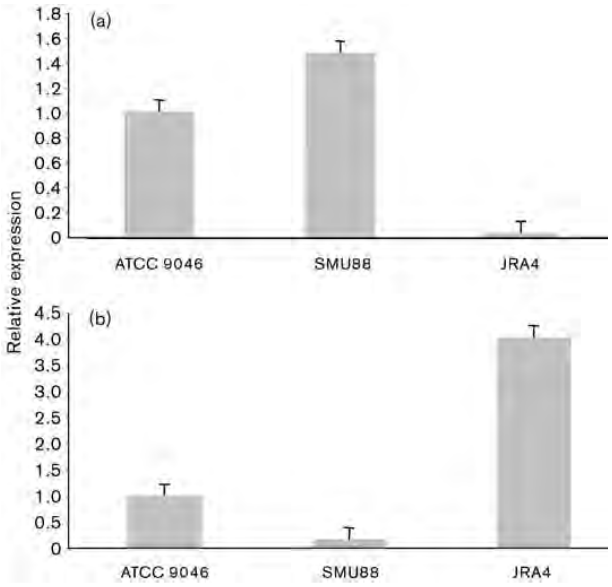


Fig. 4. Effect of AlgU on expression of *flhDC* and *cydR*. qRT-PCR analysis of *flhDC* (a), and *cydR* (b) gene expression from BS cultures of the wild-type strain ATCC 9046, the *algU* mutant SMU88 and the *mucA* mutant JRA4. The level of *flhDC* and *cydR* transcripts was normalized according to the levels of *gyrA* mRNA, and data are presented as -fold changes of mRNA levels of SMU88 and JRA4 mutant strains relative to those of the wild-type ATCC 9046.

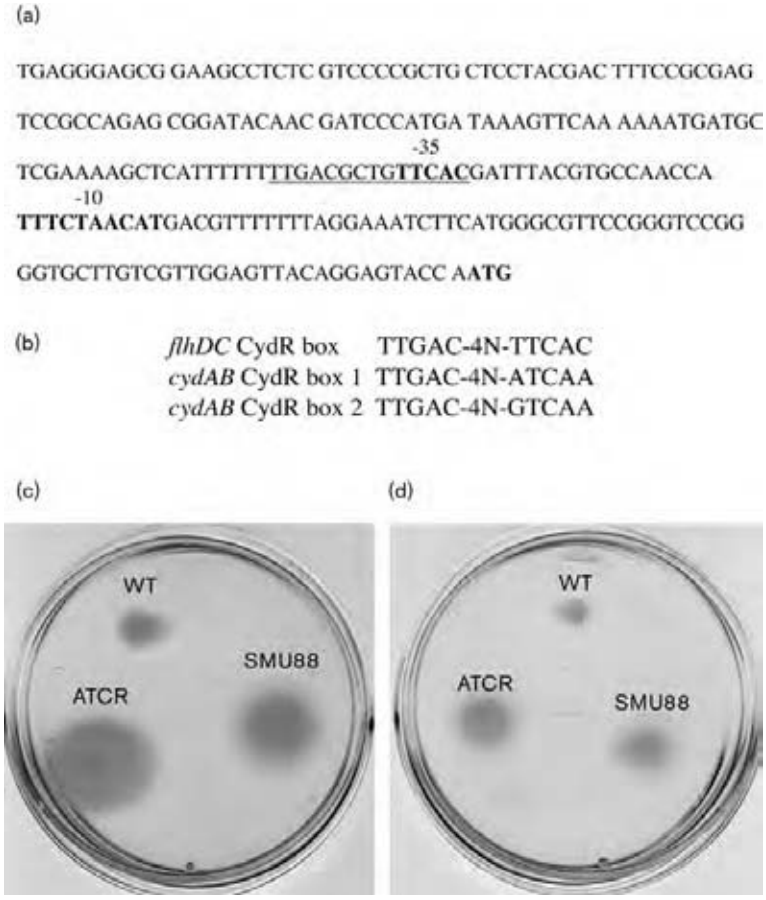


Fig. 5. Motility phenotype of *cydR* mutant. (a) DNA sequence of the 5′ region of *flhDC*. The putative CydR-binding site is underlined. The –10 and –35 regions are shown in bold. (b) Sequence alignment of the CydR boxes. (c, d) Swimming plate assay carried out in BS medium (c), and BB encystment induction medium (d), for ATCC 9046 (WT), and the *cydR* (ATCR), and *algU* (SMU88) mutants.

double mutant strain were unsuccessful, probably because of the detrimental effects on growth caused by the *cydR* mutation, and also because of the effects of the *mucA* mutation, which reduces the growth rate due to alginate overproduction (Núñez *et al.*, 2000). Taken together, these results indicate that AlgU exerts a positive control on CydR, and that this in turn is a repressor of *flhD* expression.

DISCUSSION

A. vinelandii undergoes differentiation to form a metabolically dormant cyst resistant to desiccation. A mature cyst consists of a contracted cell known as the central body, which is surrounded by a capsule containing a high proportion of alginate (Page & Sadoff, 1975). Encystment can be induced in laboratory conditions by transferring vegetative motile cells grown in liquid BS medium to Burk's medium supplemented with 0.2 % *n*-butanol or *β*-hydroxybutyrate as the sole carbon source. This induction results in loss of flagella (Sadoff, 1975).

The alternative sigma factor AlgU is required for expression of the alginate biosynthesis genes in *A. vinelandii* (Gaona *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 1998). Alginate is essential for the formation of mature cysts, and mutations in the alginate biosynthesis genes, or in *algU*, impair alginate synthesis and encystment (Campos *et al.*, 1996; Mejía-Ruíz *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, 1998). A link between alginate synthesis and flagellum expression, which are inversely regulated by the alternative sigma factor AlgU, has been shown in *P. aeruginosa* (Tart *et al.*, 2005, 2006), which is a close relative of *A. vinelandii*.

We have shown here that loss of motility upon encystment induction in *A. vinelandii* is caused by AlgU activity. Thus, as in the case of *P. aeruginosa,* alginate synthesis and flagella biogenesis, are inversely controlled by AlgU. In order to identify possible targets for AlgU among the flagella genes, we identified the *A. vinelandii* gene homologues of bacterial flagella and motility genes. Most of these genes share the highest identity with the genes of *Chr. salexigens*; this bacterium is phylogenetically closely related to *A. vinelandii*, since their 16S rRNA shares 90.86 % similarity, and this level of identity is second only to *Pseudomonas* spp., for which the similarity is around 95–96 %.

An important finding of this study was the presence in *A. vinelandii* of *fleQ* and *flhDC*, which are the master regulators of flagella biogenesis. *flhDC*, but not *fleQ*, is located in the context of other flagella genes. Inactivation of the *flhDC* and *fleQ* genes indicated that the FlhDC proteins are the master regulators of flagella biogenesis in *A. vinelandii*.

The lack of FleQ involvement in flagella biogenesis is in agreement with the absence of the *fleRS* genes (Table S2),

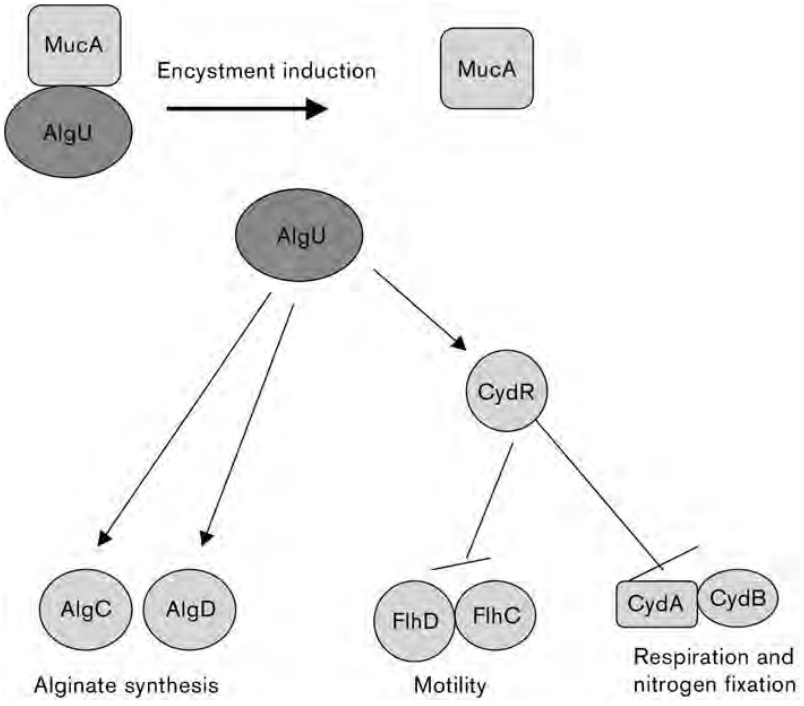


Fig. 6. Model for the control by AlgU of: motility, alginate synthesis, respiration, and nitrogen fixation upon encystment induction in *A. vinelandii*. Induction of encystment, which is likely to be caused by a stress condition, results in the release of AlgU by MucA. AlgU in turn activates transcription of alginate biosynthesis genes and CydR, which is the repressor of FlhDC and CydAB.

which are the targets of FleQ regulation in *P. aeruginosa* (Dasgupta *et al.*, 2003). It is possible that, in *A. vinelandii*, FleQ participates in regulating the expression of other genes that are not involved in flagella biogenesis.

This study showed that in *A. vinelandii*, AlgU activity inhibits flagella synthesis in vegetative cells and under encysting conditions. A negative effect of AlgU on transcription of the *flhDC* operon was also shown here. In *P. aeruginosa*, negative regulation of flagella synthesis by AlgU is carried out by activating expression of the transcriptional regulator AmrZ, which in turn represses *fleQ* transcription (Tart *et al.*, 2005, 2006). Interestingly, binding sites for CydR (CydR boxes) within the *flhDC* promoter region were identified, suggesting that CydR is a repressor of *flhDC* expression. In agreement with this proposal, inactivation of *cydR* conferred a hyper-swimming capacity to the wild-type strain. In addition, we showed that the levels of *cydR* mRNA are significantly reduced in the *algU* mutant, indicating that AlgU is required for *cydR* expression, and that CydR mediates the negative effect of AlgU. Inactivation of *cydR* was therefore expected to restore motility in the *mucA* mutant. Unfortunately, our efforts to isolate a *mucA–cydR* double mutant were unsuccessful.

CydR is a homologue of Fnr. In *A. vinelandii*, CydR has been shown to act as a repressor of the *cydAB* genes encoding cytochrome bd, which is required for aerotolerant nitrogen fixation (Wu *et al.*, 2000). The loss of flagella and nitrogen fixation activity observed upon induction of encystment (Sadoff, 1975; Hitchins & Sadoff, 1973) can now be explained by the negative effect of CydR on expression of the *cydAB* and *flhDC* genes. Taken together, the results presented in this study, indicate the existence of this regulatory cascade consisting of AlgU upstream of CydR, which in turn acts as a repressor of *flhCD* expression. A model for the control of alginate synthesis, motility, respiration and nitrogen fixation, upon encystment induction by the AlgU–CydR regulatory cascade in *A. vinelandii*, is shown in Fig. 6.

This study also showed that the common feature in the regulation of motility in both *P. aeruginosa* and *A. vinelandii* is the negative effect of AlgU, but that there is a difference in the repressor controlled by AlgU (AmrZ for *Pseudomonas*, and CydR for *Azotobacter*), and the targets of these repressors (*fleQ* for *Pseudomonas*, and *flhDC* for *A. vinelandii*). These differences may be explained by the need of *A. vinelandii* to coordinate loss of functions such as motility, high respiration rate and nitrogen fixation that occur upon encystment induction, which is a process not carried out by *Pseudomonas* species.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was founded in part by grants PAPIIT IN208805 and CONACyT U47781-Q. R. L. was the recipient of a CONACyT Scholarship. We thank Roxana Sanchez and Guadalupe Zavala for support with the electron microscopy studies, Josefina Guzmán and Soledad Moreno for technical support, and Dr Gloria Soberón for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

Aldridge, P. & Hughes, K. T. (2002). Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* **5**, 160–165.

Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. & Croughan, T. P. (1995). Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion/insertion mutagenesis. *Gene* **160**, 63–67.

Arora, S. K., Ritchings, B. W., Almira, E. C., Lory, S. & Ramphal, R. (1997). A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J Bacteriol* **179**, 5574–5581.

Bali, A., Blanco, G., Hill, S. & Kennedy, C. (1992). Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. *Appl Environ Microbiol* **58**, 1711–1718.

Blatny, J. M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H. C., Haugan, K. & Valla, S. (1997). Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl Environ Microbiol* **63**, 370–374.

Campos, M.-E., Martínez-Salazar, J. M., Lloret, L., Moreno, S., Núñez, C., Espín, G. & Soberón-Chávez, G. (1996). Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii. J Bacteriol* **178**, 1793–1799.

Clarke, M. B. & Sperandio, V. (2005). Transcriptional regulation of *flhDC* by QseBC and sigma (FliA) in enterohaemorragic *Escherichia coli. Mol Microbiol* **57**, 1734–1749.

Dasgupta, N. & Ramphal, R. (2001). Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol* **183**, 6636–6644.

Dasgupta, N., Wolfgang, M. C., Goodman, A. L., Arora, S. K., Jyot, J., Lory, S. & Ramphal, R. (2003). A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa. Mol Microbiol* **50**, 809–824.

Fellay, R., Frey, J. & Krisch, H. (1987). Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis. *Gene* **52**, 147–154.

Francez-Charlot, A., Laugel, B., Van Gemert, A., Dubarry, N., Wiorowski, F., Castanie-Cornet, M. P., Gutierrez, C. & Cam, K. (2003). RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the *flhDC* operon in *Escherichia coli. Mol Microbiol* **49**, 823–832.

Gaona, G., Núñez, C., Goldberg, J. B., Linford, A. N., Nájera, R., Castañeda, M., Guzmán, J., Espín, G. & Soberón-Chávez, G. (2004). Characterization of the *Azotobacter vinelandii algC* gene involved in alginate and lipopolysaccharide production. *FEMS Microbiol Lett* **238**, 199–206.

Garrett, E. S., Perlegas, D. & Wozniak, D. J. (1999). Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU). *J Bacteriol* **181**, 7401–7404.

Hedges, R. W. & Baumberg, S. (1973). Resistance to arsenic compounds conferred by a plasmid transmissible between strains of *Escherichia coli. J Bacteriol* **115**, 459–460.

Hitchins, V. M. & Sadoff, H. L. (1973). Sequential metabolic events during encystment in *Azotobacter vinelandii. J Bacteriol* **113**, 1273–1279.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. & Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edn, p. 79. Baltimore: Williams & Wilkins.

Jyot, J., Dasgupta, N. & Ramphal, R. (2002). FleQ, the major flagellar gene regulator in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to enhancer sites located either upstream or atypically downstream of the RpoN binding site. *J Bacteriol* **184**, 5251–5260.

Kennedy, C., Gamal, R., Hummprey, R., Ramos, J., Brigle, K. & Dean, D. (1986). The *nifH*, *nifM*, and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: characterization by Tn*5* mutagenesis and isolation from pLARF1 gene banks. *Mol Gen Genet* **205**, 318–325.

Kutsukake, K. (1997). Autogenous and global control of the flagellar master operon, *flhDC*, in *Salmonella typhimurium. Mol Gen Genet* **254**, 440–448.

Kutsukake, K. & Nambu, T. (2000). Bacterial flagellum: a paradigm for biogenesis of transenvelope supramolecular structures. *Recent Res Dev Microbiol* **4**, 607–615.

Macnab, R. M. (1996). Flagella and motility. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, pp. 123–145. Edited by F. C. Neidhardt and others. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Martin, D. W., Schurr, M. J., Mudd, M. H., Govan, J. R., Holloway, B. W. & Deretic, V. (1993). Mechanism of conversion to mucoidy in *P. aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8377–8381.

Martínez-Salazar, J. M., Moreno, S., Nájera, R., Boucher, J. C., Espín, G., Soberón-Chávez, G. & Deretic, V. (1996). Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC, and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. *J Bacteriol* **178**, 1800–1808.

Mathee, K., McPherson, C. J. & Ohman, D. E. (1997). Posttranslational control of the AlgT (*algU*)-encoded sigma22 for expression of the alginate regulon in *Pseudomonas aeruginosa* and localization of its antagonist proteins MucA and MucB (AlgN). *J Bacteriol* **179**, 3711–3720.

Mejía-Ruíz, H., Moreno, S., Guzmán, J., Nájera, R., León, R., Soberón-Chávez, G. & Espín, G. (1997). Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii algK* mutant. *FEMS Microbiol Lett* **156**, 101–106.

Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*, pp. 431–435. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Moreno, S., Nájera, R., Guzmán, J., Soberón-Chávez, G. & Espín, G. (1998). Role of alternative factor AlgU in encystment of *Azotobacter vinelandii. J Bacteriol* **180**, 2766–2769.

Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernandez, A., Juárez, K. & Espín, G. (2008). Enzyme I^{Ntr}, Npr, and IIA^{Ntr} are involved in regulation of the polyhydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii. J Mol Microbiol Biotechnol* (in press).http://dx.doi.org/10.1159/000108658

Núñez, C., León, R., Guzmán, J., Espín, G. & Soberón-Chávez, G. (2000). Role of *Azotobacter vinelandii mucA* and *mucC* gene products in alginate production. *J Bacteriol* **182**, 6550–6556.

Page, W. J. & Sadoff, H. L. (1975). Relationship between calcium and uronic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii. J Bacteriol* **122**, 145–151.

Page, W. J. & von Tigerstrom, M. (1978). Induction of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* iron limited cultures. *Can J Microbiol* **24**, 1590–1594.

Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-Gonzalez, L. & Espín, G. (2002). Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly-β-hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J Bacteriol* **184**, 5672–5677.

Qiu, D., Eisinger, V. M., Rowen, D. W. & Yu, H. D. (2007). Regulated proteolysis controls mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa. Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8107–8112.

Ramsey, D. M. & Wosniak, D. J. (2005). Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol* **56**, 309–322.

Rediers, H., Vanderleyden, J. & De Mot, R. (2004). *Azotobacter vinelandii*: a *Pseudomonas* in disguise? *Microbiology* **150**, 1117–1119.

Ritchings, B. W., Almira, E. C., Lory, S. & Ramphal, R. (1995). Cloning and phenotypic characterization of *fleS* and *fleR*, new response regulators of *Pseudomonas aeruginosa* which regulate motility and adhesion to mucin. *Infect Immun* **63**, 4868–4876.

Sadoff, H. L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol Rev* **39**, 516–539.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Schurr, M. J., Yu, H., Martinez-Salazar, J. M., Boucher, J. C. & Deretic, V. (1996). Control of AlgU, a member of the sigma E-like family of stress sigma factors, by the negative regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. *J Bacteriol* **178**, 4997–5004.

Soutourina, O., Kolb, A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Rimsky, S., Danchin, A. & Bertin, P. (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.

Tart, A. H., Wolfgang, M. C. & Wosniak, D. J. (2005). The alternative sigma factor AlgT represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of *fleQ*. *J Bacteriol* **187**, 7955–7962.

Tart, A. H., Blanks, M. J. & Wosniak, D. J. (2006). The AlgT-dependent transcriptional regulator AmrZ (AlgZ) inhibits flagellum biosynthesis in mucoid, nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *J Bacteriol* **188**, 6483–6489.

Wei, B. L., Brun-Zinkernagel, A. M., Simecka, J. W., Pruss, B. M., Babitzke, P. & Romeo, T. (2001). Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **40**, 245–256.

Wozniak, D. J. & Ohman, D. E. (1994). Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* genes *algR*, *algB*, and *algD* reveals a hierarchy of alginate gene expression which is modulated by *algT*. *J Bacteriol* **176**, 6007–6014.

Wu, G., Cruz-Ramos, H., Hill, S., Green, J., Sawers, G. & Poole, R. K. (2000). Regulation of cytochrome bd expression in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii* by CydR (Fnr). Sensitivity to oxygen species, and nitric oxide. *J Biol Chem* **275**, 4679–4686.

Xie, Z. D., Hershberger, C. D., Shankar, S., Ye, R. W. & Chakrabarty, A. M. (1996). Sigma factor-anti-sigma factor interaction in alginate synthesis: inhibition of AlgT by MucA. *J Bacteriol* **178**, 4990–4996.

Yanagihara, S., Iyoda, S., Ohnishi, K., Iino, T. & Kutsukake, K. (1999). Structure and transcriptional control of the flagellar master operon of *Salmonella typhimurium*. *Genes Genet Syst* **74**, 105–111.

Edited by: M. F. Hynes

microbiology

Offprint Order Form

PAPER mic2008/017665 **Please quote this number in any correspondence**

Authors R. León and G. Espín **Date** _____

I would like 25 free offprints, plus ☐ additional offprints, giving a **total of** ☐ **offprints**

Dispatch address for offprints (BLOCK CAPITALS please)

_____

_____

_____

_____

Please complete this form **even if you do not want extra offprints.** Do not delay returning your proofs by waiting for a purchase order for your offprints: the offprint order form can be sent separately.

Please pay by credit card or cheque with your order if possible. Alternatively, we can invoice you. All remittances should be made payable to **'Society for General Microbiology'** and crossed **'A/C Payee only'**.

Tick one

☐ Charge my credit card account (give card details below)
☐ I enclose a cheque/draft payable to Society for General Microbiology
☐ Purchase order enclosed

Return this form to: *Microbiology* Editorial Office, Marlborough House, Basingstoke Road, Spencers Wood, Reading RG7 1AG, UK.

CHARGES FOR ADDITIONAL OFFPRINTS

Copies	25	50	75	100	125	150	175	200	Per 25 extra
No. of pages									
1-2	£23	£40	£58	£76	£92	£110	£128	£145	£23
3-4	£35	£58	£81	£104	£128	£150	£173	£191	£29
5-8	£46	£76	£104	£133	£162	£191	£219	£249	£35
9-16	£58	£92	£128	£162	£196	£231	£267	£301	£40
17-24	£70	£110	£151	£191	£231	£272	£312	£353	£46
each 8pp extra	£18	£23	£29	£35	£40	£46	£53	£58	

OFFICE USE ONLY
Issue:
Vol/part:
Page nos:
Extent:
Price:
Invoice: IR/

PAYMENT BY CREDIT CARD *(Note: we cannot accept American Express)*

Please charge the sum of £_____ to my credit card account.

My Mastercard/Visa number is (*circle appropriate card; no others acceptable*):

				Expiry date			Security Number	

Signature: _____ Date: _____

Cardholder's name and address*: _____

_____

**Address to which your credit card statement is sent. Your offprints will be sent to the address shown at the top of the form.*

May 2006