

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS
PROMOTORES DIVERGENTES FLAGELARES *flhA* y *flgA* Y
DETERMINACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN DEL
ACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL *FleQ/FleT* DE
Rhodobacter sphaeroides”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE: DOCTOR EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS**

PRESENTA A: LUZ JULIETA PEÑA SÁNCHEZ

TUTOR DE TESIS: DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA

México D.F. 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

“Análisis de la regulación de la transcripción de los promotores divergentes flagelares *flhA* y *flgA* y determinación del sitio de unión del activador transcripcional flagelar FleQ de *Rhodobacter sphaeroides*”

Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias Biomédicas presenta:

Luz Julieta Peña Sánchez

**Comité tutoral: Dra. Rosa Laura Camarena Mejía
Dr. Georges Dreyfus Cortés
Dr. Luis Servín González**

**Jurado: Presidente: Dr. Roberto Coria Ortega
Secretaría: Dra. Rosa Laura Camarena Mejía
Vocal: Dr. Gabriel Guarneros Peña
Vocal: Dr. Roberto Hernández Fernández
Vocal: Dra. Bertha Maria J. González-Pedrajo**

México D.F 2009

Agradezco con todo mi corazón, a mi amado esposo y a mis tiernos y hermosos hijos junto con mis adorados padres y hermana, por brindarme su amor y apoyo incondicional y por ser la fuente de inspiración diaria en mi vida; ¡ también te agradezco a ti, querido Dios y padre mío por ser la luz que guía e ilumina mi vida.!

¡GRACIAS POR UN REGALO MAS!

ÍNDICE

RESUMEN	i
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Estructura y función del factor δ^{54}	1
1.2 Activadores del factor sigma 54	4
1.3 Jerarquía transcripcional de los genes flagelares de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	7
1.3.1 Clase I	7
1.3.2 Clase II y Clase III	7
1.3.3 Clase IV	9
1.4 Arreglo genético de los operones putativos de <i>pflhA</i> y <i>pflgA</i>	10
1.5 Modelo de regulación de la transcripción mediada por la holoenzima $E\sigma^{54}$	10
1.6 Hipótesis	12
1.7 Objetivos	12
2 MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1 Técnicas utilizadas para hacer las construcciones de las diferentes fusionestranscripcionales con el gen reportero <i>uidA</i> (β -glucuronidasa)	13
2.1.1 Cepas, plásmidos y condiciones de crecimiento	13
2.1.2 Extracción de DNA cromosomal de <i>R. sphaeroides</i> (WS8).	14
2.1.3 Preparación de células competentes	14
2.1.4 Reacción en cadena de la polimerasa PCR	15
2.1.5 Extracción de plásmidos	15
2.1.6 Clonación (Restricción y ligación)	15
2.1.7 Transformación	16
2.1.8 Tamizaje de las clonaciones	16
2.1.9 Conjugaciones	16
2.1.10 Determinación del fenotipo en cajas de nado y al microscopio óptico.	17
2.1.11 Ensayos de β -glucuronidasa	18
2.2 Diseño de la mutante por inserción de un casete de espectinomycinina entre las 53 pb	

que separan a los promotores <i>pflgA</i> y <i>pflhA</i> de <i>R. sphaeroides</i>	18
2.2.1 Mutagénesis dirigida	20
2.2.2 Footprinting <i>in vivo</i>	20
2.2.3 Búsqueda de motivos por análisis computacionales	21
3. RESULTADOS	27
3.1 Actividad Transcripcional de los promotores flagelares <i>pflgAp</i> y <i>pflhAp</i> en la cepa silvestre WS8 y en la cepa SP13 (<i>fleQΔ::kan</i>)	27
3.2 Delimitación del sitio de unión del complejo activador FleQ/FleT en <i>pflhA</i> y <i>pflgA</i>	27
3.3 Fusiones transcripcionales de <i>pflhA</i> y <i>pflgA</i> que no incluyen las posibles regiones de unión de proteínas activadoras	31
3.4 Fusiones transcripcionales de <i>pflhA</i> y <i>pflgA</i> con inserciones entre las 53 pb que separan a ambos promotores.	33
3.5 Determinación del fenotipo de una mutante en la cepa silvestre WS8 por inserción de un casete de espectinomicina entre las 53 pb que separan los promotores divergentes <i>pflhA</i> y <i>pflgA</i> .	33
3.6 Determinación del posible sitio de unión del complejo activador FleQ/FleT en los promotores <i>pflgB</i> y <i>pflgG</i>	34
3.6.1 Fusiones transcripcionales de los promotores <i>pflgB</i> , <i>pflgG</i>	34
3.7 Footprinting <i>in vivo</i> de la cadena antisentido del promotor <i>pMotA</i>	37
3.8 Análisis computacionales del sitio de unión del complejo activador FleQ/FleT.	39
4 DISCUSIÓN	42
5 CONCLUSIONES	52
6 PERSPECTIVAS	53
7. BIBLIOGRAFÍA	54
8. ANEXOS	

RESUMEN

Rhodobacter spheroides es una bacteria púrpura no sulfurosa, fotosintética, la cual utiliza para nadar un único flagelo subpolar que rota unidireccionalmente. La morfogénesis flagelar al igual que transcripción de los genes flagelares son procesos regulados de forma jerárquica. Río arriba de los genes flagelares *flhA* y *flgA* se encuentran dos promotores divergentes dependientes de sigma 54 (σ^{54}), separados por 53 pb. Los promotores dependientes de σ^{54} son siempre regulados por activadores transcripcionales que pertenecen a la familia de las EPB (enhancer binding proteins). En el modelo clásico de transcripción dependiente de sigma 54, las EBPs se unen a secuencias denominadas UAS (sitios de unión de proteínas activadoras), localizadas generalmente de 100 a 250 pb corriente arriba de su promotor, lo cual les permite formar un asa de DNA facilitando el contacto con la holoenzima. En *Rhodobacter sphaeroides* el activador maestro FleQ forma un complejo hetero- oligomérico con el activador FleT, el cual se encarga de la regulación transcripcional de la mayoría de los promotores flagelares incluyendo a *pflhA* y *pflgA*. Es de interés poder determinar tanto el posible sitio de unión del activador FleQ como la regulación de estos dos promotores ya que la distancia entre uno y otro es de solo 53 pb. Para delimitar los posibles sitios de unión del activador se hicieron diversas fusiones transcripcionales con los promotores divergentes *pflhA* y *pflgA* y con los promotores *pflgB* y *pflgG* en el plásmido pBBMCS53 que tiene el gen reportero *uidA* el cual codifica para la enzima β -glucuronidasa. Las actividades obtenidas permitieron delimitar posibles sitios de unión de complejo activador FleQ/FleT corriente abajo de *pflhA* y *pflgA* y corriente

arriba de *pflgB* y *pflgG* entre las posiciones +23 a +149 bp, +139 a +270 bp y -125 a -222 pb, -99 a -180 pb respectivamente; Análisis computacionales de las estas zonas junto con regiones previamente delimitadas de los promotores *pfljO*, y *pmotA* permitieron identificar una secuencia que puede representar el sitio de unión del complejo activador FleQ/FleT.

1. INTRODUCCIÓN

Rhodobacter sphaeroides es una bacteria púrpura no sulfurosa la cual, a diferencia de otras bacterias como *E. coli*, utiliza para nadar un único flagelo subpolar que rota unidireccionalmente. Estructuralmente el flagelo se divide en tres estructuras básicas que son: el cuerpo basal, el gancho y el filamento (Fig 1). En el caso de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium la biogénesis del flagelo depende de la expresión de más de 40 genes los cuales codifican para proteínas estructurales o para proteínas involucradas en el control de la formación del flagelo a nivel transcripcional o postranscripcional. Entre las proteínas no estructurales, se encuentran por un lado, factores sigma alternativos, activadores transcripcionales, etc. y por otro lado, proteínas involucradas en la exportación de los componentes flagelares ¹. En la mayoría de los microorganismos a la fecha estudiados, la transcripción de los genes flagelares se encuentra controlada siguiendo un patrón jerárquico de expresión. En enterobacterias, hay tres niveles en la jerarquía transcripcional, los dos primeros niveles (clase I y II) dependen del factor sigma 70. Sin embargo, en algunas bacterias no entéricas como es el caso de *Vibrio cholerae* y *R. sphaeroides* el factor sigma 54 es necesario para la transcripción de los genes flagelares tempranos (clase II y III) ²⁻⁴. A pesar de esta divergencia, en todas ellas, la expresión de los genes tardíos, incluyendo el gen de la flagelina, depende del factor sigma 28 ⁵⁻⁹.

1.1 Estructura y función del factor δ^{54}

En bacterias, el factor sigma (δ) le confiere especificidad al núcleo catalítico de la RNA polimerasa, lo que da por resultado el reconocimiento específico de la secuencia promotora. En una misma bacteria, existen factores sigma alternativos

al factor sigma principal o de mantenimiento (σ^{70}). Los factores sigma alternativos permiten que el núcleo catalítico de la RNA polimerasa (E) pueda reconocer diferentes secuencias promotoras ¹⁰. Existen dos familias de factores sigma: σ^{70} y σ^{54} los cuales se diferencian entre sí tanto por su secuencia como por la forma en la cual controlan los eventos tempranos durante la iniciación de la transcripción. El factor σ^{70} reconoce la secuencia del promotor en las posiciones -35 y -10 con respecto al sitio de inicio de la transcripción y generalmente la regulación de la transcripción se da por proteínas que

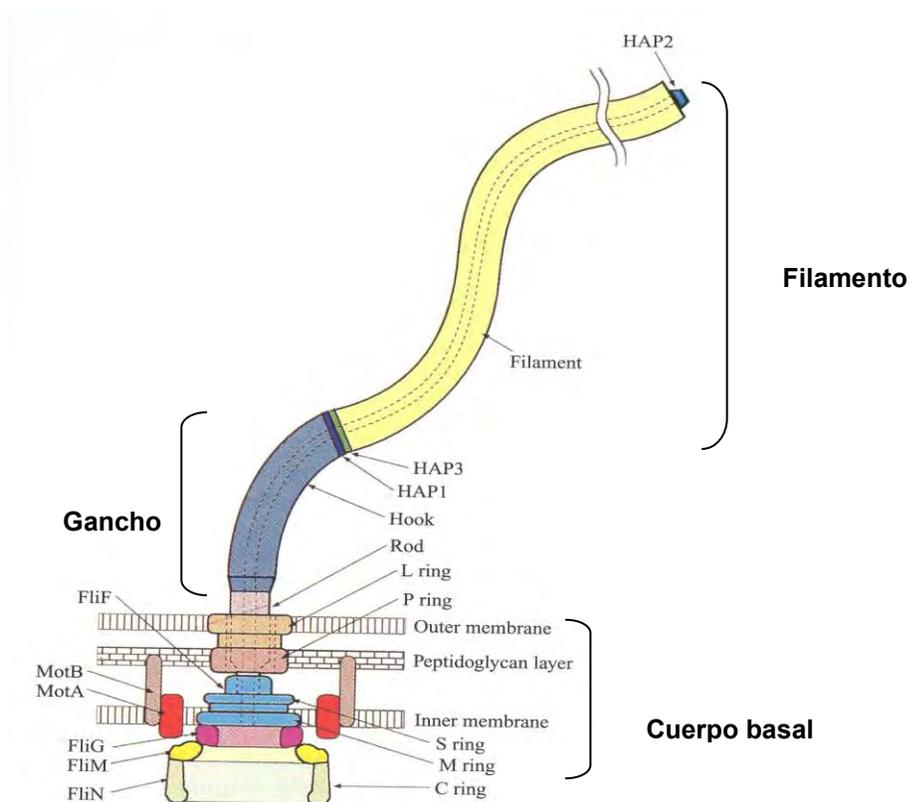


Fig.1. Representación gráfica de la estructura flagelar

obstruyen o reclutan a la holoenzima $E\sigma^{70}$. El factor sigma σ^{54} reconoce las secuencias localizadas en las posiciones -24 y -12 con respecto al sitio de inicio de transcripción, donde permanece asociado al promotor (complejo cerrado) en ausencia de activador ¹¹⁻¹⁴. La secuencia consenso de los promotores reconocidos

por σ^{54} es TGGCAC N5 TTGCA/T, siendo los nucleótidos GG y GC, así como la distancia entre ellos prácticamente invariable ¹⁵.

El factor σ^{54} fue reconocido originalmente en bacterias entéricas y su papel principal se ha descrito en la regulación de la transcripción de genes que participan en el metabolismo del nitrógeno especialmente en proteobacterias ¹⁶. Estudios posteriores han identificado la presencia de este factor en otras especies bacterianas, en las cuales su función sigue siendo la de mediar respuestas transcripcionales de acuerdo a las necesidades fisiológicas. La participación de σ^{54} en la regulación de la motilidad se ha descrito en diferentes bacterias Gram-negativas como *Pseudomona putida*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Helicobacter pylori*, *Caulobacter crescensus*, *Campylobacter jejuni* y *Rhodobacter sphaeroides* ^{4, 17, 18}. En general σ^{54} se ha asociado a funciones como: la utilización de varias fuentes de nitrógeno y carbono, el metabolismo energético, la quimiotaxis, la formación del flagelo, el transporte de electrones, la respuesta al estrés calórico, y con la expresión de otros factores sigmas alternativos ¹⁹.

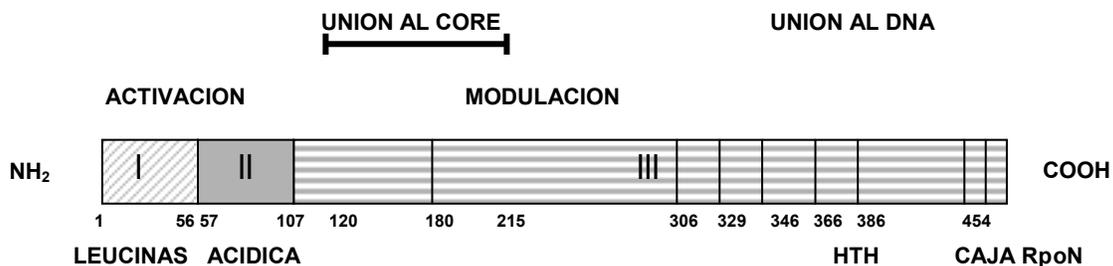


Fig. 1.1 Representación esquemática de los dominios de σ^{54} . La proteína se divide en tres regiones (I, II, III) ¹². En la región I se encuentran las secuencias de respuesta a la proteína activadora. La región II es ácida y variable. La región III tiene un motivo HTH (hélice vuelta hélice) relacionado con la unión al DNA, cerca se encuentran secuencias que modulan la unión al DNA. La caja RpoN se encuentra en el COOH-terminal. Los determinantes de unión al núcleo catalítico de la RNA polimerasa, van del aminoácido 120 al 215 ²⁰. Figura modificada de Buck y colaboradores ²⁰.

La mayoría de las bacterias cuentan con una sola copia del gen *rpoN* el cual codifica para el factor σ^{54} ó RpoN ¹⁹. En *Rhodobacter sphaeroides* se han identificado cuatro factores σ^{54} ²¹, los cuales no tienen funciones intercambiables. RpoN1 y RpoN2 son requeridos específicamente para la transcripción de los

genes de la fijación de nitrógeno y para la expresión de los genes flagelares, respectivamente ²².

El factor sigma 54 se divide estructuralmente en tres regiones: 1. La región I se encuentra en el dominio amino-terminal y participa en la inhibición de la isomerización de la RNA polimerasa en ausencia de la proteína activadora ²³⁻²⁵, así como en la iniciación de la transcripción en respuesta a la activación ²⁴⁻²⁶. 2. La región II se caracteriza por ser una región ácida y no muy conservada, su función se ha relacionado con la separación de las dos hebras de DNA durante la formación de complejo abierto ²³. La región III se ubica en la porción carboxilo terminal de la proteína y en ella se encuentran los determinantes de unión al DNA. En particular, el motivo conocido como caja RpoN el cual se asocia a la región -24 del promotor. De forma adicional a estos elementos, en la región que abarca de los aminoácidos 120 al 215, se encuentran elementos de unión al núcleo catalítico de la RNA polimerasa (Fig.1.1). A diferencia de sigma 70, sigma 54 se puede unir a ciertos promotores en ausencia del núcleo catalítico de la RNA polimerasa ²⁷.

1.2 Activadores del factor sigma 54

Los promotores dependientes de σ^{54} son siempre regulados por activadores transcripcionales que pertenecen a la familia de las EBPs (enhancer binding proteins), estos activadores estimulan la transición de complejo cerrado a complejo abierto ¹³. Los activadores σ^{54} pertenecen a la familia de proteínas denominadas AAA+ ATPasas (triple A: **A**TPasas **A**sociadas con varias **A**ctividades celulares). Las proteínas que pertenecen a esta familia muestran una gran similitud en las secuencias involucradas en la unión e hidrólisis de ATP ²⁸. En algún punto de su funcionamiento las proteínas AAA+ existen como oligómeros que frecuentemente se organizan en una estructura hexamérica en forma de anillo ^{29, 30}. Se ha visto que la unión de nucleótidos afecta el estado oligomérico de los activadores de σ^{54} . Asimismo se ha observado que en el caso del activador NtrC, la unión de éste con el DNA favorece la formación de oligómeros (Fig.1.4) ³¹.

Los activadores sigma 54 generalmente están compuestos por tres dominios funcionales: un dominio amino-terminal involucrado en la recepción de señales, un dominio central o de activación de la transcripción y un dominio carboxilo-terminal de unión al DNA (Fig 1.2)^{32, 33}.

La región amino terminal es la menos conservada, es de longitud variable y se le conoce como el dominio sensor de la proteína ya que controla la actividad del dominio central en respuesta a señales particulares³⁴⁻³⁶. Las EBPs que no tienen este dominio son constitutivamente activas y generalmente son controladas por otra proteína que se une a ellas³⁷⁻³⁹.

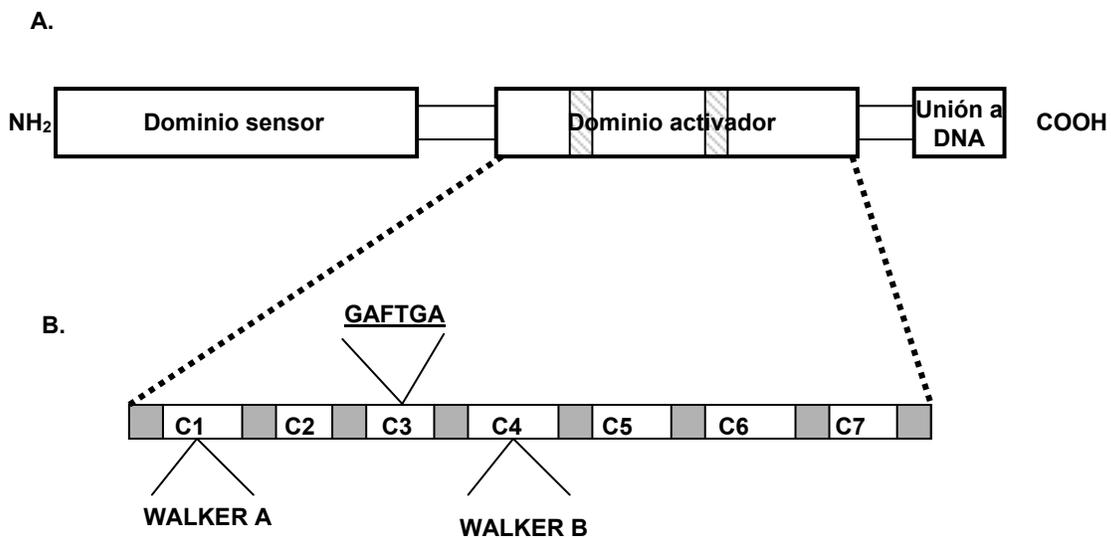


Fig. 1.2 Representación esquemática de los dominios del activador σ^{54} DmpR. A. Las cajas grises representan la localización de los motivos implicados en la hidrólisis de ATP. B. Representación de las 7 cajas del dominio central. La C1 ó Walker A tiene un motivo de unión a ATP, C3 tiene un motivo GAFTGA conservado el cual está involucrado en el contacto con σ^{54} . Modificado del artículo de Xu⁴³.

La región central es altamente conservada y se encuentra relacionada con la activación transcripcional. En esta región se encuentran los determinantes necesarios para la unión e hidrólisis de ATP, así como para la interacción con σ^{54} . Mediante comparaciones con otras EBPs, en esta región se han identificado 7

regiones o cajas conservadas (C1 a C7)¹¹. La caja 1 se denomina Walker A, y tiene el motivo de unión a ATP (G-G-GK), la caja 4 o Walker B permite la unión del Mg⁺ el cual es necesario para la hidrólisis de ATP. La caja 3 tiene un motivo altamente conservado entre los activadores σ^{54} (GAFTGA) (Fig 1.2). Estudios del motivo GAFTGA en los activadores NtrC, DctD, y NifA sugieren que éste interactúa con el factor δ^{54} durante la formación del complejo abierto (evento que se encuentra acoplado a la hidrólisis de ATP)^{40, 41}. El dominio C-terminal de la mayoría de los activadores de σ^{54} contiene un motivo hélice vuelta hélice de unión al DNA, el cual es análogo a los encontrados en numerosos activadores y represores transcripcionales (Fig 1.2). El papel de este dominio de unión es proporcionar especificidad a la EPB por un determinado sitio en el DNA. La zona a la cual se une la proteína activadora se conoce con el nombre de UAS (upstream activating sequence) o región “enhancer”. Se ha propuesto que esta región ejerce una influencia positiva en el proceso de activación y se sugiere que esto se debe al incremento de la concentración local del activador cerca de su promotor^{31, 42}.

Recientemente, se identificó la presencia de dos activadores flagelares en *Rhodobacter sphaeroides* denominados FleQ y FleT. Estas proteínas pertenecen a la familia de las EBPs y ambas son necesarias para activar la expresión de los genes flagelares. La evidencia experimental sugiere que estas proteínas forman un complejo hetero-oligomérico para llevar a cabo su función. Análisis de predicción de dominios revelaron que ninguno de estos activadores tiene dominio sensor y que FleT no tiene dominio HTH (hélice vuelta hélice) de unión a DNA⁴. En la región central de estos activadores se encontró que FleQ tiene bien conservadas las 7 cajas características de las EBPs a diferencia de FleT, que presenta algunas variaciones; específicamente, se encontraron dos aminoácidos que no son iguales al consenso y se encuentran ubicados hacia la mitad de la región amino-terminal de la caja C3 (Fig 1.2.1)⁴.

FleT

```
* ***** * ***XXX***** *****
TVFINGPTGSGKEVLARKVHEASRRAAAPFIAINCAAIPENMLEAMLEFGHEKGAFTGASGANKGHIRAAEFGTLLIDEVSEMPMGLQSKLLRVLQERRVTPLG
C1 C2 C3 C4 C5
**X** X**
SQTEVPVDYRIVATSNRHMPEEVRRREREDLWYRLNVFPLTKPLCERPDIPALAVALLRRHCPAELALPLLTPAELETLLAHDWPGNVRELENVIQRALVL
C6 C7
```

FleQ

```
* ***** *****XXX***** *****
PVLVRGSGTGTGKELAEEALHRASGRGGALIAVNCAAI PADLLESELEFGHEKGAFTGADRQRIGRIEMAHGGTLEDEIGDMPLALQAKLLRVLESRRISRVGGT
C1 C2 C3 C4 C5
**X***X**
SEIEVDERLYTATHRNLDQAQAAGGFRCDLYYRINVFPLELPDLRERASDIPLILARMLDQLARDPALDLPDFDTSALRALAGHSWPGNVRELRNVLARAIVL
C6 C7
```

Fig 1.2.1. Motivos conservados de la región central de los activadores FleQ y FleT según lo reportado por Poggio y colaboradores (2005)⁴. Los motivos del C1 al C7 se encuentran subrayados. Las cajas grises representan los motivos reportados previamente por Xu y Hoover (2001)⁴³, los asteriscos indican los aminoácidos que empatan con el consenso y las X indican posiciones para las cuales no hay preferencia para la secuencia consenso, mientras los aminoácidos no conservados carecen de símbolo.

1.3 Jerarquía transcripcional de los genes flagelares de *Rhodobacter sphaeroides*

1.3.1 Clase I

A esta categoría pertenece el activador maestro FleQ el cual, de acuerdo a las actividades obtenidas utilizando fusiones transcripcionales del reportero *'uidA* a

los diferentes promotores flagelares, demostró ser indispensable para la expresión de toda la jerarquía flagelar. Como se mencionó en la sección anterior, FleQ carece de la región amino-terminal presente en otras EBPs, lo que sugiere que este activador transcripcional es constitutivamente activo. En consecuencia, la biogénesis flagelar es regulada exclusivamente por el nivel de expresión de FleQ (Fig 1.4)⁴.

1.3.2 Clase II y Clase III

Las actividades obtenidas de fusiones transcripcionales de varios promotores flagelares dependientes de sigma 54 que fueron probados en cepas con mutaciones en los genes *fleQ*, *fleT* y en la doble mutante *fleQ/fleT* permitieron identificar la presencia de dos tipos de promotores. Uno es el promotor del operón que incluye a los genes *fleT*, *fliE*, *fliF*, *fliG*, *fliH*, *fliI*, y *fliJ*. En este promotor la presencia de FleQ fue suficiente para observar un aumento en la expresión del gen reportero; pero FleQ no es suficiente para activar completamente el segundo tipo de promotores, los cuales dependen tanto de la presencia la proteína activadora FleT como de FleQ. Por tanto, el operón *fleT* se transcribe una vez que FleQ se empieza a acumular en el citoplasma. Se han asignado diversas funciones a las proteínas codificadas en el operón *fleT*. Por ejemplo, FliI es una ATPasa flagelar específica⁴⁴⁻⁴⁶, cuya actividad es modulada por FliH. FliJ es una chaperona flagelar⁴⁷. FliF es la primera proteína flagelar que se inserta en la membrana y FliE se ubica en la cara periplásmica del anillo formado por las subunidades de FliF⁴⁸.

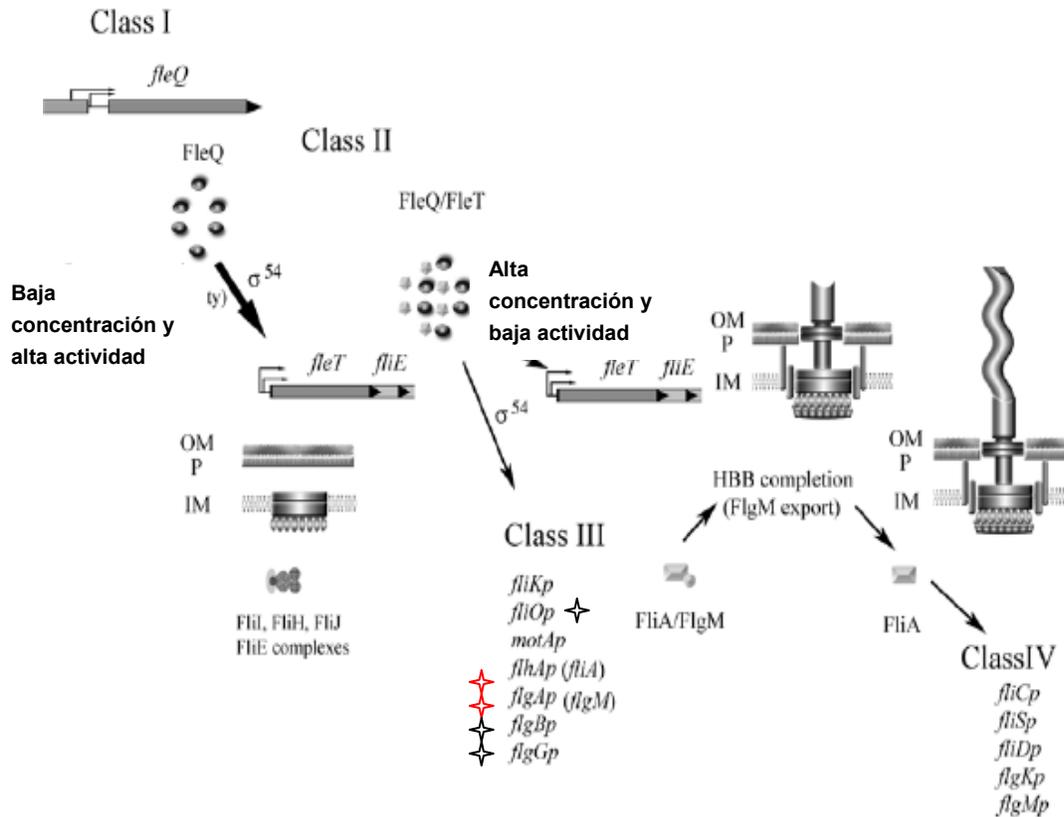
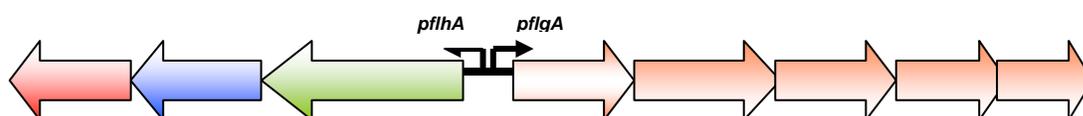


Fig 1.3 Representación esquemática de la regulación transcripcional y la biogénesis flagelar de *Rhodobacter sphaeroides*. Promotores divergentes *pflhA* y *pflgA* –clase III (estrella roja), promotor *flgB* y *pflgA* (estrella negra) ⁴.

Por lo tanto a partir de la expresión del operón de clase II, en el citoplasma se forma un complejo que contiene a las proteínas FliH, FliI y FliJ, las cuales son indispensables para la exportación del resto de los componentes del flagelo ^{48, 49}.

Los operones que pertenecen a la clase III de la jerarquía flagelar tienen promotores dependientes de sigma 54 que requieren para su completa expresión de la presencia tanto de FleQ como de FleT. A este grupo pertenecen la mayoría de los genes que codifican para las proteínas que dan lugar al cuerpo basal y al aparato de exportación flagelar. En esta jerarquía se encuentran dos promotores divergentes separados por 53 pb denominados *pflhA* y *pflgA* (Fig 1.4) ^{9, 18}.



fliA *flhF* *flhA* 53pb *RSP0035* *RSP6086* *flgA* *flgM* *RSP6087*

Fig 1.4 Esquema de los dos posibles operones expresados a partir de los promotores divergentes flagelares *pflhA* y *pflgA*. Las flechas negras indican la dirección de la transcripción de cada promotor.

1.3.3 Clase IV

En este grupo se encuentran los últimos genes requeridos para la biogénesis flagelar y su transcripción depende del factor sigma 28. Evidencia obtenida por Poggio y colaboradores en el 2005, permitió concluir que *fliC* (flagelina), *fliD* y *fliS* son expresados en este nivel de la jerarquía transcripcional.

1.4 Arreglo genético de los operones putativos *flhA* y *flgA*

En el operón *flhA* se localiza el gen *flhA* seguido corriente abajo por los genes *flhF* y *fliA*. La función de FlhF es aún desconocida, *fliA* codifica para el factor sigma 28 (regulador positivo de la transcripción de los genes flagelares clase IV) y FlhA forma parte del aparato de exportación. En el operón *flgA* se encuentran dos marcos de lectura sin función conocida (*RSP0035* y *RSP6086*) seguidos por los genes *flgA*, *flgM* y otro marco de lectura abierto (*RSP6087*) de función a la fecha desconocida. FlgA está involucrado en la formación del anillo P, mientras que FlgM es el factor anti-sigma 28. A los promotores de estos posible operones se les asignó el nombre *pflhA* y *pflgA* que corresponde al gen más cercano con función conocida al promotor (Fig. 1.4).

1.5 Modelo de regulación de la transcripción mediada por la holoenzima $E\sigma^{54}$

La transcripción de los promotores dependientes de σ^{54} ocurre cuando la holoenzima junto con σ^{54} ($E\sigma^{54}$) se une a las secuencias promotoras, formando un complejo cerrado inactivo; dentro de este complejo las bases que se encuentran corriente abajo de la caja -12 (GC) son temporalmente distorsionadas formando una estructura de DNA denominada horquilla (fork junction)²⁰, esta estructura es usada por $E\sigma^{54}$ para establecer las interacciones que previenen la separación de las dos hebras del DNA en ausencia de activación. El paso de complejo cerrado a abierto requiere de la presencia de un activador especializado usualmente conocido como, EPB⁵⁰. Los activadores de $E\sigma^{54}$, o EBPs, se unen usualmente a secuencias localizadas generalmente 150 pb corriente arriba del promotor; esta región del DNA se conoce como enhancer o UAS (upstream activating sequence). El contacto entre el activador y $E\sigma^{54}$ ocurre mediante la formación de un asa en el DNA (Fig.1.5). En algunos

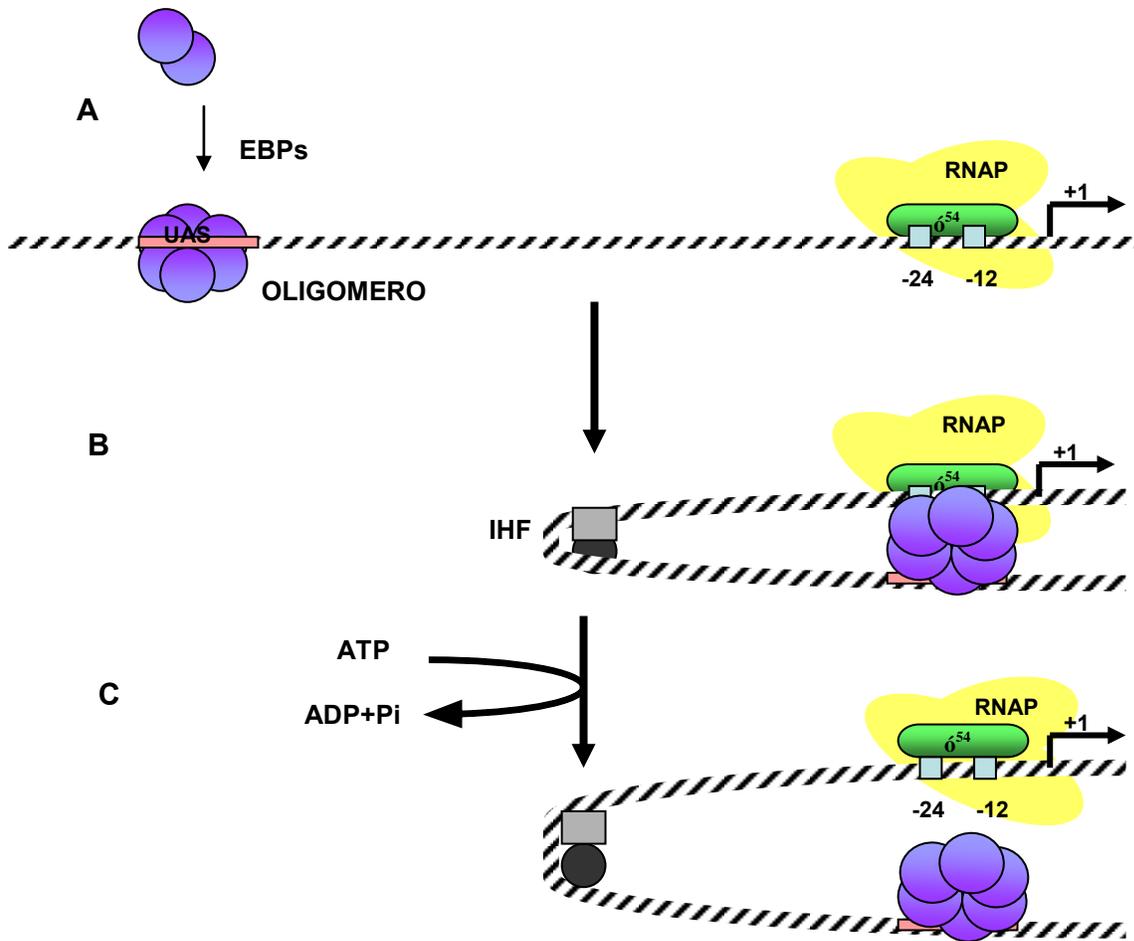


Fig. 1.5 Representación esquemática de la transcripción de promotores dependientes de σ^{54} por proteínas activadoras (EBPs). **A.** σ^{54} se une a las secuencias promotoras ubicadas alrededor de las posiciones -24 y -12 con respecto al sitio de inicio de la transcripción y junto con el núcleo catalítico de la RNA polimerasa ($E\sigma^{54}$), forman el complejo cerrado. Las EBPs se unen a las secuencias denominadas UAS localizadas corriente arriba del promotor. **B.** Las EBPs oligomerizan y forman un anillo hexamérico, el cual contacta el complejo cerrado ($E\sigma^{54}$ -promotor) a través de la formación de un asa de DNA. La proteína IHF en algunos promotores, ayuda a doblar el DNA. **C.** La hidrólisis de ATP del dominio activador AAA+ de la EPB se acopla al complejo cerrado permitiendo la transición a complejo abierto; las hebras de DNA se separan y se da el inicio de la transcripción.

promotores la formación de esta asa es favorecida por la presencia de proteínas como IHF (factor de integración del huésped) la cual facilita el doblamiento del DNA en 160° y en algunos promotores, el reclutamiento de $E\sigma^{54}$ ⁵¹. En el complejo cerrado, $E\sigma^{54}$ contacta predominantemente una sola cara de la doble hélice,

recientemente, se reportó que la EBP interactúa con la holoenzima sobre la cara opuesta a esta (Fig.1.5) ⁵².

En este trabajo nos planteamos como objetivo el delimitar el sitio de unión del complejo activador FleQ/FleT tanto en los promotores divergentes flagelares *pflhA* y *pflgA* como en los promotores *pflgG* y *pflgB* de *Rhodobacter sphaeroides*. Para ello, se llevó a cabo un mapeo por delección de cada una de estas regiones promotoras fusionadas al gen reportero *uidA*, el cual codifica para la enzima β -glucuronidasa. Asimismo, se llevaron a cabo experimentos de protección, con el fin de detectar la zona del DNA que pudiera ser protegida de la metilación por DMS debido a la unión del complejo FleQ/FleT.

1.6 Hipótesis

Los promotores divergentes *pflhA* y *pflgA* comparten secuencias regulatorias en el sitio de unión del complejo activador FleQ/FleT, ya que la distancia entre uno y otro promotor es de solo 53 pb.

1.7 Objetivos

1. Identificar la región necesaria para la activación de los promotores divergentes *pflhA* y *pflgA*.
2. Identificar la región necesaria para la activación de los promotores *pflgB* y *pflgG*.
3. Identificar la posible zona de unión del complejo FleQ/FleT, mediante ensayos de protección.
4. Analizar computacionalmente las secuencias de las regiones identificadas en los puntos anteriores con el propósito de determinar una posible secuencia consenso.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Técnicas utilizadas para hacer las construcciones de las diferentes fusiones transcripcionales con el gen reportero *uidA* (β -glucuronidasa)

Para delimitar los posibles sitios de unión del complejo activador FleQ/FleT tanto en los promotores divergentes *pflhA* y *pflgA* como en *pflgB* y *pflgG*, se amplificaron por PCR diferentes fragmentos que delimitan la posible región blanco de los activadores. Los productos de amplificación fueron clonados en el vector pTZ19R y subclonados en el vector denominado pBBMCS53, el cual tiene clonado el gen reportero *uidA* (β -glucuronidasa). Posteriormente dichos plásmidos fueron transferidos por conjugación a la cepa tipo silvestre de *R. sphaeroides* (WS8) así como a las cepas SP12 y SP13. A las cepas exconjugantes obtenidas se les hicieron ensayos de actividad de β -glucuronidasa utilizando como sustrato el 4-metil umbeliferil- β -D-glucuronido. De cada cepa se obtuvieron tres extractos a los cuales se les midió la actividad de β -glucuronidasa. A continuación se describen cada uno de los materiales y los métodos utilizados.

2.1.1 Cepas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Tanto los plásmidos como las cepas de *E. coli* y de *R. sphaeroides* se encuentran descritos en la Tabla 2.1. *R. sphaeroides* fue crecido en medio mínimo⁵³, en agitación constante de 200 rpm sin presencia de luz a 30 °C y las diferentes cepas de *E.coli* fueron crecidas en medio Luria Bertani (LB) a 37°C con agitación constante de 200 rpm. Los antibióticos y las concentraciones utilizadas fueron: para *R. sphaeroides* 50 μ g/ml de espectinomicina; 25 μ g/ml de kanamicina; 1 μ g/ml de tetraciclina; 5 μ g/ml de gentamicina para *E. coli*, y 100 μ g/ml de espectinomicina; 50 μ g/ml de kanamicina; 15 μ g/ml de tetraciclina; 30 μ g/ml de gentamicina; 100 μ g/ml de ampicilina.

2.1.2 Extracción de DNA cromosomal de *R. sphaeroides* (WS8).

Se dejó un cultivo de *R. sphaeroides* en 10 ml de medio mínimo creciendo toda la noche; al día siguiente se centrifugó a temperatura ambiente a 4000 rpm por 12 min y se resuspendió en 1 ml de buffer TE (pH 8.0), posteriormente se añadió 60 ul de SDS al 10%, 50 ul de proteinasa K (20ug/ml) y se incubó toda la noche a 37°C. Al día siguiente se transfirieron entre 0.6 y 0.7ml a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se añadieron 0.25 ml de fenol y 0.25 ml de cloroformo, seguidos por una agitación constante sin vortex de 5 min, hasta formar una emulsión de color blanca. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 5 min (este procedimiento se repitió de 2 a 3 veces hasta obtener una fase acuosa transparente). Esta fase acuosa se precipitó añadiendo 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M y un volumen de isopropanol. La hebra de DNA que se formó, se tomó con una pipeta Pasteur y se lavó con etanol al 70%. Se dejó secar a temperatura ambiente hasta que el DNA se tornó translúcido y se resuspendió en 200 ul de agua desionizada estéril. Se cuantificó en el espectrofotómetro a una D.O de 260 nm.

2.1.3 Preparación de células competentes

Este protocolo se utilizó para las cepas *E.coli* JM103, S17, LGM174 y TOP10.

De un cultivo de 3ml incubado toda la noche se inocularon 200 ul en 10 ml de medio LB, el cual se incubó en agitación constante de 200 rpm a 37°C por 2h aprox. hasta alcanzar una $D.O_{600nm} = 0.6$. Luego se colocó en hielo por 10 min y se centrifugó a 4°C (4000 rpm) por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 ml de $CaCl_2$ (100mM) por 20 min. Luego se centrifugaron nuevamente a 4°C (4000 rpm) por 5 min y se resuspendieron en 0.7 ml de $CaCl_2$ y se dejaron en hielo toda la noche, para su utilización al día siguiente.

2.1.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen final de 100 μ l. Para la mezcla se utilizó 1 μ l de DNA Taq polimerasa de alta fidelidad (HiFi) (Invitrogen), 1 ng de DNA cromosomal o DNA plasmídico, 10 μ l de buffer 10X sin Mg^{2+} , 4 μ l de $MgSO_4$ (2 mM), 1 μ l de primer forward (1 pM) y 1 μ l de primer reverse (1 pM) 13 μ l de dNTPs (2 mM), 10 μ l de DMSO. Los productos de PCR obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% a 100 V y posteriormente fueron purificados utilizando el estuche "Gel extraction kit" (Qiagen Inc., Valencia Calif). La lista de las secuencias de los primers junto con la descripción de los mismos en cada construcción se describen en la Tabla 2.2.

2.1.5 Extracción de plásmidos

Los plásmidos utilizados para las clonaciones fueron extraídos utilizando el estuche "Mini column plasmid purification kit" (Qiagen Inc., Valencia Calif.).

2.1.6 Clonación (Restricción y ligación)

Todos las regiones de DNA amplificadas para hacer las fusiones transcripcionales fueron clonadas inicialmente en pTZ19R y subclonadas en pBBMCS53. Tanto los plásmidos como los productos de PCR fueron digeridos con EcoRI y XbaI (Invitrogen) para su posterior ligación con T4 ligasa. Las enzimas de restricción al igual que la T4 ligasa se utilizaron de acuerdo a las recomendaciones incluidas en el producto. La mayoría de los plásmidos fueron secuenciados utilizando el estuche de termosecuencia (Amersham) sobre la cadena sencilla de DNA.

2.1.7 Transformación

Los productos de ligación obtenidos fueron transformados en células competentes preparadas previamente de acuerdo al protocolo que se describe a continuación.

Se adicionó 5ul del producto de ligación a 200ul de células competentes (las cuales están en hielo), se mezcló suavemente y se dejó en hielo por 30 min, posteriormente se colocaron las células a 42°C por 2 min y se pasaron inmediatamente a hielo por 3 min. Después se agregó 1 ml de medio LB y se dejó a 37°C por 45 min. El cultivo fue centrifugado a 6000 rpm y resuspendido en 50 ul de LB para ser sembrado posteriormente en cajas de agar preparadas previamente con las concentraciones de antibiótico requeridas.

2.1.8 Tamizaje de las clonaciones

Los plásmidos de las colonias obtenidas en los diferentes medios de selección fueron extraídos por la técnica descrita anteriormente, para ser posteriormente digeridos con las enzimas de restricción correspondientes, en el caso de las fusiones transcripcionales se hicieron restricciones con EcoRI y XbaI, con el fin de liberar los fragmentos de DNA clonados inicialmente, tanto en las construcciones hechas en pTZ19R como en pBBMCS53. Los productos restringidos fueron visualizados en geles de agarosa al 0.8%.

2.1.9 Conjugaciones

Se crecieron durante toda la noche las cepas de *E. coli* S17 (50 µg/ml de kanamicina) transformadas con las diferentes fusiones en pBBMCS53. La cepa silvestre, WS8 y las cepas SP12 y SP13. Al día siguiente se inocularon 200ul de cada *E.coli* y 1 ml de las cepas de *Rhodobacter* en 10 ml de medio LB para la *E. coli* y 10 ml de medio mínimo para las últimas. Se dejaron a 37°C y 30°C respectivamente en agitación constante de 200 rpm hasta alcanzar $A_{600nm}=0.5$ posteriormente se puso 1ml de cada cultivo en tubos eppendorfs de 1.5 ml y se

centrifugaron 3 min a 6000 rpm. Se retiró el sobrenadante de cada tubo y se homogenizó suavemente en 500 μ l de medio LB; se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones, se eliminó el sobrenadante de cada tubo y se mezclaron la cepa donadora con la cepa receptora (*Rhodobacter*) en 500 μ l de LB en un tubo eppendorf de 1.5, se centrifugó y el producto obtenido fue resuspendido en 50 μ l de medio LB para ser posteriormente transferido a un soporte sólido (sobre una membrana de nitrocelulosa estéril, colocada sobre una caja de LB) e incubado toda la noche a 30 C. La mezcla de conjugación, se resuspendió en 500 μ l de LB y 100 μ l fueron plateados en cajas de LB con los correspondientes antibióticos. Las cajas de agar con las células se incubaron a 30°C aprox por 72h.

2.10 Determinación del fenotipo en cajas de nado y mediante observación en el microscopio óptico.

Tanto las colonias de la cepa silvestre WS8, SP13/*flhA* Δ ::kan obtenidas de las conjugaciones con las diferentes fusiones transcripcionales como las colonias obtenidas de la mutante WS8/*flhA*,*flgA*::*hindIII*::*aad* fueron crecidas en 10 ml de medio mínimo en presencia de los antibióticos apropiados, hasta alcanzar A_{600} entre 0.5 y 0.6. Posteriormente se colocaron 4 μ l de cada cultivo en laminillas de vidrio con su correspondiente cubre laminillas y se observaron en el microscopio utilizando el objetivo de 40X, con el cual se pudo observar el nado de las bacterias. Adicionalmente se inoculó 1 μ l de cada cultivo en cajas preparadas con medio mínimo y agar al 0.21%. Se determinó el fenotipo de las cepas después de ser incubadas 72 h a 30°C en la oscuridad. Las bacterias que nadan forman un halo concéntrico alrededor del punto de inoculación de 20 mm de diámetro aprox, esto puede variar dependiendo de la concentración y del tiempo de incubación, pero se diferencia claramente de las células que no nadan ya que en estas no se observa un halo de desplazamiento sino acumulación celular en un punto fijo.

2.1.11 Ensayos de β -glucuronidasa

De la conjugación de *R. sphaeroides* con las diferentes fusiones transcripcionales en el plásmido pBBMCS53 se escogieron las colonias que nadaban después de ser observadas en cajas de nado y al microscopio óptico. Posteriormente se crecieron en medio mínimo hasta alcanzar A_{600} entre 0.5 y 0.6. Se tomó 1ml de cada cultivo, se centrifugó a 14000 rpm, se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 300ul de buffer de extracción (50 mM Na_2HPO_4 pH7.0, 10 mM β mercaptoetanol, 10 mM EDTA, 0.1% triton X-100) estos extractos se congelaron inmediatamente en hielo seco para su posterior sonicación. Luego de ser sonicados tres veces por 5 seg se centrifugaron a 4°C por 2 min, se colocaron 80 ul del sobrenadante en 320 ul de buffer de extracción en presencia del substrato de la enzima. Las condiciones de reacción han sido descritas previamente por Jefferson y colaboradores⁵⁴. Para finalizar la reacción, 100 ul de las muestras se mezclaron con 0.9 ml de buffer de paro (0.2 M Na_2CO_3) a 10, 20 y 30 min. La fluorescencia de las muestras se determinó utilizando una onda de excitación de 360nm y de emisión de 446nm). El fluorómetro fue calibrado con una curva hecha previamente utilizando 4-methyl-umbelliferona. El contenido de proteína fue determinado utilizando el reactivo de Bradford adquirido de forma comercial (BioRad protein assay) el cual utiliza albúmina como estándar. Las actividades son expresadas como pmoles de 4-methyl-umbelliferona formada por minuto por miligramo de proteína.

2.2 Diseño de la mutante por inserción de un casete de espectinomicina entre las 53 pb que separan a los promotores *pflgA* y *pflhA* de *R. sphaeroides*

Inicialmente se clonó en pTZ19R una secuencia de DNA de 1514pb (flanqueada con sitios EcoRI en ambos extremos), que contenía los promotores divergentes *pflhA* y *pflgA*, así como parte de las secuencias del gen *flhA* y del marco de lectura correspondiente a RSP0035. A esta construcción por medio mutagénesis dirigida se le insertó la secuencia (AGCTT), 64pb corriente abajo de la caja -12 de *pflhA*. La inserción de esta secuencia genera un sitio HindIII,

el cual sería utilizado posteriormente para insertar el casete *aadA* de resistencia a espectinomicina (2083 pb), el cual contiene en sus dos extremos el sitio HindIII. Posterior a la inserción del casete, se obtuvo una secuencia de 3597 pb la cual fue liberada del pTZ19R mediante el corte con EcoRI para posteriormente ser subclonada en el plásmido suicida pJQ200mp18. Este último plásmido fue introducido a la cepa WS8 y las cepas en las cuales ocurrió un evento de doble recombinación, fueron seccionadas por su fenotipo Spc^R Gm^S. El fenotipo de la mutante, denominada, JP1/WS8/*pflhA*,*pflgA*::*hindIII*::*aad* se determinó por observación en el microscopio óptico y por cajas de nado (Fig 2.2).

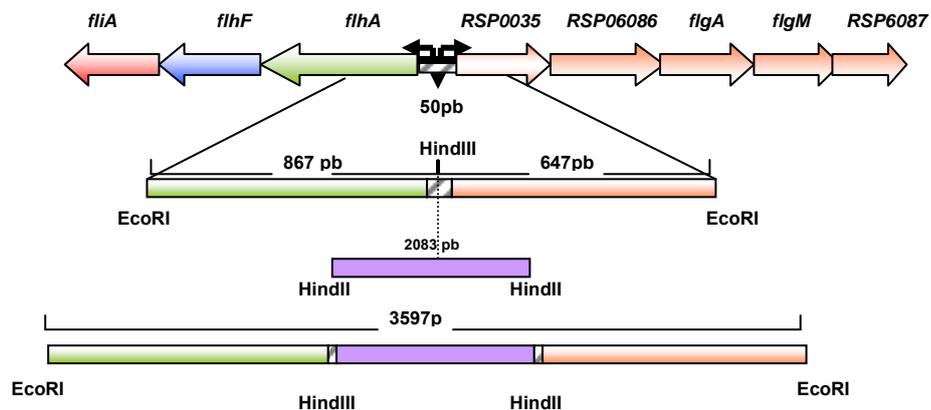


Fig.2.1. Diseño de la mutante PJ1. Inserción de un casete (*aadA*) de espectinomicina (color morado) entre las 53 pb que separan a los promotores *pflgA* y *pflhA* de *R. sphaeroides*

2.2.1 Mutagénesis dirigida

La mutagénesis fue realizada de acuerdo al método descrito por Kunkel en 1985⁶⁷ utilizando como templado la cadena sencilla de DNA conteniendo uracilo. El oligonucleótido utilizado se describe en la Tabla 2.2

2.2.3 Footprinting in vivo

Se pusieron a crecer cultivos de las cepas WS8, SP12 y SP13 (las cuales contenían el plásmido BBMCS53/*pmotA*) en 15 ml medio mínimo con sus correspondientes antibióticos, hasta alcanzar una densidad óptica $A_{600}=0.6$, posteriormente se adicionaron 5 ul de Dimetil sulfato (DMS 1M) y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos, después de este tiempo los cultivos se pusieron en hielo y se centrifugaron rápidamente en tubos corex de 30 ml a 4°C, 10,000 rpm por 2 min con el fin de colectar las células. La extracción del plásmido se hizo por medio de la técnica de lisis alcalina, utilizando el estuche “mini Kit” de purificación de plásmidos de (Qiagen). El DNA obtenido se precipitó con 1/10 del vol de AcNa (3M) y 3 volúmenes de EtOH (100%). El plásmido precipitado se resuspendió en 50 ul de piperidina (20%), luego se calentó 30 min a 90°C. El DNA cortado se paso a través de una columna de cromatografía (Sephadex G-50). Se marcaron oligonucleótidos en el extremo 5' con la enzima poli nucleótido kinasa T4 y ATP marcado radioactivamente [δ -³²P] [3000 Ci (111000 Bq) nmol⁻¹]. Estos oligonucleótido fueron utilizados para una reacción de extensión (PCR) junto con un 1ug del DNA (cortado previamente con piperidina), 6.5 ul dNTPs (2 mM final), 5ul (DMSO), 5ul de buffer 10X sin Mg²⁺, 3ul de MgCl₂ (1.5 mM final) y 0.5 ul de Taq polimerasa, todo en volúmenes finales de 50 ul. La reacción se hizo por 15 ciclos y se le adiciono 5 ul de buffer de paro que contenía urea 8 M. Se tomaron 5 ul de la reacción de PCR y se corrieron para su análisis en geles de secuencia. Los primers utilizados para esta reacción se encuentran en la tabla 2.1.

2.2.4 Búsqueda de motivos por análisis computacionales

Las secuencias utilizadas para la búsqueda de motivos en el programa de algoritmos MEME se encuentran en la tabla 3.2. El mejor motivo identificado fue transformado en una secuencia de reconocimiento degenerada y junto con la secuencia consenso de δ^{54} se utilizó para llevar a cabo una búsqueda en el genoma completo de *R. sphaeroides* utilizando el programa de búsqueda de patrones en el DNA (DNA-pattern) que es una herramienta de sitio llamado Análisis de Secuencias Regulatoria (RSA). La búsqueda se hizo en todo el genoma de *R. sphaeroides* y el motivo utilizado fue:

G[CA][TC][CG]G[AT][GC][AG]N[GC]N[GT][CG]N⁵⁵GGCAN⁵⁶TTGC[AC].

Cepas, vector o plásmido	Descripción o Genotipo	Origen o referencia
WS8	Cepa silvestre	(Sockett y colaboradores., 1990)
JP1	Derivado de WS8/ <i>flhA, flgA::hindIII::aad</i>	Este trabajo
SP13	Derivado de WS8/ <i>fleQΔ::kan</i>	(Poggio y colaboradores., 2005)
SP12	Derivado de WS8/ <i>fleTΔ:: aad</i>	Poggio y colaboradores., 2005)
JM103	<i>hsdR4 Δ(lac-pro) F' traD36 proAB lacIqZΔM15</i>	(Ausubel y colaboradores., 1987)
S17-1	<i>recA endA thi hsdR RP4-2 Tc::My::Tn7, TpR SmR</i>	(Simon y colaboradores., 1983)
JPS17-1	S17/pJQ200mp18/ <i>flhA, flgA::HindIII:: aad</i>	Este trabajo
TOP 10	Cepa de clonación	Invitrogen
LMG174	<i>Δlacx74galE thi rpsL ΔphoA (Pvull)Δara714 leu::Tn10</i>	Invitrogen
pTZ19R	Vector de clonación, ApR; pUC	Pharmacia
JPpTZ1	pTZ19R/ <i>flhA, flgA::HindIII::aad</i>	Este trabajo Este trabajo
pJQ200mp18	Vector suicida movilizable	(Quandt and Hynes, 1993)
pBBMCS53 GmR	Vector de fusión transcripcional <i>uidA</i>	(Girard y colaboradores., 2000)
pBfliOp	pBBMCS53/ <i>fliOp-uidA</i>	(Poggio y colaboradores., 2002)
pBflgAp	pBBMCS53 <i>/flgAp-uidA</i> va de la posición -288 a la +270 de <i>pflgA</i>	(Poggio y colaboradores., 2005)
pBflgAp1	Derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flgAp-uidA</i> va de la posición -228 a la +270 de <i>pflgA</i>	Este trabajo
pBflgAp2	Derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flgAp-uidA</i> va de la posición -158 a la +270 de <i>pflgA</i>	Este trabajo
pBflgAp3	Derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flgAp-uidA</i> va de la posición -99 a la +270 de <i>pflgA</i>	Este trabajo
pBflgAp4	Derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flgAp-uidA</i> va de la posición -51 a la +270 de <i>pflgA</i>	Este trabajo
pBflgAp5	Derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flgAp-uidA</i> va de la posición -288 a la +23 de <i>pflgA</i>	Este trabajo
pBflgAp6	Derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flgAp-uidA</i> va de la posición -288 a la +139 de <i>pflgA</i>	Este trabajo
pBflgAp7	Derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flgAp-uidA</i> va de la posición -288 a la +217 de <i>pflgA</i>	Este trabajo
pBflgAp8	Derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flgAp-uidA</i> va de la posición -99 a la +139 de <i>pflgA</i>	Este trabajo
pBflgAp9	Derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flgAp-uidA</i> va de la posición -99 a la +23 de <i>pflgA</i>	Este trabajo

pBflgAp10	pBBMCS53/ <i>flgAp-uidA</i> ::HindIII:: <i>aad</i> derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flgAp-uidA</i>	Este trabajo
pBflgAp11	pBBMCS53/ <i>flgAp-uidA</i> ::HindIII derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flgAp-uidA</i>	Este trabajo
pBflhAp	pBBMCS53/ <i>flhAp-uidA</i> va de la posición -349 a la +209 de <i>pflhA</i>	(Poggio y colaboradores., 2005)
PBflhAp1	Derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flhAp-uidA</i> va de la posición -147 a la +209 de <i>pflhA</i>	Este trabajo
PBflhAp2	Derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flhAp-uidA</i> va de la posición -85 a la +209 de <i>pflhA</i>	Este trabajo
PBflhAp3	Derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flhAp-uidA</i> va de la posición -50 a la +209 de <i>pflhA</i>	Este trabajo
PBflhAp4	Derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flhAp-uidA</i> va de la posición -18a la +209 de <i>pflhA</i>	Este trabajo
PBflhAp5	Derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flhAp-uidA</i> va de la posición -349 a la +149 de <i>pflhA</i>	Este trabajo
PBflhAp6	Derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flhAp-uidA</i> va de la posición -349 a la +80 de <i>pflhA</i>	Este trabajo
PBflhAp7	Derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flhAp-uidA</i> va de la posición -349 a la +23 de <i>pflhA</i>	Este trabajo
PBflhAp8	Derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flhAp-uidA</i> va de la posición -219 a la +23 de <i>pflhA</i>	Este trabajo
PBflhAp9	Derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flhAp-uidA</i> va de la posición -70 a la +23 de <i>pflhA</i>	Este trabajo
pBflhAp10	pBBMCS53/ <i>flhAp-uidA</i> ::HindIII:: <i>aad</i> derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flhAp-uidA</i>	Este trabajo
pBflhAp11	pBBMCS53/ <i>flhAp-uidA</i> ::HindII derivado de la fusión pBBMCS53/ <i>flhAp-uidA</i>	Este trabajo
pBflgB	pBBMCS53/ <i>flgBp-uidA</i> va de la posición -378 a la +225 de <i>pflgB</i>	(Poggio y colaboradores., 2005)
pBflgB1	pBBMCS53/ <i>flgBp-uidA</i> va de la posición -222 a la +225 de <i>pflgB</i>	Este trabajo
pBflgB2	pBBMCS53/ <i>flgBp-uidA</i> va de la posición -125 a la +225 de <i>pflgB</i>	Este trabajo
pBflgG	pBBMCS53/ <i>flgG-uidA</i> va de la posición -347 a la +274 de <i>pflgG</i>	(Poggio y colaboradores., 2005)
pBflgG1	pBBMCS53/ <i>flgG-uidA</i> va de la posición -180 a la +274 de <i>pflgG</i>	Este trabajo
pBflgG 2	pBBMCS53/ <i>flgG-uidA</i> va de la posición -99 a la +274 de <i>pflgG</i>	Este trabajo
pBmotA	pBBMCS53/ <i>motA-uidA</i> va de la posición -422 a la +297 de <i>pmotA</i>	(Poggio y colaboradores., 2005)

Tabla 2.2

Nombre	Secuencia del primer	Primers utilizados	Construcciones
A	5' GGGAATTC ATGTTGCCACGAAGAAGAG	A y B	pBflhAp
B	5' GCTCTAGAC CAAAGCCGATGCCGGTCAC	A y B	pBflhAp
C	5' GCTCTAGAA AGGCGGACGGAGGGCGGACGG	A y C	pBflhAp1
D	5' GCTCTAGAC GGGGTGCAAGCGCCGTGCCAG	A y D	pBflhAp2
E	5' GCTCTAGAT GCCTCGGGGGCCGGACGGGGC	A y E	pBflhAp3
F	5' GCTCTAGAC CGCTGGCACGGCGCTTGCAGCG	A y F	pBflhAp4
G	5' GGGAATTC ACCACGGCGAGGATGCCAGCG	B y G	pBflhAp5
H	5' GGGAATTC ACGGCGCTCATCCGTGAAACTC	B y H	pBflhAp6
I	5' GGGAATTC GGGTGCTTGCTGCGCCTCACGC	B y I	pBflhAp7
		I y D	pBflhAp8
J	5' GCTCTAGAG TCGGCGGGCAGCGCATCGAC	I y J	pBflhAp9
		A y B	pBflhAp10
		A y B	pBflhAp11
K	5' GCTCTAGA ATGTTGCCACGAAGAAGAG	K y L	pBflgAp
L	5' GGGAATTC CAAAGCCGATGCCGGTCAC	K y L	pBflgAp
M	5' GCTCTAGA ACCACGGCGAGGATGCCAGC	L y M	pBflgAp1
N	5' GCTCTAGAC GGCGCTCATCCGTGAAACTCG	L y N	pBflgAp2
Ñ	5' GCTCTAGAT CGTTGCTGCGCCTCCCCGCTG	L y Ñ	pBflgAp3
O	5' GCTCTAGAC CGCCCCGTCCCGCCCCCGA	L y O	pBflgAp4
P	5' GGGAATTC AGCGCAGGTCTCGGCCAGCGGG	K y P	pBflgAp5
Q	5' GGGAATTC TCTGGCGGGCAGCGCATCGACC	K y Q	pBflgAp6

R	5' <i>GGGAATTC</i> CTTCGGCCTGCGCTCCGCCCGT	K y R	pBflgAp7
		Q y N	pBflgAp8
		N y O	pBflgAp9
		K y L	pBflgAp10
S	5' <i>GGGAATTC</i> ATCCCGTCATCCGTTCTCCT	S y T	pBflgB
T	5' <i>GCTCTAGAG</i> GGTTCTCCTCGGCATCCTC	S y T	pBflgB
U	5' <i>GGGAATTC</i> TGGTGCGCAGCGTGCCGTTGC	U y V	pBflgB1
V	5' <i>GCTCTAGAC</i> GCAGGAGCGCGATCCGGGCG	U y V	pBflgB1
W	5' <i>GCTCTAGAG</i> GTCCAGAGGCYCGAGAAGCG	U y W	pBflgB2
X	5' <i>GGGAATTC</i> GACATGCATCGCATTGGT	X y Y	pBflgG1
Y	5' <i>GCTCTAGA</i> ACGAGACGGGCCGCATCCTC	X y Y	pBflgG1
Z	5' <i>GGGAATTC</i> CTTTTCCGTCGAGACGACGCG	Z y A1	pBflgG2
A1	5' <i>GCTCTAGAC</i> CGGTGCTGCAGGGCGTGCTC	Z y A1	pBflgG2
B1	5' <i>GCTCTAGAT</i> TTCGAGCTCAACCTCCGCATG	Z y B1	pBflgG3
C1	5' <i>GGGAATTC</i> CGAGCCCGTCGCCGATCGAGAG	C1 y D1	JPS17-1
D1	5' <i>GGGAATTC</i> GGCGGCCAGAGGCGCGAGGAGG	C1 y D1	JPS17-1
E1	5' TCCGCCCCCGAGGCAGG <i>AAGCTT</i> CCCCGCGGT TCTGGCACGGCG		JPpTZ1
motA10-243	5' ACGGTGGAAGATCCTCCCGAG		

Sítios de restricción en itálicas: ***GCTCTAGA*** (XbaI), ***GGGAATTC*** (EcoRI), ***AAGCTT*** (HindIII)

Tabla 2.3.

Región

Secuencias utilizadas para la búsqueda del motivo consenso

>motA GTGGCTTGGCAAGGATCGGTTTCTTCAAGGCAGAACCCGTGGGCAGGCATGCCCC
GCGCAGGACGCCCCGAGAGCCGCCGCGACGGGCGGGCGGGCCGAAGCGGAC
GCGACTTAGCCAGAAGATCCGGAGGATACCGCGCCTCTCGATCCGCT TTGCA

>flgG CGACGGCCGGATCCGGGCCGGGGGCGAGCCCCTGCCG_gCGCCCCACCAGCGCG
CCCGCGTGCTGCAGGGCGTGCTCGAGGGCTCGAACGTCAATACGATGGAGGAGCT
CGTCTCCTCGATCGAACTGCAGCGCACCTTCGAGCTCAACCTCCGCATGATC

>flgB GCAGGAGCGCGATCCGGGCGGGCGAGCAACGCGCGTCCGGGCCGGACCGGGGGCG
GCCGCGGCATGGAGGGCTTCGAGACGCGCGAGGCCCTCCCTCCGCTCCAGAGGC
TCGAGAAGCGCCAGCACGGCGCGCGGGCCGCGTCCGAGCGCG

>fliO GCGACCCGCTCGACGTGCTGGTGAACGGCACCCCCATCGCCAAGGGCGAGGTG
GTGATGGTGGGCGAGCGGTTCCGGCATCCGCTTCGGCCAGATCATCGAGCCCCGAGA
AGCGCGCCGAAAGCCTCTGACGCGGGCGGATCCTCATGCGGGCGGC ACCAT

>flgA TCCGCCCTCCGTCCGCCTTGCCGGACTGGTCCTGCCGATGCTCGCAGCCTGCGCG
CCGGGGCCGCGCGCGGTTCGATGCGCTGCCCGCCGACGCGGGCCCCCGCGTGGC
CGAGCTTGCGCGGATGAAGGATGCCAACGACAGGCTCGACGGGCGGAGCGCA

Región Secuencias que contienen la región enhancer de acuerdo a los experimentos de mapeo por delección

>fliO GGTGGTATGGTGGGCGAGCGGTTCCGGCATCCGCTTCGGCCAGATCATCGAG
CCCAGAAAGCGCG

>motA GCAAGGATCGGTTTCTTCAAGGCAGAACCCGTGGGCAGGCATGCCCCGCGC

>flgG* CGCGTGCTGCAGGGCGTGCTCGAGGGCTCGAACGTCAATACGATGGAGGAGC
TCGTCTCCTCGATCGAACTGCAGCGCACCT

>flgB* CGCAGGAGCGCGATCCGGGCGGGCGAGCAACGCGCGTCCGGGCCGGACCGGGGGC
GGCCGCGGCATGGAGGGCTTCGAGACGCGCGAGGCCCTCCCTCCG

>flgA* TGCCGGACTGGTCCTGCCGATGCTCGCAGCCTGCGCGCCGGGGCCGCGCGCG
GTCGATGCGCTGCCCGCCGACGCGGGCCCCCGCGTGGCCGAGCTTGCGCGGATG
AAGGATGCCAACGACAGGCTCGACGGGCGGAGCGCAGGCCGAAGCGCGGGCCTC
ATCGCGGTGACGCCGAAGCCGCTCGTGACCGGCATCGGATTTG

>flhA* ACCACGGCGAGGATGCCAGCGGCAGCGTCATGCCGCCGAGCCGCGCGCCCC
AGCCATCGCGGGCAGCGAC

El * representa las regiones enhancers que se mapearon por delección en este trabajo, las demás representan regiones identificadas previamente en el laboratorio.

3. RESULTADOS

3.1 Actividad transcripcional de los promotores flagelares *pflgAp* y *pflhAp* en la cepa silvestre WS8 y en la cepa SP13 (*fleQ* Δ ::kan)

Por medio de análisis de secuencia hechos previamente en el laboratorio del genoma de *Rhodobacter sphaeroides*, se identificaron los promotores divergentes flagelares clase III, *pflhA* y *pflgA* los cuales flanquean dos posibles operones. Posteriormente, se midieron las actividades (Ensayos de β -glucuronidasa) de las fusiones transcripcionales hechas previamente en el laboratorio con el gen reportero *uidA* correspondientes a las regiones que van desde la posición -349 a la +209 para *pflhA* y de la posición -288 a la +270 para *pflgA* tomando como punto de referencia la caja -12⁽⁴⁸⁾. Las actividades de β -glucuronidasa en la cepa silvestre WS8 que lleva las construcciones *pBflhAp* y *pBflgAp* fueron de 16,500 y 23,500 respectivamente. Cada uno de estos valores se tomó como el 100% de actividad de cada promotor y sobre este valor se compararon las actividades detectadas para el resto de las fusiones transcripcionales (Fig. 3.1 y 3.2).

Estas mismas fusiones en la mutante SP13 tuvieron porcentajes de actividad con valores de cero o muy cercanos (no se muestran los datos). Este último resultado confirma reportes previos en los que se muestra que estos dos promotores son dependientes de FleQ para su expresión (Fig. 3.1 y 3.2)⁴.

3.2 Delimitación del sitio de unión del complejo activador FleQ/FleT en *pflhA* y *pflgA*

Con el objeto de identificar los sitios de unión de las proteínas activadoras FleQ/FleT se realizaron diferentes fusiones transcripcionales con regiones que incluían secuencias tanto corriente arriba como corriente abajo de su correspondiente promotor, estas construcciones fueron introducidas a la cepa silvestre WS8 y a la mutante SP13 y la actividad de β -glucuronidasa fue determinada.

Se inició con el análisis de las regiones corriente arriba de los promotores ya que según lo reportado en la literatura la mayoría de estas proteínas activadoras unen al DNA generalmente entre 100 y 250 pb corriente arriba de su promotor blanco. Las fusiones transcripcionales se diseñaron tomando como base la construcción inicial de cada promotor con actividad del 100%. Las cuales van de la posición -349 a la +209 para *pflhA* y de la posición -288 a la +270 para *pflgA*. Teniendo en cuenta estos puntos de referencia se hicieron fusiones transcripcionales con fragmentos cuyos extremos 5' arriba del promotor *pflhA* se encuentra en la posición: -147, -85, -50 y -18 (tomando la caja GC de este promotor como posición +1), y de la posición -228, -158, -99 y -51 para *pflgA*. Los porcentajes que se obtuvieron fueron de 68%, 76%, 77% y 62% para *pflhA* y de 92%, 65%, 62% y 63% para *pflgA*. Como estos porcentajes representan una disminución de la actividad a niveles moderados, se decidió diseñar fusiones que eliminaran regiones de DNA ubicadas corriente abajo de los promotores con el fin de determinar si otras regiones aledañas al promotor pudieran alterar el nivel de activación transcripcional de forma evidente (Fig 3.1 y 3.2).

Al igual que para las fusiones anteriores, para las fusiones corriente abajo se tomó como referencia las construcciones de cada promotor con actividades del 100%.

Para el promotor *pflhA* se hicieron fusiones cuyo extremo 3' se encuentra corriente abajo del promotor en las posiciones +149, +80 y +23. Los porcentajes de actividad fueron del 95%, 53% y 27% respectivamente; estos porcentajes permitieron identificar una región entre la posición +23 y +149, la cual contiene elementos importantes para la activación por el complejo FleQ/FleT. El 53% de actividad obtenido con la fusión que va desde la posición +80 no permitió delimitar más esta región ya que parece ser que entre la posición +149 y +80 hay elementos importantes y necesarios para obtener una actividad cercana al 100%.

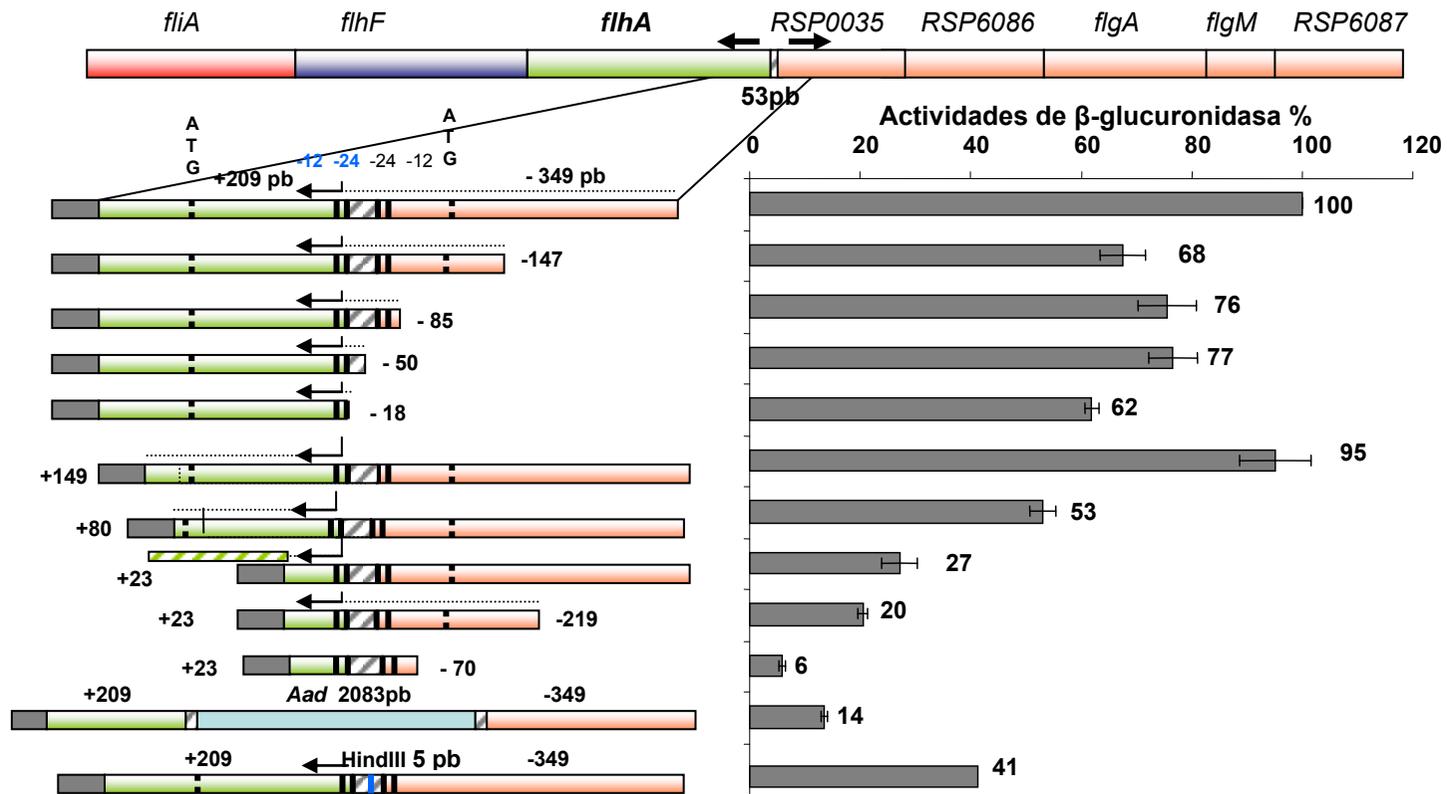


Fig. 3.1 Diseño y porcentaje de las actividades de fusiones transcripcionales del promotor *pflhA*. Cajas -24, -12 de *pflhA* (azul), cajas -24, -12 *pflgA* (negro), 53 pb entre *pflhA* y *pflgA* (rayas diagonales color gris), dirección de la transcripción (flechas negras), posible zona de unión del complejo activador FleQ/FleT (rayas diagonales color verde), gen reportero de β-glucuronidasa (caja de color gris). Las distancias corriente arriba y abajo que aparecen en cada fusión se dieron tomando como punto de referencia la caja -12 de *pflhA*. El porcentaje de las actividades se representa con barras de color gris, al frente de cada construcción. casete *aad* de resistencia a espectinomomicina (color azul), sitio HindIII (ralla de color azul). Las fusiones que no incluyen las posibles regiones de unión del complejo activador FleQ/FleT van de la posición +23 a -219 y de la posición +23 a -70 tomando como punto de referencia la caja -12 de *pflhA*. El porcentaje de las actividades se representa con barras de color gris.

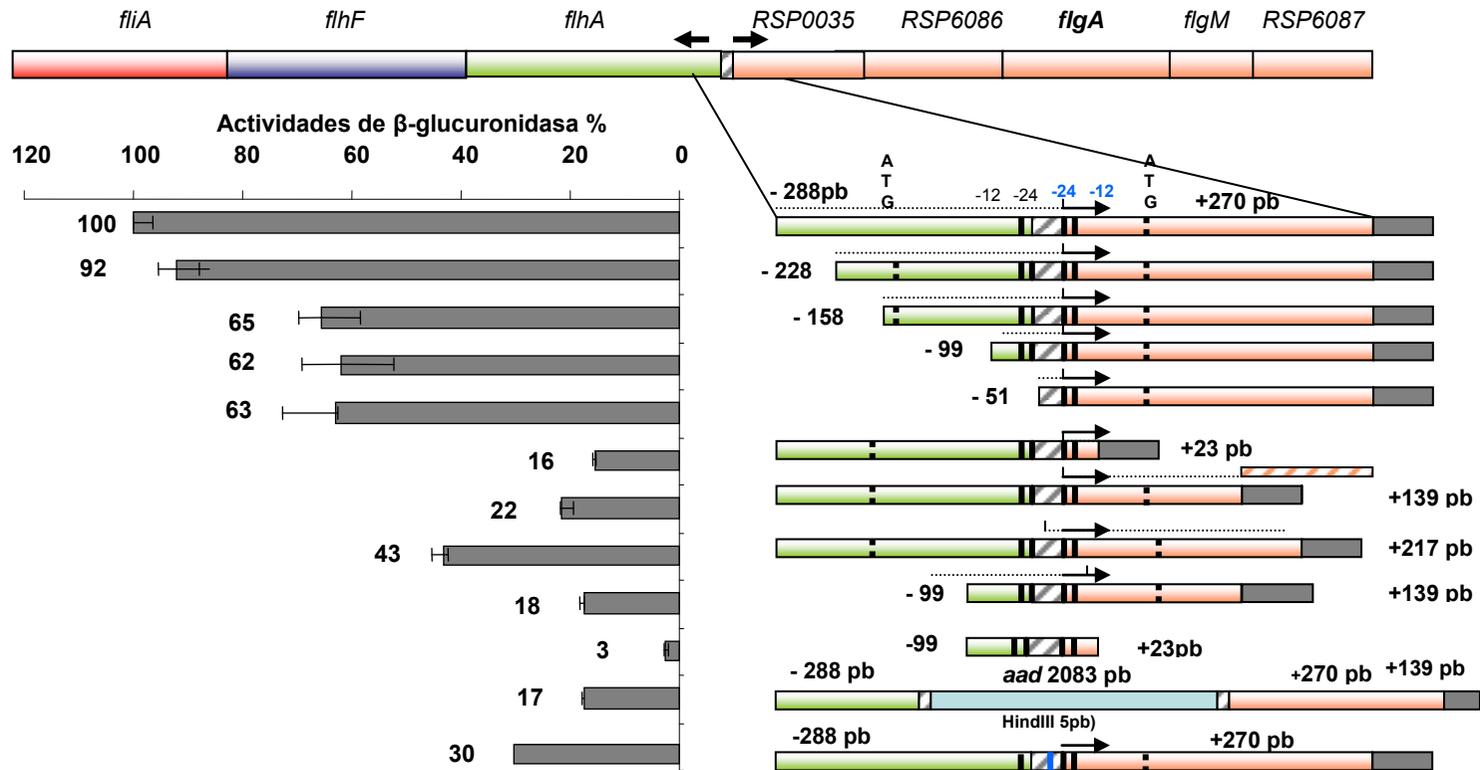


Fig. 3.2 Diseño y porcentaje de las actividades de fusiones transcripcionales del promotor *pflgA*. Cajas -24, -12 de *pflgA* (azul), cajas -24, -12 *pflhA* (negro), 53 pb entre *pflhA* y *pflgA* (rayas diagonales color gris), dirección de la transcripción (flechas negras), posible zona de unión del complejo activador FleQ/FleT (rayas diagonales color rosa), gen reportero de β -glucuronidasa (caja de color gris). Las distancias corriente arriba y abajo que aparecen en cada fusión se dieron tomando como punto de referencia la caja -12 de *pflgA*, casete *aad* de resistencia a espectinomicina (color azul), sitio *HindIII* (ralla de color azul). Las fusiones que no incluyen las posibles regiones de unión del complejo activador FleQ/FleT van de la posición +139 a -99 y de la posición +23 a -99 tomando como punto de referencia la caja -12 de *pflhA*. El porcentaje de las actividades se representa con barras de color gris. El porcentaje de las actividades se representa con barras de color gris, al frente de cada construcción.

En el promotor *pflgA* se hicieron fusiones cuyo extremo 3' corriente abajo del promotor se encuentra en la posición +217, +139 y +23. Los porcentajes obtenidos fueron del 46%, 22% y 16%. Estos valores permitieron identificar una posible zona de interacción del complejo FleQ/FleT entre la posición +270 y +139. El 46% de actividad de la fusión que va desde la posición +217 nos indica que hay elementos importantes entre la posición +270 y la +217 que son indispensables para una actividad del 100%.

3.3 Fusiones transcripcionales de *pflhA* y *pflgA* que no incluyen las posibles regiones de unión de proteínas activadoras.

En el análisis global de las actividades promovidas por las fusiones que llevan las deleciones corriente arriba de *pflhA* y *pflgA* y que muestran actividad moderada entre el 60 y 70 % se observó que en estas construcciones no está presente el posible sitio de unión del complejo activador FleQ/FleT del promotor contralateral, en comparación con las construcciones que presentaron actividades del 92%(*pflgA*), el 95%(*pflhA*) y 100%(*pflgA* y *pflhA*), donde se encuentran los posibles sitios de unión del complejo activador FleQ/FleT de ambos promotores (Fig 3.3.1 y 3.3.2). Este hecho, sugirió una probable coregulación a través de sus elementos regulatorios a distancia (UAS).

Con el fin de determinar la actividad mínima que se presenta en estas regiones promotoras se realizaron dos construcciones adicionales que van de la posición +23 a la -70 para *pflhA* y de la posición +23 a la -99 para *pflgA*. Los porcentajes de actividad fueron del 6 % y el 3 % respectivamente para cada promotor. Estos porcentajes representan la actividad basal del promotor que podría ocurrir en ausencia de activación, o quizá mediante activación en solución (Fig 3.1 y 3.2).

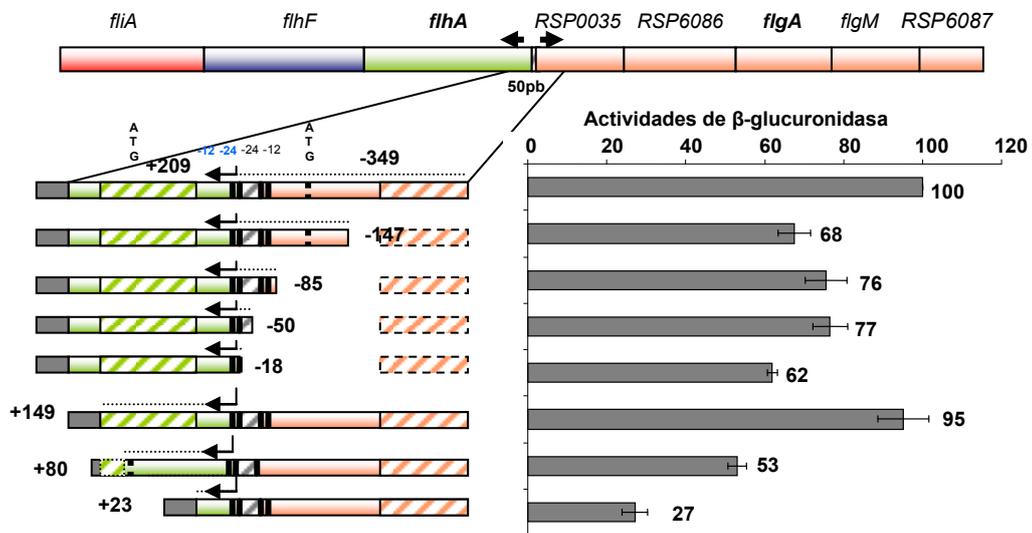


Fig 3.3.1 Fusiones transcripcionales de actividad moderada de *pflhA* que no tienen el elemento regulador contralateral. Posible zona de unión del complejo activador FleQ/FleT de *pflhA* (rayas diagonales color verde), posible zona de unión del complejo activador FleQ/FleT del promotor contralateral *pflgA* (rayas diagonales color rosa), Las fusiones de actividad moderada van de la posición -147 a +209, -85 a +209, -50 a +209, -18 a +209.

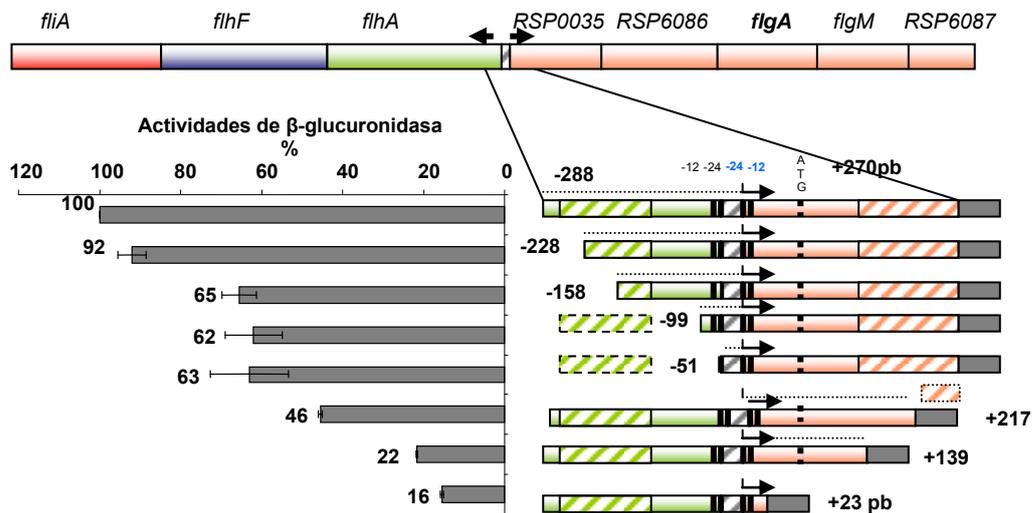


Fig 3.3.2 Fusiones transcripcionales de actividad moderada de *pflgA* que no tienen el elemento regulador contralateral. Posible zona de unión del complejo activador FleQ/FleT de *pflgA* (rayas diagonales color rosa), posible zona de unión del complejo activador FleQ/FleT del promotor contralateral *pflhA* (rayas diagonales color verde), Las fusiones de actividad moderada van de la posición -158 a +270, -99 a +270, -51 a +270.

3.4 Fusiones transcripcionales de *pflhA* y *pflgA* con inserciones entre las 53 pb que separan a ambos promotores.

Con el fin de elucidar la existencia de un posible efecto regulatorio entre las UAS de los promotores *pflhA* y *pflgA*, se decidió analizar si una inserción de 2083 pb entre los promotores afectaba la expresión del gen reportero. Como se muestra en la figura 3.1 y 3.2, las actividades de β -glucuronidasa fueron de 14% para *pflhA* y de 17% para *pflgA*. De estos resultados se puede concluir que la inserción del casete afectó la expresión del gen reportero mas allá de lo esperado (30% de reducción en caso de eliminar la activación mediada por la UAS del promotor contralateral). Es posible que la inserción del fragmento haya alterado la topología general del plásmido y en consecuencia la activación mediada por las EBPs. De acuerdo con esta posibilidad, el fenotipo de la mutante que lleva esta inserción en el cromosoma, no mostró fenotipo aparente (ver siguiente sección).

Finalmente se determinó el nivel de actividad del gen reportero al ser expresado a partir de los promotores *pflhA* y *pflgA*, cuando se insertaron solamente 5 pb entre los promotores. Esta inserción se realizó con el fin de contar con un sitio de restricción en esta zona que permitiera la clonación del casete de resistencia (ver material métodos). Los porcentajes de actividad para estas fusiones fueron del 41% para *pflhA* y 30% para *pflgA* (Fig. 3.1 y 3.2).

3.5 Determinación del fenotipo de una mutante derivada de la cepa silvestre WS8, que lleva una inserción de un casete de espectinomicina entre las 53 pb que separan los promotores divergentes *pflhA* y *pflgA*.

Para evaluar la probable corregulación de las UAS de *pflhA* y *pflgA* y el efecto biológico que producirían los cambios en la arquitectura de la región de 53 pb, se decidió insertar en el cromosoma de la cepa silvestre WS8 un casete de espectinomicina de 2083 pb entre los promotores *pflhA* y *pflgA* por un proceso de doble recombinación.

El fenotipo observado tanto en el microscopio óptico como en cajas de nado (swarm) no presentó diferencia con respecto a al fenotipo de la cepa silvestre (Fig 3.5).

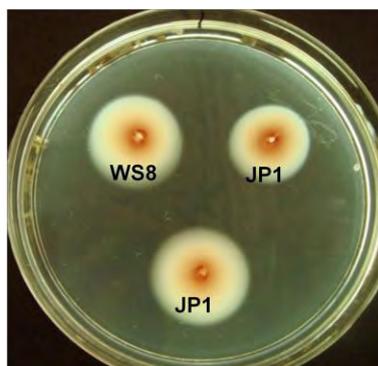


Fig. 3.5. Determinación del fenotipo de nado de la mutante JP1/WS8/*flhA, flgA::hindIII::aad* en cajas de agar semisólido. El tiempo de incubación fue de 72 h a 30° C en oscuridad.

3.6 Determinación del posible sitio de unión del complejo activador FleQ/FleT en los promotores *pflgB* y *pflgG*

3.6.1 Fusiones transcripcionales de los promotores *pflgB*, *pflgG*

Para mapear el posible sitio de unión del complejo activador FleQ/FleT en los promotores *pflgB* y *pflgG*, se tomaron fusiones hechas previamente en el laboratorio que abarcan de las posiciones +225 a la -378 para *pflgB* y de la +225 a la -347 para *pflgG* tomando como punto de referencia la caja -12¹⁵. Estas fusiones fueron introducidas a la cepa WS8 y se obtuvieron actividades con valores de 261,905 y 113,712 respectivamente. Estos valores se tomaron como el 100% de actividad de cada promotor. Posteriormente se hicieron construcciones cuyos límites corriente arriba se ubicaron en las posiciones -222 y -125 para *pflgB* y en -180 y -99 para *pflgG*, los porcentajes de actividad obtenidos fueron del 96% y 2% para *pflgB* y del 94% y 2% para *pflgG*. Estos porcentajes de actividad permitieron delimitar posibles regiones de unión del complejo activador FleQ/FleT de la posición -222 a la -125 para *pflgB* y de la posición -180 a la -99 para *pflgG* (Fig 3.6.1.1y 3.6.1.2).

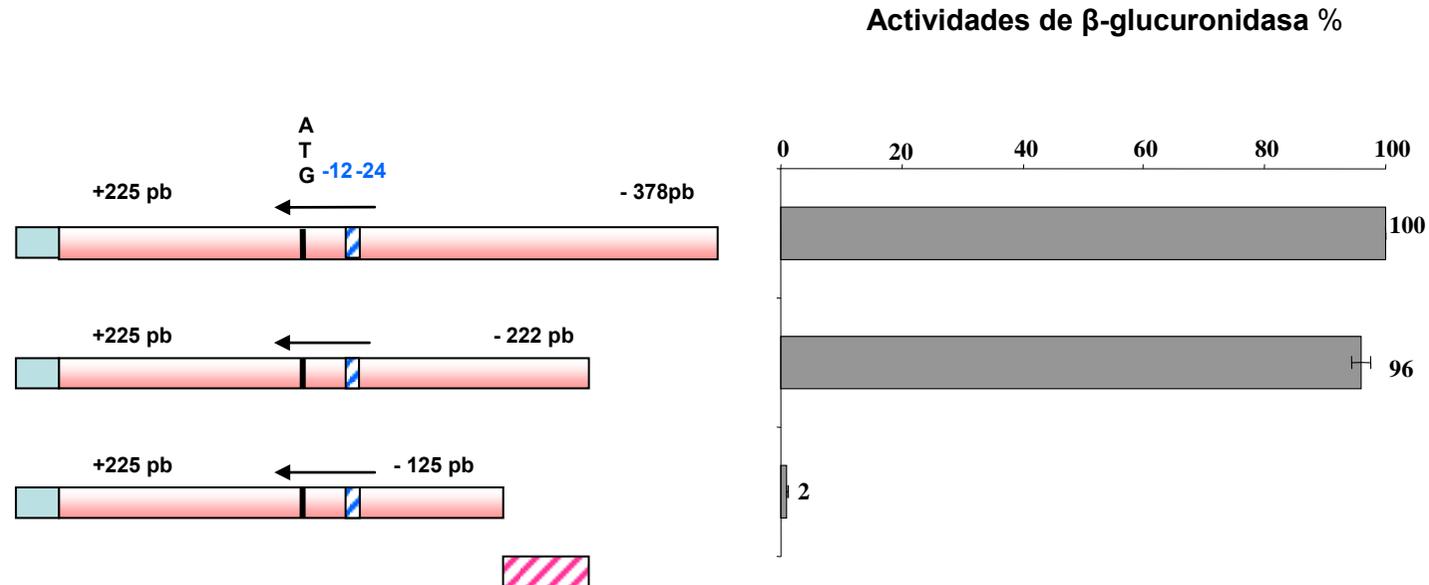


Fig. 3.6.1.1 Diseño y porcentaje de actividades de las fusiones transcripcionales del promotor *flgB*. Cajas -24,-12 del promotor *flgB* (azul), posible sitio de unión del activador (rayas diagonales color rosa), dirección de la transcripción (flechas), gen reportero de β -glucuronidasa (cajas color gris). Las distancias corriente arriba y abajo que aparecen en cada fusión se dieron tomando como punto de referencia la caja -12 de *pflgB*. El porcentaje de las actividades se representa con barras de color gris, al frente de cada construcción.

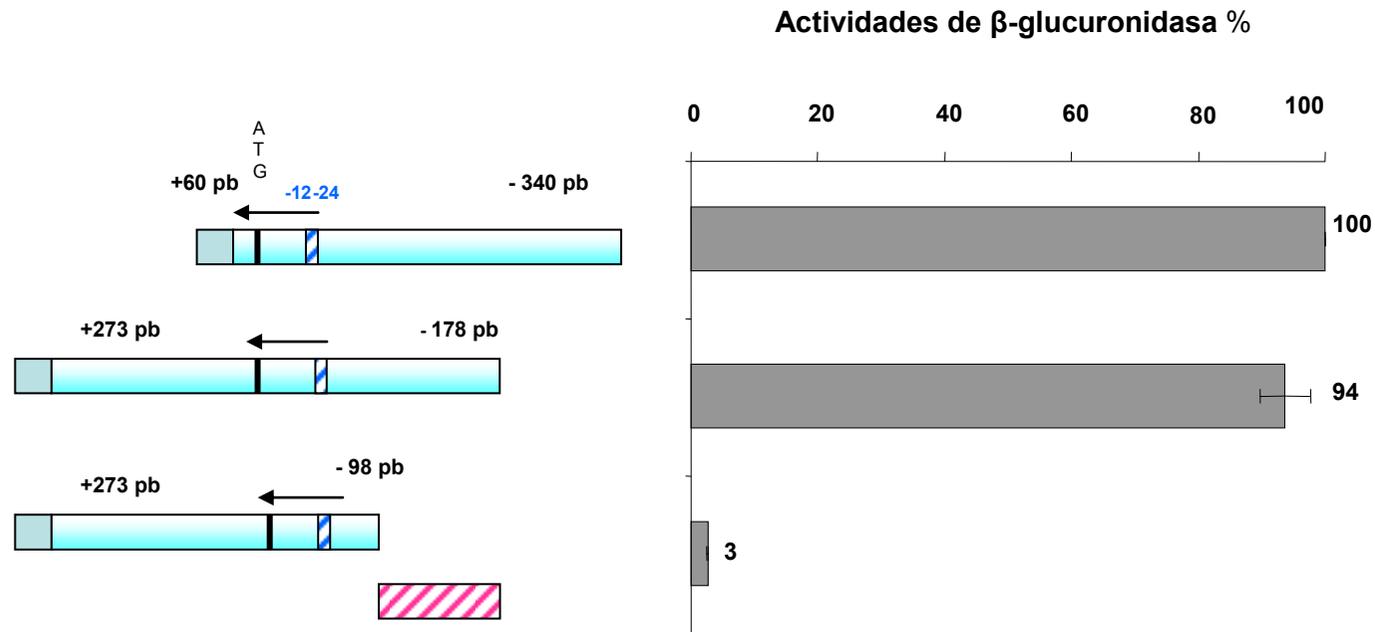


Fig. 3.6.1.2 Diseño y porcentaje de actividades de las fusiones transcripcionales del promotor *flgG*. Cajas -24,-12 del promotor *flgG* (diagonales en color azul), posible sitio de unión del activador (rayas diagonales color rosa), dirección de la transcripción (flechas), gen reportero de β -glucuronidasa (cajas color gris), las distancias corriente arriba y abajo que aparecen en cada fusión se dieron tomando como punto de referencia la caja -12 de *pflgG*, el porcentaje de las actividades se representa con barras de color gris, al frente de cada construcción.

3.7 Footprinting *in vivo* de la cadena antisentido del promotor *pmotA*

Con el propósito de revelar la huella del complejo FleQ/FleT en los promotores flagelares clase III mediante ensayos de protección, en el laboratorio previamente, se habían realizado diversos ensayos *in vitro* que no fueron éxitos. Por lo tanto, se realizaron ensayos de protección *in vivo* de varios promotores flagelares (*pflgG*, *pflgB*, *fliO*) que incluyen a *pmotA*, este fue el único promotor donde se observó una zona franca de protección. Los ensayos de protección del promotor *pmotA* (plásmido pBBMCS53/ *motA-uidA*) se realizaron, tanto en la cadena sentido como en la cadena antisentido, utilizando plásmidos aislados de las cepas WS8, SP12 (tiene una deleción de *fleT*) y SP13 (tiene una deleción de *fleQ* y como consecuencia la expresión de *fleT* es prácticamente abolida). A continuación, se describen los resultados de los experimentos de protección de la cadena antisentido (producto de este trabajo) (Fig 3.7), así como los relativos a la protección de la cadena sentido (los cuales fueron obtenidos previamente en el laboratorio).

La comparación de los patrones de metilación del plásmido aislado de las cepas WS8 y SP13 de la cadena sentido presentan varias diferencias (Fig 3.7), principalmente se observa una disminuida reactividad en las posiciones -163, -164, -169 y -176 y se observa una evidente hiperreactividad de las bases -160, -161 y -174. A diferencia de la cadena antisentido donde solo se pudo detectar una sola base hiperreactiva en la posición -151. Con el fin de corroborar que los cambios en el patrón de metilación de *pmotA* se debieron a la unión del complejo FleT/FleQ, se hicieron los mismos experimentos utilizando el plásmido proveniente de la cepa SP12 (tiene deletado *fleT*). Al comparar el patrón de metilación del plásmido obtenido de la cepa WS8, con el patrón de metilación del plásmido de la cepa SP12 se encontraron los mismos cambios de reactividad, de igual forma ocurrió cuando se compararon los patrones de metilación de la cepa WS8 con la cepa SP13. Esto sugiere que el patrón de protección observado en la cepa WS8 se debe a la unión del complejo activador FleQ/FleT. De forma interesante las posiciones -160, -161 y -174 aparecen como posiciones protegidas en el plásmido

extraído de SP12, cuando se compara con el patrón de protección del plásmido extraído de SP13, indicando que FleQ podría unirse por sí solo a esta región cuando FleT no está presente.

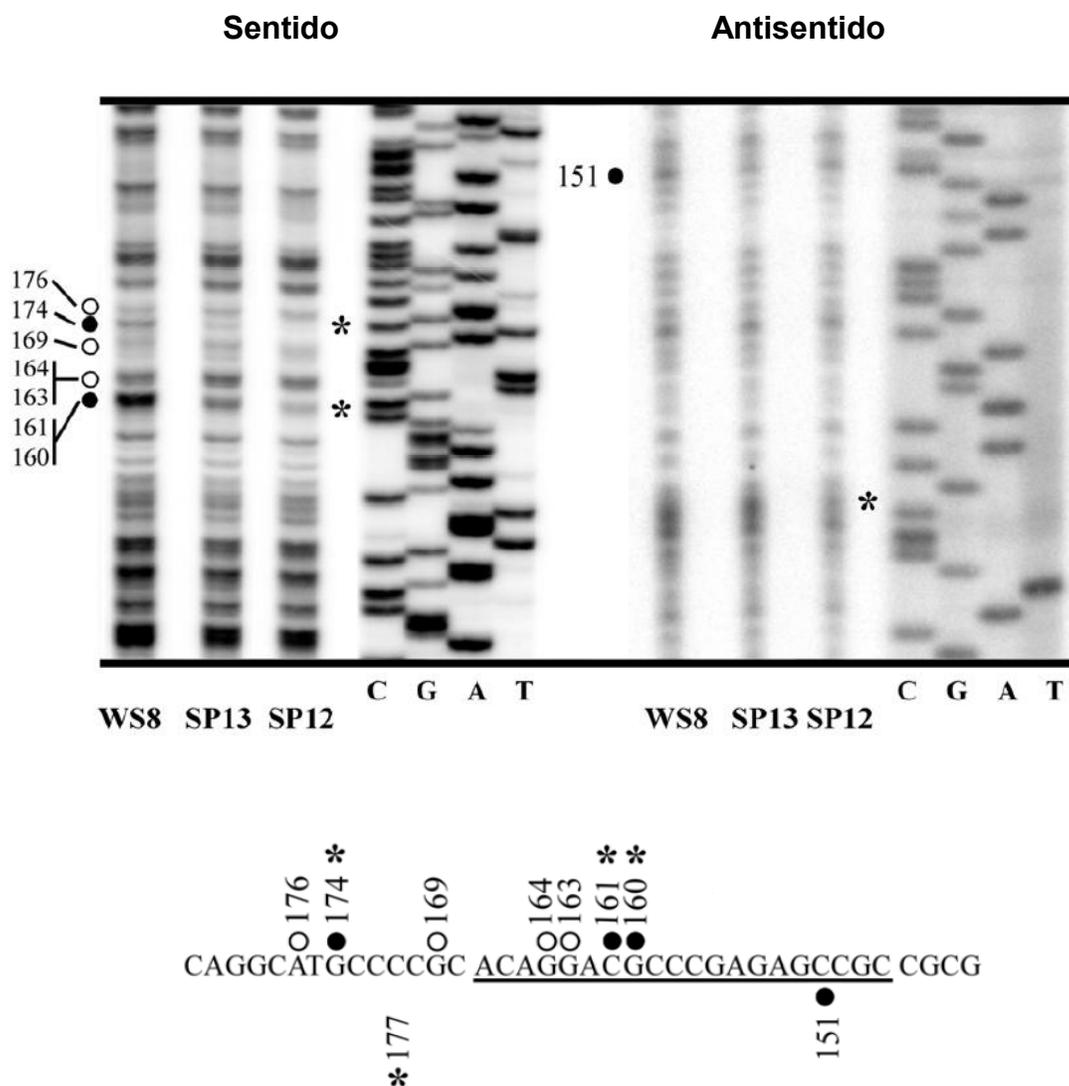


Fig 3.7 Protección *in vivo* a la metilación con DMS del *pmotA*. El patrón de metilación *in vivo* de la región reguladora fue obtenido utilizando el plásmido *pBmotA* modificado en las cepas WS8, SP13 y SP12, como se describió en materiales y métodos. Las posiciones de protección y de hiperreactividad son representadas por los círculos vacíos y llenos, respectivamente. Las posiciones protegidas en la cepa SP12 están representadas por asteriscos. La secuencia usada como referencia para la cadena sentido (se encuentra al lado izquierdo de la figura) corresponde a la a la región reguladora obtenida de *flgG* con el primer *flgG*+274. La secuencia usada como referencia de la cadena antisentido (se encuentra al lado derecho de la figura), corresponde a la región reguladora obtenida de *motA* con el primer *MotA*-243. En la parte inferior de la figura se encuentra la secuencia de la región protegida y se encuentra subrayado con negro el motivo identificado por el análisis hecho con el programa MEME.

3.8 Análisis computacionales del sitio de unión del complejo activador FleQ/FleT.

Con el fin de definir una posible secuencia consenso del complejo activador FleQ/FleT de los promotores *pflhA*, *pflgA*, *pflgG*, *pflgB*, *pfljO* y *pmotA*, se utilizó el programa MEME, para la identificación de motivos en las regiones previamente delimitadas con las fusiones transcripcionales. Este análisis permitió identificar un juego de posibles sitios de unión que se muestran en la Tabla 3.8, y cuya ubicación con respecto al promotor se muestra en la Figura 3.8.2. Con el fin de facilitar la visualización de estas secuencias, con ellas se generó la secuencia LOGO mostrada en la Figura 3.8.1.

Es conveniente remarcar que la región de *pmotA* que corresponde a este motivo se sobrepone parcialmente con las bases protegidas que se encontraron en los ensayos de protección (Fig 3.8); por lo tanto, es factible suponer que este motivo represente el sitio de unión del activador FleQ/FleT.



Fig 3.8.1 Secuencia Logo que representa el sitio de unión del complejo FleQ/FleT. Las secuencias identificadas con el programa MEME fueron utilizadas para generar la secuencia LOGO utilizando el servidor Web <http://weblogo.berkeley.edu/>.

Tabla 3.8

Nombre del promotor	Inicio	Valor P	Sitios
<i>pflgB</i>	78	4.65e-10	ctccctcagg TCCAGAGGCTCGAGAAGCG ccagcacggc
<i>pflgG</i>	54	2.01e-09	ggctogaacg TCAATACGATGGAGGAGCT cgtctctcg
<i>pfliO</i>	79	1.36e-08	ttcggccaga TCATCGAGCCCCAGAAGCG cgccgaaagc
<i>pFlgA</i>	134	2.5e-07	aaggatgcca ACGACAGGCTCGACGGGCG gagcgca
<i>pMotA</i>	12	5.62e-07	catgccccgc GCAGGACGCCCCAGAGCCG ccgcgacggg

Tabla 3.8 Alineamiento de el motivo encontrado en las secuencias de los posibles sitios de unión del complejo activador FleQ/FleT de los promotores *pflgB*, *pflgG*, *pfliO*, *pflgA*, *pmotA*, Las secuencias con colores representan el motivo encontrado por el programa MEME (meme@sdsc.edu). Los colores (letras color verde, rojo, azul y amarillo) representan los diferentes ácidos nucleicos. El valor P del motivo encontrado en todas las secuencias es < 0.0001. Las secuencias con las cuales se hicieron los alineamientos se encuentran en la tabla 2.3 de materiales y métodos.

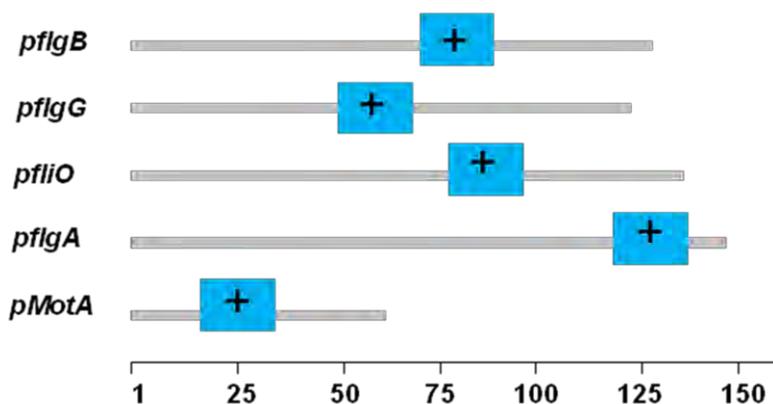


Fig 3.8.2 Representación de la ocurrencia del motivo dentro de la secuencia. Las cajas azules representan la localización del motivo dentro de la secuencia. El signo + indica que el motivo se encontró solo en la cadena sentido. La escala a la que se encuentran las secuencias se encuentra representada por números en la parte inferior. Esta información fue obtenida utilizando el programa MEME (meme@sdsc.edu).

El motivo se encontró solo en 5 de las secuencias enhancers (UAS), con buenos valores de probabilidad (Fig 3.8.1, tabla 3.8), sin embargo no se pudo identificar en la región enhancer de *flhA*, probablemente por el alto grado de degeneración del sitio de unión. En el motivo identificado en las 5 secuencias no se encontraron

secuencias repetidas ni palíndromes (Fig 3.8.1, tabla 3.8), los cuales son característicos en los sitios de unión de muchos de los activadores de sigma 54⁵⁹.

Se llevó a cabo una búsqueda en el genoma completo de *R. sphaeroides* del motivo identificado por MEME, junto con la secuencia consenso del promotor sigma 54 utilizando el programa de búsqueda de patrones en el DNA (DNA-pattern), el cual permitió identificar las cinco secuencias flagelares que generaron el motivo, y además, 8 posibles secuencias, de las cuales se descartaron 5, al ser consideradas falsos positivos; ya que el sitio de inicio de la transcripción estaba muy lejos de la región promotora o porque el gen corriente abajo del promotor no era el primer gen del operón. Las tres regiones restantes corresponden al promotor *pfliK*, el cual se demostró previamente que es dependiente del complejo FleQ/FleT⁵⁷, la región promotora de RSP2773 (posible peptidasa de la familia M15-3) y la región promotora de RSP0038; resultados obtenidos en el laboratorio han demostrado que RSP0038 forma parte de la clase III en la jerarquía flagelar de *R. sphaeroides* (Victor Ramírez, resultados no publicados).

4. DISCUSIÓN

En este trabajo se investigó acerca de la regulación transcripcional de los promotores flagelares dependientes de sigma 54 y la determinación del sitio de unión del complejo activador FleQ/FleT de *Rhodobacter sphaeroides*; Específicamente se estudiaron los promotores flagelares: *pflhA*, *pflgA*, *pflgB*, *pflgG*, y *pmotA* pertenecientes a la jerarquía transcripcional clase III.

La activación de la transcripción de los promotores flagelares de *Rhodobacter sphaeroides* es controlada por los activadores dependientes de sigma 54 FleQ y FleT, estas proteínas pertenecen a la familia de las EBPs y actúan formando complejos hetero-oligómeros, los cuales son inusuales en este tipo de activadores, ya que generalmente se encuentran formando complejos oligoméricos de una sola proteína. Hasta el momento, los únicos casos descritos de activadores hetero oligoméricos corresponden a los activadores FleQ/FleT y HrpR/HrpS de *Pseudomonas syringae*^{4, 58}. Dentro de las características de los activadores FleQ y FleT que los diferencian de otras EBPs, se encuentra que no presentan dominio sensor, FleT no tiene dominio HTH (hélice vuelta hélice) de unión a DNA, FleQ tiene bien conservadas las 7 cajas características de las EBPs mientras que FleT presenta algunas variaciones (Fig 1.2.1)⁴. La identificación del sitio de unión del complejo hetero-oligomérico FleQ/FleT es de particular interés, ya que aporta información importante para entender el proceso de activación y la afinidad de este complejo en los promotores flagelares clase II y clase III.

A partir de la evidencia experimental ha sido propuesto un modelo que explica la forma en la cual se controla la expresión de los genes flagelares en *R. sphaeroides*. De acuerdo a dicho modelo, la proteína FleQ normalmente se encuentra presente a bajas concentraciones, las cuales son suficientes para llevar a cabo la activación transcripcional del promotor *pflhT*; a medida que la concentración de FleT aumenta, ésta interactúa con FleQ y con ello aumenta la concentración de hetero- oligómeros. En consecuencia, inicia la transcripción de los promotores de clase III. Se ha observado que FleT controla negativamente la

expresión del operón *fleT*, este circuito de control se puede explicar asumiendo que en la región regulatoria de *pfleT* coexisten sitios de alta afinidad por FleT, así como sitios de baja afinidad los cuales solo serían ocupados cuando se forma el complejo hetero-oligomérico; la ocupación de los sitios de baja afinidad, provocaría una disminución en la tasa de activación mediada por FleQ⁴. La regulación negativa por sitios de baja afinidad también se ha descrito en el promotor *glnAp2*, el cual es activado por la EBP conocida como NtrC⁵⁹.

De acuerdo al modelo clásico de regulación de la transcripción, el paso de complejo abierto a cerrado se da por interacción del activador EBPs con la holoenzima $E\sigma^{54}$ a través de la formación de un asa de DNA que facilita el contacto entre ellos; generalmente el sitio de unión de las proteínas activadoras (UAS) se encuentra localizado de 100 a 250 pb corriente arriba o corriente abajo de su promotor. Las UAS de los promotores flagelares *pflhA*, *pflgA*, *pflgB*, *pflgG*, *pmotA* y *pfliO* que fueron mapeadas por deleciones, se encontraron localizadas en la posición distal de sus promotores, de tal forma que la activación mediada por el complejo hetero-oligomérico FleQ/FleT ocurre de manera similar a la descrita en otras EBPs.

En el activador flagelar FleQ de *Pseudomonas aeruginosa* se han descrito dos tipos de regulación en la jerarquía flagelar: El primero es el típico modelo de activación a distancia que se ha descrito en promotores como *pfleSR* donde al activador se encuentra corriente arriba de su promotor y por medio de la formación de una asa en el DNA puede contactar a la holoenzima $E\sigma^{54}$ e iniciar la transcripción; en el segundo tipo de regulación descrito para los promotores flagelares de *pflhA*, *pfliE* y *pfliL* donde el activador se encuentra localizado muy cerca del promotor y activa la transcripción sin la necesidad de la formación de un asa de DNA⁶⁰. Teniendo en cuenta que el activador FleQ de *P. aeruginosa* presenta una alta similitud con FleQ de *R. sphaeroides*, era factible que este último pudiera activar la transcripción a partir de sitios adyacentes a la región promotora, lo cual gracias a los resultados generados en este trabajo, podemos concluir que esta situación no ocurre para ninguno de los promotores flagelares hasta ahora conocidos.

En el contexto de la transcripción de los genes flagelares regulados por sigma 54 son pocos los reportes encontrados donde el sitio de unión del activador se ubica corriente abajo de su promotor; uno es el caso del activador FleQ de *Pseudomonas aeruginosa* y otro es el caso del activador FlrC de *Vibrio cholerae* en los cuales el activador se ha localizado tanto corriente arriba como corriente abajo de sus promotores de manera similar a lo encontrado en este trabajo con el complejo activador FleQ/FleT de *R. sphaeroides*^{60, 61}.

En otros activadores transcripcionales dependientes de sigma 54 como FlgR y CtcC de *Helicobacter pylori* y *Chlamydia trachomatis* no es necesario la formación de una asa de ADN para activar la transcripción ya que sus activadores carecen del dominio carboxilo-terminal o de unión al DNA el cual es característico de la mayoría de los activadores sigma 54⁶². Todos los genomas de Clamydias que han sido secuenciados presentan marcos de lectura abiertos que codifican potencialmente para activadores sigma 54 que carecen del dominio de unión a DNA. No es muy claro si la pérdida completa de este dominio provea algún beneficio económico para esta bacteria.

En *R. sphaeroides*, intentos previos por determinar *in vitro* el sitio de unión del complejo activador FleQ/FleT en los promotores flagelares clase III fueron fallidos. Sin embargo, los resultados de protección mostrados en este trabajo (cadena antisentido, resultado generado en este trabajo y cadena sentido resultado generado por S. Poggio) permitieron identificar una región en el promotor *pmotA* que es protegida de las modificaciones hechas por el DMS cuando el complejo FleQ/FleT se encuentra presente, lo que sugiere que el complejo activador FleQ/FleT se une a esta región. Esta zona concuerda con la región previamente delimitada por medio de un mapeo hecho con deleciones y corresponde a el mínimo fragmento requerido para activar el promotor *pmotA* (datos no mostrados).

Sorprendentemente, cuando los patrones de protección de las UAS de *pmotA* fueron evaluados en la cepa mutante *fleT*, se detectaron cambios similares de reactividad a los observados en la cepa WS8, en la mayoría de los casos los cambios detectados fueron de sobre-reactividad en la cepa WS8 y de protección en la cepa SP12. Al mismo tiempo algunas de las protecciones observadas en la cepa WS8 se perdieron en SP12. Estos hallazgos sugieren que FleQ es capaz de unirse por sí solo a esta región; sin embargo, la unión del complejo activador FleQ/FleT es diferente y la unión de FleQ no promueve la activación transcripcional del promotor *pmotA* en la cepa SP12⁴. Se requieren trabajos adicionales que confirmen la unión de FleQ a esta región y evalúen su posible efecto en la expresión de *pmotA*. Así como estudios que permitan elucidar como la unión de FleT a FleQ cambia sus propiedades de unión al DNA.

Debido a que no se tiene evidencia *in vitro* que muestre la unión del complejo activador FleQ/FleT a las UAS, queda la posibilidad de que el complejo FleQ/FleT pueda activar *in vivo* la expresión de otro activador, el cual podría ser el verdadero activador de los promotores flagelares clase III. Sin embargo esta posibilidad pierde peso ya que en *R. sphaeroides* se han encontrado solo 5 EBPs que tienen bien conservada la caja GAFTGA la cual es necesaria para la interacción con RpoN. Hasta el momento se han descrito la función de solo tres activadores: FleQ, FleT y NifA, este último es un regulador de genes que participan en la fijación del nitrógeno, el cuarto y quinto activador son codificados por los genes RSP1590 y RSP2800; resultados de la actividad de mutantes hechas previamente en el laboratorio de estos genes no presentaron ningún defecto en la motilidad (resultados sin publicar).

Con el fin de identificar las bases relevantes involucradas en la unión del complejo activador FleQ/FleT, se analizaron las secuencias UAS previamente delimitadas para los promotores *pflgG*, *pflgB*, *pmotA*, *pflhA*, *pflgA* y *pfliO* utilizando el programa de búsqueda de motivos conocido como MEME. Se encontró un motivo el cual se sobrepone con la región protegida por DMS en el promotor *pmotA*. Como prueba posterior para validar este motivo, se buscó su presencia en todo el genoma de *R.*

sphaeroides cerca a las secuencias de promotores sigma 54. Esta estrategia permitió identificar todas las secuencias promotoras flagelares de clase III previamente conocidas (con excepción de *pflhA*), así como un nuevo gen denominado RSP0038, el cual resultó ser dependiente del complejo activador FleQ/FleT.

Todos estos resultados sugieren que este motivo representa el sitio de unión del activador flagelar FleQ/FleT. De particular relevancia resulta el hecho de que al buscar el posible sitio de unión del complejo FleQ/FleT en todo el genoma de *R. sphaeroides*, el algoritmo no identificó a ninguno de los promotores flagelares de clase II, los cuales son dependientes únicamente de FleQ; Por tal motivo se infiere que el sitio de reconocimiento de FleQ difiere substancialmente del descrito por el complejo activador FleQ/FleT. Futuras caracterizaciones de las UAS de los promotores de clase II y de clase III se deben realizar con el fin de entender el tipo de cambios que ocurren en FleQ, cuando se encuentra unido con FleT.

El activador FleQ de *Rhodobacter sphaeroides* pertenece a la familia de los activadores NtrC, tiene conservadas las 7 cajas características de la región central y presenta un dominio de unión a DNA característico de estos activadores, por tal motivo se esperaría que FleQ al igual que NtrC se uniera a secuencias consenso bien definidas.

Las UAS del activador NtrC ubicadas en la región regulatoria del promotor *pglnA2* están compuestas por 5 sitios de unión del activador, los primeros dos son sitios de mayor afinidad y necesitan de bajas concentraciones del activador *in vitro* para activar la transcripción, los otros sitios específicamente el 4 y el 5 representan sitios de menor afinidad los cuales son ocupados solo cuando hay altas concentraciones del activador *in vitro* y bloquean la capacidad del activador de unirse a las UAS ya que limitan la flexibilidad del DNA y reducen la formación de asas ⁵⁹. La formación de dos dímeros por parte de NtrC es necesaria para la

estimulación de la actividad ATPasa requerida en la activación transcripcional. Los dos sitios que componen las UAS de NtrC en el promotor *glnAp2* se encuentran en la misma cara del DNA, lo cual facilita la unión cooperativa en esta zona que a su vez se ve favorecida por la fosforilación de NtrC. Esta arquitectura asegura esencialmente la ocupación constante de la región enhancer de *glnA2p* por dos dímeros ⁵⁹. De acuerdo a los hallazgos reportados de los experimentos de protección *in vitro* en el promotor *pflaA* de la región enhancer del activador FlrC de *V. cholerae*, se cree que esta zona tiene una arquitectura similar a la presentada por NtrC, ya que en la región enhancer de *pflaA* se encontraron cuatro repeticiones del motivo CGGCAA, sugiriendo el reconocimiento por dos dímeros. A pesar de estos hallazgos en otra región analizada (*pflgk*) dependiente de FlrC no se encontraron repeticiones del mismo motivo, solo se identificó una región de 14 pb con estrecha homología (GGGTAACCAAAGCG). Se cree que esta degeneración se debe a que FlrC se une más fuertemente a *pflaA* que a *pflgK* ⁶¹. A pesar de que el activador maestro FleQ de *P. aeruginosa* actúa en forma típica como los otros activadores NtrC se identificaron cuatro sitios diferentes de unión de este activador, los cuales revelaron la ausencia de alguna secuencia consenso entre ellos. En una de las regiones estudiadas (*pfliE*) se encontraron secuencias invertidas repetidas casi perfectas de unión de FleQ, las cuales no estuvieron presentes en las otras regiones ⁶⁰. El posible motivo consenso identificado en 5 de las seis regiones promotoras flagelares de *R. sphaeroides*, no presentó el tipo de secuencias repetidas características de los sitios de reconocimiento de NtrC, las cuales pueden sugerir o no el reconocimiento por dímeros. Al igual que lo observado en los otros activadores, puede haber algún tipo de degeneración de la secuencia de reconocimiento por parte del activador FleQ, como es el caso de la región de *pflhA*; donde probablemente la afinidad del activador por esta región sea menor.

En los promotores flagelares *pflhA* y *pflgA* se encuentra una región intercistrónica de 53 pb, lo cual haría pensar en la hipótesis de que el complejo activador FleQ/FleT podría: promover la activación cuando la unión de este complejo se da

cerca al promotor, o en sitios localizados en la región codificadora del gen localizado corriente arriba. Los resultados de este trabajo demostraron que ninguno de los escenarios anteriores fue correcto, ya que se encontró que la activación de estos promotores depende de una región localizada entre 150 y 250 pb corriente abajo de la secuencia promotora. La identificación de estas regiones se hizo por medio de fusiones transcripcionales con el gen reportero de β -glucuronidasa, las cuales mostraron regiones de alta y baja actividad ubicadas entre la posición +149 y +23 (95% y 27%) para *pflhA* y entre la posición +270 y +139 (100% y 25% para *pflgA* (Fig 3.2 y 3.3). La localización corriente abajo de estas regiones sugiere un tipo diferente de regulación en estos promotores en comparación al modelo encontrado usualmente en la mayoría de los promotores flagelares dependientes de sigma 54 donde el sitio de unión del activador está entre 100 y 250pb corriente arriba de su promotor, como es el caso de los promotores flagelares *pflgB* y *pflgG* cuyos sitios de unión del complejo activador FleQ/FleT se localizan entre la posición -222 a la -125 (97% y 2%) para *flgB* y entre la posición -180 a la -99 (94% y 3%) para *pflgG* (Fig 3.6.1 y 3.6.2).

Con el fin de delimitar más los sitios de unión del complejo activador FleQ/ FleT de los promotores *pflhA* y *pflgA* se realizaron fusiones transcripcionales con cortes desde la posición (+209 a la +80) y de la posición (+270 a la +217) respectivamente y se obtuvieron porcentajes de actividad del 53% y 43%, lo cual nos indica que estas zonas probablemente tengan parte de los elementos requeridos para la activación.

De manera interesante se observó que las UAS localizadas corriente arriba de cada promotor (*pflhA* y *pflgA*) eran responsables del 25% y 30% de la actividad total detectada para los promotores. Nosotros consideramos que la activación de estos promotores involucra un contacto preferencial por parte del activador unido a la UAS localizada río abajo, pero que la arquitectura de la región no imposibilita la activación mediada por FleQ/FleT unido a la UAS ubicada río arriba. Este

mecanismo molecular podría involucrar la presencia de un determinado tipo de conformación preferenciales en el DNA ó doblamientos inducidos por otras proteínas (como IHF).

La presencia de otros elementos como IHF de *E. coli* o la proteína Nac de *Klebsiella aerogenes* hacen más o menos eficiente la activación de ciertos promotores; en el caso de IHF, este facilita el doblamiento del DNA y la formación del asa de DNA para que el activador contacte a la holoenzima⁶³ a diferencia de la proteína Nac la cual se une en un sitio localizado entre las UAS y el activador reprimiendo la transcripción ya que se produce un doblamiento adverso que dificulta la formación de una asa de activación⁶⁴. En el caso de estas regiones no se encontraron secuencias consensos que coincidan con la posible presencia de este tipo de elementos.

La relevancia fisiológica del 30% de actividad podría tener implicaciones en el contexto cromosomal. Como el factor sigma, FliA (requerido para la expresión de los genes flagelares de clase IV) es codificado en el operón *flgA* y su factor antisigma *flgM* es codificado por el operón *flhA*, las UAS de estos promotores podrían compartir algún tipo actividad que permitiera llevar un adecuado control en la expresión de estos dos operones. La liberación de FliA de la acción inhibitoria de FlgM es uno de los puntos más relevantes durante la morfogénesis flagelar, esto ocurre cuando FlgM es exportado hacia el exterior celular después de que el gancho y el cuerpo basal son formados. Esto nos permitiría especular acerca de cómo la regulación cruzada de estas UAS podría mantener a estas dos proteínas en equilibrio. Con el fin de determinar el efecto biológico que tendría la inserción de nucleótidos en esta región de 53 pb en el cromosoma de *Rhodobacter sphaeroides* sobre la expresión de los genes regulados por estos promotores se hizo la mutante JP1, la cual tiene insertado por doble recombinación 2083 pb (casete de espectinomicina). Esta mutante tanto al microscopio de luz como en cajas de nado, se comportó como la cepa silvestre WS8. Este resultado indica que

en caso de que la expresión de estos promotores disminuyera 30%, el nivel de expresión remanente sería suficiente para que la concentración de los productos proteicos obtenidos cumplan con su función dentro de la morfogénesis flagelar.

Adicionalmente se hicieron fusiones transcripcionales de *pflhA* y *pflgA* en el plásmido pBBMCS53, que tenían insertado el mismo casete (2083 pb) entre las 53 pb y se obtuvieron porcentajes de actividad de 14% para *pflhA* y 18% *pflgA*; estos valores representan un promedio de pérdida de actividad de más o menos el 80%. Este 80% de pérdida de actividad también podría reflejar cambios en el super enrollamiento (geometría del DNA) de las fusiones transcripcionales en el pBBMCS53 los cuales de alguna manera afectaron la expresión de estos promotores.

Con el fin de caracterizar la dependencia de la activación de los promotores divergentes *pflhA* y *pflgA* de las UAS contralaterales, se evaluó si el 30% de activación obtenido se puede ver afectado en estos sitios cuando cambian de posición desplazándose a la cara opuesta del DNA. Para ello se adicionaron 5 pb entre las 53 pb que separan a ambos promotores. Ya que las UAS principales de estos promotores se encuentran localizadas corriente abajo, esta inserción no estaría afectando la activación dada por la UAS ubicada río abajo. Sin embargo, la inserción de 5 pb produjo un promedio de pérdida de actividad de ambos promotores del 65%. La reducida actividad observada para estas construcciones podría ser interpretada en términos de la pérdida de la activación mediada por las UAS ubicadas río arriba; o como en el caso de la inserción del casete *aadA*, por la alteración de la topología particular de esta región. Con el fin de evaluar estas posibilidades, es necesario realizar experimentos en los cuales se determine el nivel de actividad del gen reportero insertando 10 pb en esta región.

Hasta el momento únicamente dos promotores divergentes dependientes de sigma 54 han sido caracterizados ^{65, 66}. Por un lado, los promotores divergentes *pnifJ* y *pnifH* de *Klebsiella pneumoniae*, donde la presencia de la proteína IHF evita la activación del promotor *nifJ* por el activador NifA cuando este se encuentra

unido a la UAS responsables de la activación del promotor divergente *nifH*. En este caso las UAS se encuentran localizadas corriente arriba de los promotores⁶⁵. El otro caso es el de los promotores divergentes *phycA* y *phypA* de *E. coli*, los cuales están separados por solo 120 pb. En esta región hay una secuencia de reconocimiento de la proteína IHF. La actividad del promotor *phycA* disminuye en cepas deficientes de IHF a diferencia de *phypA* que aumenta la actividad. Esto muestra como la actividad de los promotores divergentes se puede ver afectada por la presencia de otros factores como IHF.

5. CONCLUSIONES

El mapeo por delección para la identificación de las UAS en los diferentes promotores flagelares, el ensayo de protección *in vivo* de la cadena antisentido del promotor *pmotA* y las herramientas computacionales utilizadas en este trabajo, permitieron identificar un motivo que representa la posible secuencia consenso de unión del complejo activador FleQ/FleT.

Las UAS principales de los promotores divergentes *pflhA* y *pflgA* se localizan corriente abajo a diferencia de las UAS de los promotores *pflgB* y *pflgG* que se encuentran corriente arriba.

El 30% de actividad observado en las diferentes fusiones transcripcionales de los promotores divergentes *pflhA* y *pflgA* depende de las UAS localizadas corriente arriba de sus correspondientes promotores mientras que el 65-70% de actividad depende de las UAS localizadas corriente abajo.

Las UAS principales de *pflhA* y *pflgA* se localizan corriente abajo de las secuencias consenso de estos promotores y se superponen con la región responsable del 30% de actividad del promotor contralateral, sugiriendo que la misma UAS puede ser capaz de activar ambos promotores.

6. PERSPECTIVAS

Caracterizar el motivo consenso identificado en los 5 promotores flagelares (*pflgA*, *pflgB*, *pflgG*, *pfliO* y *pmotA*) por medio de mutagénesis dirigida.

Aclarar las posibles asociaciones a nivel molecular entre FleQ y FleT por medio de pruebas que permitan identificar interacciones proteína-proteína como pull-down, y ensayos de doble híbrido.

Identificar la región regulatoria de los promotores clase II y los sitios de unión del complejo activador FleQ.

Investigar en detalle el posible efecto corregulatorio entre las UAS de los promotores divergentes *pflhA* y *pflgA*, midiendo los niveles de expresión de sus mRNAs y evaluar las implicaciones biológicas de este efecto.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Aizawa SI. Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 1996;19:1-5.
2. Aldridge P, Hughes KT. Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:160-5.
3. Hughes KT, Gillen KL, Semon MJ, Karlinsey JE. Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* 1993;262:1277-80.
4. Poggio S, Osorio A, Dreyfus G, Camarena L. The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins. *Mol Microbiol* 2005;58:969-83.
5. Dasgupta N, Wolfgang MC, Goodman AL, Arora SK, Jyot J, Lory S, Ramphal R. A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 2003;50:809-24.
6. Milcamps A, Van Dommelen A, Stigter J, Vanderleyden J, de Bruijn FJ. The *Azospirillum brasilense* *rpoN* gene is involved in nitrogen fixation, nitrate assimilation, ammonium uptake, and flagellar biosynthesis. *Can J Microbiol* 1996;42:467-78.
7. Millikan DS, Ruby EG. FlrA, a sigma54-dependent transcriptional activator in *Vibrio fischeri*, is required for motility and symbiotic light-organ colonization. *J Bacteriol* 2003;185:3547-57.
8. Ritchings BW, Almira EC, Lory S, Ramphal R. Cloning and phenotypic characterization of *fleS* and *fleR*, new response regulators of *Pseudomonas aeruginosa* which regulate motility and adhesion to mucin. *Infect Immun* 1995;63:4868-76.
9. Spohn G, Scarlato V. The autoregulatory HspR repressor protein governs chaperone gene transcription in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 1999;34:663-74.
10. Ishihama A. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:499-518.
11. Morett E, Buck M. In vivo studies on the interaction of RNA polymerase-sigma 54 with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* *nifH* promoters. The role of *NifA* in the formation of an open promoter complex. *J Mol Biol* 1989;210:65-77.
12. Ninfa AJ, Reitzer LJ, Magasanik B. Initiation of transcription at the bacterial *glnAp2* promoter by purified *E. coli* components is facilitated by enhancers. *Cell* 1987;50:1039-46.
13. Popham DL, Szeto D, Keener J, Kustu S. Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. *Science* 1989;243:629-35.
14. Wigneshweraraj SR, Burrows PC, Bordes P, Schumacher J, Rappas M, Finn RD, Cannon WV, Zhang X, Buck M. The second paradigm for activation of transcription. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2005;79:339-69.
15. Barrios H, Valderrama B, Morett E. Compilation and analysis of sigma(54)-dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 1999;27:4305-13.
16. Merrick MJ. In a class of its own--the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). *Mol Microbiol* 1993;10:903-9.

17. Hendrixson DR, DiRita VJ. Transcription of sigma54-dependent but not sigma28-dependent flagellar genes in *Campylobacter jejuni* is associated with formation of the flagellar secretory apparatus. *Mol Microbiol* 2003;50:687-702.
18. Niehus E, Gressmann H, Ye F, Schlapbach R, Dehio M, Dehio C, Stack A, Meyer TF, Suerbaum S, Josenhans C. Genome-wide analysis of transcriptional hierarchy and feedback regulation in the flagellar system of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 2004;52:947-61.
19. Studholme DJ, Buck M. The biology of enhancer-dependent transcriptional regulation in bacteria: insights from genome sequences. *FEMS Microbiol Lett* 2000;186:1-9.
20. Buck M, Gallegos MT, Studholme DJ, Guo Y, Gralla JD. The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. *J Bacteriol* 2000;182:4129-36.
21. Mackenzie C, Choudhary M, Larimer FW, Predki PF, Stilwagen S, Armitage JP, Barber RD, Donohue TJ, Hosler JP, Newman JE, Shapleigh JP, Sockett RE, Zeilstra-Ryalls J, Kaplan S. The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Photosynth Res* 2001;70:19-41.
22. Poggio S, Domeinzain C, Osorio A, Camarena L. The nitrogen assimilation control (Nac) protein represses *asnC* and *asnA* transcription in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 2002;206:151-6.
23. Cannon W, Chaney M, Buck M. Characterisation of holoenzyme lacking sigmaN regions I and II. *Nucleic Acids Res* 1999;27:2478-86.
24. Sasse-Dwight S, Gralla JD. Role of eukaryotic-type functional domains found in the prokaryotic enhancer receptor factor sigma 54. *Cell* 1990;62:945-54.
25. Syed A, Gralla JD. Identification of an N-terminal region of sigma 54 required for enhancer responsiveness. *J Bacteriol* 1998;180:5619-25.
26. Wang JT, Syed A, Hsieh M, Gralla JD. Converting *Escherichia coli* RNA polymerase into an enhancer-responsive enzyme: role of an NH2-terminal leucine patch in sigma 54. *Science* 1995;270:992-4.
27. Buck M, Cannon W. Specific binding of the transcription factor sigma-54 to promoter DNA. *Nature* 1992;358:422-4.
28. Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* 1999;9:27-43.
29. Hanson PI, Roth R, Morisaki H, Jahn R, Heuser JE. Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* 1997;90:523-35.
30. Wang J, Song JJ, Seong IS, Franklin MC, Kamtekar S, Eom SH, Chung CH. Nucleotide-dependent conformational changes in a protease-associated ATPase HslU. *Structure* 2001;9:1107-16.
31. Porter SC, North AK, Wedel AB, Kustu S. Oligomerization of NTRC at the *glnA* enhancer is required for transcriptional activation. *Genes Dev* 1993;7:2258-73.

32. Morett E, Segovia L. The sigma 54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J Bacteriol* 1993;175:6067-74.
33. North AK, Klose KE, Stedman KM, Kustu S. Prokaryotic enhancer-binding proteins reflect eukaryote-like modularity: the puzzle of nitrogen regulatory protein C. *J Bacteriol* 1993;175:4267-73.
34. Lee JH, Scholl D, Nixon BT, Hoover TR. Constitutive ATP hydrolysis and transcription activation by a stable, truncated form of *Rhizobium meliloti* DCTD, a sigma 54-dependent transcriptional activator. *J Biol Chem* 1994;269:20401-9.
35. Perez-Martin J, De Lorenzo V. Integration host factor suppresses promiscuous activation of the sigma 54-dependent promoter Pu of *Pseudomonas putida*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7277-81.
36. Shingler V. Signal sensing by sigma 54-dependent regulators: derepression as a control mechanism. *Mol Microbiol* 1996;19:409-16.
37. Jovanovic G, Weiner L, Model P. Identification, nucleotide sequence, and characterization of PspF, the transcriptional activator of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. *J Bacteriol* 1996;178:1936-45.
38. Preston G, Deng WL, Huang HC, Collmer A. Negative regulation of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* by HrpV. *J Bacteriol* 1998;180:4532-7.
39. Xiao Y, Heu S, Yi J, Lu Y, Hutcheson SW. Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. *J Bacteriol* 1994;176:1025-36.
40. Rombel I, Peters-Wendisch P, Mesecar A, Thorgeirsson T, Shin YK, Kustu S. MgATP binding and hydrolysis determinants of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. *J Bacteriol* 1999;181:4628-38.
41. Chaney M, Grande R, Wigneshweraraj SR, Cannon W, Casaz P, Gallegos MT, Schumacher J, Jones S, Elderkin S, Dago AE, Morett E, Buck M. Binding of transcriptional activators to sigma 54 in the presence of the transition state analog ADP-aluminum fluoride: insights into activator mechanochemical action. *Genes Dev* 2001;15:2282-94.
42. Schumacher J, Joly N, Rappas M, Zhang X, Buck M. Structures and organisation of AAA+ enhancer binding proteins in transcriptional activation. *J Struct Biol* 2006;156:190-9.
43. Xu H, Hoover TR. Transcriptional regulation at a distance in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2001;4:138-44.
44. Dreyfus G, Williams AW, Kawagishi I, Macnab RM. Genetic and biochemical analysis of *Salmonella typhimurium* FliI, a flagellar protein related to the catalytic subunit of the F0F1 ATPase and to virulence proteins of mammalian and plant pathogens. *J Bacteriol* 1993;175:3131-8.
45. Fan F, Macnab RM. Enzymatic characterization of FliI. An ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 1996;271:31981-8.
46. Vogler AP, Homma M, Irikura VM, Macnab RM. *Salmonella typhimurium* mutants defective in flagellar filament regrowth and sequence similarity of

- FliI to F0F1, vacuolar, and archaebacterial ATPase subunits. *J Bacteriol* 1991;173:3564-72.
47. Muller V, Jones CJ, Kawagishi I, Aizawa S, Macnab RM. Characterization of the *fliE* genes of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* and identification of the FliE protein as a component of the flagellar hook-basal body complex. *J Bacteriol* 1992;174:2298-304.
 48. Minamino T, Yamaguchi S, Macnab RM. Interaction between FliE and FlgB, a proximal rod component of the flagellar basal body of *Salmonella*. *J Bacteriol* 2000;182:3029-36.
 49. Fraser GM, Gonzalez-Pedrajo B, Tame JR, Macnab RM. Interactions of FliJ with the *Salmonella* type III flagellar export apparatus. *J Bacteriol* 2003;185:5546-54.
 50. Zhang X, Chaney M, Wigneshweraraj SR, Schumacher J, Bordes P, Cannon W, Buck M. Mechanochemical ATPases and transcriptional activation. *Mol Microbiol* 2002;45:895-903.
 51. Bertoni G, Fujita N, Ishihama A, de Lorenzo V. Active recruitment of sigma54-RNA polymerase to the Pu promoter of *Pseudomonas putida*: role of IHF and alphaCTD. *EMBO J* 1998;17:5120-8.
 52. Huo YX, Tian ZX, Rappas M, Wen J, Chen YC, You CH, Zhang X, Buck M, Wang YP, Kolb A. Protein-induced DNA bending clarifies the architectural organization of the sigma54-dependent *glnAp2* promoter. *Mol Microbiol* 2006;59:168-80.
 53. Siström WR. The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas spheroides*. *J Gen Microbiol* 1962;28:607-16.
 54. Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D. beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:8447-51.
 55. Austin S, Lambert J. Purification and in vitro activity of a truncated form of ANFA. Transcriptional activator protein of alternative nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem* 1994;269:18141-8.
 56. Abril MA, Michan C, Timmis KN, Ramos JL. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J Bacteriol* 1989;171:6782-90.
 57. Poggio S, Aguilar C, Osorio A, Gonzalez-Pedrajo B, Dreyfus G, Camarena L. sigma(54) Promoters control expression of genes encoding the hook and basal body complex in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 2000;182:5787-92.
 58. Grimm C, Aufsatz W, Panopoulos NJ. The *hrpRS* locus of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* constitutes a complex regulatory unit. *Mol Microbiol* 1995;15:155-65.
 59. Atkinson MR, Pattaramanon N, Ninfa AJ. Governor of the *glnAp2* promoter of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2002;46:1247-57.
 60. Jyot J, Dasgupta N, Ramphal R. 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* 2002;184:5251-60.

61. Correa NE, Klose KE. Characterization of enhancer binding by the *Vibrio cholerae* flagellar regulatory protein FlrC. *J Bacteriol* 2005;187:3158-70.
62. Brahmachary P, Dashti MG, Olson JW, Hoover TR. *Helicobacter pylori* FlgR is an enhancer-independent activator of sigma54-RNA polymerase holoenzyme. *J Bacteriol* 2004;186:4535-42.
63. Claverie-Martin F, Magasanik B. Role of integration host factor in the regulation of the *glnHp2* promoter of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:1631-5.
64. Feng J, Goss TJ, Bender RA, Ninfa AJ. Repression of the *Klebsiella aerogenes* *nac* promoter. *J Bacteriol* 1995;177:5535-8.
65. Charlton W, Cannon W, Buck M. The *Klebsiella pneumoniae* *nifJ* promoter: analysis of promoter elements regulating activation by the *NifA* promoter. *Mol Microbiol* 1993;7:1007-21.
66. Lutz S, Bohm R, Beier A, Bock A. Characterization of divergent *NtrA*-dependent promoters in the anaerobically expressed gene cluster coding for hydrogenase 3 components of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1990;4:13-20.
67. Kunkel, T. A. The mutational specificity of DNA polymerases-alpha and -gamma during in vitro DNA synthesis. *J Biol Chem* 1985;23: 12866-74

Identification of the binding site of the σ^{54} hetero-oligomeric FleQ/FleT activator in the flagellar promoters of *Rhodobacter sphaeroides*

J. Peña-Sánchez,¹ S. Poggio,¹ U. Flores-Pérez,¹ A. Osorio,¹
C. Domenzain,¹ G. Dreyfus² and L. Camarena¹

Correspondence

L. Camarena

rosal@servidor.unam.mx

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico

²Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico

Expression of the flagellar genes in *Rhodobacter sphaeroides* is dependent on one of the four sigma-54 factors present in this bacterium and on the enhancer binding proteins (EBPs) FleQ and FleT. These proteins, in contrast to other well-characterized EBPs, carry out activation as a hetero-oligomeric complex. To further characterize the molecular properties of this complex we mapped the binding sites or upstream activation sequences (UASs) of six different flagellar promoters. In most cases the UASs were identified at approximately 100 bp upstream from the promoter. However, the activity of the divergent promoters *flhAp-flgAp*, which are separated by only 53 bp, is mainly dependent on a UAS located approximately 200 bp downstream from each promoter. Interestingly, a significant amount of activation mediated by the upstream or contralateral UAS was also detected, suggesting that the architecture of this region is important for the correct regulation of these promoters. Sequence analysis of the regions carrying the potential FleQ/FleT binding sites revealed a conserved motif. *In vivo* footprinting experiments with the *motAp* promoter allowed us to identify a protected region that overlaps with this motif. These results allow us to propose a consensus sequence that represents the binding site of the FleQ/FleT activating complex.

Received 21 September 2008

Revised 5 January 2009

Accepted 26 January 2009

INTRODUCTION

Promoter recognition in bacteria is mediated by the RNA polymerase core (E) associated with a sigma factor. There are two families of sigma factors, the σ^{70} family and that of σ^{54} . These two families differ not only in their sequence but also in the mechanism that brings about transcriptional initiation. Whereas $E\sigma^{70}$ is capable of forming open complex by itself, $E\sigma^{54}$ requires an activator protein that, through ATP hydrolysis, allows open complex formation (for reviews, see Buck *et al.*, 2000; Wigneshweraraj *et al.*, 2005). Activator proteins of $E\sigma^{54}$ usually bind approximately 100 bp upstream of the promoter sequence, and a DNA loop favours the interaction of the activator with the RNA polymerase holoenzyme bound to the promoter (Reitzer & Magasanik, 1986; Ninfa *et al.*, 1987; Buck *et al.*, 1986; Hoover *et al.*, 1990; Su *et al.*, 1990; Wedel *et al.*,

1990). The mechanism that allows open complex formation is still unknown, but the current model suggests that the activator protein remodels the nucleoprotein complex formed by $E\sigma^{54}$ and DNA in order to initiate transcription (Guo *et al.*, 2000; Cannon *et al.*, 2000; Burrows *et al.*, 2004; Rappas *et al.*, 2007). The DNA region to which the activator proteins bind is known as the upstream activation sequence or UAS (Buck *et al.*, 1986; Morett *et al.*, 1988). It has been shown for the *glnA* promoter that this region can be moved more than 1000 bp without losing its ability to stimulate transcription (Ninfa *et al.*, 1987). Based on this property, the UASs are also known as enhancers, and the activator proteins as enhancer binding proteins, or EBPs.

The σ^{54} -dependent promoters show a highly conserved consensus sequence, and their main characteristics are the dinucleotides GG and GC located in the -24 and -12 boxes, respectively (Beynon *et al.*, 1983; Merrick, 1993; Barrios *et al.*, 1999).

Proteins that belong to the EBP family of transcriptional activators usually show three domains: a variable N terminus, a very well-conserved central domain, and a helix–turn–helix (HTH) motif at the C-terminal domain

Abbreviations: DMS, dimethyl sulfate; EBP, enhancer binding protein; HTH, helix–turn–helix; IHF, integration host factor; UAS, upstream activation sequence.

Two supplementary tables, listing oligonucleotides used in this work and relevant sequences for motif finding, are available with the online version of this paper.

(Studholme & Dixon, 2003; Morett & Segovia, 1993). The N-terminal domain controls the ability of the EBP to form hexameric or heptameric oligomers in response to a particular stimulus (Lee *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2003; Doucleff *et al.*, 2005a; De Carlo *et al.*, 2006). The EBPs can be classified by the type of domain that is present in the N-terminal region (Studholme & Dixon, 2003). However, some EBPs do not have an N-terminal domain; in consequence, these proteins are constitutively active, and the control of this kind of proteins is usually achieved through binding of another protein (Jovanovic *et al.*, 1996; Preston *et al.*, 1998; Elderkin *et al.*, 2005; Hankamer *et al.*, 2004). The central domain is responsible for ATP hydrolysis, oligomerization and transcriptional activation (for reviews, see Wigneshweraraj *et al.*, 2005; Schumacher *et al.*, 2006; Rappas *et al.*, 2007). This domain is present in all members of the AAA+ family of ATPases. These proteins, when active, form ring shaped oligomers and exert their activity through the ATP-dependent remodelling of macromolecules (Neuwald *et al.*, 1999; Schumacher *et al.*, 2006; Wyman *et al.*, 1997; Rippe *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003; Rappas *et al.*, 2005; Sallai & Tucker, 2005). Seven conserved regions have been identified in the central domain of the EBPs (C1–C7) (Morett & Segovia, 1993; Zhang *et al.*, 2002). Within these regions a distinctive signature of the EBPs is the GAFTGA sequence that is located in the C3 region; experimental evidence suggests that this sequence interacts with $E\sigma^{54}$ during ATP hydrolysis (Chaney *et al.*, 2001; De Carlo *et al.*, 2006). For some activators such as DctD, NifA and PspF, it has been shown that, in the absence of the N- and C-terminal domains, the central region by itself is sufficient to activate transcription (Xu *et al.*, 2004).

The C-terminal domain allows specific binding of the activator to a particular UAS (Doucleff *et al.*, 2005b), limiting the activity of the EBP to a few promoters in the chromosome; this fact allows the σ^{54} factor to be involved in the transcription of different non-related pathways in the same bacterium. Functional EBPs without an HTH motif have been described in *Helicobacter pylori*, *Chlamydia trachomatis* and *Rhodobacter sphaeroides* (Brahmachary *et al.*, 2004; Poggio *et al.*, 2005; Beck *et al.*, 2007). In the first two cases, only one EBP is present in the genome of these micro-organisms, and it has been proposed that these EBPs promote open complex formation from solution (i.e. without DNA binding) (Brahmachary *et al.*, 2004). In contrast, *R. sphaeroides* has four σ^{54} factors and five well-conserved EBPs (Poggio *et al.*, 2002, 2005). It has previously been shown that the four σ^{54} proteins present in *R. sphaeroides* are not functionally interchangeable. RpoN1 along with NifA specifically recognizes and allows transcription of the genes required for nitrogen fixation, while RpoN2 along with FleQ and FleT regulates expression of a subset of the flagellar genes (flagellar class III) required to form the flagellar structures known as the hook and basal body. The functions of RpoN3 and RpoN4

are still unknown, but several lines of evidence suggest that neither of them is able to trigger the expression of the promoters recognized by RpoN1 or RpoN2 (Poggio *et al.*, 2002, 2006). The *R. sphaeroides* flagellar EBPs FleQ and the HTH-lacking FleT protein are both required for the expression of the flagellar genes. By itself, FleQ is only capable of activating transcription of the single class II operon, which contains the *fleT* gene and six other flagellar genes. Even though FleT lacks the characteristic HTH motif in the C-terminal region, this protein forms a complex with FleQ which is required to transcribe the flagellar class III operons (Poggio *et al.*, 2005). These operons encode the majority of the flagellar proteins required for the formation of the flagellum.

The only other hetero-oligomeric EBP so far described is the HrpR/HrpS complex from *Pseudomonas syringae* (Grimm *et al.*, 1995; Hutcheson *et al.*, 2001). In this case both proteins have an HTH motif, and both are required for full expression of the genes of the pathogenic type III protein export system (Hutcheson *et al.*, 2001).

In this work, we characterize the UAS regions that are recognized by the FleQ/FleT complex. This study includes six out of the seven promoters known to be dependent upon FleQ/FleT. From deletion mapping, *in vivo* footprinting and *in silico* analysis, we propose a sequence motif that represents the binding site of this activating complex.

METHODS

Plasmids, bacterial strains and growth conditions. Plasmids and bacterial strains used in this work are listed in Table 1. *R. sphaeroides* cells were grown in Siström's minimal medium (Siström, 1962) at 30 °C, in the dark with shaking at 200 r.p.m. *Escherichia coli* was grown in LB medium at 37 °C. When required, antibiotics were added at the following concentrations: for *R. sphaeroides*, gentamicin (5 µg ml⁻¹), kanamycin (25 µg ml⁻¹) and spectinomycin (50 µg ml⁻¹); for *E. coli*, gentamicin (30 µg ml⁻¹), kanamycin (50 µg ml⁻¹), spectinomycin (100 µg ml⁻¹) and ampicillin (100 µg ml⁻¹).

Oligonucleotides. The oligonucleotides used in this work are listed in Supplementary Table S1.

Recombinant DNA techniques. Standard methods were used to obtain chromosomal or plasmid DNA (Ausubel *et al.*, 1987). To construct the plasmids used in this work, chromosomal or plasmid DNA was amplified with the appropriate oligonucleotides (Supplementary Table S1) using Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) according to the recommendations of the manufacturer. All the PCR products were sequenced after cloning. Standard methods were used for transformation, ligation and other related techniques.

Conjugation. Plasmid DNA was mobilized into *R. sphaeroides* by conjugation according to published procedures (Davis *et al.*, 1988).

Deletion mapping. The DNA fragments carrying the promoter sequence along with the adjacent sequence were obtained by PCR using the appropriate oligonucleotide (Supplementary Table S1). The boundaries of each construct were considered to be from the conserved C that is part of the GC dinucleotide within the σ^{54} consensus promoter. The DNA fragments were cloned in pTZ19R

Table 1. Strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant phenotype or genotype	Reference or source
<i>R. sphaeroides</i> strains		
WS8	Wild-type strain	Socket et al. (1990)
SP13	<i>fleQΔ::kan</i>	Poggio et al. (2005)
<i>E. coli</i> strains		
TOP10	Cloning strain	Invitrogen
S17	RP4-2 (Tc::Mu) (Kn::Tn7)	Simon et al. (1983)
Plasmids		
pRK415	Vector for cloning, Tc ^R	Keen et al. (1988)
pBBMCS53	Transcriptional ' <i>uidA</i> fusion vector	Girard et al. (2000)
pBflgBp	pBBMCS53 carrying <i>flgBp</i> from -378 to +225	Poggio et al. (2005)
pBflgGp	pBBMCS53 carrying <i>flgGp</i> from -347 to +274	Poggio et al. (2005)
pRKfliOp	pRK415 carrying <i>fliOp</i> from -224 to +179 fused to ' <i>uidA</i>	Poggio et al. (2002)
pBmotAp	pBBMCS carrying <i>motAp</i> from -422 to +297	Poggio et al. (2005)
pBflgAp	pBBMCS carrying <i>flgAp</i> from -288 to +270	Poggio et al. (2005)
pBflhAp	pBBMCS carrying <i>flhAp</i> from -349 to +209	Poggio et al. (2005)

(Pharmacia) and after sequencing they were cloned in the proper orientation into pBBMCS53, to create the corresponding transcriptional fusion. The fragments corresponding to the *fliOp* promoter were cloned in pRK415. In these constructs, the '*uidA* reporter gene had previously been fused to the promoter fragment in pTZ19R, and finally the fusion was transferred to pRK415 in the orientation opposite to that of the plasmid *lac* promoter.

β -Glucuronidase activity. β -Glucuronidase was determined from sonicated cell-free extracts using 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronide as substrate, and following a published protocol (Jefferson et al., 1986). 4-Methyl-umbelliferone (Sigma) was used as a standard. In this work, specific activities are expressed as nmol 4-methyl-umbelliferone formed min⁻¹ (mg protein)⁻¹.

***In vivo* footprinting.** These experiments followed a published protocol (Borowiec & Gralla, 1986), with slight modifications. Briefly, *R. sphaeroides* cultures carrying the indicated plasmid were grown to OD₆₀₀ 0.5 with shaking. Dimethyl sulfate (DMS) was added at a final concentration of 10 mM and incubation was continued for 5 min. After this time, the culture was rapidly chilled to 4 °C and cells were collected by centrifugation. The plasmid was isolated with a Plasmid Mini Kit (Qiagen), precipitated with ethanol and suspended in 1 M piperidine. After incubation at 90 °C for 30 min, the cleaved DNA was desalted by chromatography on Sephadex G-50. The oligonucleotides were 5'-labelled with T4 polynucleotide kinase and [γ -³²P]ATP [3000 Ci (111 000 Bq) mmol⁻¹]. These primers were used for an extension reaction of the cleaved products using 5 μ g DNA and *Taq* DNA polymerase in a final volume of 20 μ l. The reaction was carried out for 15 cycles and stopped by adding 5 μ l of loading buffer containing 8 M urea (Ausubel et al., 1987). A 5 μ l sample from this reaction was analysed on sequencing gels. The primers used to carry out these experiments are indicated with asterisks in Supplementary Table S1.

Computational search of motifs. The sequences in Supplementary Table S2 were used as input for the MEME algorithm (Bailey & Elkan, 1994). The best motif was transformed into a degenerated recognition sequence and together with the consensus σ^{54} degenerated promoter sequence were used as a motif for the DNA-pattern of the Regulatory Sequence Analysis tools algorithm. The used motif was G[CA][TC][CG]G[AT][GC][AG]N[GC]N[GT][CG]N[70,300]GGCAN[6]TTGC[AC], and the whole genome of *R. sphaeroides* was searched.

RESULTS

Deletion analysis of the regulatory regions of promoters dependent on FleT/FleQ

The flagellar promoters dependent on FleQ/FleT have been previously identified by an *in silico* analysis and confirmed by experimental evidence, and they are: *fliKp*, *fliOp*, *flgBp*, *flgGp*, *motAp*, and the divergently transcribed *flhAp* and *flgAp* promoters (Poggio et al., 2000, 2005). In this work, we identify the binding region of the FleQ/FleT complex for six of these promoters.

As reported previously (Poggio et al., 2005), DNA fragments that included approximately 300 bp upstream and downstream of each flagellar σ^{54} promoter were cloned upstream of the '*uidA* reporter gene and proved to be sufficient for β -glucuronidase expression in a FleQ/FleT-dependent fashion [Fig. 1, first construct of panels (a-d), and line 1 of Figs 2 and 3; see Methods for details].

Sequential deletions of the upstream regions of *fliOp*, *flgBp*, *flgGp* and *motAp* allowed us to determine that a region of between 50 and 100 bp is essential for the activity of these promoters Fig. 1(a, b, c and d). No activity was observed when these constructs were introduced into either SP13 (*fleQΔ::kan*) or SP12 (*fleTΔ::aadA*) mutant strains (data not shown), indicating that no spurious promoters were generated in the different constructs. From the results shown in Fig. 1 it can be inferred that the binding site of the FleQ/FleT complex must be located in a 97 bp fragment between positions -222 and -125 upstream of the GC dinucleotide for *flgBp* (compare Fig. 1a, lines 2 and 3); for *flgGp* in an 81 bp fragment between positions -180 and -99 bp (compare Fig. 1b, lines 2 and 3); for *motAp* the binding site must be in a fragment of 50 bp between positions -217 and -167 bp (compare Fig. 1c, lines 3 and 4); and for *fliOp* in a 64 bp fragment between positions -175 and -111 bp (compare Fig. 1d, lines 2 and 3). The

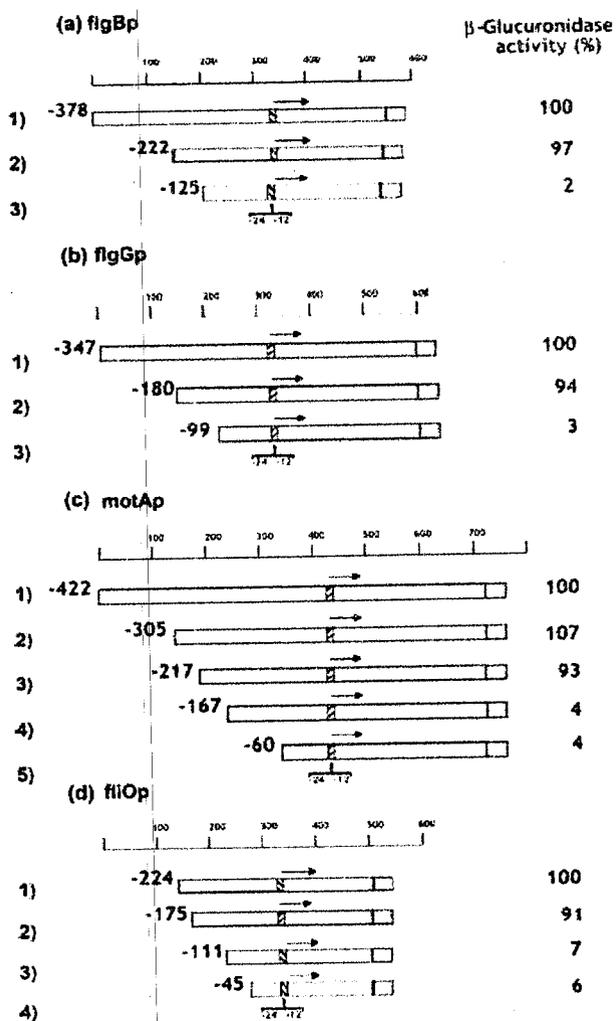


Fig. 1. Deletion analysis of the regulatory region of the flagellar class III σ^{54} -dependent promoters. Promoters (striped boxes) were cloned along with their regulatory region upstream of the reporter gene *uidA* (grey box). The scale at the top of each panel indicates the length in base pairs. The numbers to the left of each construct show the distance between the 5' end and the C of the conserved GC dinucleotide of the -12 box. Activities are expressed as percentages of the β -glucuronidase activity of the largest construct. The β -glucuronidase activities, expressed as nmol 4-methyl-umbelliferone formed min^{-1} (mg protein^{-1}), of the reference constructs were 261 905 for *flgBp*, 1 200 820 for *flgGp*, 1 961 538 for *motAp*, and 1 354 23 for *fliOp*. For each construct, the activity was measured at least three times independently, and the SD was less than 15%.

sequences of the fragments identified as containing an enhancer region can be found in Supplementary Table S2.

Localization of the UAS of the divergent promoters *flhAp*-*flgAp*

The divergent promoters *flhAp* and *flgAp* are separated by only 53 bp from the conserved GG dinucleotide of each

promoter. Given the reported location of previously characterized UASs, we envisioned that the UAS for *flhAp* and *flgAp* could be contiguous to the promoter, as has been reported for FleQ in *Pseudomonas aeruginosa* (Jyot *et al.*, 2002), or at the canonical 100 bp distance from each promoter, overlapping the coding sequence of the *flhA* and *flgA* operons. To test these possibilities a deletion analysis for each promoter region was carried out, as shown in Figs 2 and 3. Initially, a DNA fragment extending from -349 to +209 from *flhAp* was cloned upstream of the reporter gene *uidA*. The first deletion removed 202 bp from the 5' end of the original construct, causing a reduction of approximately 30% in the activity of the reporter gene (Fig. 2, compare lines 1 and 2). Surprisingly, all of the subsequent deletions of the upstream region that removed 264, 299 or 331 bp did not cause any further decrement in the observed activity (Fig. 2, lines 3, 4 and 5). It should be noted that the last deletion left only 18 bp upstream of the conserved GC dinucleotide. For the following deletions, fragments from the 3' end were removed using the original construct as a starting point. As shown in Fig. 2, the activity level did not change when the first 60 bp were removed (compare lines 1 and 6). However, an additional deletion of 69 bp reduced the β -glucuronidase activity to 53%, and when 57 bp were additionally deleted, 73% of the original activity was lost (Fig. 2, lines 7 and 8). To determine whether the remaining activity was dependent on the presence of the region upstream of the promoter, 279 bp were removed from the 5' end of the last construct. The resulting plasmid yielded only 6% of the activity of the full promoter (Fig. 2, line 9). As shown in Fig. 2, lines 3 and 4, deletion of this region by itself reduced the activity of *flhAp* by only 30%. Together, these results suggest that approximately 30% of the observed activity of this promoter depends on the sequences located upstream of *flhAp*, whereas 65–70% of the activity depends on the sequences located downstream.

A similar situation was found for the *flgAp* promoter, for which a reduction of no more than 35% in the β -glucuronidase activity was observed when 60, 130, 198 or 237 bp were deleted from the 5' end of an initial fragment that contained 288 and 270 bp upstream and downstream of the promoter, respectively (Fig. 3, lines 2–5). In contrast, a deletion that removed 53 bp from the 3' end caused a reduction of approximately 60% (Fig. 3, line 6). Further deletions of the 3'-end did not abolish the activity of the promoter completely, since approximately 20% residual activity could still be detected, even when only 23 bp were left downstream from the promoter (Fig. 3, line 8). This remaining activity was lost when 189 bp from the 5' end of the shorter 3' end deletion were removed (Fig. 3, line 9).

It should be noted that for *flgAp*, the promoter activity was reduced 57% when 53 bp were deleted from the 3' end of the original DNA fragment; an additional reduction (~20%) was observed if the next 78 bp were removed (Fig. 3, compare lines 6 and 7). A similar pattern was observed for *flhAp* (Fig. 2, compare lines 7 and 8). These

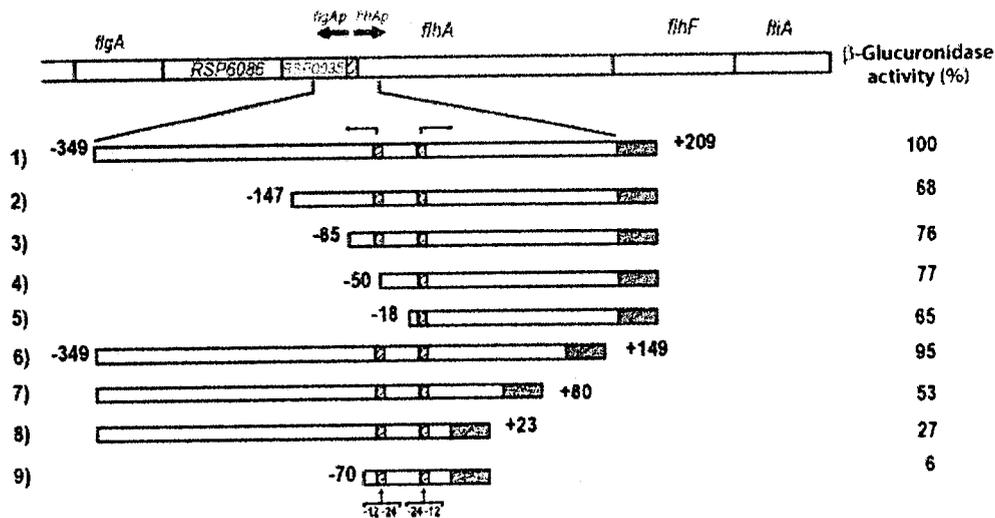


Fig. 2. Deletion analysis of the regulatory region of *flhAp*. The σ^{54} -dependent promoter *flhAp* was cloned along with its regulatory region upstream of the reporter gene '*uidA*' (grey box). The map at the top of the figure shows the general arrangement of the region, including the complete *flhA* operon, and some of the genes in the *flgA* operon. The numbers to the left of each construct show the distance between the 5' end and the C of the conserved GC dinucleotide of the -12 box of the *flhA* promoter. Striped boxes indicate the positions of the *flhA* and *flgA* promoters. Hypothetical genes belonging to the *flgA* operon are indicated by their locus tag number. Activities are expressed as percentages of the β -glucuronidase activity determined for the largest construct. The β -glucuronidase activity of this construct was 16 905 nmol 4-methyl-umbelliferone formed min^{-1} (mg protein) $^{-1}$. For each construct, the activity was determined at least three times independently, and the SD was less than 10%.

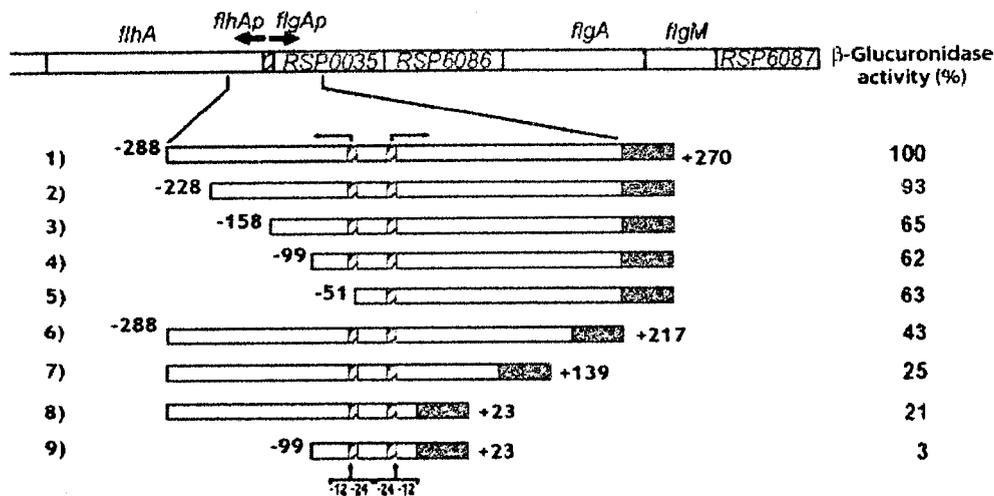


Fig. 3. Deletion analysis of the regulatory region of *flgAp*. The σ^{54} -dependent promoter *flgAp* was cloned along with its regulatory region upstream of the reporter gene '*uidA*' (grey box). The map at the top of the figure shows the general arrangement of the region, including the complete *flgA* operon and some of the genes in the *flhA* operon. The numbers to the left of each construct show the distance between the 5' end and the C of the conserved GC dinucleotide of the -12 box of the *flgA* promoter. Striped boxes indicate the positions of the *flgA* and *flhA* promoters. Hypothetical genes belonging to the *flgA* operon are indicated by their locus tag number. Activities are expressed as percentages of the β -glucuronidase activity determined for the largest construct. The β -glucuronidase activity for this construct was 20 970 nmol 4-methyl-umbelliferone formed min^{-1} (mg protein) $^{-1}$. For each construct, the activity was determined at least three times independently, and the SD was less than 12%.

results suggest that other binding sites of minor affinity are located in these regions that could be considered as an extended UAS. In agreement with this notion, it has been shown that several EBP binding sites are present in the regulatory region of some σ^{54} -dependent promoters; these multiple sites are required for efficient oligomerization of the EBP and in consequence for full promoter activity (for examples, see Atkinson *et al.*, 2002; Tucker *et al.*, 2006; D'Autreaux *et al.*, 2008).

In summary, our results indicate that approximately 30% of the activity observed for the *flhAp* and *flgAp* promoters depends on the UAS located upstream, while 65–70% of the activity depends on the UAS located downstream. Fig. 4 summarizes the position of the upstream and downstream UASs identified for these promoters. As can be observed, the main UAS region for each promoter is located downstream of the consensus promoter sequence and overlaps with the region responsible for 30% of the activity of the contralateral promoter, suggesting that the same UAS is able to activate both promoters.

To further characterize the activation dependency of the *flhA* and *flgA* promoters on the contralateral UAS, we tested whether the 30% activation given by these sites was affected when they are displaced to the opposite faces of the DNA. For this, we inserted 5 or 10 bp in the spacing region located between *flhAp* and *flgAp*. Since the main UASs of both promoters are located downstream, these insertions should not affect the activation of these promoters by their specific UASs; however, the 5 bp insertion should place each promoter and its downstream UAS on opposite faces of the DNA helix, disfavoured activation by the contralateral UAS. Finally, the insertion of 10 bp should restore the original topology of this region, and the activity of the *flhA* and *flgA* promoters should return to wild-type levels.

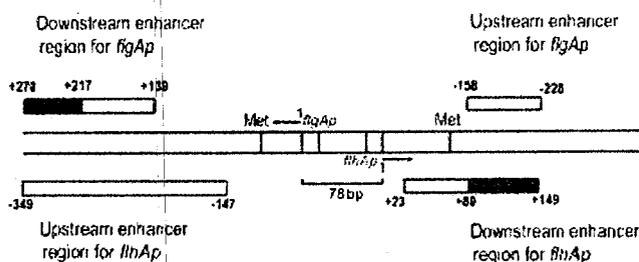


Fig. 4. Schematic representation of the FleQ/FleT binding sites in the *flhA-flgA* region. In the centre of the figure, the positions of the *flhAp* and *flgAp* promoters are shown as well as the translational start site for the first gene of each operon. Above and below this map the regulatory regions of the *flgAp* and *flhAp* promoters are indicated as follows: upstream enhancers (white boxes), downstream enhancers (black boxes) and extended downstream enhancer regions (black and grey boxes). The numbers indicate the position of each regulatory element with respect to the C of the conserved GC dinucleotide of the -12 box, defined as $+1$.

The DNA fragments carrying *flhAp*, *flhAp* + 5 bp and *flhAp* + 10 bp extend from -349 to $+209$ bp from the conserved dinucleotide GC of *flhAp*. The DNA fragments carrying *flgAp*, *flgAp* + 5 bp and *flgAp* + 10 bp extend from -288 to $+270$ from the corresponding GC dinucleotide of *flgAp*. All these fragments were cloned upstream of the reporter gene *uidA* and introduced into WS8 cells. A reduction in the amount of β -glucuronidase produced by *flhAp* + 5 bp and *flgAp* + 5 bp was observed (Table 2). In contrast, an activity level similar to that of the wild-type promoters was detected for the constructs carrying a 10 bp insertion (Table 2). These results suggest that the activation mediated by the contralateral UAS is sensitive to the relative position of the promoters on the DNA helix.

In vivo footprinting experiments

Given that previous attempts to determine the binding site of FleQ/FleT in the flagellar class III promoters *in vitro* were unsuccessful (Poggio *et al.*, 2005), we decided to carry out *in vivo* footprinting experiments. Plasmids carrying the complete *flgGp*, *motAp*, *fliOp* and *flgBp* promoters (line 1 of Fig. 1b, c, d and a, respectively) were introduced into wild-type WS8 and SP13 strains. SP13 carries a deletion of the *fleQ* gene and as a consequence the expression of *fleT* is practically abolished; therefore, no flagellar EBPs are present in this strain (Poggio *et al.*, 2005). Cultures of the strains carrying these plasmids were subject to a 5 min treatment with DMS, and the plasmids were then purified and cleaved. The methylation pattern was obtained with 15 cycles of primer extension. No protection could be observed from the plasmids containing the *fliOp* and *flgBp* regions. A slight protection at -182 bp upstream of the conserved dinucleotide GC of the *flgGp* promoter was detected in some experiments, but this protection was not always present and no other unambiguous protection was observed for this promoter (data not shown). In contrast, a clear protection was observed in the pattern of cleaved products corresponding to the *motAp* promoter region (Fig. 5). In this case, a comparison of the methylation

Table 2. β -Glucuronidase activities promoted by the wild-type and mutant versions of *flhAp* and *flgAp*

Plasmid	β -Glucuronidase activity (%)*
pBflhAp	100
pBflgAp	100
pBflhAp + 5	41
pBflgAp + 5	30
pBflhAp + 10	89
pBflgAp + 10	95

*Activities are expressed as percentages of the β -glucuronidase activity measured for the construct of the respective promoter without any additional nucleotides. The absolute values of these are indicated in the legends of Figs 2 and 3 for pBflhAp and pBflgAp, respectively.

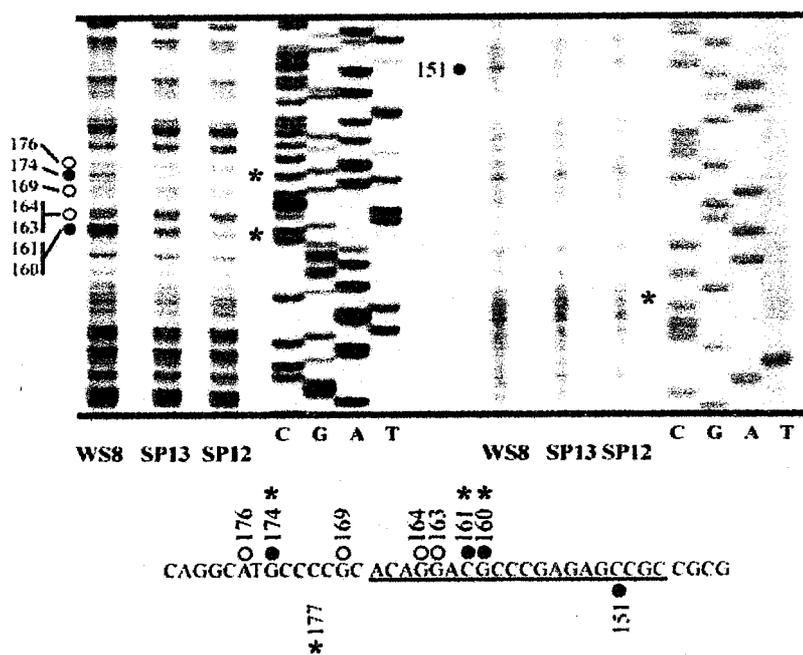


Fig. 5. *In vivo* DMS footprinting assay of *motAp*. The *in vivo* methylation pattern of the *motAp* regulatory region was obtained for WS8, SP13 and SP12 strains carrying pBmotAp, as described in Methods. Protected and hyperreactive positions in the WS8 strain are indicated by \circ and \bullet , respectively. Protected positions in the SP12 strain are indicated by asterisks. The sequence used as the reference for the top strand (left side of the figure) corresponds to the *flgG* regulatory region obtained with the *flgG* +274 primer. The sequence used as reference for the bottom strand (right side of the figure) corresponds to the *motA* regulatory region obtained with the *motA*10 -243 primer. In the lower part of the figure, the sequence of the protected region is shown (with the same symbols as above) together with the sequence corresponding to the motif identified by MEME analysis (underlined sequence, see below).

patterns of the plasmids isolated from the wild-type and the SP13 strain revealed several differences. In the protection corresponding to the top strand a diminished reactivity at positions -163, -164, -169 and -176, and an evident overreactivity of the bases at -160, -161 and -174, were observed. In the complementary strand a single overreactive base could be detected at position -151.

To further corroborate that the changes in the methylation pattern of *motAp* were due to the binding of the FleT/FleQ complex, we carried out the same experiments using a DMS-modified plasmid obtained from a *fleT* deletion mutant strain (SP12). As shown in Fig. 5, when the protection pattern of the plasmid obtained from the WS8 strain was compared with that of the plasmid obtained from SP12, the same DMS reactivity changes were detected to those observed when the WS8 protection pattern was compared with that of the SP13 strain. This suggested that the protection pattern observed in the WS8 strain is due to the binding of the FleQ/FleT complex. Interestingly, positions -160, -161 and -174 appeared to be protected positions when the protection pattern of the plasmid obtained from SP12 was compared with that obtained from the plasmids purified from the SP13 strain, indicating that FleQ can bind by itself to this region when FleT is not present. Further supporting this result, position -177 was protected in the bottom strand of the SP12 strain.

In silico analysis of the FleQ/FleT binding sites

To identify the binding sequence of the FleQ/FleT activator we carried out a MEME analysis (Bailey & Elkan, 1994) of the regions required for activation of the flagellar

promoters identified in this work. This analysis allowed us to identify a set of putative binding sites, from which the sequence logo (Crooks *et al.*, 2004; Schneider & Stephens, 1990) shown in Fig. 6 was generated. The fact that the *motAp* region that corresponds to this motif partially overlaps with the protected bases in the footprinting experiments (see Fig. 5) supports the functionality of this motif. The motif is present in five of the six UASs with a good probability value (see legend of Fig. 6); however, it was not possible to identify it in the putative UAS region of *flhAp*, presumably due to a higher degeneracy of the binding site in this particular UAS. This motif, together with the σ^{54} promoter consensus sequence, was used to search the *R. sphaeroides* chromosome using the algorithm DNA-pattern of the Regulatory Sequence Analysis tools (RSA) (Thomas-Chollier *et al.*, 2008). Besides the promoters used to generate the FleQ/FleT consensus binding



Fig. 6. Sequence logo of the binding site of FleQ/FleT. The sequences identified by the MEME program as FleQ/FleT binding sites present in the regions characterized in the deletion analysis were converted into a sequence logo using the WebLogo server at <http://weblogo.berkeley.edu/>. The *P* values of the identified sequences are: *flgB*, 1.2×10^{-09} ; *fliO*, 8.23×10^{-09} ; *flgG*, 4.33×10^{-08} ; *motA*, 1.7×10^{-06} ; and *flgA*, 5.24×10^{-06} .

sequence, from this analysis eight other regions were identified; even though they cannot be completely discarded, we considered five of them to be false positives, either because the promoter was too far from the translation start site or because the first gene downstream of the putative promoter was not the first gene of the operon. The remaining three regions were the *fliKp* promoter, which has been previously shown to be dependent on FleQ/FleT (Poggio *et al.*, 2000), the promoter region of RSP2773 (a putative peptidase of the M15-3 family) and the promoter region of RSP0038. Since the hypothetical gene RSP0038 is located in the same chromosomal region as the promoters analysed in this work, we decided to test whether this gene was part of the flagellar hierarchy. For this, a 585 bp DNA fragment containing the predicted RSP0038 σ^{54} -dependent promoter and 469 bp upstream of the conserved GC dinucleotide of the -12 box (the predicted enhancer is located 207 bp upstream of the promoter) was cloned upstream of the promoterless *uidA* gene. Activity levels of the β -glucuronidase enzyme produced from this construct were dependent on the presence of FleQ/FleT (data not shown). This result further supports the validity of the predicted binding site and allows us to include RSP0038 in the class III of the flagellar hierarchy of *R. sphaeroides*.

DISCUSSION

Activators of $E\sigma^{54}$ normally work in oligomeric complexes of a single protein. Until now, the HrpR/HrpS (Grimm *et al.*, 1995; Hutcheson *et al.*, 2001) and FleQ/FleT complexes are the only cases in which a hetero-oligomer is required for transcriptional activations. Besides the scarce knowledge available on this kind of σ^{54} activators, the identification of the binding site of the FleQ/FleT complex is of particular interest to understand the switch in affinity from type II to type III flagellar promoters shown by FleQ once it is in complex with the HTH-less σ^{54} activator FleT (Poggio *et al.*, 2005).

The deletion mapping carried out in this work indicates that the UAS regions of six out of the seven FleQ/FleT-dependent promoters identified so far in the genome of *R. sphaeroides* are found at sites distal to the promoter sequence. These UASs are located from 100 to 250 bp upstream or downstream of the conserved GC dinucleotide. Therefore, activation mediated by the hetero-oligomeric FleQ/FleT complex must occur using similar mechanisms to those of other well-characterized EBP proteins. In contrast, it has been reported that FleQ from *P. aeruginosa* is able to activate transcription from sites that are adjacent to the promoter sequence (Jyot *et al.*, 2002). Since FleQ from *P. aeruginosa* is highly similar to FleQ from *R. sphaeroides*, it appeared possible that these proteins shared this particular property. From our study, we conclude that this is not the case, and that at least in this regard the FleQ/FleT complex is similar to other members of the EBP family.

Previous *in vitro* attempts to determine the binding site of the FleQ/FleT complex to the class III flagellar promoters have been unsuccessful. In this work, using an *in vivo* approach, we were able to identify a DNA region that was protected from DMS modification, indicating that FleQ/FleT binds to this region. In accordance with the deletion mapping experiments, this protected region is within the minimal fragment required to activate the *motAp* promoter.

Surprisingly, when the protection pattern of the *motAp* enhancer region was tested in a *fleT* mutant strain, changes in the reactivity of the same positions detected in the WS8 strain were observed, and in most cases these changes were a switch from over-reactivity in the WS8 to protection in the SP12 strain. At the same time, the protection of some positions observed in the WS8 were lost in the SP12 strain. This indicates that although FleQ seems to be able to bind by itself to this region, this binding is different from that of the FleQ/FleT complex and does not promote transcriptional activation, since, as has been shown previously, the *motAp* promoter is not active in the SP12 strain (Poggio *et al.*, 2005). Further work will be required to elucidate how the binding of FleT to FleQ changes its DNA binding properties and how these changes are related to the transcriptional activation of the flagellar class III promoters.

Since *in vitro* evidence showing that FleQ/FleT binds to the enhancer region of the flagellar promoters is still lacking, the possibility remains that *in vivo* the FleQ/FleT complex activates the expression of another EBP that is the real activator of the flagellar class III promoters. However, it has been shown that *R. sphaeroides* has only five EBPs that show a well-conserved GAFTGA signature, which is required to productively interact with RpoN. The role of three of them has already been reported, i.e. FleQ, FleT and NifA (the regulator of the nitrogen fixation genes). The two remaining EBP proteins are encoded by the RSP1590 and RSP2800 genes; mutants of these genes do not show any motility defect (our unpublished results).

To identify the relevant bases for binding of the FleQ/FleT complex, a bioinformatic approach was taken. The regions identified in the deletion analysis of the *flgGp*, *flgBp*, *fliOp*, *flgAp* and *motAp* promoters were used as input for the MEME algorithm. The motif obtained from this analysis overlaps with the DMS-protected region observed in the *motAp* promoter. To further test the validity of this motif, we searched the complete *R. sphaeroides* genome for its presence in the vicinity of a σ^{54} promoter sequence. This strategy allowed the identification of all the previously characterized class III flagellar promoters (with the exception of the weak *flhAp*) and of the new FleQ/FleT-dependent gene RSP0038. These results together suggest that this motif represents the binding site of the FleQ/FleT flagellar activator. Since the search in the complete genome for the proposed motif did not identify the class II flagellar promoters that are dependent on FleQ alone (i.e. *fleTp*), it may be inferred that the FleQ recognition site must differ substantially from the one recognized by the FleQ/FleT

complex. Further characterization of the class II and class III enhancer regions is necessary to understand the specificity switch of the FleQ EBP mediated by the interaction with FleT.

In *R. sphaeroides*, the intercistronic region between the divergently transcribed promoters *flhAp* and *flgAp* is only 53 bp long; from this fact we hypothesized that the FleQ/FleT complex could promote activation when bound to sites lying close to the promoter, or from sites located inside the coding region of the gene located upstream. Instead, activation of these promoters depends on a region located 150–200 bp downstream from the promoter sequence. Interestingly we observed that the UAS located upstream was responsible for 25–30% of the full activity level detected for both promoters. Our current model to explain how activation in these promoters occurs involves a biased random contact of the FleQ/FleT complex bound to the enhancer regions with $E\sigma^{54}$ bound to either promoter. The molecular bias mechanism could involve a preferential bending conformation of the DNA and/or induced bending by some other protein (e.g. integration host factor; IHF). The physiological relevance of this 30% activation remains to be tested in the chromosomal context. Nevertheless, since the sigma factor FliA (required for the expression of the flagellar class IV operons) is encoded in the *flgA* operon and its anti-sigma factor, FlgM, is encoded in the *flhA* operon, the shared activity of these UASs could be required to fine-tune the expression of these two operons. The release of FliA from the inhibitory action of FlgM is one of the most important check-points during flagella formation, and it occurs when FlgM is exported out of the cell once the hook-basal body structure is completed. Hence, it is tempting to speculate that cross-regulation mediated by these UASs helps keep these two proteins in equilibrium.

So far, only two divergently transcribed σ^{54} -dependent promoters have been characterized (Charlton *et al.*, 1993; Lutz *et al.*, 1990; Hopper *et al.*, 1994). In *Klebsiella pneumoniae*, it has been reported that the IHF protein avoids activation of the *niff* promoter by NifA when it is bound to the UAS responsible for activating the divergently transcribed promoter *niffH*. In this case, both UASs are located upstream from the promoter sequences *niffp* and *niffHp* (Charlton *et al.*, 1993). In the case of the *hyc* and *hyp* operons of *E. coli*, the distance between the dinucleotide GC of the promoter sequences *hycAp* and *hypAp* is only 120 bp. This region contains an IHF binding site and the UAS that allows activation of *hycAp*, whereas the UAS responsible for the activation of *hypAp* is found between *hycA* and the following gene, *hycB* (~700 bp upstream of *hypAp*). It has been shown that *hycAp* decreases its expression in a strain deficient in IHF, whereas *hypAp* increases its activity. Therefore, it has been suggested that transcription from the *hycAp* promoter negatively affects activation of *hypAp* (Hopper *et al.*, 1994). These examples show that expression from divergent σ^{54} promoters can be affected reciprocally, although other factors such as IHF

can modify the final output. So far, the role of IHF and other similar proteins in the control of σ^{54} -dependent transcription in *R. sphaeroides* remains to be evaluated.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Teresa Ballado and Javier de la Mora for technical assistance, Victor Ramirez Cabrera (Inst. Inv. Biomédicas, UNAM) for his data related to the RSP0038 promoter, and the Instituto de Fisiología Celular Molecular Biology unit for DNA sequencing. This work was partially supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (47172/A-1) and Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)/Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) IN213408. J. S.-P. was supported by a fellowship from DGAPA/UNAM.

REFERENCES

- Atkinson, M. R., Pattaramanon, N. & Ninfa, A. J. (2002). Governor of the *glnAp2* promoter of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **46**, 1247–1257.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley Interscience.
- Bailey, T. L. & Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **2**, 28–36.
- Barrios, H., Valderrama, B. & Morett, E. (1999). Compilation and analysis of σ^{54} -dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res* **27**, 4305–4313.
- Beck, L. L., Smith, T. G. & Hoover, T. R. (2007). Look, no hands! Unconventional transcriptional activators in bacteria. *Trends Microbiol* **15**, 530–537.
- Beynon, J., Cannon, M., Buchanan-Wollaston, V. & Cannon, F. (1983). The *nif* promoters of *Klebsiella pneumoniae* have a characteristic primary structure. *Cell* **34**, 665–671.
- Borowiec, J. A. & Gralla, J. D. (1986). High-resolution analysis of lac transcription complexes inside cells. *Biochemistry* **25**, 5051–5057.
- Brahmachary, P., Dashti, M. G., Olson, J. W. & Hoover, T. R. (2004). *Helicobacter pylori* FlgR is an enhancer-independent activator of σ^{54} -RNA polymerase holoenzyme. *J Bacteriol* **186**, 4535–4542.
- Buck, M., Miller, S., Drummond, M. & Dixon, R. (1986). Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. *Nature* **320**, 374–378.
- Buck, M., Gallegos, M. T., Studholme, D. J., Guo, Y. & Gralla, J. D. (2000). The bacterial enhancer-dependent σ^{54} (σ^N) transcription factor. *J Bacteriol* **182**, 4129–4136.
- Burrows, P. C., Severinov, K., Buck, M. & Wigneshweraraj, S. R. (2004). Reorganisation of an RNA polymerase–promoter DNA complex for DNA melting. *EMBO J* **23**, 4253–4263.
- Cannon, W. V., Gallegos, M. T. & Buck, M. (2000). Isomerization of a binary sigma–promoter DNA complex by transcription activators. *Nat Struct Biol* **7**, 594–601.
- Chaney, M., Grande, R., Wigneshweraraj, S. R., Cannon, W., Casaz, P., Gallegos, M. T., Schumacher, J., Jones, S., Elderkin, S. & other authors (2001). Binding of transcriptional activators to sigma 54 in the presence of the transition state analog ADP-aluminum fluoride: insights into activator mechanochemical action. *Genes Dev* **15**, 2282–2294.

- Charlton, W., Cannon, W. & Buck, M. (1993). The *Klebsiella pneumoniae* *nifH* promoter: analysis of promoter elements regulating activation by the *NifA* promoter. *Mol Microbiol* 7, 1007–1021.
- Chen, B., Sysoeva, T. A., Chowdhury, S. & Nixon, B. T. (2008). Regulation and action of the bacterial enhancer-binding protein AAA⁺ domains. *Biochem Soc Trans* 36, 89–93.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M. & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 14, 1188–1190.
- D'Autreaux, B., Tucker, N., Spiro, S. & Dixon, R. (2008). Characterization of the nitric oxide-reactive transcriptional activator NorR. *Methods Enzymol* 437, 235–251.
- Davis, J., Donohue, T. J. & Kaplan, S. (1988). Construction, characterization, and complementation of a Puf⁻ mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 170, 320–329.
- De Carlo, S., Chen, B., Hoover, T. R., Kondrashkina, E., Nogales, E. & Nixon, B. T. (2006). The structural basis for regulated assembly and function of the transcriptional activator NtrC. *Genes Dev* 20, 1485–1495.
- Doucleff, M., Chen, B., Maris, A. E., Wemmer, D. E., Kondrashkina, E. & Nixon, B. T. (2005a). Negative regulation of AAA⁺ ATPase assembly by two component receiver domains: a transcription activation mechanism that is conserved in mesophilic and extremely hyperthermophilic bacteria. *J Mol Biol* 353, 242–255.
- Doucleff, M., Malak, L. T., Pelton, J. G. & Wemmer, D. E. (2005b). The C-terminal RpoN domain of σ^{54} forms an unpredicted helix–turn–helix motif similar to domains of σ^{70} . *J Biol Chem* 280, 41530–41536.
- Elderkin, S., Bordes, P., Jones, S., Rappas, M. & Buck, M. (2005). Molecular determinants for PspA-mediated repression of the AAA transcriptional activator PspF. *J Bacteriol* 187, 3238–3248.
- Girard, L., Brom, S., Davalos, A., Lopez, O., Soberon, M. & Romero, D. (2000). Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL*–*fixK* cascade. *Mol Plant Microbe Interact* 13, 1283–1292.
- Grimm, C., Aufsatz, W. & Panopoulos, N. J. (1995). The *hrpRS* locus of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* constitutes a complex regulatory unit. *Mol Microbiol* 15, 155–165.
- Guo, Y., Lew, C. M. & Gralla, J. D. (2000). Promoter opening by σ^{54} and σ^{70} RNA polymerases: σ factor-directed alterations in the mechanism and tightness of control. *Genes Dev* 14, 2242–2255.
- Hankamer, B. D., Elderkin, S. L., Buck, M. & Nield, J. (2004). Organization of the AAA⁺ adaptor protein PspA is an oligomeric ring. *J Biol Chem* 279, 8862–8866.
- Hoover, T. R., Santero, E., Porter, S. & Kustu, S. (1990). The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NIFA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell* 63, 11–22.
- Hopper, S., Babst, M., Schlensog, V., Fischer, H. M., Hennecke, H. & Bock, A. (1994). Regulated expression *in vitro* of genes coding for formate hydrogenlyase components of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 269, 19597–19604.
- Hutcheson, S. W., Bretz, J., Sussan, T., Jin, S. & Pak, K. (2001). Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate *hrp*-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. *J Bacteriol* 183, 5589–5598.
- Jefferson, R. A., Burgess, S. M. & Hirsh, D. (1986). β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 8447–8451.
- Jovanovic, G., Weiner, L. & Model, P. (1996). Identification, nucleotide sequence, and characterization of PspF, the transcriptional activator of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. *J Bacteriol* 178, 1936–1945.
- 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.
- Keen, N. T., Tamaki, S., Kobayashi, D. & Trollinger, D. (1988). Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* 70, 191–197.
- Lee, J. H., Scholl, D., Nixon, B. T. & Hoover, T. R. (1994). Constitutive ATP hydrolysis and transcription activation by a stable, truncated form of *Rhizobium meliloti* DCTD, a σ^{54} -dependent transcriptional activator. *J Biol Chem* 269, 20401–20409.
- Lee, S. Y., De La, T. A., Yan, D., Kustu, S., Nixon, B. T. & Wemmer, D. E. (2003). Regulation of the transcriptional activator NtrC1: structural studies of the regulatory and AAA⁺ ATPase domains. *Genes Dev* 17, 2552–2563.
- Lutz, S., Bohm, R., Beier, A. & Bock, A. (1990). Characterization of divergent NtrA-dependent promoters in the anaerobically expressed gene cluster coding for hydrogenase 3 components of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 4, 13–20.
- Merrick, M. J. (1993). In a class of its own – the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σ^N). *Mol Microbiol* 10, 903–909.
- Morett, E. & Segovia, L. (1993). The σ^{54} bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J Bacteriol* 175, 6067–6074.
- Morett, E., Cannon, W. & Buck, M. (1988). The DNA-binding domain of the transcriptional activator protein NifA resides in its carboxy terminus, recognises the upstream activator sequences of *nif* promoters and can be separated from the positive control function of NifA. *Nucleic Acids Res* 16, 11469–11488.
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L. & Koonin, E. V. (1999). AAA⁺: a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* 9, 27–43.
- Ninfa, A. J., Reitzer, L. J. & Magasanik, B. (1987). Initiation of transcription at the bacterial *glmAp2* promoter by purified *E. coli* components is facilitated by enhancers. *Cell* 50, 1039–1046.
- Poggio, S., Aguilar, C., Osorio, A., Gonzalez-Pedrajo, B., Dreyfus, G. & Camarena, L. (2000). σ^{54} Promoters control expression of genes encoding the hook and basal body complex in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 182, 5787–5792.
- Poggio, S., Osorio, A., Dreyfus, G. & Camarena, L. (2002). The four different σ^{54} factors of *Rhodobacter sphaeroides* are not functionally interchangeable. *Mol Microbiol* 46, 75–85.
- Poggio, S., Osorio, A., Dreyfus, G. & Camarena, L. (2005). The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins. *Mol Microbiol* 58, 969–983.
- Poggio, S., Osorio, A., Dreyfus, G. & Camarena, L. (2006). Transcriptional specificity of RpoN1 and RpoN2 involves differential recognition of the promoter sequences and specific interaction with the cognate activator proteins. *J Biol Chem* 281, 27205–27215.
- Preston, G., Deng, W. L., Huang, H. C. & Collmer, A. (1998). Negative regulation of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* by HrpV. *J Bacteriol* 180, 4532–4537.
- Rappas, M., Schumacher, J., Beuron, F., Niwa, H., Bordes, P., Wigneshweraraj, S., Keetch, C. A., Robinson, C. V., Buck, M. & Zhang, X. (2005). Structural insights into the activity of enhancer-binding proteins. *Science* 307, 1972–1975.
- Rappas, M., Bose, D. & Zhang, X. (2007). Bacterial enhancer-binding proteins: unlocking σ^{54} -dependent gene transcription. *Curr Opin Struct Biol* 17, 110–116.

- Reitzer, L. J. & Magasanik, B. (1986). Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. *Cell* 45, 785–792.
- Rippe, K., Mucke, N. & Schulz, A. (1998). Association states of the transcription activator protein NtrC from *E. coli* determined by analytical ultracentrifugation. *J Mol Biol* 278, 915–933.
- Sallai, L. & Tucker, P. A. (2005). Crystal structure of the central and C-terminal domain of the σ^{54} -activator ZraR. *J Struct Biol* 151, 160–170.
- Schneider, T. D. & Stephens, R. M. (1990). Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res* 18, 6097–6100.
- Schumacher, J., Joly, N., Rappas, M., Zhang, X. & Buck, M. (2006). Structures and organisation of AAA+ enhancer binding proteins in transcriptional activation. *J Struct Biol* 156, 190–199.
- Simon, R., Prier, U. & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* 1, 784–791.
- Sistrom, W. R. (1962). The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas spheroides*. *J Gen Microbiol* 28, 607–616.
- Sockett, R. E., Foster, J. C. A. & Armitage, J. P. (1990). Molecular biology of the *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. *FEMS Symp* 53, 473–479.
- Studholme, D. J. & Dixon, R. (2003). Domain architectures of σ^{54} -dependent transcriptional activators. *J Bacteriol* 185, 1757–1767.
- Su, W., Porter, S., Kustu, S. & Echols, H. (1990). DNA-looping and enhancer activity: association between DNA-bound NtrC activator and RNA polymerase at the bacterial *glnA* promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5504–5508.
- Thomas-Chollier, M., Sand, O., Turatsinze, J. V., Janky, R., Defrance, M., Vervisch, E., Brohee, S. & van Helden, J. (2008). RSAT: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* 36, W119–W127.
- Tucker, N. P., D'Autreaux, B., Spiro, S. & Dixon, R. (2006). Mechanism of transcriptional regulation by the *Escherichia coli* nitric oxide sensor NorR. *Biochem Soc Trans* 34, 191–194.
- Wedel, A., Weiss, D. S., Popham, D., Droge, P. & Kustu, S. (1990). A bacterial enhancer functions to tether a transcriptional activator near a promoter. *Science* 248, 486–490.
- Wigneshweraraj, S. R., Burrows, P. C., Bordes, P., Schumacher, J., Rappas, M., Finn, R. D., Cannon, W. V., Zhang, X. & Buck, M. (2005). The second paradigm for activation of transcription. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 79, 339–369.
- Wyman, C., Rombel, I., North, A. K., Bustamante, C. & Kustu, S. (1997). Unusual oligomerization required for activity of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. *Science* 275, 1658–1661.
- Xu, H., Gu, B., Nixon, B. T. & Hoover, T. R. (2004). Purification and characterization of the AAA+ domain of *Sinorhizobium meliloti* DctD, a σ^{54} -dependent transcriptional activator. *J Bacteriol* 186, 3499–3507.
- Zhang, X., Chaney, M., Wigneshweraraj, S. R., Schumacher, J., Bordes, P., Cannon, W. & Buck, M. (2002). Mechanochemical ATPases and transcriptional activation. *Mol Microbiol* 45, 895–903.

Edited by: J. G. Shaw