



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

ANÁLISIS FUNCIONAL DEL OPERÓN 1 QUIMIOTÁCTICO DE *RHODOBACTER*
SPHAEROIDES

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
ANA ELISA MARTÍNEZ DEL CAMPO

DIRECTOR DE TESIS
DR. GEORGES DREYFUS CORTÉS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
COMITÉ TUTOR
DRA. LAURA CAMARENA MEJÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. DIMITRIS GEORGELLIS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO, D. F. MARZO 2013

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Georges Dreyfus Cortés en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a los miembros de mi Comité Tutor los doctores: Georges Dreyfus Cortés, Laura Camarena Mejía y Dimitris Georgellis, por los consejos y la asesoría presentada a lo largo de este proyecto.

Agradezco la asesoría técnica de la Q.F.B. Teresa Ballado Nava, además de su valiosa participación en el presente trabajo. Al Dr. Francisco Javier de la Mora por el apoyo técnico otorgado durante la elaboración de este trabajo.

A los miembros de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por su ayuda con la secuenciación de ADN utilizados en esta tesis.

Agradezco a los miembros del jurado por la revisión de esta tesis, los doctores: Miguel Ángel Cevallos Gaos, Georges Dreyfus Cortés, Lorenzo Segovia Forcella, Soledad Funes Argüello y Sebastián Poggio Ghilarducci.

Al CONACyT por otorgarme una beca para realizar mis estudios de doctorado (No. de becario 21775).

Este trabajo fue apoyado por el CONACyT con el donativo 106081 y por la DGAPA con el donativo del PAPIIT IN206811.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
El flagelo bacteriano	5
El motor flagelar	11
Patrones de flagelación	13
Patrón de nado	14
Comportamiento quimiotáctico	17
Componentes principales de la señalización quimiotáctica	19
Complejos quimiotácticos	26
Señalización quimiotáctica en <i>E. coli</i>	27
Mecanismo de “switching”	29
Quimiotaxis en <i>Bacillus subtilis</i>	31
ANTECEDENTES PARTICULARES	33
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> como modelo de estudio	33
El flagelo de <i>R. sphaeroides</i> o el sistema flagelar 1 (Fla1)	34
Quimiotaxis en <i>R. sphaeroides</i>	36
Descubrimiento de un segundo sistema flagelar 2 en <i>R. sphaeroides</i>	42
Quimiotaxis y el flagelo 2	43
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	45
HIPÓTESIS	47
OBJETIVOS	48
MATERIALES Y MÉTODOS	49
RESULTADOS	60
Sesgo rotacional del sistema flagelar 2 de <i>R. sphaeroides</i>	60
Fuente de energía del motor flagelar 2	62
Aislamiento y caracterización de las mutantes del <i>cheOp1</i>	63
Ensayos de complementación	65
Ensayos de nado en medio líquido	65
DISCUSIÓN	71
Rotación unidireccional del flagelo 2	71
La fuerza protón motriz impulsa al flagelo 2	73
Comportamiento de nado de la cepa AM1	73
El operón quimiotáctico 1 regula el nado del flagelo 2	74
Modelo de la vía de señalización quimiotáctica del flagelo 2 de <i>R. sphaeroides</i>	79
Origen del operón quimiotáctico 1 de <i>R. sphaeroides</i>	80
CONCLUSIONES	81
PERSPECTIVAS	82
REFERENCIAS	83
ANEXO	99

RESUMEN

Rhodobacter sphaeroides es una bacteria púrpura no sulfurosa que pertenece al grupo de las α -proteobacterias. Su genoma contiene dos grupos de genes que codifican para dos sistemas flagelares distintos. Los genes del primer grupo se expresan constitutivamente bajo condiciones de laboratorio y se requieren para la síntesis de un flagelo subpolar (Fla1); este flagelo es responsable del nado de la cepa silvestre WS8N. Los genes del segundo conjunto de genes flagelares no se expresan en esta cepa; sin embargo, se pueden aislar cepas que sí expresan dichos genes y cuando lo hacen la bacteria sintetiza varios flagelos de localización polar (Fla2).

Además de poseer dos sistemas flagelares *R. sphaeroides* presenta un sistema quimiotáctico complejo, ya que posee múltiples homólogos de las proteínas quimiotácticas: cuatro CheA (cinasa), cuatro CheW (proteína adaptadora), seis CheY (regulador de respuesta), dos CheB (metilesterasa), y tres CheR (metiltransferasa). Los genes que codifican para estas proteínas están localizados en tres *loci*: *cheOp1*, *cheOp2* y *cheOp3*; de éstos sólo *cheOp2* y *cheOp3* son esenciales para la respuesta quimiotáctica del sistema Fla1. De manera contrastante, los reguladores de respuesta CheY1, CheY2 y CheY5, los cuales se localizan en *cheOp1*, se necesitan para el control quimiotáctico del sistema Fla2. Estos descubrimientos sugieren que las proteínas codificadas en el *cheOp1* pueden estar involucradas en el control quimiotáctico del flagelo 2. Para poder comprobar esta hipótesis se aislaron mutantes por interrupción de los genes localizados en este *locus* en dos fondos genéticos diferentes: *fla1⁺fla2⁻* y *fla1⁻fla2⁺*. Se analizó el comportamiento de nado de todas las mutantes por medio de cajas de nado en medio semi-sólido y del nado libre en medio líquido. La evidencia experimental muestra que las mutantes en el fondo genético *fla1⁺fla2⁻* tienen el mismo fenotipo que la cepa silvestre, mientras que las mutantes del fondo genético *fla1⁻fla2⁺* presentan un fenotipo no quimiotáctico. En este trabajo demostramos que, cuando *R. sphaeroides* nada con el sistema flagelar 2 el *cheOp1* controla su comportamiento quimiotáctico, lo que sugiere que en este *locus* se codifican los componentes que forman la vía de señalización quimiotáctica del sistema flagelar 2.

ABSTRACT

Rhodobacter sphaeroides is a purple non-sulfur bacterium that belongs to the α -subgroup of proteobacteria. *R. sphaeroides* genome encodes two flagellar gene clusters. The genes that belong to the first cluster are expressed constitutively under laboratory conditions and are required for the synthesis of the well-characterized single sub-polar flagellum (Fla1); which allows the swimming of the WS8N wild-type strain. The genes of the second flagellar cluster are not expressed in this strain, however strains that express it can be isolated. When these genes are expressed, bacteria assemble polar flagella that are used for swimming (Fla2).

In addition to having two flagellar systems, *R. sphaeroides* possess multiple chemotactic protein homologues: four CheA (kinase), four CheW (adaptor protein), six CheY (response regulator), two CheB (methyl-esterase) and three CheR (methyltransferase), which are encoded in three *loci*: *cheOp1*, *cheOp2* and *cheOp3*. Only *cheOp2* and *cheOp3* are essential when the cell is swimming with the Fla1 flagellum. By contrast CheY1, CheY2 and CheY5, encoded in *cheOp1*, are required for the chemotactic control of the Fla2 flagellum. This evidence suggests that *cheOp1* could be involved in the chemotactic control of the flagellar system 2. To test this hypothesis, we proceeded to interrupt each gene within this locus in two different genetic backgrounds: *fla1⁺fla2⁻* and *fla1⁻fla2⁺*. We analyzed the phenotype of all the mutants by soft-agar motility assays and free-swimming behavior in liquid media. Mutants in the *fla1⁺fla2⁻* genetic background have the same phenotype as the wild-type strain, while the same mutants in a *fla1⁻fla2⁺* background show a non-chemotactic phenotype. In this work, we demonstrate that when *R. sphaeroides* swims with Fla2 flagella *cheOp1* controls its chemotactic behavior, which suggests that the proteins encoded in this *locus* constitute its signaling pathway.

INTRODUCCIÓN

Frecuentemente las bacterias se consideran formas de vida relativamente simples, sin embargo, son organismos sofisticados y muy adaptables. Habitan ambientes en los cuales pueden variar las condiciones del medio rápida e inesperadamente, tales como la luz, el pH, la disponibilidad de nutrientes, la osmolaridad, la temperatura y los niveles de toxinas. Para poder sobrevivir, las bacterias deben de ser capaces de detectar, integrar y responder adecuadamente a estos cambios. Por ello existen diversos mecanismos que les permiten regular su desarrollo, su estructura y fisiología para ajustar su crecimiento ante los estímulos ambientales. Esto, aunando a una gran versatilidad metabólica, es lo que les ha permitido colonizar los más diversos hábitats; como el rumen de diferentes mamíferos herbívoros, los manantiales de aguas calientes y ácidas, las ventilas hidrotermales en los océanos, las raíces de las leguminosas, la mucosa gástrica de animales, e inclusive desechos radioactivos. Es debido a esta amplia distribución por lo que se les considera seres cosmopolitas.

Uno de los mecanismos que le confiere a muchas especies bacterianas una ventaja adaptativa importante, es la habilidad de migrar hacia ambientes más favorables o alejarse de ambientes nocivos. Este movimiento dirigido se conoce como *taxis*. Existen diferentes tipos de *taxis*, dentro de los que se encuentran: la *fitotaxis*, la tendencia a moverse hacia o lejos de la luz; la *aerotaxis*, la habilidad de desplazarse hacia o lejos del oxígeno; la *osmotaxis*, la capacidad de trasladarse hacia diferentes condiciones de osmolaridad; la *magnetotaxis*, la habilidad de orientarse de acuerdo al campo magnético de la Tierra; y la *quimiotaxis*, el movimiento activo hacia un químico deseado (atrayente) o de alejarse de un químico nocivo (repelente). Este último, es uno de los comportamientos biológicos más estudiados y mejor entendidos. La quimiotaxis requiere de la detección de estímulos por medio de receptores, un sistema de transducción de señales y finalmente un mecanismo de desplazamiento, como el nado.

El nado bacteriano es un tipo de motilidad que involucra una estructura especializada llamada flagelo (**Figura 1**). El flagelo es un organelo locomotor que le permite a las bacterias desplazarse en medios líquidos por medio de la rotación de un

largo filamento helicoidal, el cual produce una fuerza que impulsa el cuerpo de la célula hacia adelante (Berg y Anderson, 1973). La vía de señalización quimiotáctica monitorea constantemente el medio y transduce los estímulos ambientales para finalmente controlar la rotación flagelar.

Los sistemas flagelares mejor estudiados pertenecen a las bacterias entéricas *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, es por ésto que representan el paradigma del flagelo bacteriano. Por esta razón, los temas que se revisarán a lo largo de la introducción están basados principalmente en la información que se ha obtenido de estos microorganismos.

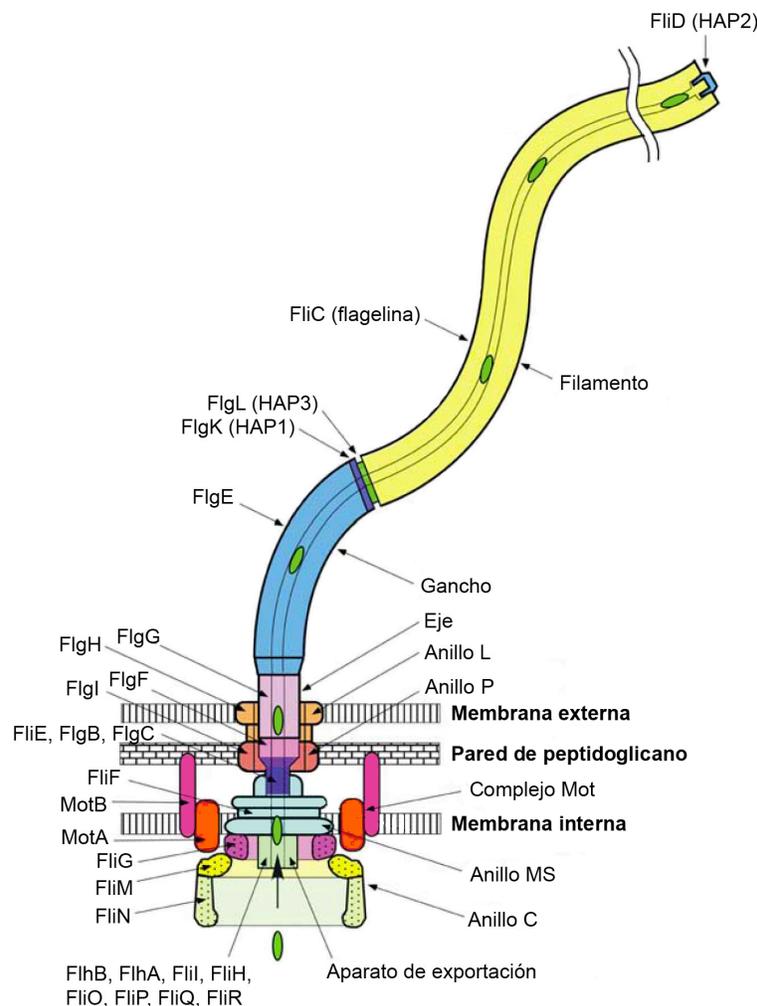


Figura 1. Representación esquemática del flagelo bacteriano. De lado derecho se señala el nombre de cada estructura flagelar y de lado izquierdo el nombre de la proteína que lo compone. Ver más detalles en el texto. Modificado de Yonekura *et al.*, 2002.

El flagelo bacteriano

El flagelo es una estructura compleja constituida por más de veinte proteínas diferentes. Generalmente, se divide en tres partes principales: filamento, gancho y cuerpo basal (**Figura 1**). Tanto el filamento como el gancho se localizan fuera de la célula, mientras que el cuerpo basal se halla embebido en la superficie celular.

Filamento

Es el componente del flagelo que realiza el trabajo hidrodinámico sobre el medio, y por lo tanto quién propulsa a la célula. Es una estructura cilíndrica larga (5-15 μm) y delgada (20 nm) de forma helicoidal que cuando rota funciona como la propela de un barco o como tornillo de Arquímedes. El filamento está conformado por hasta 30,000 monómeros de la proteína FliC o flagelina, siendo el componente más abundante del flagelo ya que comprende más del 99% de su longitud.

El filamento está organizado en una hélice conformada por 11 subunidades de flagelina por cada dos vueltas (O'Brien y Bennett, 1972), ver **Figura 2A**. También puede describirse como una estructura tubular compuesta por 11 protofilamentos empacados longitudinalmente en un arreglo helicoidal de subunidades de flagelina (O'Brien y Bennett, 1972). La estructura del filamento puede adoptar diferentes formas helicoidales, fenómeno conocido como polimorfismo (Asakura, 1970). Existen dos tipos de filamentos rectos con diferentes simetrías helicoidales; en el tipo L ("*left*") todos los protofilamentos están inclinados hacia izquierda y en el tipo R ("*right*") todos los protofilamentos están inclinados hacia la derecha (Kamiya *et al.*, 1979), ver **Figura 2B**. Si alguno de los 11 protofilamentos está en estado L y otros en estado R, se logra alcanzar curvatura que en conjunto con la inclinación de los protofilamentos dan lugar a formas superenrolladas (Caldine, 1978). Cuando la mayoría de los protofilamentos están en estado L se forma una hélice izquierda. De igual forma, cuando aumenta el número de protofilamentos en estado R se crea una hélice derecha (**Figura 2B**).

La forma normal del filamento de *E. coli* y *S. enterica* es una hélice izquierda que se usa para la propulsión. Como se describirá más adelante, los eventos moleculares detrás del patrón de nado de estas bacterias involucra transiciones entre diferentes estados de superenrollamiento (Macnab y Ornston, 1977, Turner *et al.*, 2000). Sin

embargo, también se pueden inducir las transiciones polimórficas con cambios en el pH, la fuerza iónica, el estrés mecánico y la presencia de ciertas mutaciones (Kamiya y Asakura, 1976, Martinez *et al.*, 1968, Hotani, 1982).

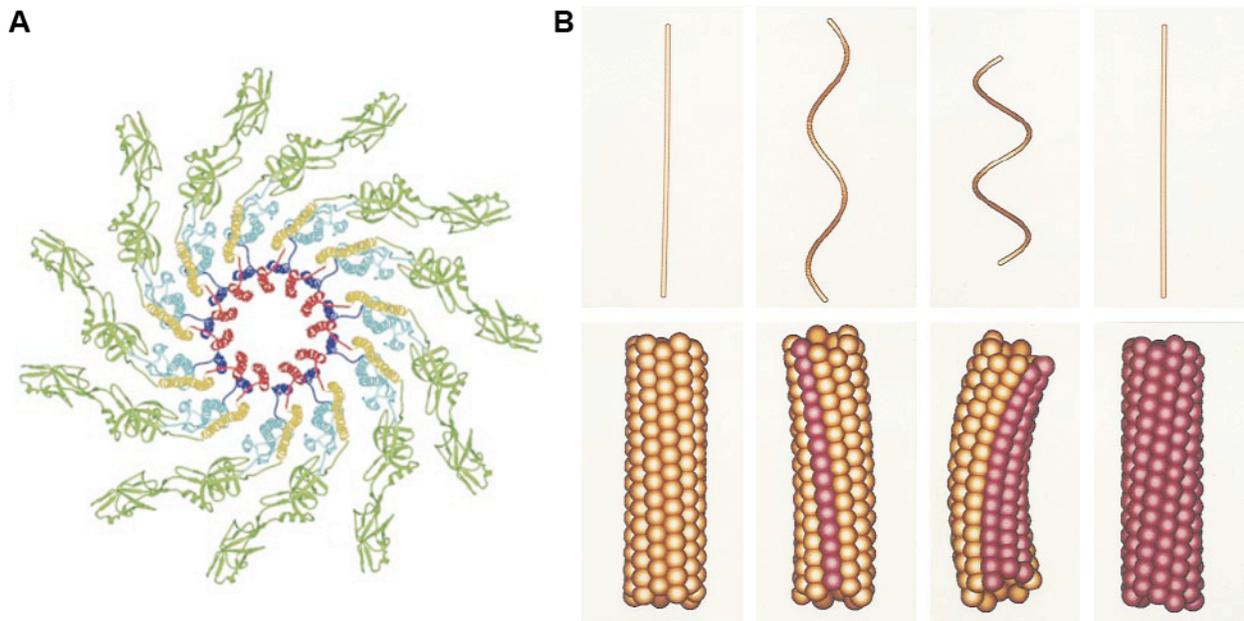


Figura 2. Estructura y polimorfismos del filamento flagelar. **A)** Diagrama de listones del filamento visto desde el extremo distal, se visualizan 11 subunidades. Las cadenas están coloreadas de la siguiente forma: azul residuos 1-44, cian 44-179, verde 179-406, amarillo 406-454 y rojo 454-494. Modificado de Yonekura *et al.*, 2003. **B)** El panel superior muestra la morfología del filamento completo y el panel inferior sólo muestra un segmento del filamento. De izquierda a derecha: filamento recto tipo L, filamento normal superenrollado en una hélice izquierda, filamento “curly” superenrollado en una hélice derecha y filamento recto tipo R. El color amarillo indica que los protofilamentos se encuentran en estado L, mientras que el rojo en estado R. Tomado de Namba y Vonderviszt, 1997.

Gancho

Ubicado entre el cuerpo basal y el filamento se encuentra el gancho, el cual posee una estructura tubular corta, altamente curva. Esta estructura está constituida por aproximadamente 120 monómeros de la proteína FlgE (Jones *et al.*, 1990), la segunda más abundante. El gancho es estructuralmente similar al filamento, pero al compararlo con este último es menos rígido y posee un largo definido de 55 ± 6 nm (Hirano *et al.*, 1994). Estas características le permiten funcionar como conector universal, ya que transmite la fuerza de torsión producida por el motor flagelar al filamento.

El gancho, al igual que el filamento, posee un arreglo helicoidal organizado en 11 protofilamentos (**Figura 3**) que presenta polimorfismos (Wagenknecht *et al.*, 1982). Ambas estructuras también poseen un motivo estructural similar, unas α -hélices superenrolladas formadas por las cadenas terminales de FliC y FlgE (Fujii *et al.*, 2009). No obstante, estas hélices superenrolladas están orientadas y empaçadas de manera diferente para producir dos estructuras con funciones mecánicas distintas. En el gancho las hélices superenrolladas están inclinadas, lo que les permite deslizarse mientras el gancho se comprime de un lado y se extiende del otro lado. La distancia entre los protofilamentos al interior del gancho es de 54 y 39 Å, mientras que en la parte exterior es 59 y 35 Å, ver **Figura 3C**. En un gancho recto la distancia de la parte interior y exterior es la misma, 46 Å. Por lo tanto, los protofilamentos se comprimen y extienden aproximadamente 6-8 Å en la parte interior del gancho y 11-13 Å en la parte exterior (Samatey *et al.*, 2004).

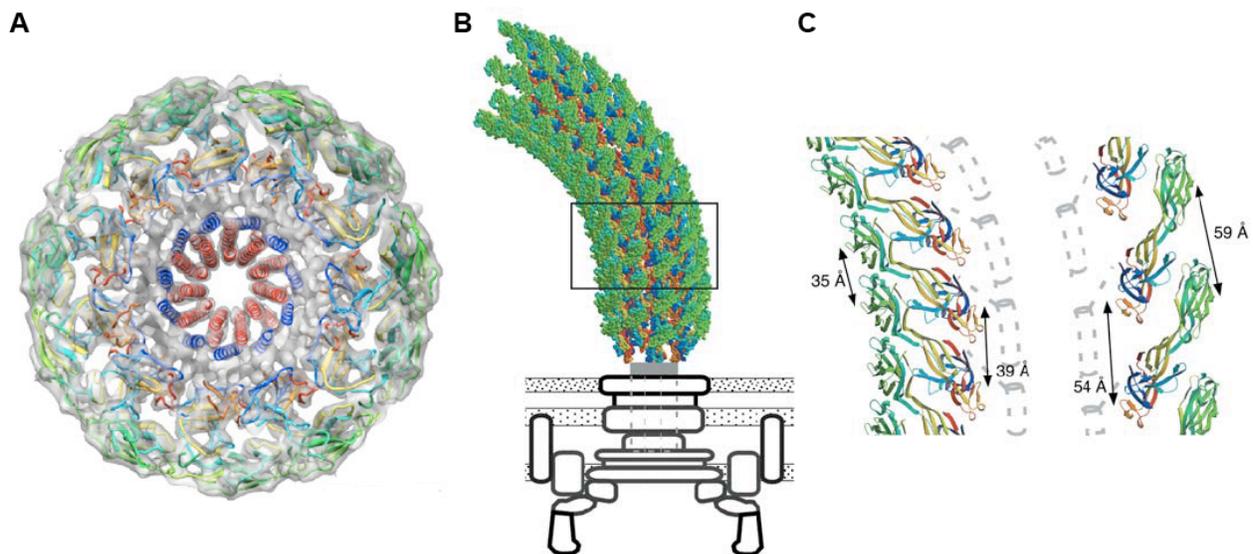


Figura 3. Estructura del gancho flagelar. **A)** Mapa de densidad tridimensional del gancho ajustado con el modelo atómico; vista desde el extremo distal. Tomado de Fujii *et al.*, 2009. **B)** Modelo atómico del gancho junto con el diagrama esquemático del cuerpo basal. **C)** Imagen magnificada del gancho donde se aprecia la compresión y la extensión de los protofilamentos. Modificado de Samatey *et al.*, 2004.

Existen otras tres proteínas axiales que son esenciales para el ensamblaje y el funcionamiento del flagelo (Homma *et al.*, 1984b) llamadas proteínas asociadas al

gancho o HAPs por las siglas en inglés de “hook-associated proteins”. FlgK (HAP1) y FlgL (HAP3) se encuentran localizadas en la interfase del filamento y el gancho (**Figura 1**), en donde funcionan como adaptadores, ya que conectan dos estructuras filamentosas con propiedades mecánicas distintas (Homma y Iino, 1985, Fahrner *et al.*, 1994). Por otro lado, FliD (HAP2) se localiza en la parte distal del flagelo formando un pentámero (Maki *et al.*, 1998), el cual funciona como una tapa que facilita la polimerización y la elongación del filamento (Yonekura *et al.*, 2000). En la ausencia de FliD el filamento no polimeriza y los monómeros de flagelina se secretan al medio extracelular (Homma *et al.*, 1984a).

Cuerpo basal

El gancho está conectado al cuerpo basal, éste último, es una estructura compleja que atraviesa la membrana interna, la pared de peptidoglicano y la membrana externa, finalizando en el citoplasma. El cuerpo basal está constituido por las siguientes subestructuras: eje, anillos L, P, MS y C, aparato de exportación y complejo Mot (**Figuras 1 y 4**). Los complejos gancho-cuerpo basal pueden aislarse por métodos en donde se lisan las células y se tratan con detergente (DePamphilis y Adler, 1971); posteriormente estas preparaciones se observan en el microscopio electrónico o por criomicroscopía electrónica para obtener imágenes como la que se muestra en la **Figura 4A**.

El eje es una estructura cilíndrica que atraviesa la membrana externa y la capa de peptidoglicano y está compuesto por cinco diferentes proteínas que conforman el eje distal y el eje proximal (Homma *et al.*, 1990). Se estima que 26 subunidades de la proteína FlgG conforman al eje distal (Jones *et al.*, 1990), mientras que seis subunidades de cada una de las proteínas FlgB, FlgC, FlgF (Jones *et al.*, 1990) y nueve copias de FliE constituyen el eje proximal (Müller *et al.*, 1992). El eje distal se encuentra unido al gancho mientras que el eje proximal se localiza sobre el anillo MS, por lo que su función es transmitir la fuerza de torsión generada por el motor hacia el gancho.

Los anillos L (lipopolisacárido) y P (peptidoglicano) se ensamblan alrededor del eje y están formados por 26 copias de las proteínas FlgI y FlgH respectivamente (Homma *et al.*, 1987, Schoenhals y Macnab, 1996, Jones *et al.*, 1990). Como su

nombre lo indica, el anillo L está localizado en la membrana externa y el anillo P en la pared de peptidoglicano. Se cree que la función de ambos anillos es formar un forro que permite la libre rotación del eje (Akiba *et al.*, 1991).

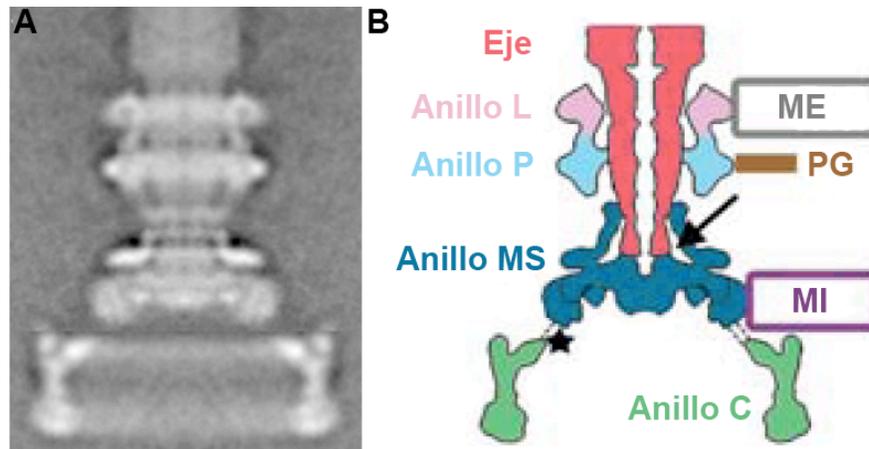


Figura 4. Estructura del cuerpo basal. **A)** Imagen de criomicroscopía electrónica del cuerpo basal de *S. enterica*. El aparato de exportación y el complejo Mot no sobreviven la extracción con detergente por lo tanto su estructura no se observa. Modificado de Thomas *et al.*, 2001. **B)** Interpretación esquemática de la imagen en **A**. ME: membrana externa, PG: pared de peptidoglicano y MI: membrana interna. Modificado de Murphy *et al.*, 2006.

En la membrana interna se localiza el anillo MS (“membrane supramembrane”) conformado por 26 subunidades de la proteína FliF (Jones *et al.*, 1990, Ueno *et al.*, 1992) y que funciona como plataforma para la formación del anillo C. En el centro de este anillo se ensambla el aparato de exportación.

La exportación de los componentes extracelulares del flagelo se logra gracias a una vía especializada que transloca los componentes a través de la estructura naciente. Este aparato de exportación está compuesto por seis proteínas integrales de membrana FliA, FliB, FliO, FliP, FliQ y FliR y tres proteínas solubles FliH, FliI y FliJ (Minamino y Macnab, 1999, Minamino y Macnab, 2000b). Estos componentes muestran una alta similitud con proteínas del sistema de secreción tipo III de bacterias patógenas de plantas y animales involucrados en la translocación de factores de virulencia hacia las células huésped (Hueck, 1998, Cornelis, 2006). Se piensa que las seis proteínas membranales forman una compuerta para la exportación en la base del flagelo

(Minamino y Namba, 2008). FliI es una ATPasa tipo Walker que posee una alta similitud con la subunidad β de la F_0F_1 -ATP sintasa (Fan y Macnab, 1996), FliH es el regulador negativo de esta enzima (Minamino y MacNab, 2000a) y FliJ es la chaperona general de la vía de exportación (Minamino *et al.*, 2000). El mecanismo para la exportación ocurre de la siguiente forma, FliI y FliH forman un complejo estable $FliH_2FliI$ (Minamino y MacNab, 2000a) el cual, en conjunto con FliJ, une a los sustratos de exportación (complejos sustrato-chaperona) en el citoplasma para reclutarlos eficientemente a la compuerta de exportación (Thomas *et al.*, 2004). Una vez en la compuerta, el complejo se disocia gracias a la hidrólisis de ATP y el sustrato se exporta a través del canal. Se cree que la fuente de energía que utiliza la compuerta para la translocación de los sustratos es la fuerza protón motriz (Minamino y Namba, 2008). Resulta interesante que, las estructuras de FliI y FliJ se parecen a las subunidades α/β y parte de la subunidad γ de la F_0F_1 -ATP sintasa (Ibuki *et al.*, 2011).

Asociado al anillo MS, se encuentra el anillo C (citoplasma), el cual como su nombre lo indica se extiende en el citoplasma (Francis *et al.*, 1994). Está conformado por 26 copias de FliG (Francis *et al.*, 1992), 34 subunidades de FliM (Thomas *et al.*, 1999) y >100 copias de FliN (Zhao *et al.*, 1996), las cuales están implicadas en la rotación del motor. Esta estructura también se conoce como rotor ya que forma parte del motor flagelar, específicamente la proteína FliG interviene en la generación del torque (Lloyd *et al.*, 1996). Por otro lado, FliM es el blanco de la vía de señalización quimiotáctica y es la proteína responsable de inducir un cambio en la dirección de la rotación flagelar (Welch *et al.*, 1993), por esta razón este complejo también se conoce como “switch” o interruptor. Estudios recientes sugieren que FliN también juega un papel importante en el control de la rotación (Sarkar *et al.*, 2010a), además esta proteína interacciona con la proteína del aparato de exportación FliH (González-Pedrajo *et al.*, 2006).

Las proteínas MotA y MotB son proteínas integrales de membrana, MotA tiene cuatro cruces transmembranales, mientras que MotB posee sólo uno. Estas proteínas forman heterohexámeros con una estequiometría 4:2, $MotA_4MotB_2$ (Kojima y Blair, 2004). Se estima que 11 de estos complejos Mot se asocian alrededor del anillo MS y

conforman al estator del motor flagelar (Reid *et al.*, 2006). Los complejos del estator MotAB forman canales iónicos que permiten el paso de protones (Blair y Berg, 1990).

El motor flagelar

El motor flagelar es una nanomáquina rotatoria que transforma la energía química en mecánica. Se puede dividir en dos componentes: rotor y estator. La fuerza de torsión del motor se genera por las interacciones rotor-estator acopladas a la translocación de protones a través de un canal formado dentro del estator.

Rotor

El complejo del rotor o “switch”, como se mencionó anteriormente, corresponde estructuralmente al anillo C. Las estructuras de las proteínas que lo conforman, FliG, FliM y FliN, han sido resueltas por cristalografía de rayos X (Park *et al.*, 2006, Brown *et al.*, 2005, Brown *et al.*, 2002) y junto con experimentos de interacción de proteínas y de mutagénesis (Sarkar *et al.*, 2010b, Paul *et al.*, 2011b, Brown *et al.*, 2007, Lowder *et al.*, 2005) han permitido el desarrollo de un modelo de su organización (**Figura 5A y B**). En la parte inferior del “switch” un arreglo de tetrámeros de FliN (Paul y Blair, 2006) con aspecto de dona forma un complejo con FliM, específicamente con el extremo carboxilo terminal de la proteína (FliM_C). Arriba del arreglo FliN₄FliM_C se encuentra el dominio medio de FliM (FliM_M), mientras que el dominio N-terminal de la proteína, el cual une a la proteína CheY-P (ver más adelante), tiene una conformación extendida. FliG está próxima a la membrana y se divide en tres dominios, cada uno con función distinta: el dominio N-terminal (FliG_N) interacciona con FliF (Oosawa *et al.*, 1994), la proteína del anillo MS, el dominio medio (FliG_M) interacciona con FliM (Oosawa *et al.*, 1994), y el dominio C-terminal (FliG_C) posee un conjunto de residuos cargados conservados que interaccionan con el estator (Zhou *et al.*, 1998a).

Estator

Los motores flagelares obtienen la energía de la fuerza protón motriz (Manson *et al.*, 1977) o en el caso de bacterias marinas o alcalófilas (de los géneros *Vibrio* o *Bacillus*) de la fuerza sodio motriz (Hirota y Imae, 1983, Atsumi *et al.*, 1992b). Estos

iones son conducidos a través de un canal formado por los complejos MotAB en el caso de motores de H^+ o sus ortólogos PomAB para los motores de Na^+ (Asai *et al.*, 1997).

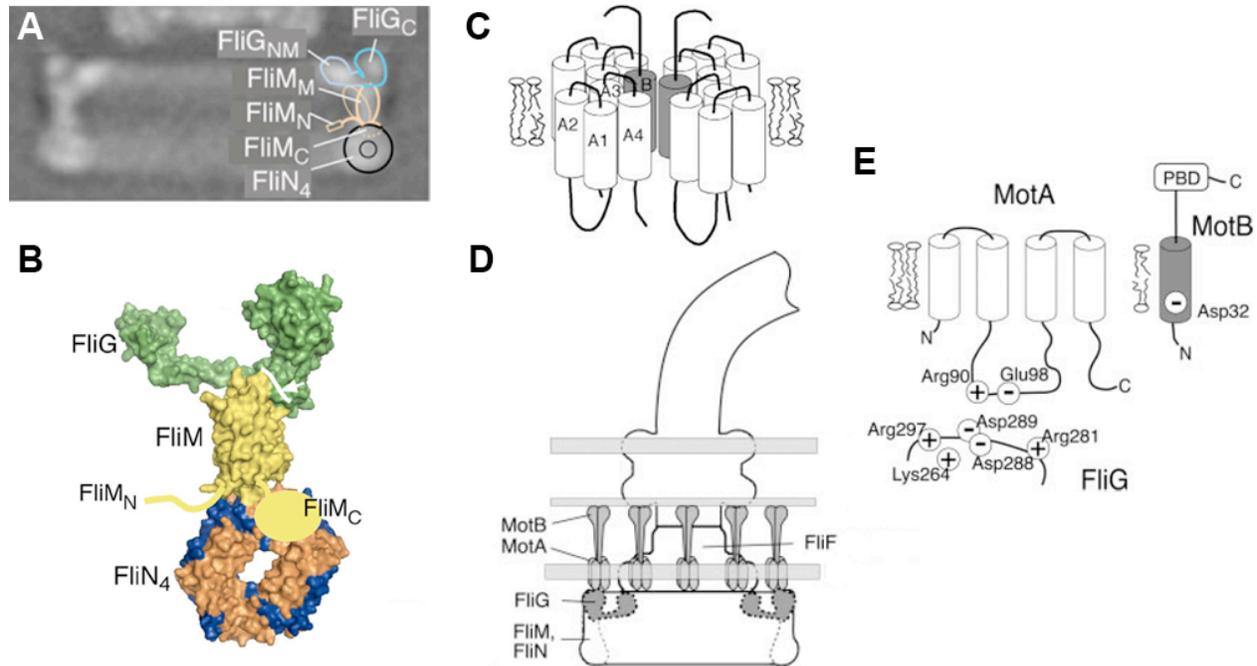


Figura 5. Estructura y organización del motor flagelar. **A)** Imagen de criomicroscopía electrónica del cuerpo basal de *S. enterica*, sólo se muestra el anillo C junto con la organización propuesta de las proteínas FliG, FliM y FliN, modificado de Paul *et al.*, 2011a. **B)** Modelo molecular del anillo C basado en estructuras cristalográficas, se observa el tetrámero de FliN seguido de FliM, sin embargo aún se desconoce la estructura del dominio FliM_C, en la parte superior se encuentra la proteína FliG. Modificado de Sarkar *et al.*, 2010b. **C)** Esquema del arreglo del complejo MotA₄MotB₂ en la membrana, tomado de Braun *et al.*, 2004. **D)** Diagrama de la disposición de las proteínas que intervienen en la rotación del flagelo de *E. coli*, modificado de Yakushi *et al.*, 2006. **E)** Topología de MotA y MotB, en donde se muestran los residuos importantes para la interacción electrostática entre el rotor y el estator, tomado de Yakushi *et al.*, 2006.

Como se mencionó anteriormente, estos complejos se ensamblan en la membrana citoplásmica alrededor del anillo MS conformando el estator (**Figura 5D**). MotA tiene cuatro cruces transmembranales (Zhou *et al.*, 1995), entre los cruces 2 y 3 contiene una asa citoplásmica larga con unos residuos cargados conservados que interaccionan con los de FliG (Zhou y Blair, 1997). MotB tiene una sola hélice transmembranal (Chun y Parkinson, 1988), en la porción N-terminal de esta hélice se encuentra un residuo conservado cargado negativamente (Asp32) que se predice como el sitio de unión del ión (Zhou *et al.*, 1998b), ver **Figura 5E**. La mayor parte de MotB se

encuentra en el espacio periplásmico y en su extremo carboxilo terminal posee un dominio de unión a peptidoglicano, que permite su anclaje a la pared celular (De Mot y Vanderleyden, 1994). En el heterohexámero MotA₄MotB₂ el dímero de MotB se encuentra en el centro del complejo y las hélices transmembranales de MotA se arreglan alrededor del dímero (**Figura 5C**). Este arreglo posiciona los residuos Asp32 en direcciones opuestas, lo que sugiere que cada complejo posee dos canales de protones (Braun *et al.*, 2004).

Generación de la fuerza rotacional

El mecanismo exacto mediante el cual el motor flagelar genera la rotación aún se desconoce, sin embargo, existen varios modelos que predicen cómo se genera la fuerza de rotación. El más aceptado sostiene que el movimiento se produce por medio de interacciones electrostáticas entre el rotor y el estator (Zhou *et al.*, 1998a).

Con base en este modelo, la unión de un protón al residuo Asp32 de MotB en el canal induce un cambio conformacional en la proteína MotA que permite la interacción de los residuos cargados del asa citoplásmica de MotA, Arg90 y Glu98, con los residuos cargados del dominio FliG_C, Lys264, Arg281, Asp288, Asp289, y Arg297 (Lloyd y Blair, 1997, Zhou y Blair, 1997), ver **Figura 5E**. La repulsión de cargas provoca el movimiento del rotor, quien a su vez transmite el torque hacia al eje, al gancho y por último al filamento. De acuerdo con el modelo, la sustitución del Asp32 de MotB por varios aminoácidos, excepto por glutamato, suprime la motilidad, en específico la rotación y no el ensamblaje del flagelo. Por otro lado, ninguno de los residuos acídicos en MotA y FliG son esenciales para la generación del torque. Sin embargo, la neutralización o la inversión de la carga de este conjunto de residuos altera la rotación del motor por lo que se cree que funcionan colectivamente. No existe un residuo crítico para la rotación en la proteínas MotA y FliG, el único residuo cargado esencial para la rotación es el Asp32 de MotB (Zhou *et al.*, 1998b).

Patrones de flagelación

La localización y el número de flagelos varía entre las diferentes especies bacterianas, ver **Figura 6**. Bacterias como *Caulobacter crescentus* y *Vibrio shilonii*

poseen un solo flagelo localizado en el polo, es decir, ensamblan un flagelo monotrico. Por su parte *Rhodospirillum rubrum* presenta un patrón de flagelación anfítrico, ya que posee varios flagelos en ambos polos de la célula. *Vibrio fischeri* y *Helicobacter pylori* también ensamblan varios flagelos pero en un solo polo de la célula, son bacterias lofótricas. Y aquellas con flagelos peritricos, como *E. coli* y *S. enterica*, poseen entre cinco y diez flagelos distribuidos alrededor del cuerpo celular.

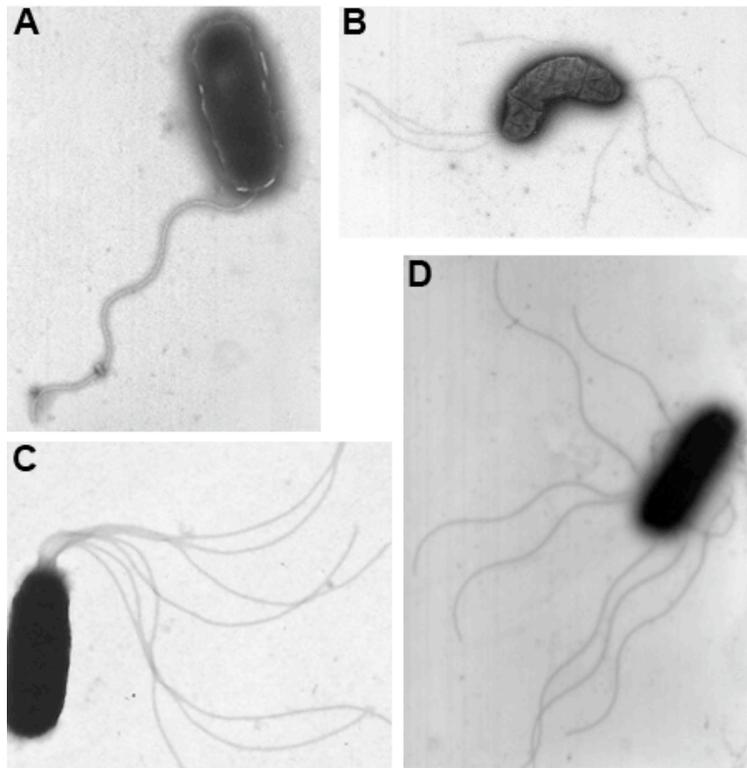


Figura 6. Patrones de flagelación de diferentes bacterias. Imágenes de microscopía electrónica de: **A)** *V. shilonii*, monotrico. **B)** *R. rubrum*, anfítrico. **C)** *V. fischeri*, lofotrico. **D)** *S. enterica*, peritrico.

Es importante tomar en cuenta que existen diferentes tipos de arreglos flagelares, ya que cada uno de ellos, en conjunto con la dirección de la rotación del motor dan lugar a diferentes patrones de nado.

Patrón de nado

El motor flagelar de *E. coli* es un motor reversible (o bidireccional) que alterna entre dos estados (Silverman y Simon, 1974): uno que genera la rotación en dirección

contraria a las manecillas del reloj o CCW (“counterclockwise”), y otro que genera la rotación en dirección de las manecillas del reloj o CW (“clockwise”). Como ya se mencionó, el flagelo bacteriano posee una estructura helicoidal, por lo tanto la rotación en un sentido produce un resultado diferente a la rotación en la dirección contraria. Esto genera dos patrones de nado conocidos como “running” o nado y “tumbling” o reorientación.

Nado

Debido a que los filamentos de *E. coli* son normalmente una hélice izquierda, cuando éstos rotan en sentido CCW se genera una fuerza que empuja a la célula hacia adelante. Las fuerzas hidrodinámicas y mecánicas provocan que todos los flagelos alrededor de la célula se junten en un eje común, usualmente paralelo al eje celular (Macnab, 1977). Los filamentos se ordenan en una trenza que impulsa a la célula y genera el nado o “run”, ver **Figura 7**. La velocidad de rotación de los filamentos en la trenza es de 100 Hz y *E. coli* llega a alcanzar velocidades entre 20 y 35 $\mu\text{m/s}$ (Lowe *et al.*, 1987). Sin embargo, existen bacterias más rápidas, como *Bdellovibrio bacteriovorus* que nada a una velocidad de 160 $\mu\text{m/s}$ (Lambert *et al.*, 2006).

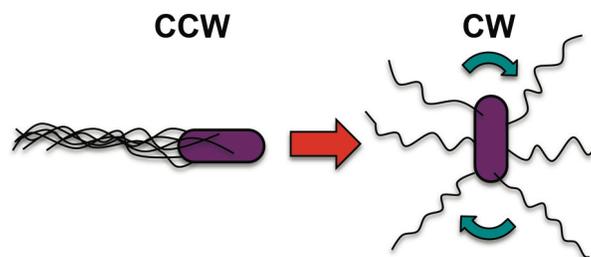


Figura 7. Patrón de nado de *E. coli*. La rotación CCW favorece la formación de una trenza que induce el nado; mientras que la rotación CW desorganiza esta trenza provocando un evento de reorientación.

Reorientación

La rotación en sentido CW provoca que la forma normal del filamento, la hélice izquierda, experimente una transición polimórfica hacia la forma “curly”, una hélice

derecha (Macnab y Ornston, 1977), tal como se muestra en la **Figura 8**. Cuando uno o más filamentos rotan en dirección CW la trenza se deshace, provocando que los filamentos trabajen de forma descoordinada (**Figura 7**). Los filamentos empujan y jalan en diferentes direcciones al mismo tiempo por lo que no hay una velocidad neta. El resultado de este fenómeno es que la célula se reoriente aleatoriamente. Cuando de nueva cuenta los filamentos roten en sentido CCW la célula nadará en una dirección diferente a la original.

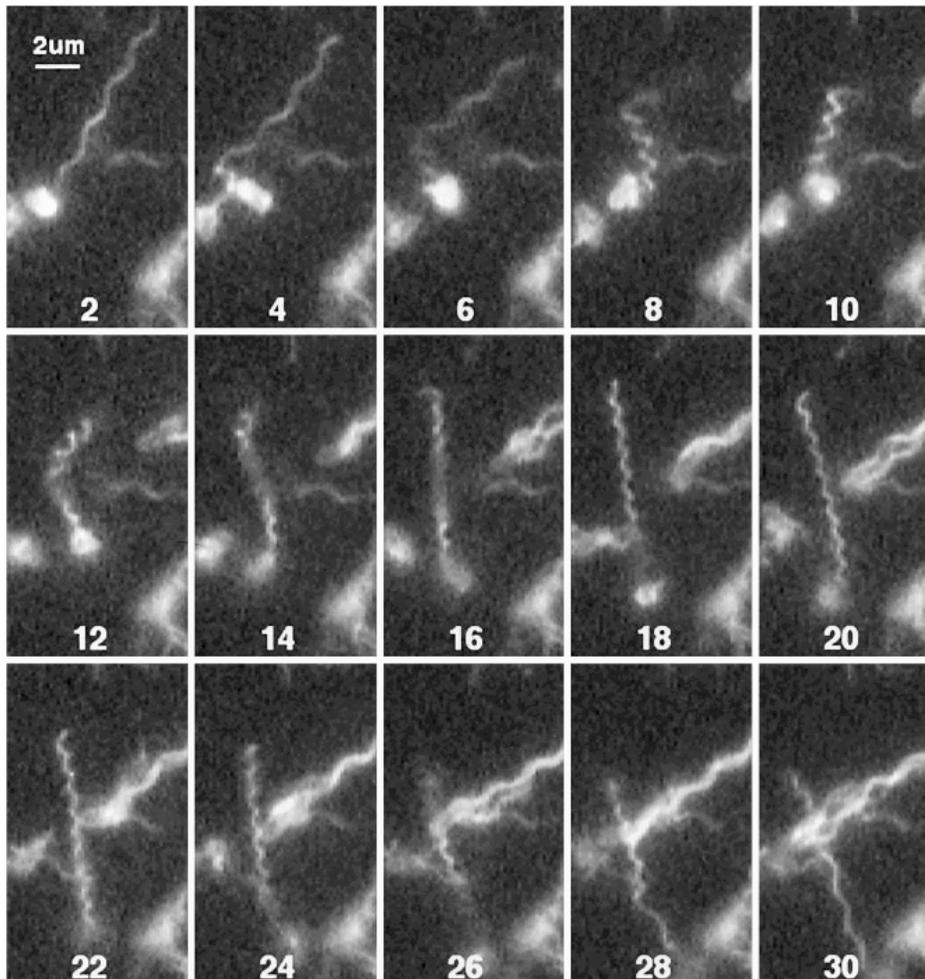


Figura 8. Grabación de una célula de *E. coli* con un solo filamento experimentando una transición polimórfica. En el cuadro 2 se observa el filamento normal, una hélice izquierda. Del cuadro 4 al 18 se observa la transformación a la forma “curly”. Mientras que del cuadro 24 al 30 la transición de “curly” a normal. Inicialmente la célula nadaba hacia la esquina inferior izquierda (cuadro 2), después de la transición nada hacia la esquina inferior derecha. Tomado de Turner *et al.*, 2000.

Comportamiento quimiotáctico

La mayoría de las bacterias flageladas presentan una respuesta quimiotáctica (Wadhams y Armitage, 2004). Sin embargo, a diferencia de organismos más grandes, se cree que la mayoría de las bacterias son muy pequeñas (1-2 μm) para poder detectar una diferencia de concentración a lo largo de su cuerpo. En lugar de esto, mientras se mueven, las bacterias comparan el estado del ambiente actual con el ambiente detectado unos pocos segundos antes. En otras palabras, las bacterias responden temporalmente (en lugar de espacialmente) a los cambios en el ambiente (Adler, 1975).

En un ambiente isotrópico las bacterias nadan y se reorientan aleatoriamente (en *E. coli* aproximadamente 1 vez por segundo), al no haber una direccionalidad en el nado no hay un desplazamiento neto (Berg y Brown, 1974). Este tipo de movimiento se conoce como “random walk” o nado azaroso (**Figura 9A**).

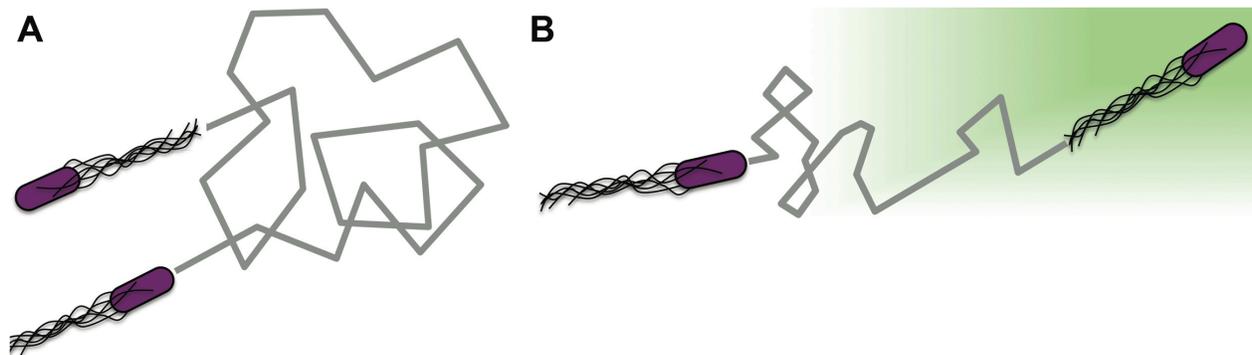


Figura 9. Comportamiento quimiotáctico de una bacteria en diferentes medios. **A)** Nado azaroso, las células se mueven pero no hay un desplazamiento neto. **B)** Nado sesgado, en la presencia de un gradiente de algún atrayente las células se dirigen hacia el atrayente.

Por el contrario, cuando las células se encuentran en un medio donde hay un gradiente en la concentración de algún atrayente, el número de eventos de reorientación disminuye y las trayectorias de nado se hacen más largas. El flagelo rota más tiempo en dirección CCW que CW. Esto, permite que las células se desplacen hacia una concentración óptima de atrayente. A este desplazamiento se le denomina “biased walk” o nado sesgado (**Figura 9B**). Para el caso de un repelente se emplea el mismo mecanismo, sin embargo, ocurre de forma invertida; aumenta el número de episodios de reorientación con la finalidad de alejar a la célula de la sustancia tóxica o nociva.

Sin embargo, ¿cómo detectan las bacterias un aumento en la concentración de un atrayente? Como se mencionó anteriormente las bacterias detectan los cambios temporalmente. Cuando detectan un estímulo, en específico un atrayente, responden a éste nadando por más tiempo. A pesar de la continua presencia del estímulo, el comportamiento alterado permanece por unos minutos, después de este tiempo las células regresan al patrón intermitente de nados y reorientaciones, se comportan como si no hubiera estímulo presente. La respuesta inicial al estímulo se conoce como excitación y la recuperación del comportamiento previo al estímulo se denomina adaptación. El proceso de adaptación regresa el sesgo en el nado a la línea basal, permitiéndole de nuevo a la célula detectar y responder ante futuros cambios en la concentración. En la **Figura 10** se muestra la respuesta ante un estímulo, en donde se grafica la probabilidad de rotación CCW contra el tiempo. La fase de excitación se manifiesta como un aumento en la probabilidad de nado, seguido de la fase de adaptación en la que disminuye el grado de excitación.

Por consiguiente, en *E. coli* la frecuencia de cambio en la rotación flagelar es la base de la respuesta quimiotáctica (Larsen *et al.*, 1974b).

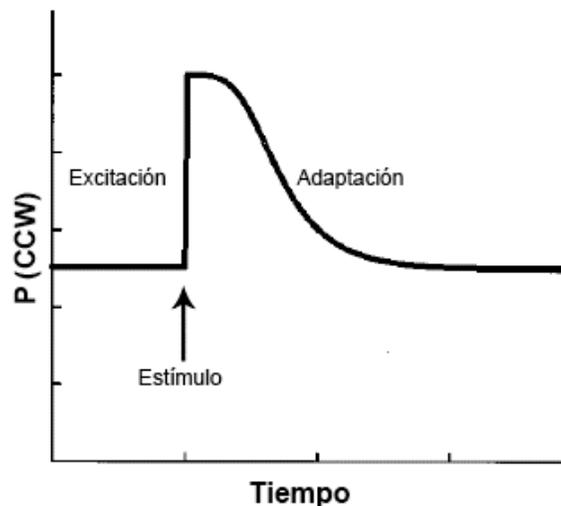


Figura 10. Respuesta quimiotáctica ante un estímulo en el tiempo. En el eje de las ordenadas se grafica la probabilidad (P) de rotación CCW en función del tiempo, eje de las abscisas. La fase de excitación ocurre rápidamente, mientras que la fase de adaptación es más lenta.

Componentes principales de la señalización quimiotáctica

La maquinaria quimiotáctica está encargada de detectar, amplificar e integrar los cambios del ambiente para generar una respuesta locomotora coherente y apropiada. Esta vía de señalización utiliza un sistema de dos componentes para regular la actividad del motor flagelar (Baker *et al.*, 2006). En general, los sistemas de dos componentes se conforman por una cinasa de histidina que cataliza la transferencia del grupo fosforilo del ATP a un residuo conservado de histidina, y un regulador de respuesta el cual es fosforilado por la cinasa en un residuo aspártico conservado (Gao y Stock, 2009).

A pesar de ser un sistema de dos componentes, el sistema quimiotáctico de *E. coli* es más complejo que los sistemas de dos componentes canónicos. Esto se debe a la presencia de componentes adicionales. A continuación, se describen las proteínas involucradas en esta vía de señalización quimiotáctica.

Quimiorreceptores

Los quimiorreceptores o proteínas quimiotácticas aceptoras de metilos o MCPs (*methyl-accepting chemotactic proteins*), tienen como función detectar los estímulos ambientales y transmitirlos hacia el citoplasma. Usualmente, los quimiorreceptores son proteínas transmembranales dimericas con un dominio periplásmico de unión al ligando y un dominio citoplásmico. El análisis de la estructura de ambos dominios muestra que los MCPs se conforman principalmente por α -hélices superenrolladas (Kim *et al.*, 1999, Yeh *et al.*, 1996), ver **Figura 11**.

Los receptores poseen dos regiones transmembranales, entre las cuales se encuentra el dominio periplásmico de unión al ligando. Este dominio llamado dominio sensor muestra un empaquetamiento de cuatro hélices en los MCPs de *E. coli* (Yeh *et al.*, 1996). Sin embargo, el plegamiento del dominio periplásmico en otras especies es variable y especializado para cada ligando. De acuerdo con los resultados obtenidos con el quimiorreceptor Tar de *E. coli*, el ligando se une en la interfase de los dos monómeros, lo que altera la interacción entre los dominios periplásmicos y las hélices transmembranales (Milburn *et al.*, 1991). Se ha demostrado que la unión del ligando induce un movimiento tipo pistón de 1.4 Å de la segunda hélice transmembranal con

respecto a la primera y la rotación de las subunidades del dímero (Ottemann *et al.*, 1999). Estos cambios conformacionales pudieran ser responsables de la propagación de la señal a través de la membrana celular.

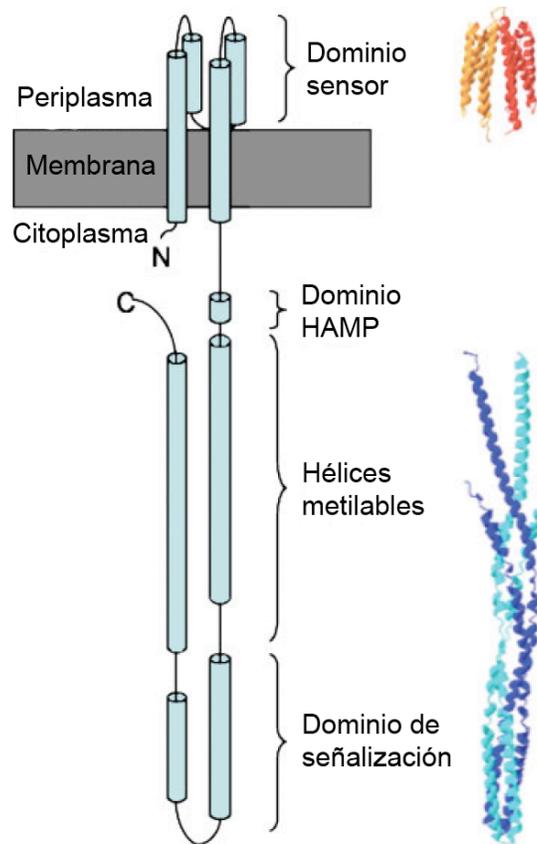


Figura 11. Estructura de un quimiorreceptor. En la parte izquierda se muestra el diagrama esquemático de los dominios de un MCP. Mientras que de lado derecho se observa la estructura obtenida por cristalografía de rayos X. Modificado de Baker *et al.*, 2006.

El dominio citoplásmico se aleja de la membrana y luego se dobla sobre sí mismo formando una horquilla (Kim *et al.*, 1999). Este dominio puede dividirse en cuatro subdominios: dominio HAMP (*histidine kinase, adenyl cyclase, methyl-accepting chemotaxis protein, and phosphatase*), hélice de metilación 1, dominio de señalización y hélice de metilación 2 (**Figura 11**). Muchas proteínas de señalización contienen el dominio HAMP, el cual contiene alrededor de 50 aminoácidos que forman dos hélices

anfílicas unidas por un segmento conector. El dominio HAMP une al dominio sensor y al dominio citoplásmico, su función es convertir las señales de entrada transmembranales en señales de salida para generar una respuesta (Parkinson, 2010). Las hélices de metilación contienen los residuos glutámicos blancos de la metilación (Terwilliger *et al.*, 1983). Finalmente el dominio de señalización interacciona con CheW y CheA (Surette y Stock, 1996), formando así lo que se conoce como complejo ternario, MCP-CheW-CheA.

El número de quimiorreceptores que una bacteria posee depende de cada especie; *E. coli* presenta cuatro quimiorreceptores: Tsr, Tar, Trg y Tap. En la Tabla 1, se muestran los atrayentes y repelentes que reconoce cada MCP. Además, *E. coli* posee un quinto receptor, llamado Aer, el cual regula la respuesta aerotáctica. Tsr y Tar son los receptores más abundantes, inclusive se ha visto que los niveles de Tsr duplican los de Tar. Los otros dos receptores Trg y Tap representan cada uno el 3% del total de quimiorreceptores (Li y Hazelbauer, 2004).

Tabla 1. Ligandos reconocidos por los diferentes quimiorreceptores de *E. coli*¹

Receptor	Atrayentes	Repelentes
Tsr	<i>Serina</i> , alanina, cisteína, glicina, aminoisobutirato	Leucina, pH ácido, benzoato
Tar	<i>Aspartato</i> , glutamato, malato, maltosa	Co ²⁺ , Ni ²⁺
Trg	<i>Galactosa</i> , <i>glucosa</i> , <i>ribosa</i>	
Tap	Dipéptidos (<i>glicil-L-leucina</i>), pirimidinas, s-triazinas	

¹En cursiva se muestran los atrayentes más fuertes para cada quimiorreceptor.

Proteína adaptadora

CheW es una proteína citoplásmica monomérica (18 kDa), esencial para la quimiotaxis, que conecta físicamente a los MCPs con la cinasa, ya que interacciona simultáneamente con el dominio de señalización de los quimiorreceptores y con el extremo C-terminal de CheA (Boukhvalova *et al.*, 2002). No posee actividad catalítica, por lo tanto se cree que actúa como una proteína de andamiaje que transduce las señales de los receptores hacia CheA (Liu y Parkinson, 1989). A pesar de que juega un papel muy importante en la formación de los complejos ternarios (Maddock y Shapiro, 1993), aún se desconoce el mecanismo por el cual CheW acopla la señal.

De acuerdo con la estructura cristalográfica de CheW de *Thermotoga maritima*, la proteína contiene dos dominios de hojas β , cada dominio contiene cinco barriles β

que forman un centro hidrofóbico que sirve para interacciones proteína-proteína (Griswold *et al.*, 2002). La estructura de CheW es similar a la del dominio P5 de CheA, a través del cual se da la interacción CheW-CheA.

Cinasa

CheA es la enzima encargada de transferir la información detectada por los quimiorreceptores hacia el citoplasma. Es una proteína dimérica soluble con actividad de cinasa de histidina. CheA se autofosforila mediante la transferencia del grupo γ -fosforilo del ATP a un residuo de histidina conservado (His48), esta reacción ocurre en la ausencia de alguna otra proteína (Zhou y Dahlquist, 1997). La actividad de cinasa de CheA está regulada tanto negativamente como positivamente por la información que reciben los receptores. Posee cinco dominios funcionales: dominio de autofosforilación (P1), dominio de unión al regulador de respuesta (P2), dominio de dimerización (P3), dominio de cinasa de histidina (P4) y dominio regulatorio (P5). Estos cinco dominios están numerados en orden de localización desde el extremo amino al carboxilo terminal (Swanson *et al.*, 1993).

El dominio P1 es homólogo al dominio HPt (“Histidine-containing Phosphotransfer domain”) que se encuentra en cinasas sensoras de otros sistemas de dos componentes. Dentro de este dominio se encuentra el residuo de histidina que participa en las reacciones de fosfotransferencia. Este dominio funciona como intermediario en la transferencia del grupo fosforilo del ATP al regulador de respuesta, es decir, funciona como fosforeceptor y fosfodonador (Mourey *et al.*, 2001).

A través del dominio P2 CheA interacciona con los reguladores de respuesta CheY y CheB, quienes compiten por la unión a este dominio (Li *et al.*, 1995). Una versión de la proteína CheA carente del dominio P2 aún es capaz de fosforilar a CheY, sin embargo lo hace a una tasa menor que la proteína completa (Stewart *et al.*, 2000). Estos resultados sugieren que este dominio contribuye a hacer más eficiente la fosfotransferencia. De acuerdo con esta idea se ha demostrado que la unión de CheY al dominio P2 provoca un cambio conformacional en el sitio activo de CheY que aumenta la accesibilidad al aspartato (Stewart, 1997).

Los monómeros de CheA se encuentran inactivos, mientras que la forma dimérica presenta actividad enzimática (k_{cat} , $\sim 0.2 \text{ s}^{-1}$), por lo que el dominio de dimerización P3 es importante para la actividad de cinasa. Otros estudios demostraron que el centro catalítico de CheA tiene que formar un dímero para poder fosforilar la histidina del dominio P1 (Surette *et al.*, 1996).

El dominio P4 posee la actividad catalítica, en presencia de ATP y Mg^{2+} el dímero de CheA se *trans*-fosforila mediante el siguiente mecanismo: el dominio P4 de un monómero une ATP, posteriormente la unión del dominio P1 del otro monómero activa la fosfotransferencia dando como resultado la unión covalente del grupo fosforilo al residuo His48 (Bilwes *et al.*, 2001, Ellefson *et al.*, 1997).

El último dominio, P5, como se mencionó, está involucrado en la unión a CheW (Bourret *et al.*, 1993) y también a los quimiorreceptores; ya que se han demostrado interacciones directas entre CheA y éstos últimos (Levit *et al.*, 2002). Esta unión permite la inhibición o activación de la autofosforilación de CheA mediante un mecanismo que controla el acceso del dominio P1 de un monómero al dominio P4 del otro monómero (Bilwes *et al.*, 1999).

Cabe notar que la actividad de cinasa de histidina del dímero de CheA aumenta más de 100 veces en la presencia de los complejos quimiotácticos, pero para su activación tanto los receptores como CheW deben estar presentes (Levit *et al.*, 1999). En *E. coli*, CheA aumenta su actividad en respuesta a una disminución en la unión de un atrayente o un aumento en la unión de un repelente a los quimiorreceptores.

Regulador de respuesta: CheY

La forma fosforilada de CheA (CheA-P) funciona como fosfodonor del regulador de respuesta CheY, el cual es una proteína soluble monomérica de bajo peso molecular (14 kDa). CheY cataliza su propia fosforilación en un residuo aspártico conservado (Asp57) usando a CheA-P como sustrato (Sanders *et al.*, 1989), esta reacción ocurre rápidamente (k_{cat} , $\sim 800 \text{ s}^{-1}$) e involucra la interacción con los dominios P1 y P2 de CheA (Stewart, 1997, Stewart *et al.*, 2000). La forma desfosforilada se une fuertemente al dominio P2 de CheA, mientras que su fosforilación (CheY-P) disminuye su afinidad por CheA lo que permite su difusión hacia el motor flagelar (Sourjik y Berg,

2002a). CheY-P interacciona con la proteína con FliM y FliN en la base del motor flagelar (Welch *et al.*, 1993, Bren y Eisenbach, 1998).

La proteína CheY posee un dominio receptor llamado REC, el cual se encuentra conservado entre los reguladores de respuesta. Este dominio participa en la catálisis de la transferencia del grupo fosforilo. La estructura de CheY muestra un plegamiento $(\alpha/\beta)_5$ típica del dominio REC (Stock *et al.*, 1989). El sitio activo se conforma por cinco aminoácidos conservados, los residuos Asp12, Asp13 y Asp57 unen el catión divalente requerido para la fosforilación y la desfosforilación; y los residuos Thr87 y Lys109 coordinan junto con el metal los tres oxígenos del grupo fosforilo (Lukat *et al.*, 1990, Lukat *et al.*, 1991). La fosforilación del residuo Asp57 induce un cambio conformacional que activa al regulador de respuesta (Cho *et al.*, 2000).

Como otros reguladores de respuesta, CheY se puede autofosforilar por moléculas de bajo peso molecular que actúan como fosfodadores, como son el acetilfosfato, fosforamidato, carbamil fosfato y fosfoimidazol (Da Re *et al.*, 1999). Sin embargo, se desconoce la relevancia biológica de este tipo de fosforilación.

Metiltransferasa

Los MCPs, como su nombre lo dice, son sensibles a la metilación; la enzima que cataliza esta reacción es CheR, una metiltransferasa que transfiere los grupos metilo del donador S-adenosilmetionina a residuos glutámicos específicos de los receptores (Springer y Koshland, 1977). Cada receptor posee entre cuatro y cinco residuos glutámicos que sirven como sustrato para ser metilados por CheR.

CheR es una proteína monomérica citoplásmica de 32 kDa que tiene dos dominios (Djordjevic y Stock, 1998). El dominio N-terminal contiene residuos cargados positivamente que se ha postulado sirven para el reconocimiento de los residuos cargados negativamente en los receptores. Sin embargo, el dominio C-terminal, el cual posee la actividad de metiltransferasa, es el responsable de la interacción directa con los receptores. Por su parte, los receptores más abundantes, Tar, Tsr y Tcp, poseen un motivo de cinco residuos (NWETF) que funciona como sitio de unión para CheR (Wu *et al.*, 1996). Esta interacción favorece la localización y concentración de CheR cerca de los sitios metilables de los quimiorreceptores, aún cuando estos últimos carezcan del

pentapéptido (Trg y Tap). De acuerdo con esto, los receptores a los que se les mutaron o deletaron estos residuos mostraron menores niveles de metilación (Le Moual *et al.*, 1997).

Metilesterasa

La enzima encargada de desmetilar a los receptores es la proteína CheB, la cual posee actividad metilesterasa (Kehry y Dahlquist, 1982). También actúa como desamidasa ya que cataliza la conversión de residuos específicos de glutamina en residuos de glutamato que se convierten en blancos potenciales para la metilación por CheR.

CheB es una proteína soluble compuesta por dos dominios: un dominio N-terminal regulatorio y un dominio C-terminal catalítico (Djordjevic *et al.*, 1998). El dominio regulatorio es homólogo al dominio REC de CheY, por lo tanto posee un residuo aspártico conservado que cuando se fosforila activa a la proteína. En este caso la fosforilación, por medio de CheA, del residuo Asp56 induce un cambio conformacional que expone el sitio activo del dominio catalítico lo que incrementa 100 veces su actividad de metilesterasa (Anand y Stock, 2002). La interacción de CheB con los MCPs provoca la hidrólisis del enlace metil ester en el residuo de glutamato provocando la desmetilación del receptor y la liberación de metanol como un subproducto (Kehry *et al.*, 1985).

El sitio de unión de CheB a los receptores es el mismo motivo de pentapéptidos con el que interacciona CheR (Barnakov *et al.*, 1999). Por lo que la tasa de metilación/desmetilación puede estar influenciada por la competencia de estas dos proteínas por los mismos sitios de unión.

Fosfatasa

Para poder terminar la señal, en específico la de CheY-P, la vía de señalización de *E. coli* posee un fosfatasa llamada CheZ, la cual es una proteína citoplásmica homodimérica que cataliza la desfosforilación de CheY-P (Hess *et al.*, 1988). La actividad de CheZ disminuye la vida media de CheY-P de 20 segundos a 200

milisegundos. Esta tasa de desfosforilación se requiere para permitir la detección de estímulos a través del tiempo.

Estudios bioquímicos revelaron que, de forma similar a FliM, la unión de CheZ a CheY depende de la fosforilación de esta última (Blat y Eisenbach, 1994). El dominio de unión a CheY-P se encuentra en el extremo C-terminal de CheZ (Blat y Eisenbach, 1996). La actividad de CheZ depende de la concentración de CheY-P y muestra cooperatividad positiva (Zhao *et al.*, 2002).

Mientras CheY-P está unida a FliM, se encuentra protegida de la desfosforilación por CheZ. Estos datos sugieren que CheZ desfosforila la poza de CheY-P que se encuentra libre, probablemente esta actividad desplaza el equilibrio entre CheY-P unido y libre, lo que finalmente provoca la disociación de CheY-P del motor flagelar (Bren *et al.*, 1996).

Se ha demostrado que una subpoblación de CheZ se localiza en los complejos ternarios mediante la interacción con CheA-short (Cantwell *et al.*, 2003), CheA_s, una versión trunca de la proteína que se genera por el uso de un sitio alternativo del inicio de la traducción (Kofoid y Parkinson, 1991). La asociación de CheA_s con CheZ, aumenta aproximadamente 3 veces la actividad de fosfatasa de CheZ. Se cree que la actividad de CheZ es mayor en los complejos quimiotácticos para homogenizar la concentración de CheY-P a lo largo de la célula (Wang y Matsumura, 1996).

Complejos quimiotácticos

La unidad central de la maquinaria quimiotáctica es el complejo ternario que se forma entre los quimiorreceptores, CheA y CheW. Estos complejos se localizan en un polo de la célula formando una enorme agrupación macromolecular que contiene miles de receptores y demás proteínas quimiotácticas. Estas agrupaciones se han observado mediante diversas técnicas: microscopía de fluorescencia (Maddock y Shapiro, 1993), inmunomicroscopía electrónica (Harrison *et al.*, 1999) y criotomografía electrónica (Zhang *et al.*, 2007, Briegel *et al.*, 2008). La última de estas técnicas reveló que estas agrupaciones forman arreglos hexagonales de 12 nm presuntamente constituidos por trímeros de homodímeros de quimiorreceptores, en los que cada vértice del hexágono posee un trímero (Khursigara *et al.*, 2008). Un estudio posterior confirmó que esta

arquitectura se encuentra conservada en varias especies bacterianas (Briegel *et al.*, 2009).

Las agrupaciones se estabilizan mediante la asociación de CheA y/o CheW (Maddock y Shapiro, 1993). La estequiometría entre los complejos ternarios puede variar por lo que el arreglo exacto dentro de la agrupación aún sigue siendo motivo de debate (Sourjik y Armitage, 2010). Los demás componentes quimiotácticos, como ya se mencionó, se localizan mediante interacciones con los complejos ternarios: CheR y CheB mediante el pentapéptido en el C-terminal de los receptores Tsr y Tar, CheZ a través de CheA_s, y CheY y CheB se asocian mediante la unión al dominio P2 de CheA.

La respuesta quimiotáctica en *E. coli* es muy sensible, ya que se ha demostrado que las células pueden responder a aumentos de 10 nM en la concentración de aspartato (Mao *et al.*, 2003). Se estima que un aumento en los sitios de unión de los receptores de tan sólo 0.2% resulta en un cambio de 23% en el sesgo de la rotación del motor, es decir, amplifican la señal aproximadamente 100 veces (Segall *et al.*, 1986). Este comportamiento se logra durante el procesamiento de la señal, ya que la señalización se lleva a cabo de forma cooperativa por medio de esta red interconectada de quimiorreceptores (Vaknin y Berg, 2008). De tal forma que los quimiorreceptores de diferentes tipos están mezclados en estas agrupaciones formando complejos entre los cuales ocurren interacciones alostéricas que integran múltiples estímulos y amplifican señales débiles (Sourjik y Berg, 2002b); brindándole a la bacteria la capacidad de responder a cambios muy pequeños de atrayentes y repelentes.

Señalización quimiotáctica en *E. coli*

Los eventos que ocurren durante la transducción de la señal quimiotáctica (**Figura 12**) se pueden separar en dos pasos, los cuales se detallan en los siguientes párrafos:

1) *Excitación*. Los quimiorreceptores, localizados en la membrana interna de las bacterias, detectan los atrayentes y los repelentes directamente o en algunos casos indirectamente por medio de la interacción con proteínas periplásmicas que se unen al efector y posteriormente al MCP (Mowbray y Koshland, 1987). Los cambios en las concentraciones de atrayentes y repelentes son detectados por los quimiorreceptores a

través de su dominio periplásmico de unión al ligando. La unión de un repelente o la salida del atrayente del sitio de unión induce un cambio conformacional en el receptor que se transmite hasta el dominio de señalización citoplásmico mediante un movimiento tipo pistón (Ottemann *et al.*, 1999). En el citoplasma, la proteína adaptadora CheW recibe esta señal y promueve la autofosforilación de la cinasa CheA, formando CheA-P (Borkovich y Simon, 1990). Posteriormente, el grupo fosforilo de CheA-P es transferido al regulador de respuesta CheY.

CheY es la proteína clave del sistema, ya que es quien modula la rotación del flagelo. CheY-P difunde a través del citoplasma y se une en la base del motor flagelar a la proteína del “switch” FliM y FliN. Esta unión induce un cambio en la dirección de rotación (CCW a CW) lo que ocasiona que la célula haga “tumble” y por lo tanto se reorienta (Welch *et al.*, 1993). La desfosforilación de CheY-P se lleva a cabo por la actividad de la fosfatasa CheZ, quien permite la terminación de la señal. Los repelentes aumentan los niveles de CheY-P, lo que favorece la rotación CW o lo que es lo mismo eventos de reorientación, contrariamente los atrayentes disminuyen los niveles de CheY-P lo que provoca rotación CCW que se traduce en mayor tiempo de nado.

2) *Adaptación*. Como se mencionó la adaptación es un circuito de retroalimentación que funciona para restablecer el sistema, permitiéndole a la bacteria comparar condiciones previas con las actuales. Este proceso involucra la metilación reversible de los receptores por medio de las enzimas CheB y CheR.

La cinasa CheA también fosforila a CheB, un segundo regulador de respuesta. La forma fosforilada de CheB (CheB-P) es una metilesterasa que remueve los grupos metilo de los quimiorreceptores, función antagónica a la de la enzima CheR, una metiltransferasa que cataliza su metilación. El grado de metilación de los receptores está relacionado con el proceso de adaptación (Levit y Stock, 2002). Ante el estímulo de un atrayente, CheA se encuentra inactiva y por lo tanto los niveles de CheY-P y CheB-P permanecen bajos, es decir, se favorece la rotación CCW. Debido a que la actividad de CheR es constitutiva, el estado de metilación de los receptores aumenta. Consecuentemente, los MCPs metilados inducen la activación de CheA, a pesar de que la concentración del atrayente sea la misma (Li y Weis, 2000). Como resultado, se elevan los niveles de CheB-P, quien remueve los grupos metilo de los receptores. Los

receptores en su estado desmetilado pierden su capacidad de activar a CheA, restableciendo la actividad de CheA a los niveles previos al estímulo. De esta forma, las reacciones de metilación/desmetilación le permiten a la bacteria volver a la frecuencia de reorientación basal.

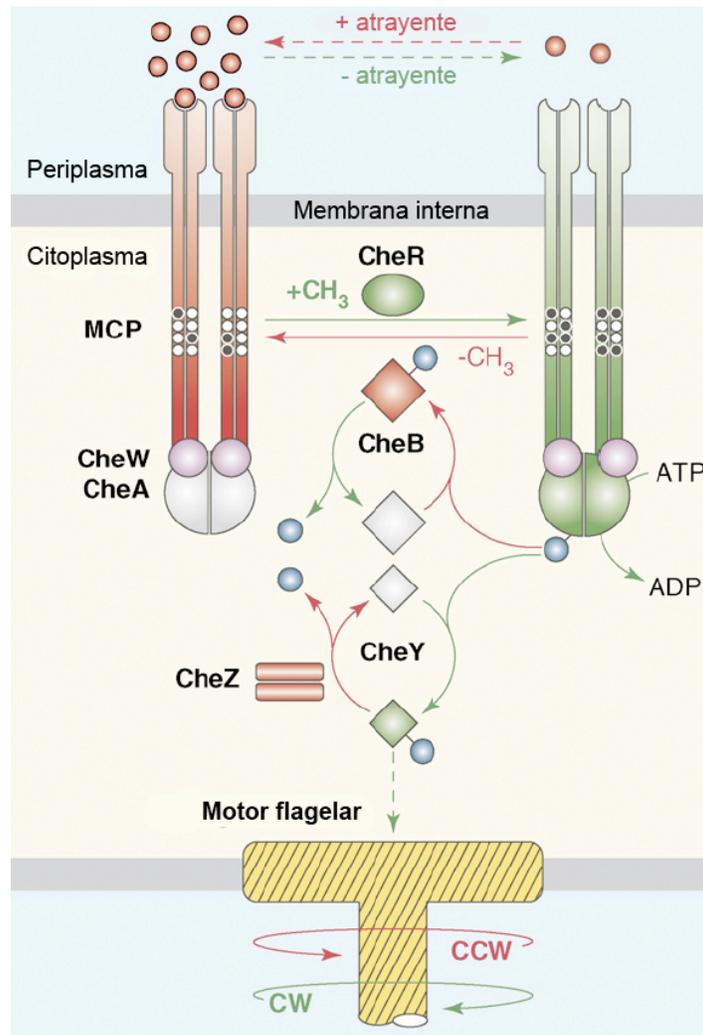


Figura 12. Vía de señalización quimiotáctica de *E. coli*. En verde se muestran los componentes que inducen rotación CW y en rojo aquellos que promueven rotación CCW. Ver el texto para más detalles. Modificado de Hazelbauer *et al.*, 2008.

Mecanismo de “switching”

Como se mencionó el complejo “switch” está formado por las proteínas FliG, FliM y FliN, a pesar de conocer la estructura y las funciones de dichas proteínas el mecanismo por el cual el motor cambia de dirección de rotación se desconocía.

Recientemente, se propuso el modelo que se describe a continuación (Paul *et al.*, 2011a).

La proteína CheY-P activa el cambio en la rotación de CCW a CW uniéndose a FliM y FliN en la parte baja del anillo C. Esta unión induce movimientos pequeños de las subunidades FliM_C y de los tetrámeros de FliN. Dichos movimientos alteran los contactos de FliM_M y FliG_C provocando la inclinación de estos dominios y finalmente la rotación de los dominios FliG_C, lo que reorienta los sitios de interacción con el estator aproximadamente 90°. De acuerdo con la actual hipótesis sobre el mecanismo de rotación del motor, este cambio en la orientación de FliG sería suficiente para el sentido de la rotación, ver **Figura 13**.

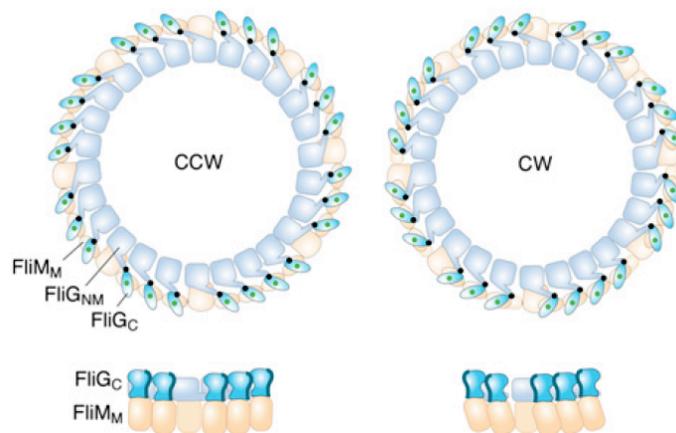


Figura 13. Modelo del mecanismo de “switching” del motor flagelar. En la parte superior se muestra la vista distal del anillo C, se puede observar la rotación del dominio FliG_C cuando el motor pasa de estado CCW a CW. En la parte inferior se muestra la vista lateral en donde se muestra el movimiento de FliM_M. Tomado de Paul *et al.*, 2011a.

En un estudio reciente usando microscopía de fluorescencia de reflexión interna total o TIRF (“*total internal reflection fluorescence*”) se observó la localización de CheY fusionada a una proteína verde fluorescente CheY-GFP (“*green fluorescent protein*”) mientras el motor rotaba (Fukuoka *et al.*, 2013). De acuerdo con estos resultados se necesitan en promedio 13 moléculas de CheY para inducir el cambio en el sentido de rotación de CCW a CW. Este número es menor al número de moléculas

de FliM presentes en el anillo C, sin embargo, como se ha propuesto en varios modelos existe una fuerte cooperatividad en la unión y la disociación de CheY al motor flagelar (Alon *et al.*, 1999, Cluzel *et al.*, 2000). Lo que reafirma el modelo propuesto en el que el cambio conformacional que sufre una subunidad de FliM por la unión de CheY-P se propaga hacia las subunidades vecinas para inducir el “switching”.

Quimiotaxis en *Bacillus subtilis*

La vía de señalización de *E. coli* es la más conocida y en la que se basan los modelos de la quimiotaxis bacteriana. Sin embargo, cada vez son más comunes los ejemplos de bacterias en los que la quimiotaxis, aunque basada en los mismos principios, es mucho más compleja. Bacterias, como *B. subtilis*, poseen un mayor número de receptores (inclusive citoplásmicos) y proteínas quimiotácticas; e inclusive presentan estrategias alternativas en la fase de adaptación y durante la terminación de la señal.

B. subtilis una bacteria Gram positiva con flagelos peritricos. La vía de señalización quimiotáctica de esta bacteria ocurre al revés que en *E. coli*. Es decir, aunque la vía de excitación ocurre a través de CheA, las reacciones de fosforilación suceden al revés. De tal forma que un aumento en la concentración de un atrayente incrementa la actividad de CheA y por lo tanto aumenta la concentración de CheY-P. En *B. subtilis*, la unión de CheY-P al motor flagelar promueve el nado en lugar de un evento de reorientación como en *E. coli* (Bischoff y Ordal, 1991).

Dentro de las diferencias más importantes, con respecto a *E. coli*, se encuentra la fase de adaptación; ya que *B. subtilis* posee tres mecanismos diferentes: la metilación de los quimiorreceptores (Goldman y Ordal, 1984), el sistema CheC/CheD/CheY (Muff y Ordal, 2007) y el sistema CheV (Karatan *et al.*, 2001). El mecanismo de metilación de los receptores es diferente entre los dos organismos, a pesar de tener las mismas enzimas CheB y CheR (Kirsch *et al.*, 1993b, Kirsch *et al.*, 1993a). En *B. subtilis* los receptores se desmetilan cuando se agrega o se remueve el atrayente (Thoelke *et al.*, 1989), por lo que se predice que la metilación de ciertos residuos activa a CheA mientras que la metilación de otros inhibe a la cinasa. De acuerdo con esta idea, el receptor McpB de *B. subtilis* posee dos sitios de metilación:

Glu630 y Glu637. La metilación del residuo 630 y la desmetilación del residuo 637 activa al receptor, mientras que la desmetilación del residuo 630 y la metilación del 637 inhibe al receptor (Zimmer *et al.*, 2000). El segundo sistema está conformado por CheD una desamidasa de residuos de glutamina (Kristich y Ordal, 2002) y CheC una fosfatasa de CheY-P (Szurmant *et al.*, 2004). CheD se une a los receptores provocando la activación de CheA (Kirby *et al.*, 2001). CheC controla la unión de CheD a los receptores a través de un mecanismo de competencia. CheY-P aumenta la afinidad de CheD por CheC, por lo que la concentración de CheY-P controla la unión de CheD a los receptores por medio de su interacción con CheC. Cuando los niveles de CheY-P aumentan, se incrementa la afinidad de CheD por CheC, como resultado la actividad de CheA disminuye ya que hay menos CheD unido a los receptores (Muff y Ordal, 2007). Por último se encuentra CheV, una proteína con dos dominios fusionados, un dominio N-terminal homólogo a CheW y un dominio C-terminal de regulador de respuesta (Fredrick y Helmann, 1994), este último puede fosforilarse por CheA (Karatan *et al.*, 2001). CheV acopla a los receptores y a la cinasa CheA, sin embargo, su función es redundante con CheW (Rosario *et al.*, 1994) por lo que su función específica durante la adaptación aún se desconoce.

Otra de las diferencias con *E. coli* es la ausencia de un homólogo de la fosfatasa CheZ, proteína ausente en la mayoría de las bacterias flageladas (Szurmant y Ordal, 2004). En su lugar *B. subtilis* posee otras dos enzimas que pertenecen a la familia de fosfatasas del tipo CheC. Dentro de esta familia se encuentran proteínas que poseen la secuencia consenso D/S-X₃-E-X₂-N-X₂₂-P que conforma el sitio activo (Park *et al.*, 2004). Pueden dividirse en tres subgrupos: CheC, FliY y CheX (Muff y Ordal, 2008). *B. subtilis* posee sólo a las fosfatasas FliY y CheC (Bischoff y Ordal, 1992, Rosario *et al.*, 1995). FliY presenta varios dominios, un dominio de unión a CheY en el N-terminal, un dominio central de fosfatasa y un dominio homólogo a FliN en el extremo C-terminal (Bischoff y Ordal, 1992). FliY se localiza en la base del flagelo donde forma parte del anillo C y es ahí donde hidroliza el fosfato de CheY-P (Szurmant *et al.*, 2003). La localización de FliY es distinta a la de CheZ de *E. coli*, es por esto que se desconoce la razón de esta localización, a pesar de esto es la principal fosfatasa de CheY-P.

ANTECEDENTES PARTICULARES

***Rhodobacter sphaeroides* como modelo de estudio**

R. sphaeroides es una bacteria púrpura no sulfurosa que pertenece al grupo de las α -proteobacterias. Se le considera una bacteria metabólicamente versátil dada su capacidad de crecer en diferentes ambientes. Puede crecer por respiración aeróbica o anaeróbica, fotosíntesis o fermentación. Durante el crecimiento fotoheterotrófico utiliza una variedad de compuestos orgánicos como fuente de carbono y poder reductor (Clayton y Sistrom, 1978); en condiciones fotoautotróficas, en la ausencia de oxígeno, emplea al dióxido de carbono como fuente de carbono y al hidrógeno como poder reductor (Woese *et al.*, 1984). En la oscuridad en presencia de oxígeno, presenta crecimiento quimioheterotrófico usando compuestos orgánicos reducidos como fuente de carbono y poder reductor (Clayton y Sistrom, 1978); y también crecimiento quimioautotrófico utilizando dióxido de carbono como fuente de carbono e hidrógeno como poder reductor (Woese *et al.*, 1984). Además, en condiciones con bajas fuentes de nitrógeno exhibe crecimiento diazotrófico. *R. sphaeroides* se ha estudiado ampliamente como organismo modelo de la fotosíntesis anoxigénica (Allen y Williams, 2011, Jones, 2009).

El genoma completo de *R. sphaeroides* 2.4.1, cepa comúnmente utilizada para estudios de la fotosíntesis, se secuenció en el 2001 (Mackenzie *et al.*, 2001). El genoma de esta cepa está compuesto por dos cromosomas circulares (I y II) y cinco plásmidos (A, B, C, D y E). La secuenciación reveló la existencia de varios genes duplicados o multiplicados; tales como algunos genes del metabolismo de carbono, de lípidos y de aminoácidos, oxidoreductasas, genes reguladores, genes de replicación y partición, genes de transporte de nutrientes y genes de respuesta a choque de calor. Además de los genes mencionados, se encontró la presencia de dos grupos de genes flagelares (**Figura 14**) y múltiples copias de los genes quimiotácticos. Sin embargo, la cepa que comúnmente se utiliza para los estudios de motilidad es la cepa WS8N, debido a que posee una mayor capacidad de nado en comparación con la cepa 2.4.1. Afortunadamente, el genoma de esta cepa se secuenció y se liberó recientemente (Porter *et al.*, 2011b). El genoma de la WS8N consta de dos cromosomas circulares,

3.14 y 0.97 Mb, y dos plásmidos endógenos de 200 y 100 kb; posee un contenido de GC de 69.1% y contiene alrededor de 4,205 marcos de lectura abierta. Al igual que la cepa 2.4.1 presenta dos conjuntos de genes flagelares (*fla1* y *fla2*) y 33 genes que codifican para proteínas quimiotácticas.

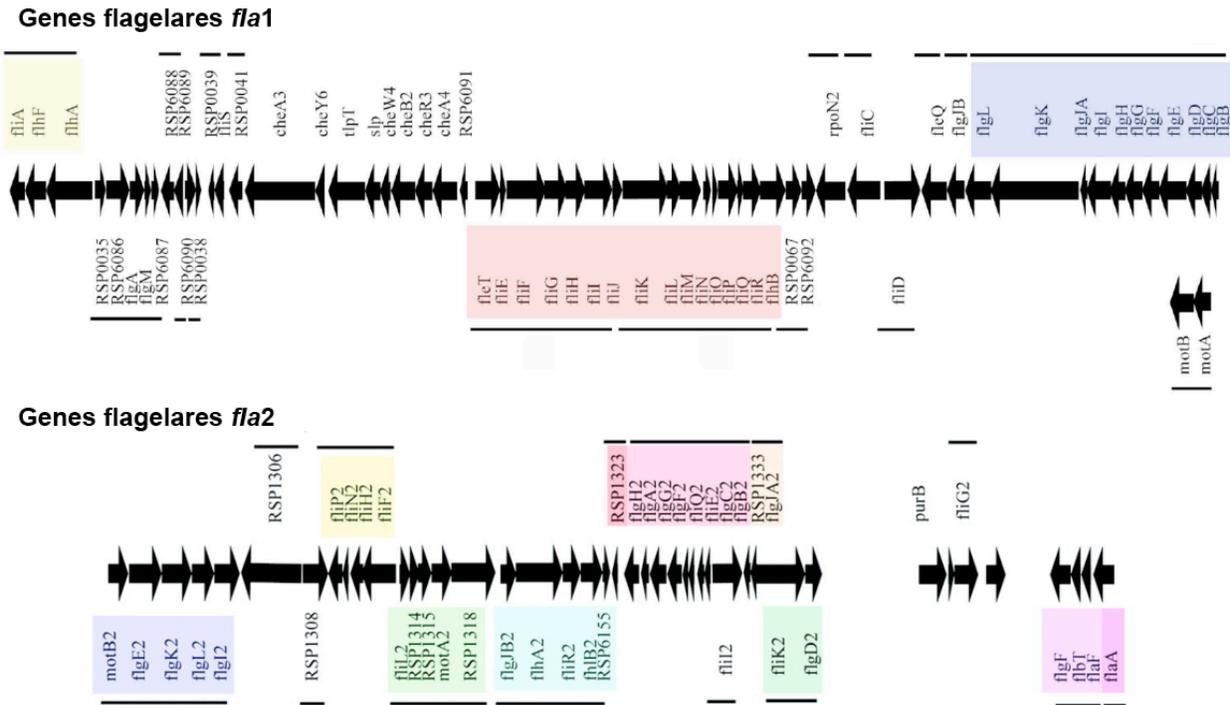


Figura 14. Organización genética de los genes flagelares *fla1* y *fla2* de *R. sphaeroides*. Las flechas representan los genes y la dirección de su transcripción. Las líneas y los colores muestran la posible organización de los operones. Modificado de Poggio *et al.*, 2007.

El flagelo de *R. sphaeroides* o el sistema flagelar 1 (Fla1)

En condiciones normales de laboratorio, *R. sphaeroides* ensambla un flagelo único de localización subpolar, ver **Figura 15A**. De acuerdo con varios estudios bioquímicos y genéticos, los genes que codifican para las proteínas que ensamblan este flagelo se localizan en la agrupación *fla1* (Ballado *et al.*, 1996, Ballado *et al.*, 2001, de la Mora *et al.*, 2007, García *et al.*, 1998, González-Pedrajo *et al.*, 1997, González-Pedrajo *et al.*, 2002, Poggio *et al.*, 2000, Poggio *et al.*, 2001, Poggio *et al.*, 2005, Ramírez-Cabrera *et al.*, 2012, Suaste-Olmos *et al.*, 2010), (**Figura 14**).

Estructura

El flagelo 1 posee un filamento con un diámetro de 20 nm que se extiende el equivalente a varios cuerpos celulares. Al igual que el de *E. coli* y *S. enterica* sufre transiciones polimórficas. Durante el nado se han observado tres conformaciones: enrollada, helicoidal y recta (Armitage *et al.*, 1999).

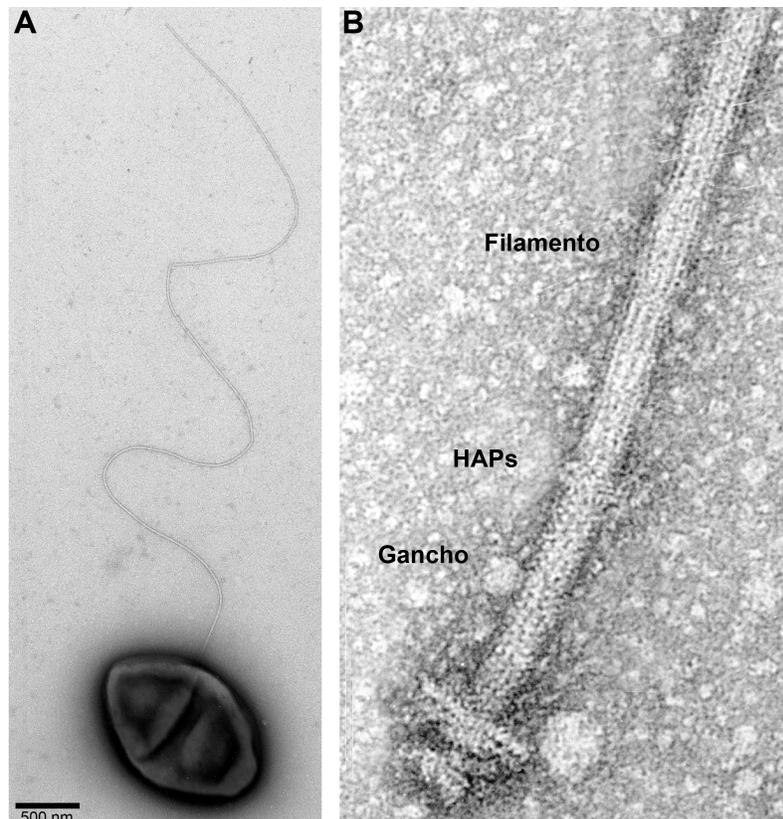


Figura 15. Imágenes de microscopía electrónica del flagelo 1 de *R. sphaeroides*. **A)** Célula de la cepa WS8N en la que se observa un flagelo único de localización subpolar. **B)** Estructura del complejo filamento-gancho-cuerpo basal. Se observa el gancho recto y un engrosamiento en la zona de las HAPs. Fotografías obtenidas en nuestro laboratorio.

Dos estudios diferentes aislaron los complejos filamento-gancho-cuerpo basal del flagelo 1 de *R. sphaeroides* (Kobayashi *et al.*, 2003, West y Dreyfus, 1997). En ambas investigaciones se encontró que las principales diferencias estructurales se hallaban en el gancho y en la interfase gancho-filamento (**Figura 15B**). De manera opuesta al gancho curvo de los flagelos de *E. coli* y *S. enterica*, el flagelo 1 posee un gancho recto. Un análisis posterior identificó una zona rica en prolinas cerca del extremo amino

terminal de la proteína FlgE de *R. sphaeroides*, la cual está ausente en FlgE de *S. enterica*. Es interesante que, al hacer una ablación de esta región rica en prolinas las células ensamblaban un flagelo con gancho curvo, que afecta el comportamiento de nado de las bacterias (Ballado *et al.*, 2001). Observación que sugiere que se necesita un gancho recto para un nado eficiente. Por otro lado, en la zona correspondiente a HAP1 y HAP3 se observó un engrosamiento producto del inusual tamaño de la proteína FlgK (1363 aa, contra los 552 aa de FlgK de *S. enterica*). En un trabajo posterior se estableció que una región central no conservada (860 aa) de FlgK es la responsable del tamaño inusual de la proteína (Castillo *et al.*, 2009).

Patrón de nado

La velocidad de nado promedio de *R. sphaeroides* cuando se desplaza con el flagelo 1 es de aproximadamente 27 $\mu\text{m/s}$ (Armitage *et al.*, 1999). Al igual que *E. coli*, presenta un patrón de nado tridimensional aleatorio con periodos de nado interrumpidos por eventos de reorientación, pero a diferencia de ésta, *R. sphaeroides* se detiene en lugar de hacer “tumble”. Esto se debe a que el flagelo 1 posee un motor dependiente de H^+ que, de manera contraria al motor bidireccional de *E. coli*, rota unidireccionalmente (Armitage y Macnab, 1987, Packer *et al.*, 1994). Actualmente se cree que la rotación en sentido CCW produce el nado y que la reorientación ocurre por la relajación del filamento, el cual pasa de la forma helicoidal a la enrollada cuando el motor para (Armitage *et al.*, 1999). Utilizando una trampa óptica, un estudio reciente, demostró que la unión de CheY-P provoca un bloqueo en el motor, lo que significa que el motor Fla1 de *R. sphaeroides* se detiene utilizando un sistema de frenado (Pilizota *et al.*, 2009).

Aún se desconoce por qué existen dos tipos de motores (bidireccional vs. unidireccional) y también se ignoran las bases moleculares de estas diferencias; ya que a nivel de secuencia las proteínas del motor y del estator están altamente conservadas.

Quimiotaxis en *R. sphaeroides*

R. sphaeroides presenta una respuesta táctica positiva ante varios estímulos entre los que se encuentran ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos, luz y oxígeno (Armitage *et al.*, 1979, Sockett *et al.*, 1987). Se ha reportado que la respuesta

quimiotáctica hacia algunos atrayentes requiere tanto de su transporte como de su metabolismo (Gauden y Armitage, 1995, Grishanin *et al.*, 1997, Ingham y Armitage, 1987, Jeziore-Sassoon *et al.*, 1998, Poole y Armitage, 1989, Poole *et al.*, 1993). A la fecha no se han encontrado repelentes; sin embargo, dependiendo de las condiciones de crecimiento puede mostrar una respuesta negativa; por ejemplo: el oxígeno es un repelente y la luz un atrayente durante el crecimiento fotoheterotrófico, mientras que el oxígeno es un atrayente y la luz un repelente bajo crecimiento aeróbico (Armitage y Evans, 1981).

La regulación de la quimiotaxis en *R. sphaeroides* es más compleja que la de sus contrapartes entéricas debido a la presencia de múltiples genes reiterados. Aunque en principio la vía de señalización es similar a la de *E. coli*, se han encontrado peculiaridades y componentes novedosos.

Genes quimiotácticos reiterados

Como se mencionó, *R. sphaeroides* posee en su genoma 33 genes que codifican para proteínas quimiotácticas, entre ellas se encuentran: 13 quimiorreceptores (9 transmembranales y 4 citoplásmicos), 4 CheW, 4 CheA, 6 CheY, 2 CheB, 3 CheR y 1 CheD. La mayoría de los genes están localizados en el cromosoma I, con la excepción de 6 quimiorreceptores y un regulador de respuesta, lo cuales están alojados en el cromosoma II (Porter *et al.*, 2011b). Cabe mencionar, que el genoma no presenta homólogos de la proteína CheV, ni de las fosfatasa de CheY-P descritas hasta ahora CheZ, CheC y FliY (Porter *et al.*, 2011a).

Con la excepción de los genes que codifican para los receptores, que suelen estar distribuidos a lo largo del genoma, la mayoría de los genes quimiotácticos están organizados en tres *loci* que potencialmente codifican para vías quimiotácticas completas, llamados *cheOp1*, *cheOp2* y *cheOp3* (Ward *et al.*, 1995a, Ward *et al.*, 1995b, Hamblin *et al.*, 1997b, Porter *et al.*, 2002), ver **Figura 16**. En el *cheOp1* se encuentran los genes que codifican para las siguientes proteínas: CheY5, McpB, TlpS, McpA, CheD, CheY1, CheA1, CheW1, CheR1, CheY2 y un marco de lectura abierta RSP2432. Los genes que codifican para las proteínas CheY3, CheA2, CheW2, CheW3, CheR2, CheB1 y TlpC se localizan en el *cheOp2*. Finalmente, dentro del *cheOp3* están

ubicados los genes que codifican para CheA4, CheR3, CheB2, CheW4, PpfA, TlpT, CheY6 y CheA3. El gen que codifica para CheY4 se encuentra fuera de estos loci junto al receptor McpG en el cromosoma chico (Shah *et al.*, 2000a).

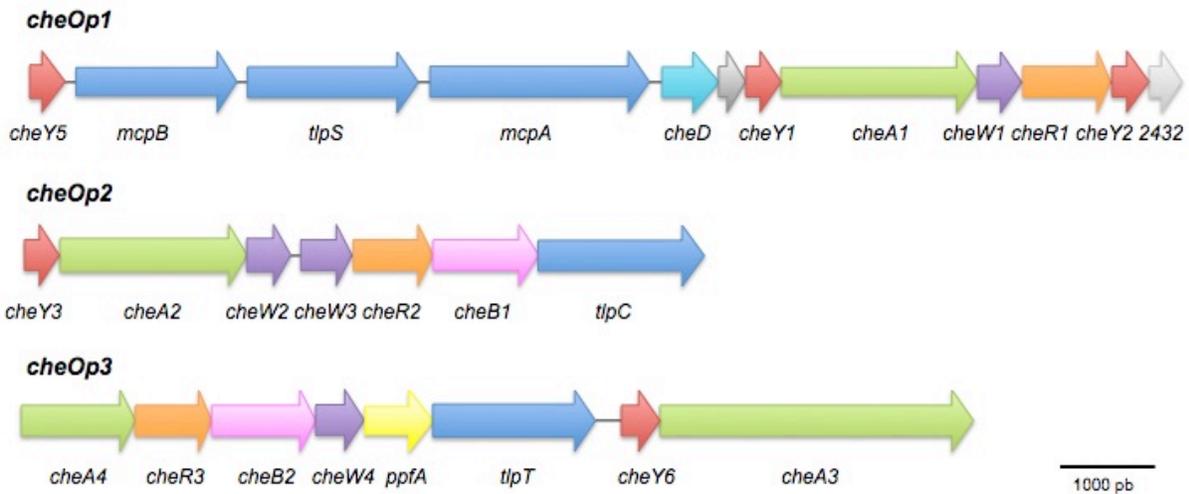


Figura 16. Organización genética de los *loci* quimiotácticos de *R. sphaeroides*. Las flechas representan los genes y la dirección de su transcripción. En rojo se muestran los genes que codifican para los reguladores de respuesta, en azul para los quimiorreceptores, en verde para las cinasas, en morado para las proteínas adaptadoras, en naranja para las metiltransferasas y en rosa para las metilesterasas.

Los estudios en los que se aislaron mutantes nulas de cada uno de los genes localizados en estos *loci* y la ablación completa de *cheOp1*, *cheOp2* o *cheOp3* (Ward *et al.*, 1995a, Ward *et al.*, 1995b, Hamblin *et al.*, 1997a, Hamblin *et al.*, 1997b, Shah *et al.*, 2000b, Martin *et al.*, 2001b, Martin *et al.*, 2001a, Porter *et al.*, 2002), demostraron que tanto *cheOp2* y *cheOp3* son esenciales para regular la respuesta quimiotáctica del flagelo 1. Específicamente, las proteínas que se requieren son TlpC, TlpT, CheW2, CheW3, CheW4, CheA2, CheA3, CheA4, CheR2, CheR3, CheB1, CheB2 y PpfA. Además, se requiere de los reguladores de respuesta CheY6 y CheY3 o CheY4, la función de CheY3 y CheY4 es redundante (Porter *et al.*, 2006).

Formación de complejos quimiotácticos

Cada *loci* codifica para vías de señalización independientes. A través de estudios de microscopía electrónica y de microscopía de fluorescencia se determinó la localización celular de diferentes proteínas quimiotácticas. Los receptores

transmembranales junto con los productos del *cheOp2* CheW2, CheW3, CheA2 y CheR2 forman puntos discretos que se localizan en los polos de la célula (Wadhams *et al.*, 2000, Martin *et al.*, 2001a, Martin *et al.*, 2003, Wadhams *et al.*, 2003). Mientras que los receptores citoplásmicos y las proteínas codificadas en el *cheOp3* CheW4, CheA3, CheA4 y CheR3 forman una agrupación citoplásmica aproximadamente a la mitad de la célula (Wadhams *et al.*, 2002, Wadhams *et al.*, 2003). En la **Figura 17** se muestran estas dos vías de señalización.

Aún se desconoce por qué se necesitan dos complejos independientes para la quimiotaxis, sin embargo se especula que la agrupación membranal detecta las señales del medio extracelular, mientras que la citoplásmica monitorea el estado metabólico de la célula (Porter *et al.*, 2008b).

Los receptores citoplásmicos y membranales forman complejos de señalización separados, cada uno con su propia proteína adaptadora y cinasa. Al igual que en *E. coli*, el complejo transmembranal requiere de CheW2, CheW3 y CheA2 para su formación (Martin *et al.*, 2001a, Martin *et al.*, 2003, Wadhams *et al.*, 2003, Wadhams *et al.*, 2005), contrariamente el cluster citoplásmico se forma aún en la ausencia de CheA3 y CheA4 y sólo requiere de TlpT y CheW4 para su ensamblaje (Wadhams *et al.*, 2003, Wadhams *et al.*, 2005). Sin embargo, la agrupación citoplásmica requiere de la proteína PpfA para su localización y su segregación. Esta proteína es homóloga a ParA la cual está involucrada en la segregación de los plásmidos y los cromosomas. Las mutantes nulas de *ppfA* muestran una localización aberrante de la agrupación y durante la división sólo una célula hereda la agrupación mientras que la otra empieza a sintetizarlo *de novo* (Thompson *et al.*, 2006). Este mecanismo de partición de un complejo proteico es similar a la forma en la que las bacterias segregan los cromosomas y los plásmidos durante la división celular. Recientemente se demostró que al igual que las proteínas ParA, PpfA co-localiza con el DNA cromosomal de *E. coli* (Roberts *et al.*, 2012).

La ausencia de alguna de las proteínas de cualquier agrupación suprime la quimiotaxis lo que quiere decir que se requiere de ambas para la señalización quimiotáctica del flagelo 1. Por lo tanto, las señales de ambas agrupaciones deben integrarse para producir una respuesta adecuada. Los componentes que comparten las dos vías de señalización son las proteínas que generan la respuesta final, CheY3,

CheY4, CheY6, CheB1 y CheB2. Indicando que probablemente a través de estos componentes es como se integra la señal de ambos complejos.

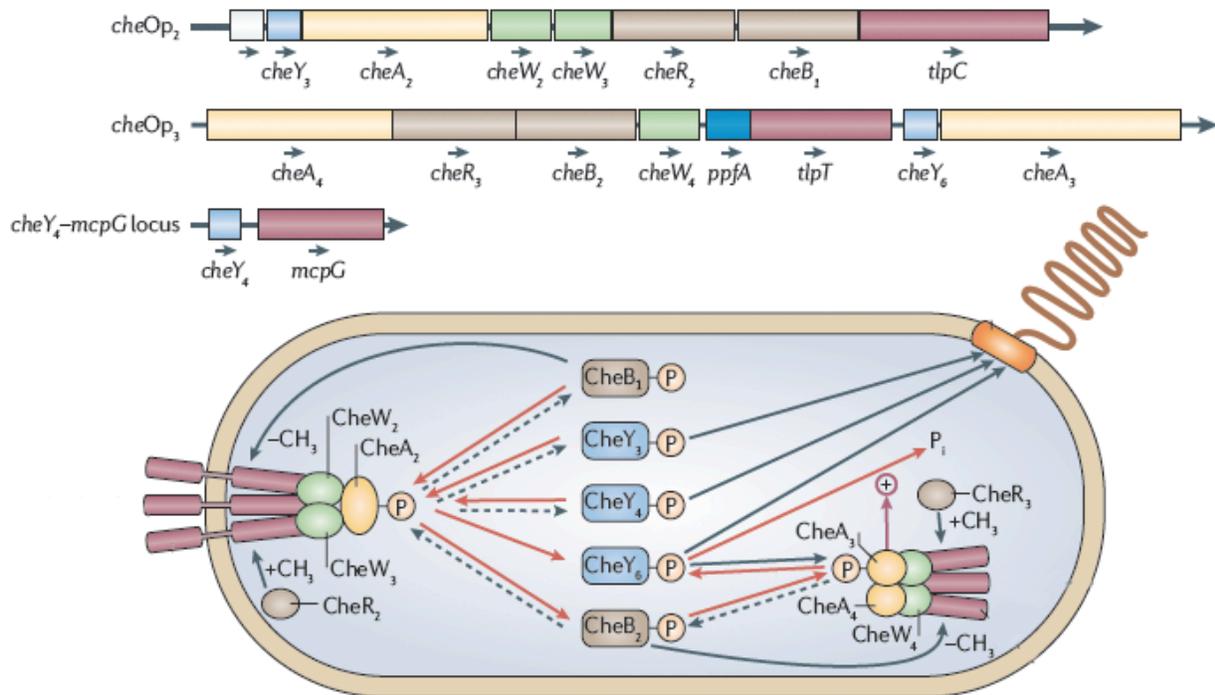


Figura 17. Vía de señalización quimiotáctica del sistema flagelar 1 de *R. sphaeroides*. El *cheOp2*, mostrado en la parte superior, codifica para los componentes membranales. Por otro lado, en el *cheOp3* se encuentran codificadas las proteínas que forman las agrupaciones citoplásmicas. Ver el texto para más detalles. Modificado de Porter *et al.*, 2011a.

Especificidad de las cinasas

R. sphaeroides posee cuatro homólogos de la cinasa CheA, pero sólo tres son esenciales cuando la bacteria nada con el flagelo 1: CheA2, CheA3 y CheA4. Tanto CheA1 como CheA2 son cinasas canónicas, es decir, contienen los cinco dominios (P1-P5) que las distinguen (Porter y Armitage, 2002). Sin embargo, CheA3 y CheA4 carecen de algunos dominios; CheA3 únicamente presenta los dominios P1 y P5 y CheA4 sólo tiene los dominios P3, P4 y P5. Por medio de ensayos de autofosforilación *in vitro* se determinó que ninguna de las dos proteínas posee actividad de cinasa. Pero si se incubaban juntas las dos proteínas se formaba una cinasa funcional, ya que el dominio cinasa de CheA4 puede fosforilar el dominio P1 de CheA3 (Porter y Armitage, 2004).

En *E. coli* CheA fosforila a CheY y CheB, en *R. sphaeroides* las reacciones de fosfotransferencia son más complejas debido a la presencia no sólo de varias cinasas

sino también de múltiples homólogos de CheY y CheB. Algunos trabajos previos de fosfotransferencia *in vitro* demostraron que cada CheA fosforila selectivamente a los reguladores de respuesta (Porter y Armitage, 2002). CheA2 es la única proteína capaz de fosforilar a todas las proteínas CheY1, CheY2, CheY3, CheY4, CheY5, CheY6, CheB1 y CheB2. Por su parte CheA1 transfiere el grupo fosforilo sólo a CheY1, CheY2, CheY3 y CheY5, y por último el complejo CheA3CheA4 fosforila únicamente a CheY1, CheY6 y CheB2 (Porter y Armitage, 2004). Un análisis de proteínas quiméricas mostró que el dominio determinante para establecer la especificidad de la fosfotrasferencia es el dominio P1 (Scott *et al.*, 2010).

Cada proteína CheA está asociada a una agrupación diferente por lo que reciben señales distintas para su activación generando la respuesta mediante diferentes reguladores de respuesta. CheA2 se encuentra en la agrupación membranal y genera una respuesta a través de CheY3-P, CheY4-P y CheY6-P, la proteína responsable de parar el motor flagelar. Mientras que CheA3CheA4, en el agrupación citoplásmica, produce una respuesta sólo mediante CheY6-P. Las tres CheYs en su estado fosforilado se pueden unir a FliM (Ferré *et al.*, 2004), la proteína del switch, sin embargo, el efecto de CheY3-P y CheY4-P sobre la rotación aún se desconoce.

Terminación de la señal

Muchas bacterias poseen fosfatasas específicas de CheY-P para terminar la señal debido a que estas aumentan su tasa de desfosforilación. Hasta el momento se conocen dos tipos de fosfatasas CheZ y CheC/CheX/FliY. *R. sphaeroides* no posee homólogos de estas proteínas.

Algunas investigaciones recientes proponen que CheA3 es la fosfatasa específica de CheY6-P (Porter *et al.*, 2008a). Al mutar el residuo de histidina fosforilable de CheA3 se demostró que la desfosforilación no ocurre a través de una fosfotransferencia reversa, como se ha visto para otras cinasas, por lo que el mecanismo por el cual CheA3 desfosforila a CheY6-P aún se desconoce. También se ignora si los demás reguladores de respuesta se desfosforilan por alguna fosfatasa o por alguna estrategia alterna.

Descubrimiento de un segundo sistema flagelar 2 en *R. sphaeroides*

La secuenciación del genoma reveló la presencia de un segundo grupo de genes flagelares (*fla2*) en el cromosoma grande (Mackenzie *et al.*, 2001). En un principio se creía que esta agrupación se había originado por un evento de duplicación y que dada la ausencia de ciertos genes flagelares estructurales, los genes *fla2* no eran funcionales (Choudhary *et al.*, 2004). Sin embargo, en un análisis posterior se identificaron 30 genes flagelares en la agrupación y otros genes *fla2* en diferentes regiones del cromosoma, entre ellos *fliG2* y la flagelina *flaA*, ver **Figura 14**. En este mismo estudio, a partir de mutantes *fla1⁻*, se logró aislar cepas capaces de expresar los genes de la agrupación *fla2* y de ensamblar un flagelo funcional (Poggio *et al.*, 2007). De acuerdo con los resultados que se obtuvieron en ese trabajo, se presume que las cepas que nadan con el flagelo 2 presentan una o varias mutaciones. A la fecha se desconoce la identidad del gen o los genes responsables de inducir la expresión de sistema flagelar 2. Sin embargo se especula que dicha mutación pudiera involucrar un gen regulatorio, como un factor transcripcional que activa la expresión de los genes *fla2* bajo alguna condición que aún no se ha determinado. De manera alternativa, se ha sugerido que la expresión del flagelo 2 podría ser el resultado de la reversión de una mutación comúnmente presente en las cepas de laboratorio de *R. sphaeroides*.

Las células que expresan los genes *fla2* ensamblan dos a cuatro flagelos de localización polar (**Figura 18**) que utilizan para nadar en medio líquido. En cuanto a su estructura, el filamento de este flagelo es más delgado (10 nm) en comparación con el del flagelo 1 (20 nm) y su gancho es 30 nm más largo, pero en ambos casos es recto (Poggio *et al.*, 2007).

Existen ejemplos de diferentes especies bacterianas que poseen dos sistemas flagelares (Merino *et al.*, 2006), un tipo de flagelo se utiliza para el nado en ambientes líquidos y el otro para desplazarse en superficies sólidas; tal es el caso de *Vibrio parahaemolyticus* (Shinoda y Okamoto, 1977), *Rhodospirillum centenum* (Ragatz *et al.*, 1995), *Azospirillum brasilense* (Hall y Krieg, 1983), entre otras. Sin embargo, a diferencia de estas especies en *R. sphaeroides* no ocurre esa especialización, ya que ambos tipos de flagelo se utilizan para el nado en ambientes líquidos, por lo que aún se desconoce la razón por la que esta bacteria posee dos sistemas flagelares.

El análisis de la filogenia y la sintenia de los genes flagelares reveló que los genes de la agrupación *fla1*, los que expresa la bacteria en condiciones de laboratorio, fueron adquiridos por transferencia horizontal de una γ -proteobacteria; mientras que la agrupación *fla2* contiene los genes nativos de *R. sphaeroides* (Poggio *et al.*, 2007). En este análisis también se encontraron otras tres α -proteobacterias (*Loktanella vestfoldensis*, *Erythrobacter* sp. y *Zymomonas mobilis*) con genes flagelares adquiridos lateralmente (*fla1*), sin embargo estas bacterias no poseen la agrupación original (*fla2*). Lo que sugiere que la conservación del flagelo 2 en *R. sphaeroides* es resultado de selección positiva.

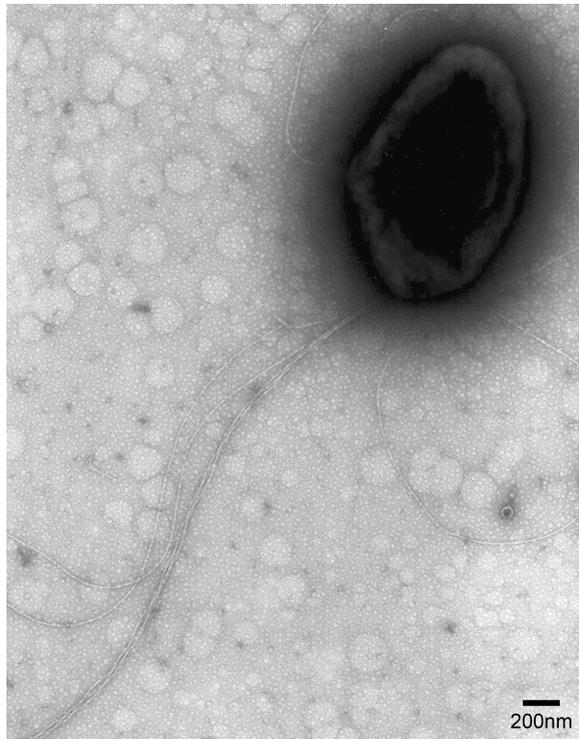


Figura 18. El flagelo 2 de *R. sphaeroides*. Fotografía de microscopía electrónica de la cepa AM1 (*fla1⁻ fla2⁺*), se observa un patrón de flagelación lofotrico. Imagen obtenida de nuestro laboratorio.

Quimiotaxis y el flagelo 2

La existencia de dos sistemas flagelares y de múltiples genes quimiotácticos reiterados nos llevó a preguntarnos ¿cuáles proteínas son las responsables de la

respuesta quimiotáctica del flagelo 2? En un estudio anterior, en el que se aislaron mutantes de los seis reguladores de respuesta, se demostró que sólo CheY1, CheY2 y CheY5, codificados dentro del *cheOp1*, se necesitan para el control quimiotáctico del sistema Fla2. Esta fue la primera vez que se observó un fenotipo asociado a genes dentro de este *locus*. Por lo tanto, el flagelo 1 y 2 son controlados por diferentes reguladores de respuesta (del Campo *et al.*, 2007). En este mismo estudio se encontró un marco de lectura abierta (*RSP6099*), localizado fuera del conjunto de genes *fla2*, homólogo al gen *fliM* del flagelo 1. Al eliminar este gen se comprobó que codifica para la proteína del “switch” del flagelo 2 de *R. sphaeroides*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el genoma de *R. sphaeroides* se encuentran codificados dos conjuntos de genes flagelares, *fla1* y *fla2*. Los genes del primer grupo (*fla1*) se expresan en condiciones de laboratorio y se requieren para la síntesis de un sólo flagelo subpolar; el cual permite el nado de la cepa silvestre WS8N. Los componentes, la regulación, y el funcionamiento del sistema flagelar 1 se han dilucidado en diversos trabajos. Sin embargo, la función del segundo grupo de genes flagelares (*fla2*) permaneció por mucho tiempo desconocida hasta que en un estudio reciente se aislaron mutantes que expresan estos genes. Las mutantes aisladas son capaces de ensamblar múltiples flagelos localizados en un polo de la célula.

Además de poseer dos sistemas flagelares *R. sphaeroides*, presenta un sistema quimiotáctico que parece ser más complejo que el de sus contrapartes entéricas, ya que posee varios genes quimiotácticos reiterados: dos *cheB*, cuatro *cheW*, tres *cheR*, cuatro *cheA*, seis *cheY*, trece quimiorreceptores, pero ningún homólogo de *cheZ*. Con la excepción de los genes que codifican para los receptores, que suelen estar distribuidos a lo largo del genoma, los genes quimiotácticos están organizados en tres *loci* (*cheOp1*, *cheOp2* y *cheOp3*) que potencialmente codifican para vías quimiotácticas completas.

Algunos trabajos previos han demostrado que *cheOp2* y *cheOp3* son esenciales para el control quimiotáctico del sistema Fla1. Sin embargo, las mutantes de los genes del *cheOp1* o inclusive la ablación del *locus* no tienen efecto sobre la respuesta quimiotáctica de este sistema flagelar. Estas evidencias sugerían que *cheOp1* era prescindible para *R. sphaeroides*.

No obstante, nuestro grupo de trabajo encontró que sólo los reguladores de respuesta CheY1, CheY2 y CheY5, los cuales están localizados en el *cheOp1*, se necesitan para el control quimiotáctico del sistema Fla2. Esta es la primera vez que se observa un fenotipo asociado a genes dentro de este operón. Por otra parte, en otro estudio se reportó que las proteínas CheY6 y CheY3 o CheY4 modulan la respuesta quimiotáctica del sistema Fla1. Estos descubrimientos sugieren que el *cheOp1* juega un papel importante en la regulación quimiotáctica del sistema flagelar 2, y que probablemente *R. sphaeroides* posee vías quimiotácticas independientes para cada

sistema flagelar. La caracterización de mutantes de los genes del *cheOp1* puede generar información sobre el papel que estas proteínas juegan en *R. sphaeroides*.

HIPÓTESIS

El operón quimiotáctico 1 (*cheOp1*) de *R. sphaeroides* se requiere para el control quimiotáctico del sistema flagelar 2.

OBJETIVOS

General

Caracterizar al sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides*, así como analizar el papel que desempeñan las proteínas codificadas en el *cheOp1* en la respuesta quimiotáctica del flagelo 2.

Particulares

- Determinar la dirección de rotación (sesgo rotacional) del flagelo 2.
- Caracterizar qué fuente de energía impulsa el motor del sistema flagelar 2.
- Generar mutantes por interrupción de los genes localizados en *cheOp1* en los fondos genéticos: *fla1⁺ fla2⁻* y *fla1⁻ fla2⁺*.
- Caracterización fenotípica de las mutantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y plásmidos

En la **Tabla 2** se enlistan las cepas y los plásmidos utilizados en este estudio.

Tabla 2. Cepas y plásmidos		
Cepa o plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>Cepas de E. coli</i>		
TOP10	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara leu)7697$ <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^r) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
S17-1	<i>recA</i> <i>endA</i> <i>thi</i> <i>hsdR</i> RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7; Tp ^r Sm ^r	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Cepas de R. sphaeroides</i>		
WS8N	Cepa silvestre; Nal ^r	Sockett <i>et al.</i> , 1990
RS1Y5	WS8N <i>cheY5::aadA</i> ; Nal ^r Spc ^r	Este trabajo
RS1B	WS8N <i>mcpB::aadA</i> ; Nal ^r Spc ^r	Este trabajo
RS1S	WS8N <i>tlpS::aadA</i> ; Nal ^r Spc ^r	Este trabajo
RS1A	WS8N <i>mcpA::aadA</i> ; Nal ^r Spc ^r	Este trabajo
RS1D	WS8N <i>cheD::aadA</i> ; Nal ^r Spc ^r	Este trabajo
RS1Y1	WS8N <i>cheY1::aadA</i> ; Nal ^r Spc ^r	Este trabajo
RS1A1	WS8N <i>cheA1::aadA</i> ; Nal ^r Spc ^r	Este trabajo
RS1W1	WS8N <i>cheW1::aadA</i> ; Nal ^r Spc ^r	Este trabajo
RS1R1	WS8N <i>cheR1::aadA</i> ; Nal ^r Spc ^r	Este trabajo
RS1Y2	WS8N <i>cheY2::aadA</i> ; Nal ^r Spc ^r	Este trabajo
RS12432	WS8N <i>RSP2432::aadA</i> ; Nal ^r Spc ^r	Este trabajo
AM1	<i>flaQ</i> Δ ::Kan <i>fla2</i> ⁺ ; Nal ^r Km ^r	del Campo <i>et al.</i> , 2007
RS2Y5	AM1 <i>cheY5::aadA</i> ; Nal ^r Km ^r Spc ^r	del Campo <i>et al.</i> , 2007
RS2B	AM1 <i>mcpB::aadA</i> ; Nal ^r Km ^r Spc ^r	Este trabajo
RS2S	AM1 <i>tlpS::aadA</i> ; Nal ^r Km ^r Spc ^r	Este trabajo
RS2A	AM1 <i>mcpA::aadA</i> ; Nal ^r Km ^r Spc ^r	Este trabajo
RS2D	AM1 <i>cheD::aadA</i> ; Nal ^r Km ^r Spc ^r	Este trabajo
RS2Y1	AM1 <i>cheY1::aadA</i> ; Nal ^r Km ^r Spc ^r	del Campo <i>et al.</i> , 2007
RS2A1	AM1 <i>cheA1::aadA</i> ; Nal ^r Km ^r Spc ^r	Este trabajo
RS2W1	AM1 <i>cheW1::aadA</i> ; Nal ^r Km ^r Spc ^r	Este trabajo
RS2R1	AM1 <i>cheR1::aadA</i> ; Nal ^r Km ^r Spc ^r	Este trabajo
RS2Y2	AM1 <i>cheY2::aadA</i> ; Nal ^r Km ^r Spc ^r	del Campo <i>et al.</i> , 2007
RS22432	AM1 <i>RSP2432::aadA</i> ; Nal ^r Km ^r Spc ^r	Este trabajo
<i>Plásmidos</i>		
pTZ19R/pTZ18R	Vector de clonación, derivado del pUC; Ap ^r	Pharmacia

pJQ200mp18	Vector suicida utilizado para reemplazo alélico, Gm ^r	Quandt y Hynes, 1993
pRK415	Derivado de pRK404, utilizado para expresar genes en <i>R. sphaeroides</i> ; Tc ^r	Keen <i>et al.</i> , 1988
pRKtlpS	Derivado de pRK415, contiene <i>tlpS</i> ⁺ ; Tc ^r	Este trabajo
pRKmcpA	Derivado de pRK415, contiene <i>mcpA</i> ⁺ ; Tc ^r	Este trabajo
pRKcheD	Derivado de pRK415, contiene <i>cheD</i> ⁺ ; Tc ^r	Este trabajo
pRKcheA1	Derivado de pRK415, contiene <i>cheA1</i> ⁺ ; Tc ^r	Este trabajo
pRKcheW1	Derivado de pRK415, contiene <i>cheW1</i> ⁺ ; Tc ^r	Este trabajo
pRKcheR1	Derivado de pRK415, contiene <i>cheR1</i> ⁺ ; Tc ^r	Este trabajo
pRK2432	Derivado de pRK415, contiene <i>RSP2432</i> ⁺ ; Tc ^r	Este trabajo

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

LB (Bertani, 1951)

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O c.b.p.	1 L

Para preparar medio sólido se agregan 20 g de agar por litro.

Sistrom 10X (Sistrom, 1962)

KH ₂ PO ₄	27.2 g
NH ₄ Cl	1.95 g
Ácido succínico	40 g
Ácido L-glutámico	1 g
Ácido L-aspártico	0.4 g
NaCl	5 g
Ácido nitriloacético	2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.334 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.020 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.002 g
Solución de elementos traza*	1 mL
Solución de vitaminas**	1 mL
H ₂ O c.b.p.	1 L

*Solución de elementos traza:

EDTA	1.765 g
ZnSO ₄ •7H ₂ O	10.95
FeSO ₄ •7H ₂ O	5 g
MnSO ₄ •H ₂ O	1.54 g
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.392 g
Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	0.248 g
H ₃ BO ₃	0.114 g
H ₂ O c.b.p.	100 mL

**Solución de vitaminas:

Ácido nicotínico	1 g
Tiamina-HCl	0.5 g
Biotina	0.010 g
H ₂ O c.b.p.	100 mL

Nota: Para preparar medio Sistrom 1X, se diluye 1:10 el medio 10X con H₂O y se ajusta el pH a 7.0 con KOH; adicionalmente se añaden 2 g de casamioácidos por litro. Para medio sólido se agregan 20 g de agar por litro.

Medio para motilidad: Sistrom modificado

Se elabora de igual forma que el medio Sistrom completo descrito en la parte superior, excepto porque no contiene ácido succínico ni casaminoácidos.

Las cepas de *E. coli* se crecieron a 37°C en medio LB. Cuando se requirió se agregaron antibióticos en las siguientes concentraciones: ampicilina 200 µg/mL, espectinomicina 50 µg/mL, gentamicina 30 µg/mL y tetraciclina 25 µg/mL.

Los cultivos de *R. sphaeroides* se crecieron en condiciones fotoheterotróficas con iluminación constante o aeróbicamente a 30°C con agitación constante en medio Sistrom o en medio para motilidad. En caso necesario se añadieron los siguientes antibióticos al medio de cultivo en las siguientes concentraciones: ácido nalidíxico 20

$\mu\text{g/mL}$, kanamicina 25 $\mu\text{g/mL}$, espectinomicina 50 $\mu\text{g/mL}$, gentamicina 30 $\mu\text{g/mL}$ y tetraciclina 1 $\mu\text{g/mL}$.

Células “tethered”: observación de la rotación de células inmovilizadas por medio de un anticuerpo (Berry y Armitage, 2000, Shah *et al.*, 2000b)

Se inocularon 16 mL de medio para motilidad con la cepa AM1. El cultivo se creció bajo condiciones fotoheterotróficas, cuando alcanzó una $D.O_{.600} = 0.3$ se tomó 1 mL del cultivo y se pasó 50-60 veces por una jeringa de insulina (27G), con la finalidad de acortar los filamentos de las bacterias. Después, las células se centrifugaron por 5 minutos a 800 x *g*. Se lavó con cuidado la pastilla con 1 mL de HEPES 10 mM pH 7.2 y las células se centrifugan de nuevo a 800 x *g* por 5 minutos. Por último, el paquete celular se resuspendió en 100 μL de HEPES 10 mM pH 7.2 adicionado con cloranfenicol 50 $\mu\text{g/mL}$ para inhibir la síntesis de proteínas.

En un portaobjetos se incubaron 10 μL del anticuerpo $\alpha\text{-FlaA}$ por 10 minutos para favorecer su unión al vidrio. Se lavó el portaobjetos una vez con 20 μL HEPES 10 mM pH 7.2 y se agregaron 10 μL de células. Se incubó por 15 minutos y se lavó tres veces con HEPES 10 mM pH 7.2. Las células se dejaron en 10 μL de HEPES 10 mM pH 7.2 adicionado con 0.1 mM de succinato y se taparon con un cubreobjetos. Estas muestras se observaron bajo un microscopio de campo oscuro de alta intensidad (Olympus BH-2). Se grabaron aquellas células que estuvieran inmovilizadas al portaobjetos a través de su flagelo. La señal de video se capturó usando una videocámara digital Canon HV20 bajo el formato dv a 29.97 cuadros/segundo. Estas grabaciones se transfirieron a una computadora usando el software iMovie (Apple Inc.) en fomato dv. Los videos se convirtieron a formato avi (DV-NTSC) con el programa Prism Video Converter (NCH Software). Finalmente, estos archivos se analizaron con el software CellTrak (Motion Analysis).

Ensayos de motilidad en presencia de CCCP

Se creció la cepa de *R. sphaeroides* AM1 en medio para motilidad en condiciones fotoheterotróficas. Cuando el cultivo alcanzó una $D.O_{.600} = 0.3$ se tomó una muestra para observar al microscopio para corroborar que la mayoría de las células en

la población nadara activamente. Posteriormente, se tomaron 3 alícuotas de 500 μL ; la primera se dejó como control de nado, a la segunda se le agregó carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona (CCCP) a una concentración final de 10 μM y a la tercera alícuota se le agregó etanol como control de toxicidad debido a que el CCCP se disuelve en este compuesto. Por último, se tomaron 5 μL de cada tratamiento para observar bajo el microscopio y grabar videos del comportamiento de nado como se describió en la sección anterior.

Ensayos de motilidad en presencia de amilorida

Un cultivo de la cepa AM1 en medio para motilidad se creció fotoheterotróficamente hasta alcanzar una $\text{D.O.}_{600} = 0.3$. En este punto se tomó una alícuota que se observó bajo el microscopio para comprobar que las células nadaran activamente. Después, se tomaron 3 muestras de 500 μL cada una: el control sin tratamiento, el tratamiento al cual se le agregó 0.5 mM de amilorida y un segundo control al que se le agregó dimetilsulfóxido (DMSO) debido a que la amilorida se disuelve en dicho compuesto. Finalmente, de cada tratamiento se tomaron 5 μL para observar el nado de las bacterias en el microscopio y capturar videos de las células nadando bajo estas condiciones.

Transformación de *E. coli* (Cohen *et al.*, 1972)

Se creció la cepa de interés hasta alcanzar una $\text{D.O.}_{550} = 0.5$. El cultivo se incubó en hielo por 5 minutos y posteriormente se centrifugó a $3500 \times g$ durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 1/2 del volumen inicial con una solución fría de CaCl_2 100 mM. Las células se incubaron 20 minutos en hielo y se volvieron a centrifugar como en el paso anterior. El sobrenadante se decantó suavemente y se resuspendió el botón celular en 1/15 del volumen original con la solución de CaCl_2 . Las células se incubaron por 1 hora en hielo; opcionalmente se dejaron 24 horas a 4°C . Se tomaron alícuotas de 200 μL y se les agregó la cantidad deseada de DNA. Las células competentes se incubaron con el DNA por 1 hora en hielo, pasado este tiempo las células se sometieron a un choque de calor a 42°C por 2 minutos. Inmediatamente después se colocaron en hielo por 5 minutos para después

agregar 800 μL de medio LB. Las células se recuperaron a 37°C por 1 hora. Finalmente se plaqueron en medio selectivo.

Conjugación bacteriana (Davis *et al.*, 1988)

Se creció la cepa donadora de *E. coli* S17-1 y la cepa receptora de *R. sphaeroides* hasta fase exponencial. En este punto se tomaron 1.5 mL de cada cultivo y se cosecharon centrifugando a 3000 x *g* durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 500 μL de LB, este paso se repitió dos veces más con la finalidad de lavar a las células. En el último lavado la cepa donadora y la receptora se mezclaron en proporción 1:1 y se centrifugaron como en el paso anterior. Se retiró el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 50 μL de medio LB. La mezcla obtenida se depositó en la superficie de una membrana de nitrocelulosa de aproximadamente 1 cm^2 colocada sobre una caja de LB-agar y se incubó a 30°C toda la noche. Después de este tiempo, se tomaron las membranas para colocarlas en tubos eppendorf y se añadieron 500 μL de LB. La mezcla se agitó vigorosamente para desprender a las células de la membrana de nitrocelulosa y se plaqueó en medio selectivo.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La mezcla de las reacciones de PCR contenía: 2 μL (5 U) de *Pfu* DNA polimerasa (Stratagene), amortiguador Native Plus (Stratagene) 1X, DMSO 10%, dNTPs 0.2 mM, 100 pmolas de cada oligonucleótido y 100 ng de templado. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 100 μL en un termociclador TC-512 (Techne).

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% en amortiguador TAE (Tris 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM), se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron por medio de un transiluminador de luz UV.

Digestiones con enzimas de restricción

Los vectores y los fragmentos de DNA se cortaron con endonucleasas de restricción, adquiridas comercialmente de New England Biolabs, Promega o Invitrogen. Para cada enzima se siguieron las recomendaciones de uso del fabricante.

Reacciones de ligación

Se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs) para las clonaciones. La reacción se llevó a cabo con 1 µL de ligasa en amortiguador 1X, las ligaciones se incubaron a 16°C por 16 horas.

Purificación de plásmidos

Se empleó el sistema QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) para purificar DNA plasmídico. La extracción de los plásmidos se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Recuperación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Para extraer y purificar fragmentos de DNA de los geles de agarosa se utilizó el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Las instrucciones del fabricante se siguieron en todos los pasos.

Aislamiento de mutantes no polares de los genes localizados en *cheOp1*

Dentro del *cheOp1* se localizan once genes: *cheY5*, *mcpB*, *tlpS*, *mcpA*, *cheD*, *cheY1*, *cheA1*, *cheW1*, *cheR1* y un marco de lectura abierta *RSP2432*, como se muestra en la **Figura 16**. Las mutantes por interrupción de los reguladores de respuesta *cheY1*, *cheY2* y *cheY5* se aislaron y caracterizaron en un trabajo anterior (del Campo *et al.*, 2007), por lo que para este proyecto se construyeron las mutantes de los ocho genes restantes.

Para aislar las mutantes por interrupción de estos genes se siguió la siguiente estrategia: los genes silvestres correspondientes se amplificaron por PCR, a partir del DNA cromosomal de *R. sphaeroides* WS8N. Para esto se diseñaron oligonucleótidos específicos que amplifican río arriba y río abajo de cada gen (**Tabla 3**). Los productos

de PCR de *mcpB* 1.8kb (-107*mcpB*+40), *tlpS* 1.9kb (-103*tlpS*+48), *mcpA* 2.5kb (-106*mcpA*+59), *cheD* 1.6kb (-250*cheD*+725), *cheA1* 2.6kb (-479*cheA1*+102), *cheW1* 1.1kb (-136*cheW1*+517), *cheR1* 1.6kb (-225*cheR*+466) y *RSP2432* 1.5kb (-943*RSP2432*+226) se clonaron en el plásmido pTZ18R o pTZ19R (Pharmacia). Para corroborar la identidad de los fragmentos, las clonas se secuenciaron en un secuenciador automático ABI Prism Genetic Analyzer (Applied Biosystems) en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Posteriormente, se insertó el gen *aadA*, el cual confiere resistencia a espectinomicina, en un sitio único que corta aproximadamente a la mitad de cada gen. Este casete no contiene terminadores de la transcripción para evitar posibles efectos polares. Los alelos mutantes *mcpB::aadA*, *tlpS::aadA*, *mcpA::aadA*, *cheD::aadA*, *cheA1::aadA*, *cheW1::aadA*, *cheR1::aadA* y *RSP2432::aadA* se subclonaron en el vector suicida pJQ200mp18 (Quandt y Hynes, 1993) y se introdujeron en las cepas WS8N (*fla1*⁺ *fla2*⁻) y AM1 (*fla1*⁻ *fla2*⁺) por conjugación biparental con la cepa S17-1 de *E. coli*. Las exconjugantes en las que se sustituyó el alelo silvestre por el mutante se seleccionaron por su resistencia a espectinomicina y su sensibilidad a gentamicina como marcador de la ausencia del plásmido pJQ200mp18.

PCR de colonia

Para confirmar que en las mutantes el intercambio alélico se llevó a cabo se amplificaron por PCR en colonia los genes correspondientes. Para esto, se crecieron durante 16 horas en medio Sistrom cultivos fotoheterotróficos de las cepas de *R. sphaeroides* para usar como templado. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ L que contenían: 1 μ L de *Taq* DNA polimerasa (Donada por la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular, UNAM), amortiguador Native Plus (Stratagene) 1X, DMSO 10%, dNTPs 0.2 mM, 10 pmolas de cada oligonucleótido y 5 μ L de cultivo. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador TC-512 (Techne). Para todas las mutantes se usó como control la cepa parental con la que se realizó la conjugación de forma que cuando se corrieron los fragmentos de PCR en geles de agarosa los genes mutantes tuvieron un peso mayor al de la cepa parental debido a la

inserción del casete de espectinomicina que pesa aproximadamente 1.4kb; confirmando que el alelo mutante reemplazó al alelo silvestre.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia	T _m
Fw mcpB Xba	5' -CTAGTCTAGAGAAGGTGGCCGGCGCCTGAGG-3'	80.2°C
Rv mcpB Sst	5' -CGCGGAGCTCGGCAGCTCAGGCTGCTCGATC-3'	88.1°C
Fw tlpS Pst	5' -AAAAGTGCAGCCCAGCCCTTGATCCCACG-3'	86.1°C
Rv tlpS Xba	5' -CTAGTCTAGAGTGCAATTCTTAGCGCTCACC-3'	70.5°C
Fw mcpA Sal	5' -ACGCGTCGACCGCACCAGCCTTCACCAGTTG-3'	86.4°C
Rv mcpA Xba	5' -CTAGTCTAGATGGGGCTCGCAGTGTGTCAGACC-3'	76.0°C
Fw cheD	5' -CTAGTCTAGATGCGGGCGGCTCTCGAGGAGGC-3'	81.1°C
CheY1Eco Rev	5' -CCGGAATTCAAGAACGGTCAGCGGCATGAT-3'	81.3°C
Chey1XbaFw	5' -CTAGTCTAGAGCGGAAGGTCACCAATTCAC-3'	71.4°C
CheA1Xbarev	5' -CTAGTCTAGACTGGTCCAGCGTGATCACGC-3'	74.9°C
Fw cheW1 Xba	5' -CTAGTCTAGAGAGAACGGATACGGCCGCATTC-3'	75.0°C
Rv cheW1 Bam	5' -CGCGGATCCGAGGCTGCAAACCAGCCTGC-3'	86.9°C
Fw cheR1	5' -CTAGTCTAGAGAGGCCCGTCACGTCATCATC-3'	74.5°C
Chey2EcoRv	5' -CCGGAATTCCCCACGGCCTCCTCGACGATCTC-3'	70.5°C
CheY2fw1	5' -CTAGTCTAGAGGCGCGACATGGCGCACGGG-3'	83.2°C
CheY2rv4	5' -CTAGTCTAGAGCTGCGCGGACCCTAGGGG-3'	79.6°C

Ensayos de nado en medio semi-sólido (agar suave)

Se inocularon cajas Petri 0.25% agar con medio para motilidad suplementado con 100 µM de atrayente con 2 µL de un cultivo en fase estacionaria. Las cajas se incubaron a 30°C en la oscuridad bajo condiciones aeróbicas o fotoheterotróficas con iluminación constante por 48 horas.

Ensayos de complementación

Para complementar las mutantes los siguientes fragmentos se clonaron en el vector pRK415: *tlpS* 1.9kb (-103*tlpS*+48), *mcpA* 2.5kb (-106*mcpA*+59), *cheD* 0.9kb (-250*cheD*+75), *cheA1* 2.2kb (-125*cheA1*+102), *cheW1* 1.1kb (-136*cheW1*+517), *cheR1* 1.1kb (-225*cheR*+23) y *RSP2432* 1.5kb (-943*RSP2432*+226). De esta forma se

generaron las construcciones pRKtlpS, pRKmcpA, pRKcheD, pRKcheA1, pRKcheW1, pRKcheR1 y pRK2432, las cuales se movilizaron a las mutantes correspondientes por conjugación. Las exconjugantes se seleccionaron por su resistencia a tetraciclina, como marcador de la presencia del plásmido.

Ensayos de nado en medio líquido

Se crecieron las cepas de *R. sphaeroides* en medio para motilidad en condiciones fotoheterotróficas. Cuando el cultivo alcanzó una D.O.₆₀₀ = 0.3 se tomó una muestra para observar al microscopio de campo oscuro de alta intensidad y confirmar que la mayoría de las células en la población estuvieran nadando. En este punto se tomaron 5 µL del cultivo y se colocaron en un portaobjetos tratado con mezcla crómica, que se cubrió con un cubreobjetos de 24x50 mm. Las muestras se observaron bajo un microscopio de campo oscuro de alta intensidad (Olympus BH-2). Se buscaron campos en donde la densidad de células no fuera muy alta. De cada cepa se grabaron siete videos por experimento con una duración aproximada de 5 segundos. La señal de video se capturó con una videocámara digital Canon HV20 bajo el formato dv a 29.97 cuadros/segundo. Estas grabaciones se transfirieron a una computadora usando el software iMovie (Apple Inc.) en fomato dv. Posteriormente, los videos se convirtieron a formato avi (DV-NTSC) con el programa Prism Video Converter (NCH Software).

Análisis de la velocidad de nado y frecuencia de paro

Los archivos de video generados como se describió en la sección anterior se analizaron con el programa CellTrak versión 1.5 (Motion Analysis Corporation). Todos los videos fueron procesados bajo los siguientes parámetros:

Edge Detection Method: Binary Smoothed Edges (BSE)

Threshold Value: 25

Neighborhood Size: 3

Maximum Object Size: 300

Minimum Object Size: 30

Maximum Object Speed: 25 pixels/frame

Use prediction

Una vez aplicados estos tratamientos el programa generó las trayectorias de nado de las bacterias. Estas trayectorias se editaron manualmente, se eliminaron aquellas bacterias que no estaban nadando y se siguió cada bacteria para confirmar que la trayectoria corresponda a la célula analizada. Se descartaron aquellas trayectorias que duraron menos de 2 segundos y se guardaron los parámetros deseados (velocidad instantánea, velocidad promedio) de las trayectorias como un archivo de Excel (Microsoft Corporation). Se analizaron 2 segundos (~59 cuadros) de cada trayectoria. Se estableció que cuando la velocidad instantánea fuera menor a 10 $\mu\text{m/s}$ se había llevado a cabo evento de reorientación, de tal forma que la frecuencia de paro se obtuvo contando el número de eventos de paro por unidad de tiempo. La velocidad de nado se calculó como la velocidad promedio entre dos eventos de reorientación.

Análisis estadístico

La velocidad de nado y la frecuencia de paro de cada cepa se determinaron promediando 100 células de tres experimentos independientes ($n=3$). El análisis estadístico se realizó con el programa Prism versión 4 (GraphPad Software, Inc.). La significancia se evaluó mediante el análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnett.

RESULTADOS

Sesgo rotacional del sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides*

El sistema quimiotáctico está encargado de regular la frecuencia de cambio de la rotación flagelar. Como ya se mencionó, diferentes especies bacterianas utilizan diversos mecanismos para cambiar la dirección, los cuales dependen de la capacidad del motor de rotar en dos sentidos (bidireccional) o en un solo sentido (unidireccional).

Para poder determinar la dirección de rotación del flagelo 2 se realizó un ensayo de células “tethered”, el cual consiste en adherir células flageladas a una superficie sólida mediante un anticuerpo como se muestra en la **Figura 19**. Para este ensayo primero se acortan los filamentos mediante estrés mecánico para después inmovilizar a las bacterias mediante un anticuerpo anti-flagelina a un portaobjetos. Cuando se observa a las bacterias en el microscopio se puede ver como todo el cuerpo celular rota alrededor del flagelo; de tal forma que se puede determinar la dirección de la rotación (CW o CCW) y además si la rotación es bidireccional como en el caso de *E. coli* o unidireccional como el sistema flagelar 1 de *R. sphaeroides*.

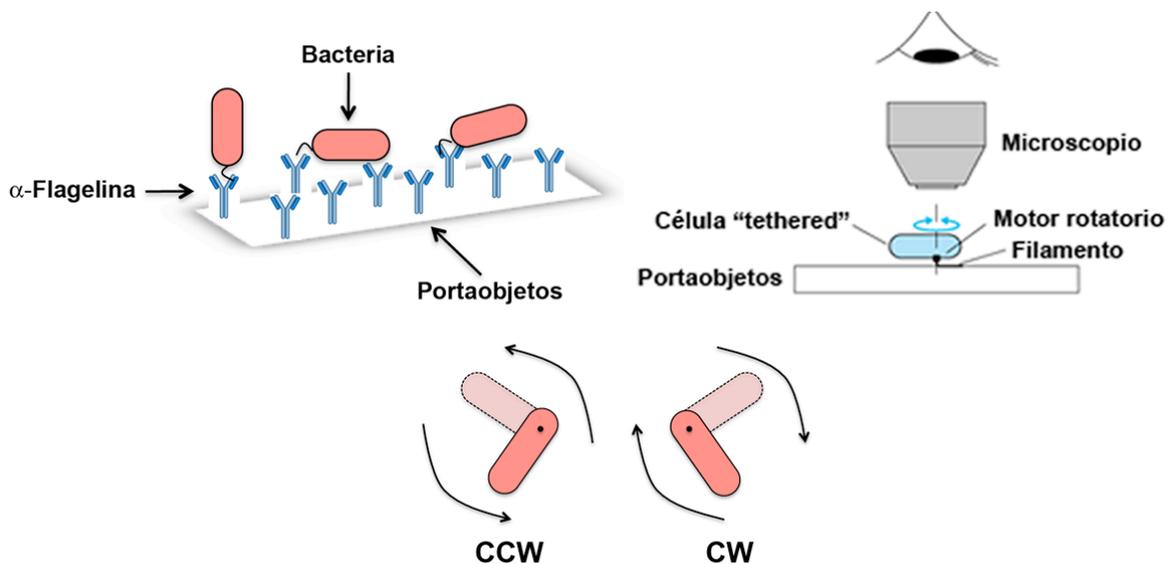


Figura 19. Experimento de células “tethered”. Las células se inmovilizan por medio del filamento flagelar a un portaobjetos mediante un anticuerpo específico y después se observan en un microscopio. El cuerpo celular de la bacteria rota, lo cual permite establecer la dirección de rotación del motor flagelar. Modificado de Kojima y Blair, 2003.

Este ensayo se realizó con células AM1 (*fla1⁻ fla2⁺*), las cuales se fijaron a un portaobjetos por medio de un anticuerpo α -FlaA. Las preparaciones se observaron bajo un microscopio de campo oscuro de alta intensidad para grabar videos de aquellas bacterias que estuvieran adheridas mediante su flagelo. Las células se monitorearon por varios segundos, en la **Figura 20** se muestra la secuencia de video de una célula rotando en dirección CCW. En total se lograron observar 40 células rotando, de las cuales 26 giraban en sentido CCW y 14 en sentido CW.

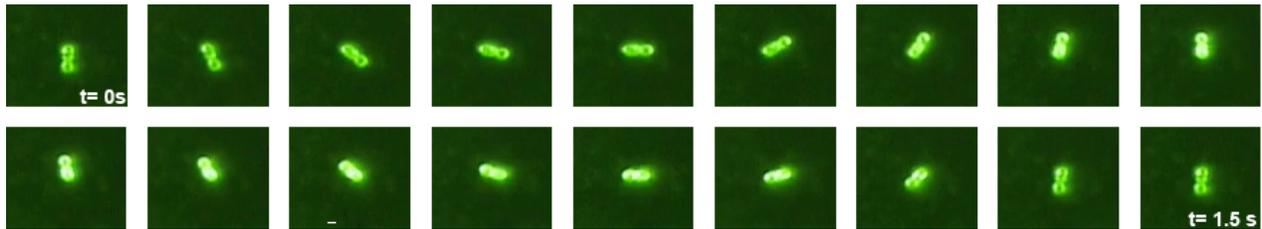


Figura 20. Serie de tiempo de una célula “tethered” de la cepa AM1 (*fla1⁻ fla2⁺*). Cada imagen representa un cuadro de la grabación, cuya duración total es de 1.5 segundos.

Al analizar las 40 células por un lapso mayor a 1.5 segundos se observó que permanecían rotando en la misma dirección a lo largo del tiempo, nunca cambiaban el sentido de la rotación, lo cual sugirió que su rotación era unidireccional. Seguramente veíamos células girando en ambas direcciones porque éstas se adherían tanto al portaobjetos como al cubreobjetos. Debido a este problema metodológico no se pudo determinar la dirección de rotación del flagelo 2.

Por último, se utilizó el programa CellTrak 1.5 (Motion Analysis Corp.) para analizar las grabaciones de las células “tethered”. En la **Figura 21** se presentan los resultados que se obtienen al graficar la orientación de una célula, medida en grados, con respecto al tiempo. La gráfica muestra que los grados se acumulan en función del tiempo, es decir, a lo largo de 10 segundos la bacteria mantiene la misma dirección de rotación.

Estos resultados sugieren que el motor del flagelo 2 de *R. sphaeroides* rota unidireccionalmente, de manera similar al sistema flagelar 1.

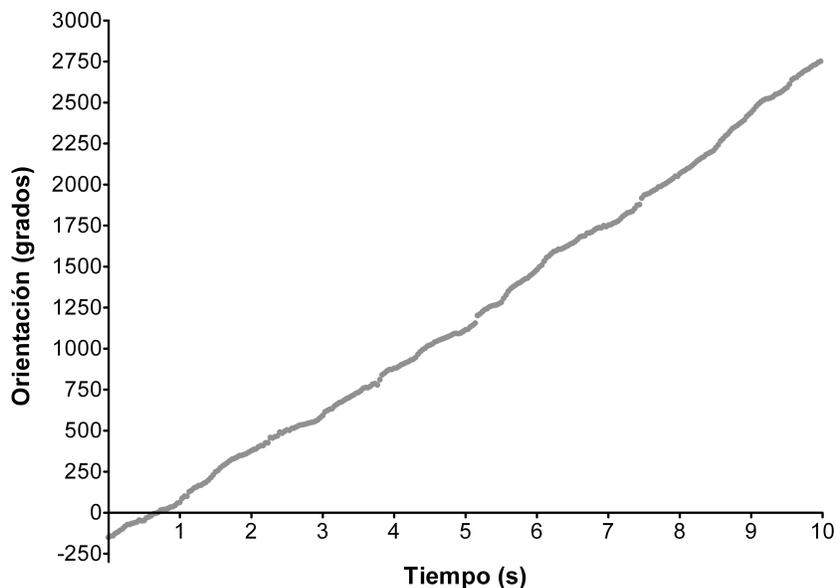


Figura 21. Análisis de células “tethered”. En la gráfica se muestran los datos obtenidos de una célula representativa. Conforme la célula rota en una sola dirección, la orientación aumenta linealmente.

Fuente de energía del motor flagelar 2

La fuente de energía del motor flagelar es un gradiente electroquímico de iones específicos. Existen dos tipos de motores: aquellos dependientes de protones como el de *E. coli* (Manson *et al.*, 1977, Larsen *et al.*, 1974a) y los dependientes de iones de sodio como *V. parahaemolyticus* (Atsumi *et al.*, 1992b) y *V. shilonii* (González *et al.*, 2010). En este trabajo, decidimos determinar qué tipo de gradiente impulsa la rotación del sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides*.

Para poder evaluar si el motor del flagelo 2 acopla la energía del gradiente electroquímico de H^+ o Na^+ se utilizaron inhibidores específicos. El primero, la amilorida, es un bloqueador de canales de sodio que ha sido usado en varios estudios en los cuales se demostró que este compuesto inhibe específicamente motores flagelares Na^+ -dependientes de diferentes organismos (Sugiyama *et al.*, 1988, Atsumi *et al.*, 1992a). Para estudiar el efecto de la amilorida sobre la motilidad del flagelo 2 se agregó 0.5 mM de amilorida a un cultivo de la cepa AM1 (*fla1⁻ fla2⁺*) en el que las células nadaban activamente. Como control se observaron en el microscopio células expuestas a DMSO, debido a que la amilorida se disuelve en este compuesto, la motilidad no se

afectó por el DMSO. Al examinar bajo el microscopio a las bacterias en presencia de amilorida se observó que las células continuaban nadando.

El segundo inhibidor que se utilizó fue el protonóforo CCCP, un agente desacoplante del gradiente electroquímico de H^+ . Un cultivo de células nadadoras AM1 (*fla1⁻ fla2⁺*) primero se expuso a etanol ya que el CCCP se prepara en este solvente; demostrando que la presencia de etanol no tiene ningún efecto sobre la motilidad. Sin embargo, al agregar 10 μ M de CCCP la motilidad de la cepa AM1 (*fla1⁻ fla2⁺*) se inhibió inmediatamente. El video de los resultados con CCCP se puede ver en el siguiente sitio:

<http://jib.asm.org/content/suppl/2011/11/07/193.23.6781.DC1/SuppMovie.mov>.

A partir de estos datos, podemos concluir que la fuerza protón motriz (Δp) es la fuente de energía responsable de la rotación del motor del flagelo 2 de *R. sphaeroides*.

Aislamiento y caracterización de las mutantes del *cheOp1*

El locus *cheOp1* contiene 11 genes entre los que se encuentran, un marco de lectura abierta (RSP2432) y genes que codifican para las siguientes proteínas: un receptor citoplásmico (TlpS), dos receptores membranales (McpB y McpA), una proteína adaptadora (CheW1), una cinasa (CheA1), tres reguladores de respuesta (CheY1, CheY2 y CheY5), una metiltransferasa (CheR1) y una desamidasa de receptores (CheD). Es decir, potencialmente dentro de este locus se encuentran las proteínas necesarias para formar una vía quimiotáctica completa.

Para demostrar la participación de estas proteínas en la regulación quimiotáctica del flagelo 2 se interrumpió cada gen por medio de la inserción de un casete no polar de espectinomicina. Las cepas mutantes se obtuvieron en los fondos genéticos *fla1⁺ fla2⁻* y *fla1⁻ fla2⁺*, con la excepción de las mutantes en los genes *cheY1*, *cheY2* y *cheY5* las cuales fueron aisladas en un trabajo previo (del Campo *et al.*, 2007). La inserción correcta del casete se verificó mediante PCR en colonia tal como se describe en la sección de Materiales y métodos (datos no mostrados).

Una vez que se obtuvieron las mutantes se determinó su fenotipo mediante ensayos de nado en medio semi-sólido. En esta prueba, cajas con agar suave (0.25%) se inoculan en un punto, de tal forma que las bacterias nadadoras se alejan del punto

de inoculación formando un halo de nado. Mutantes no mótiles generan un punto de crecimiento, mientras mutantes no quimiotácticas forman un halo de nado más pequeño que la cepa silvestre (Porter *et al.*, 2006).

El análisis del fenotipo de nado producido por los alelos mutantes *cheY5::aadA*, *mcpB::aadA*, *tlpS::aadA*, *mcpA::aadA*, *cheD::aadA*, *cheY1::aadA*, *cheA1::aadA*, *cheW1::aadA*, *cheY2::aadA*, *cheR1::aadA* y *RSP2432::aadA* en el fondo genético WS8N (*fla1⁺ fla2⁻*) reveló un fenotipo igual al silvestre, **Figura 22B**. Este resultado concuerda con resultados previos en los que mutantes en los genes del *cheOp1* no tienen efectos en el comportamiento quimiotáctico del flagelo 1 (Ward *et al.*, 1995a, Ward *et al.*, 1995b, Hamblin *et al.*, 1997a, Hamblin *et al.*, 1997b, Shah *et al.*, 2000b).

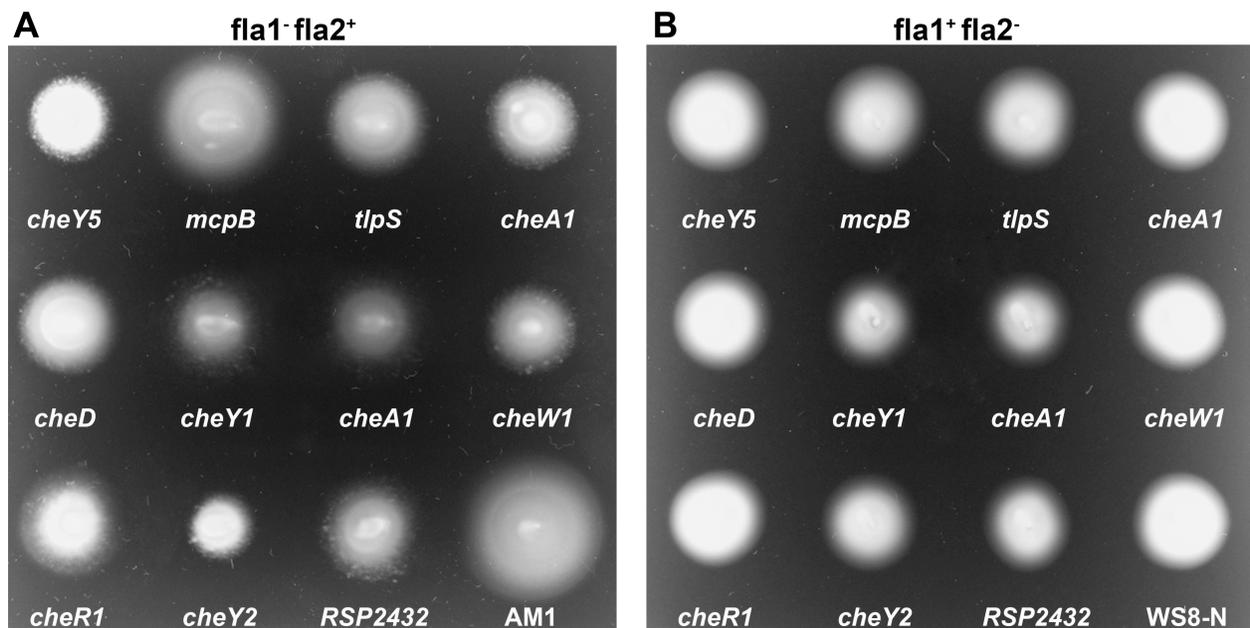


Figura 22. Análisis fenotípico de las mutantes del *cheOp1* en los fondos genéticos **A)** *fla1⁻ fla2⁺* y **B)** *fla1⁺ fla2⁻*. Los ensayos de nado en medio semi-sólido se realizaron en medio para motilidad suplementado con 100 μ M de succinato como quimioatrayente.

Un resultado diferente se obtiene cuando se analiza la respuesta de los mismos alelos mutantes bajo el fondo genético *fla1⁻ fla2⁺*, en este caso la mayoría de las mutantes muestran un halo de nado más pequeño que el de la cepa silvestre AM1 (**Figura 22A**). Como se puede apreciar en la **Figura 22A**, únicamente la mutante en el gen *mcpB*, el cual codifica para un receptor membranal, presenta un fenotipo igual al

silvestre. Estos resultados demuestran que las proteínas codificadas en el *cheOp1* están involucradas en la motilidad del flagelo 2.

Dado que los receptores están encargados de detectar quimioatrayentes específicos, se evaluó el fenotipo de las mutantes *mcpB*, *mcpA* y *tlpS* del fondo genético *fla1⁻ fla2⁺* en cajas de agar suave con diferentes ácidos orgánicos que se sabe son quimioatrayentes. En la **Figura 23** se muestran los resultados obtenidos con acetato, fumarato, malato, piruvato, propionato y succinato en condiciones aeróbicas y fotosintéticas. La mutante *mcpB* tiene un fenotipo igual al silvestre en todas las condiciones. Sin embargo, las mutantes *mcpA* y *tlpS* muestran una disminución del halo de nado en las dos condiciones y con todos los quimioatrayentes.

Ensayos de complementación

Para demostrar que el defecto en el nado se debe sólo a la ausencia de los genes mutados se introdujo en *trans* el alelo silvestre respectivo a las cepas mutantes. Para esto, los genes silvestres se clonaron en el plásmido pRK415 (Keen *et al.*, 1988) y posteriormente se movilizaron a cada cepa. Como se puede apreciar en la **Figura 24**, las mutantes se complementaron con el gen silvestre correspondiente, salvo la mutante *mcpA* la cual se complementó parcialmente.

Ensayos de nado en medio líquido

Por otro lado, se evaluó la capacidad de las mutantes del *cheOp1* para nadar en medio líquido mediante su observación en un microscopio óptico de campo oscuro de alta intensidad. De acuerdo a lo esperado todas las mutantes podían nadar, reafirmando que las mutantes ensamblan un flagelo funcional y que su fenotipo probablemente se debe a una deficiencia en la quimiotaxis. Sólo la mutante *cheR1* tuvo un fenotipo diferente al silvestre visible al ojo humano, las células presentaban más eventos de reorientación (paros) con respecto a la cepa silvestre.

Dado que no se pudieron apreciar diferencias evidentes en el comportamiento de nado en la mayoría de las cepas, se grabaron videos de las células nadando para después analizarlos con el programa CellTrak.

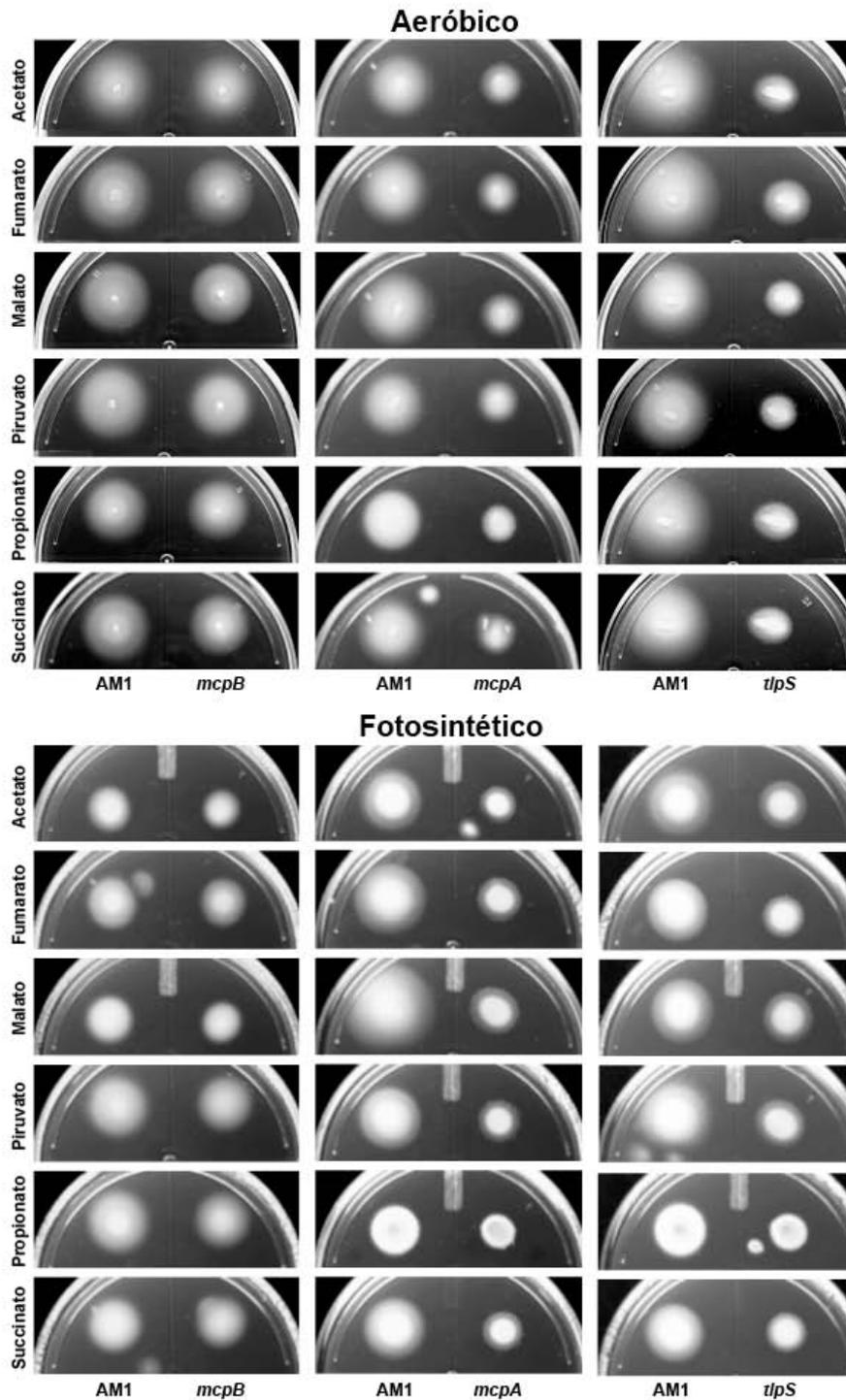


Figura 23. Ensayos de nado en cajas de agar suave de las mutantes *mcpB*, *tlpS* y *mcpA* en presencia de diferentes quimioatrayentes. Las cajas se incubaron en condiciones aeróbicas o fotosintéticas por 48 horas.

Este programa procesa archivos de video de células móviles y extrae lecturas de sus movimientos. Primero hace el seguimiento o “tracking” de cada célula generando trayectorias que después pueden ser editadas manualmente. Por último, el programa permite obtener los datos de diferentes parámetros.

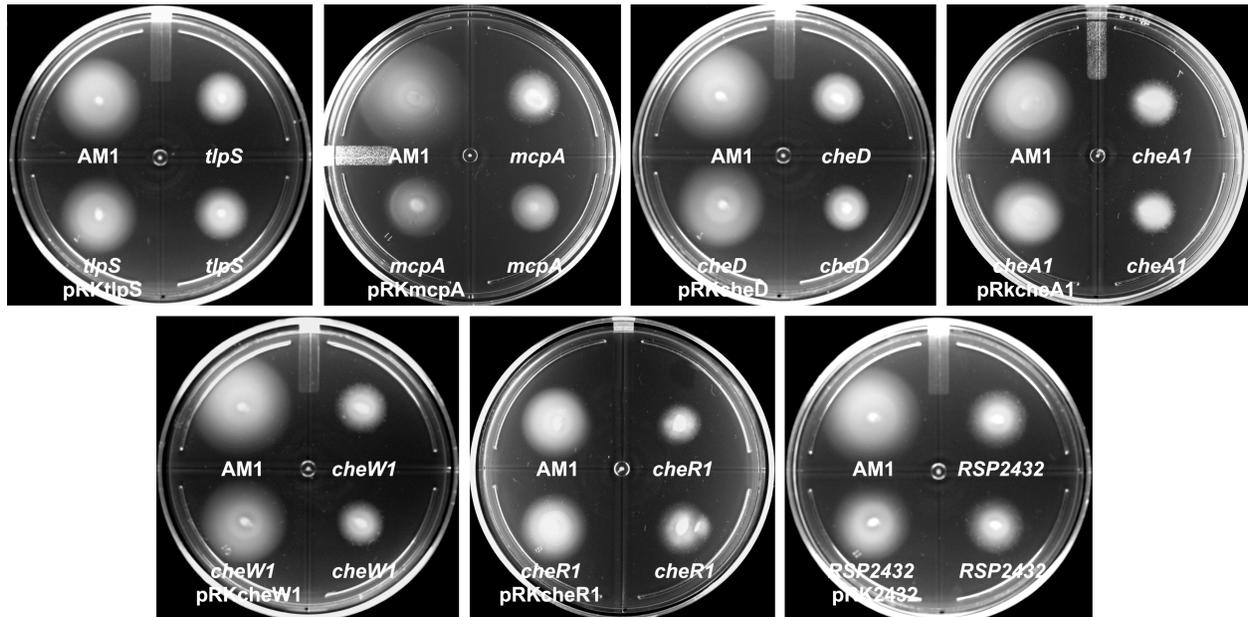


Figura 24. Complementación de las mutantes del *cheOp1*. La expresión del gen silvestre a partir del vector pRK415 restablece la capacidad de nado de las mutantes. Los ensayos de nado en cajas de agar suave se realizaron en medio para motilidad suplementado con 100 μ M de succinato como quimioatrayente.

Se obtuvieron las trayectorias de nado de 100 células de cada cepa a partir de tres experimentos independientes ($n=3$). Estas trayectorias se analizaron por 2 segundos para determinar la velocidad de nado y la frecuencia de reorientación.

La velocidad de nado se midió como el promedio de la velocidad entre dos eventos de paro. Este parámetro se determinó para la cepa AM1 (*fla1⁻ fla2⁺*) y todas las mutantes. El promedio de la velocidad de nado del flagelo 2 fue de 61.35 μ m/s. Asimismo, la mayoría de las mutantes poseen una velocidad similar a la silvestre (**Figura 25**), con la excepción de la mutante *cheR1* cuya velocidad (39.51 μ m/s) fue significativamente menor que la de la cepa AM1.

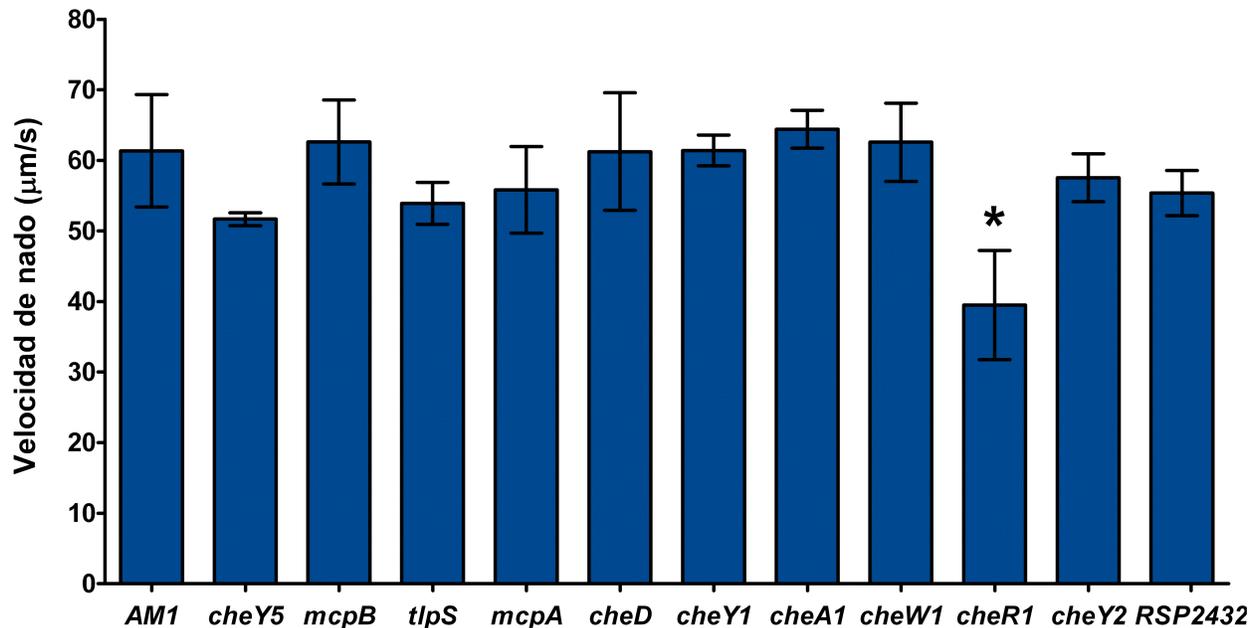


Figura 25. Velocidad de nado para el flagelo 2 y las mutantes del *cheOp1*. La gráfica muestra los valores promedio \pm desviación estándar de 100 células ($n=3$). La significancia estadística se obtuvo mediante una prueba de ANOVA; * $P<0.01$.

Del mismo modo, se evaluó la frecuencia de reorientación es decir, el número de paros por unidad de tiempo. Como se muestra en la **Figura 26**, las células de la cepa AM1 se reorientan en promedio aproximadamente una vez cada 2 segundos (0.55 paros/s). Al comparar esta cepa con las cepas mutantes se observaron tres fenotipos diferentes. Las mutantes *mcpB*, *tlpS*, *cheY1* y *RSP2432* tienen esencialmente la misma frecuencia de reorientación que la cepa AM1 (representadas con barras grises en la **Figura 26**), es decir, presentan fenotipo silvestre. En cambio, las células de las mutantes *mcpA*, *cheD*, *cheA1*, *cheW1* y *cheY2* realizan menos paros que las células de la cepa silvestre (barras verdes en la **Figura 26**). Es decir, tienden a reorientarse menos, lo que sería equivalente al fenotipo “smooth” de mutantes quimiotácticas en *E. coli* (Parkinson y Houts, 1982). Lo contrario ocurre con las mutantes *cheY5* y *cheR1*, las cuales se reorientan a una frecuencia más alta (barras rojas en la **Figura 26**). Tienen un comportamiento similar al “tumbly” de mutantes quimiotácticas en *E. coli* (Parkinson y Houts, 1982). Este fenotipo se ve reflejado en el patrón de nado de dichas mutantes (**Figura 27**); mientras que la cepa silvestre presenta trayectorias largas con pocos

periodos de reorientación las mutantes nadan por trayectorias cortas que se ven rápidamente interrumpidas por eventos de paro.

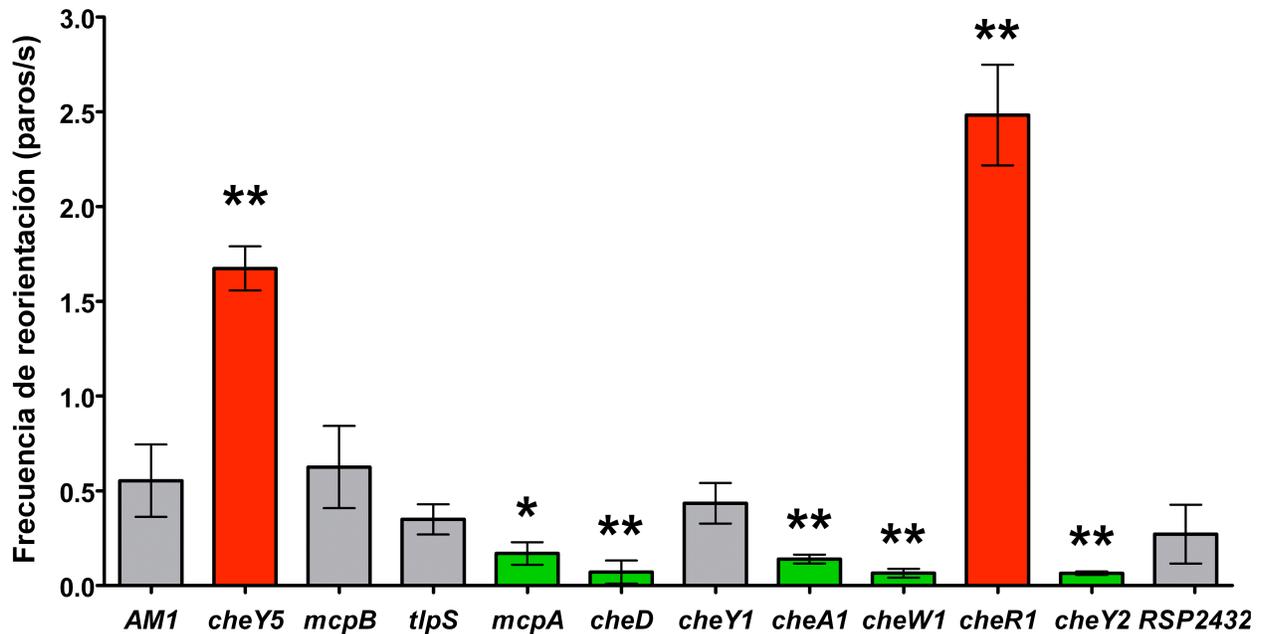


Figura 26. Frecuencia de reorientación de la cepas AM1 y mutantes del *cheOp1*. La gráfica muestra los valores promedio \pm desviación estándar de 100 células (n=3). La significancia estadística se obtuvo mediante una prueba de ANOVA; **P<0.01, *P<0.05.

Los datos obtenidos con el software CellTrak nos confirman que varias mutantes del *cheOp1* presentan alteraciones en la frecuencia de reorientación, indicando que forman parte de la vía quimiotáctica del flagelo 2 de *R. sphaeroides*.

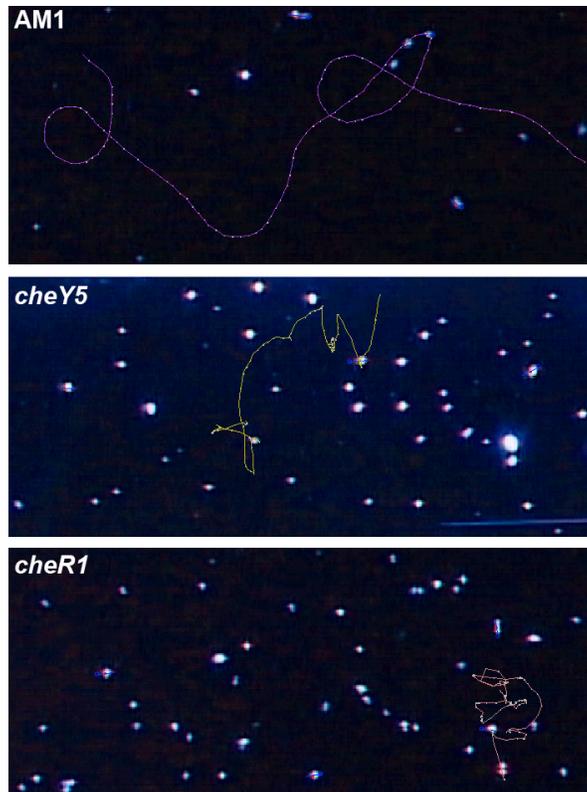


Figura 27. Trayectorias de nado de la cepa AM1 y mutantes. Cada imagen muestra una la trayectoria de una célula representativa. Las imágenes se obtuvieron con el programa CellTrak.

DISCUSIÓN

Rotación unidireccional del flagelo 2

El sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides* ensambla 3-4 flagelos de localización polar (Poggio *et al.*, 2007). Mediante el análisis de células “tethered” se demostró que los flagelos lofotricos Fla2 rotan en una sola dirección. No se detectaron pausas o paros en la rotación con esta metodología. Sin embargo como se discutirá más adelante, el análisis de “tracking” nos ayudó a comprobar que las células si realizaban paros. Por otro lado, tampoco fue posible determinar la dirección de rotación del flagelo, esto se debe a que se encontraron a la mayoría de las células rotando en dirección CCW y algunas en la dirección CW. A pesar de esto, al analizar dichas células por 10 segundos o más no se observaron cambios en la orientación.

Observaciones preliminares, realizadas en el laboratorio, de células de la cepa AM1 nadando en un microscopio de campo oscuro de alta intensidad muestran que los flagelos polares del sistema flagelar 2 forman una trenza helicoidal (**Figura 28**). Considerando estos resultados junto con el análisis de células “tethered”, proponemos que los filamentos forman una trenza la cual rota unidireccionalmente para impulsar a la célula, estos periodos de nado se ven interrumpidos por eventos de paro los cuales reorientan a la célula. Por lo consiguiente, el control del motor Fla2 no implica un cambio (“switching”) en la dirección de rotación, de manera contraria a lo que ocurre con *E. coli* y otras bacterias (**Tabla 4**).

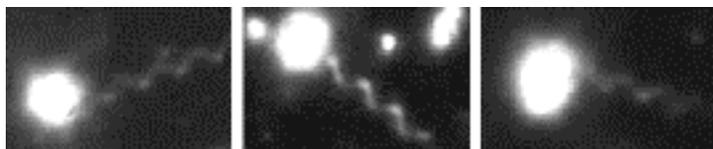


Figura 28. Microscopia de campo oscuro de alta intensidad de células nadando con el flagelo 2. Las imágenes muestran un cuadro extraído de una

El mecanismo de los motores bidireccionales es el mejor entendido; estos motores regulan la frecuencia de reorientación mediante el cambio en la dirección de rotación (Berg, 2003, Li *et al.*, 2011, Minamino *et al.*, 2008).

En comparación, los motores unidireccionales (**Tabla 4**) han sido poco estudiados. Sólo se conoce con más detalle el mecanismo de *Sinorhizobium meliloti* y el del sistema flagelar 1 de *R. sphaeroides*. En *S. meliloti*, los flagelos peritricos rotan únicamente en sentido CW y sus motores pueden aumentar y disminuir la velocidad rotacional; por lo tanto el cambio en la dirección de nado ocurre durante el frenado cuando varios flagelos rotan a diferentes velocidades (Götz y Schmitt, 1987, Platzer *et al.*, 1997). En cambio, en *R. sphaeroides* el motor Fla1, de acuerdo con un estudio reciente (Pilizota *et al.*, 2009), rota exclusivamente en dirección CCW (este dato contradice el primer estudio donde se reportaba que giraba en dirección CW (Armitage y Macnab, 1987)) y periódicamente realiza paros para cambiar la dirección de nado. Curiosamente, el mecanismo que más se asemeja al del flagelo 2 es el del sistema flagelar 1. Sin embargo, una diferencia entre ambos sistemas es el número y la posición de los flagelos (**Tabla 4**). Sería interesante analizar si el motor del flagelo 2 también se detiene usando un sistema de frenado como lo hace el flagelo 1 (Pilizota *et al.*, 2009) o si existe un mecanismo diferente. Finalmente, concluimos que el sistema flagelar 2 posee un motor unidireccional de arranque-paro (start-stop).

Tabla 4. Comparación de mecanismos de rotación entre diferentes especies bacterianas

Especie	Clase	Arreglo flagelar	Número de flagelos	Dirección de rotación
<i>R. sphaeroides</i>	α -proteobacteria	Lofotrico (Fla2)	3-4	Unidireccional
		Subpolar (Fla1)	1	Unidireccional (CCW) ¹
<i>B. subtilis</i>	Bacilli	Peritrico	4-9	Bidireccional ²
<i>C. crescentus</i>	α -proteobacteria	Monotrico	1	Unidireccional (CW) ³
<i>E. coli</i>	γ -proteobacteria	Peritrico	5-7	Bidireccional ⁴
<i>S. meliloti</i>	α -proteobacteria	Peritrico	2-6	Unidireccional (CW) ⁵
		Monotrico	1	Bidireccional ⁶
<i>V. alginolyticus</i>	γ -proteobacteria	Lateral	>100	Unidireccional (CCW) ⁶
		Monotrico	1	Bidireccional ⁷

¹(Pilizota *et al.*, 2009), ²(Goldman y Ordal, 1981), ³(Koyasu y Shirakihara, 1984), ⁴(Silverman y Simon, 1974), ⁵(Götz y Schmitt, 1987), ⁶(Kojima *et al.*, 2007), ⁷(Butler y Camilli, 2004).

La fuerza protón motriz impulsa al flagelo 2

Nuestros experimentos con la cepa AM1, la cual nada utilizando el flagelo 2, muestran que la motilidad es dependiente del flujo de protones. El Δp , la diferencia en el potencial electroquímico de protones a través de una membrana biológica, consiste de dos componentes: el potencial eléctrico de membrana ($\Delta\Psi$) y el gradiente transmembranal de protones (ΔpH). El CCCP es un desacoplante que colapsa tanto el $\Delta\Psi$ como el ΔpH ; a una concentración de 10 μM suprime por completo la motilidad mediada por el flagelo 2. Esta concentración se ha utilizado previamente con éxito para inhibir motores H^+ -dependientes (Packer *et al.*, 1994, Kawagishi *et al.*, 1995, Manson *et al.*, 1977). Por el contrario, la amilorida un bloqueador de canales de sodio no tiene efecto alguno sobre la motilidad del flagelo 2. Por lo tanto, el sistema flagelar 2 posee un motor H^+ -dependiente que utiliza la fuerza protón motriz como fuente de energía para impulsar al flagelo.

Actualmente, se sabe que las proteínas MotB y PomB son los componentes del estator que determinan la especificidad del ión (Ito *et al.*, 2005). Los resultados que se obtuvieron con los diferentes inhibidores concuerdan con el mayor grado de similitud de la proteína MotB2 de *R. sphaeroides* con MotB de *E. coli* y su menor parecido con PomB de *V. alginolyticus* (identidad: 29% y 19%, similitud: 48% y 39%, respectivamente).

Comportamiento de nado de la cepa AM1

Las células de *R. sphaeroides* que expresan el flagelo 2 nadan en tres dimensiones. El análisis de las trayectorias de nado de las células rastreadas con el programa de análisis de movimiento muestra que las trayectorias tienden a ser curvas con eventos de paro en los que disminuye la velocidad de nado hasta 0 $\mu m/s$. Estos episodios de paro correlacionan con cambios en la dirección de nado los cuales probablemente le permiten a la bacteria reorientarse, de manera similar a lo que ocurre en *E. coli* cuando la bacteria hace “tumble”.

Las células que expresan el flagelo 2 nadan a una velocidad promedio de aproximadamente 60 $\mu m/s$, y se reorientan una vez cada 2 segundos. Estas bacterias

nadan más rápido que *E. coli* cuya velocidad de nado es de aproximadamente 20 $\mu\text{m/s}$ y se reorientan con menor frecuencia, ya que *E. coli* se reorienta una vez por segundo.

El operón quimiotáctico 1 regula el nado del flagelo 2

Los resultados que se presentan en este estudio indican que la mayoría de las proteínas codificadas en el *cheOp1* modulan la respuesta quimiotáctica del sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides*. La interrupción de cada uno de los genes del *locus*, con la única excepción de *mcpB*, resultó en un fenotipo no quimiotáctico en cajas de nado. Estos resultados se confirmaron mediante la complementación en *trans* de cada mutante con el gen silvestre correspondiente.

Al analizar la frecuencia de reorientación de todas las mutantes se observaron tres fenotipos diferentes: mutantes con una frecuencia de reorientación menor, entre ellas *mcpA*, *cheD*, *cheA1*, *cheW1* y *cheY2*, equivalente a un sesgo de nado tipo “smooth”. Dos mutantes con una frecuencia de reorientación mayor, *cheR1* y *cheY5*, similar a un comportamiento “tumbly”. Y por último, aquellas mutantes que no presentaban cambios en la frecuencia de reorientación como *cheY1*, *mcpB*, *tlpS* y *RSP2432*.

Si se compara el fenotipo de estas mutantes con mutantes quimiotácticas en otras especies (**Tabla 5**), se puede observar que al igual que en *E. coli* la ausencia de aquellos genes que participan en la vía de activación (receptores, *cheW* y *cheA*) provoca un fenotipo “smooth”. Lo cual indica que la proteína CheY en su forma fosforilada (CheY-P) es la responsable de parar al motor flagelar Fla2. De los tres genes que codifican para reguladores de respuesta dentro del *locus*, sólo la mutante en *cheY2* tiene fenotipo “smooth”, por lo que planteamos que CheY2 es el componente que induce los paros en el motor flagelar 2. Proponemos que McpA, CheW1, CheA1 y CheY2 forman la vía de señalización quimiotáctica que controla la rotación del flagelo 2. De acuerdo con esta idea, se ha demostrado que la cinasa CheA1 fosforila *in vitro* a CheY2 y también a CheY1, y CheY5 (Porter y Armitage, 2002), estos tres reguladores de respuesta están codificados dentro del *cheOp1*.

El hecho de que las tres mutantes de *cheY* tengan fenotipos distintos demuestra que estas proteínas no son redundantes, lo que sugiere que juegan un papel diferente

en la regulación de la rotación flagelar. Como se mencionó anteriormente, la mutante *cheY2* tiene el mismo fenotipo que las mutantes en los genes *mcpA*, *cheW1* y *cheA1*, indicando que CheY2-P es la señal que induce los paros del flagelo 2. Como se muestra en el modelo de la **Figura 29**, en la mutante *cheY2* están presentes CheY1 y CheY5, sin embargo, ninguna de estas proteínas tiene un efecto directo sobre la rotación del motor. Al no haber señal de paro (CheY2-P) el flagelo rota continuamente y por lo tanto se observa el fenotipo “smooth”.

Tabla 5. Fenotipos de mutantes quimiotácticas en diferentes especies			
Mutante	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>R. sphaeroides (cheOp1)</i>
MCP	Smooth (<i>tsr + tar</i>)		Smooth (<i>mcpA</i>)
<i>cheW</i>	Smooth	Tumbly	Smooth
<i>cheA</i>	Smooth	Tumbly	Smooth
<i>cheY</i>	Smooth	Tumbly	WT ^b (<i>cheY1</i>) Smooth (<i>cheY2</i>) Tumbly (<i>cheY5</i>)
<i>cheR</i>	Smooth	Tumbly	Tumbly
<i>cheB</i>	Tumbly	WT ^b	NP ^a
<i>cheZ</i>	Tumbly	NP ^a	NP ^a
<i>cheD</i>	NP ^a	Tumbly	Smooth

^a NP: no presenta.

^b WT: silvestre.

Por el contrario, la mutante *cheY5* presenta un aumento en la frecuencia de reorientación. Este fenotipo en mutantes quimiotácticas de *E. coli* se conoce como “tumbly”, y está asociado con genes que intervienen en la terminación de la señal, tales como la fosfatasa CheZ (Parkinson y Houts, 1982). En la mutante de *cheY5* observamos sólo el efecto de las proteínas CheY1 y CheY2, **Figura 29**. En este escenario probablemente aumenta la transferencia de fosfatos de la cinasa CheA1 a CheY2 provocando un incremento en la concentración intracelular de CheY2-P. Los niveles elevados de CheY2-P inducen un mayor número de paros y por lo consiguiente se detecta el fenotipo “tumbly”. De acuerdo con esta idea sugerimos que la proteína

CheY5 asume un papel similar al de una fosfatasa de CheY2-P. Un caso similar se ha reportado en la bacteria *S. meliloti*, la cual tampoco posee fosfatasa pero tiene dos reguladores de respuesta: CheY1 y CheY2. En esta bacteria, CheA fosforila tanto a CheY1 como a CheY2 sin embargo, sólo CheY2 en su estado fosforilado se une al motor flagelar para controlar la rotación (Sourjik y Schmitt, 1996). La respuesta se termina cuando CheY2-P transfiere su grupo fosforilo a CheA, quien a su vez finalmente lo transfiere a CheY1 (Sourjik y Schmitt, 1998). Nuestros datos sugieren que al igual que CheY1 de *S. meliloti*, CheY5 en *R. sphaeroides* funciona como una poza de fosfatos. Actualmente, en el laboratorio se está investigando el papel de CheY5 mediante la construcción y caracterización de una doble mutante *cheY2 cheY5*; y además se están llevando a cabo ensayos de fosfotransferencia *in vitro* entre CheA1 y los tres reguladores de respuesta para evaluar el mecanismo por el cual CheY5 acelera la desfosforilación de CheY2-P.

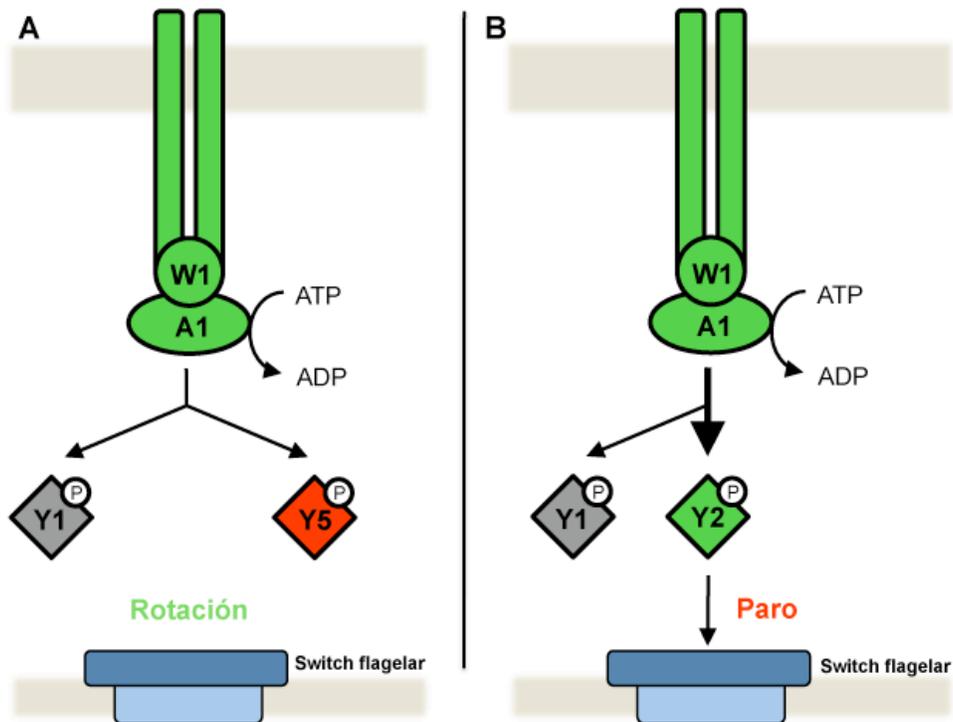


Figura 29. Modelo esquemático de la vía de señalización quimiotáctica en las mutantes *cheY2* y *cheY5*. En verde se muestran los productos de los genes con fenotipo “smooth”, en rojo fenotipo “tumbly” y en gris con fenotipo silvestre. En ambos casos la señal proviene de los receptores (representados como barras), CheW1 (W1) y CheA1 (A1) **A**) En la ausencia de CheY2, CheA1 fosforila a CheY1 (Y1) y CheY5 (Y5), sin embargo ninguna puede detener al motor, por lo que la rotación es continua. **B**) CheA1 fosforila a CheY1 y CheY2 (Y2), pero al no haber CheY5 se aumenta la concentración de CheY2-P, lo que provoca un mayor número de paros.

Otra de las mutantes con una alta frecuencia de reorientación fue la mutante en *cheR1*, lo cual indica que esta proteína es un componente de la vía de señalización quimiotáctica que controla al flagelo 2. En *E. coli* CheR metila constitutivamente a los receptores, la metilación aumenta la actividad de la cinasa CheA. Por el contrario, *B. subtilis* presenta un sistema más complejo ya que la metilación de ciertos residuos activa a la cinasa mientras que la metilación de otros inhibe su actividad (Zimmer *et al.*, 2000). El fenotipo de la mutante *cheR1* en *R. sphaeroides* (**Tabla 5**) nos lleva a proponer que CheR1 metila a un(os) receptor(es) hasta ahora desconocido(s), que pudiera ser McpA, y que la metilación probablemente inhibe la actividad de CheA1.

La fase de adaptación requiere una metilesterasa que contrarreste la actividad de CheR es decir, se necesita una enzima que remueva los grupos metilo de los receptores. La forma fosforilada de CheB (CheB-P) cumple esta función tanto en *E. coli* como en *B. subtilis*, sin embargo, dentro del *cheOp1* no existe un homólogo de esta proteína. No obstante, se encuentra otro gen que está involucrado en la fase de adaptación conocido como *cheD*. La proteína CheD es una desamidasa, cuya función en *B. subtilis* es activar a los quimiorreceptores mediante la desamidación de residuos de glutamina (Kristich y Ordal, 2002) y como parte del sistema de adaptación CheC/CheD/CheY (Muff y Ordal, 2007). Ahora bien, se ha descrito que CheD en *Thermotoga maritima* adicionalmente posee actividad de metilesterasa (Chao *et al.*, 2006). En *R. sphaeroides* la ausencia de CheD provoca una reducción en la frecuencia de paro. Si esta proteína es la responsable de remover los grupos metilo de los receptores, entonces en la mutante *cheD* los receptores se encuentran metilados. De acuerdo con lo que se mencionó anteriormente un receptor no metilado es capaz de activar a CheA1, mientras que un receptor metilado inhibe su actividad. Por lo tanto, la ausencia de CheD inactiva la cinasa CheA1 provocando una disminución en los niveles de CheY2-P, que se refleja en un menor número de eventos de reorientación.

Sin embargo, aún se requieren más estudios para determinar cómo funciona la fase de adaptación en la vía quimiotáctica del flagelo 2. *E. coli* utiliza un solo sistema de adaptación a través de la metilación de los receptores. Pero, *B. subtilis* utiliza tres sistemas (Rao *et al.*, 2008): la metilación de los receptores, un sistema que involucra la fosforilación de CheV y el sistema CheC/CheD/CheY. En *R. sphaeroides* aún falta por

explorar cuáles son los receptores que se metilan, qué residuos son sensibles a metilación y qué efecto tiene esta metilación. También, sería interesante investigar cuál es el papel de CheD, ya que esta proteína sólo se ha estudiado en organismos como parte del sistema CheC/CheD/CheY. Cabe resaltar que *R. sphaeroides* no posee un homólogo de la proteína CheC al igual que otras bacterias como *Agrobacterium tumefaciens*, *Borrelia burgdorferi*, *C. crescentus*, *P. aeruginosa*, *S. meliloti* y *Xanthomonas campestris* (Yuan *et al.*, 2012). La ausencia de CheC sugiere que CheD debe tener una función distinta en estas bacterias, por lo que el estudio de CheD en *R. sphaeroides* probablemente revelará un mecanismo de adaptación aún no descrito en la quimiotaxis bacteriana.

La única mutante que presentó una disminución significativa en la velocidad de nado fue la mutante en *cheR1* (**Figura 25**). Esta reducción en la velocidad correlaciona con que esta cepa tiene una alta frecuencia de reorientación (**Figura 26**), por lo que es posible que las bacterias no puedan alcanzar la máxima velocidad de nado entre cada paro. Un efecto similar se ha observado en *E. coli*, en donde la sobreexpresión de CheY-P no sólo causa un aumento en frecuencia de reorientación sino también afecta la velocidad de nado negativamente (Alon *et al.*, 1998).

Cabe mencionar que mientras que las mutantes *cheY1*, *tIpS* y *RSP2432* presentaron una disminución en el halo de nado (**Figura 22**) su frecuencia de reorientación y velocidad de nado fueron similares a la cepa silvestre AM1 (**Figura 25 y 26**). Una posible explicación para las diferencias encontradas es que las señales quimiotácticas en las cajas de agar suave son más fuertes que en medio líquido, esto debido a diferencias en la tasa de difusión. Es posible que CheY1, TIpS y RSP2432 controlen al flagelo 2 sólo cuando el estímulo quimiotáctico es fuerte. No obstante, se necesitan más estudios para determinar si esta hipótesis es adecuada para explicar los fenotipos observados.

Finalmente, la única mutante que tuvo un fenotipo similar al silvestre fue la mutante en *mcpB*. Este gen codifica para un receptor membranal por lo que pensamos que probablemente McpB detecta señales que están ausentes en las condiciones probadas durante este estudio.

Modelo de la vía de señalización quimiotáctica del flagelo 2 de *R. sphaeroides*

Con base en los resultados obtenidos en este estudio, proponemos el modelo que se muestra en la **Figura 30**.

En este modelo, los quimiorreceptores, entre los que se pudiera encontrar McpA (representados como barras rosas en la **Figura 30**), controlan la actividad de cinasa de CheA1 mediante su interacción con CheW1. Cuando CheR1 metila los MCPs, se inhibe la autofosforilación de CheA1 y los flagelos rotan continuamente. La proteína CheD podría desmetilar a los quimiorreceptores para promover la activación de CheA1 quien posteriormente fosforila a CheY1, CheY2 y CheY5. Al aumentar los niveles CheY2-P se incrementa la probabilidad de reorientación (evento de paro). Por lo otro lado, CheY5 probablemente modula los niveles intracelulares de CheY2-P actuando como una poza de fosfatos.

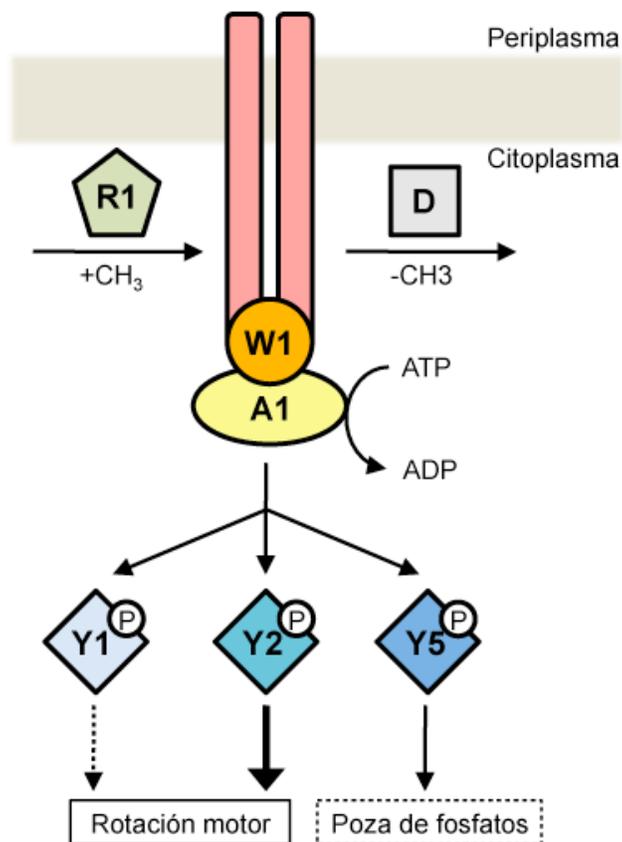


Figura 30. Modelo de la participación de las proteínas codificadas en el *cheOp1* en la vía de señalización quimiotáctica del flagelo 2. R1: CheR1, D: CheD, W1: CheW1, A1: CheA1, Y1: CheY1, Y2: CheY2, Y5: CheY5. Ver el texto para más detalles.

Origen del operón quimiotáctico 1 de *R. sphaeroides*

Como se mencionó en la introducción la agrupación flagelar 1 se adquirió por transferencia horizontal de una γ -proteobacteria, mientras que la agrupación flagelar 2 contiene los genes nativos de *R. sphaeroides* (Poggio *et al.*, 2007). Esto nos lleva a preguntarnos, ¿cuál es el origen de los diferentes loci quimiotácticos? Las proteínas codificadas en *cheOp2* y *cheOp3* controlan al flagelo 1 (Shah *et al.*, 2000b, Porter *et al.*, 2002), e incluso el *cheOp3* está localizado dentro de la agrupación flagelar 1 (**Figura 14**), lo que sugiere tentativamente que estos genes también pudieron haber sido adquiridos por transferencia horizontal. Desafortunadamente, no podemos decir nada de los otros dos *loci* basándonos en su contexto genético. Ya que descubrimos que *cheOp1* controla al flagelo 2 y además se encuentran genes ortólogos de esta agrupación en otras α -proteobacterias que no poseen flagelo 1 (Miller *et al.*, 2007), podríamos inferir que estos genes son los nativos de *R. sphaeroides*. Sin embargo, es necesario hacer un análisis filogenético de los genes quimiotácticos para poder determinar si las diferentes copias de genes quimiotácticos se originaron por eventos de multiplicación o por transferencia horizontal.

CONCLUSIONES

- 1) Los flagelos del sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides* rotan unidireccionalmente.
- 2) La fuerza protón motriz es la fuente de energía que impulsa al flagelo 2.
- 3) La mayoría de las proteínas codificadas en el *cheOp1* conforman la vía de señalización quimiotáctica del sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides*:
 - a) La fase de activación es similar a la de *E. coli*, en la que CheY-P induce un cambio en la rotación flagelar. CheY2-P es la señal que induce los eventos de paro en *R. sphaeroides*.
 - b) La fase de adaptación, las reacciones de metilación/demetilación ocurren al revés que en *E. coli*.
 - c) CheY5 actúa como una poza de fosfatos de CheY2-P.

PERSPECTIVAS

- Analizar cuál es el efecto en la frecuencia de reorientación de las dobles mutantes *cheY2 cheY5*, *cheY1 cheY5* y *cheY1 cheY2*.
- Estudiar las reacciones de fosfotransferencia entre la cinasa CheA1 y los tres reguladores de respuesta. En específico efectuar ensayos de competencia entre las proteínas CheY para establecer el mecanismo por el cual CheY5 acelera la desfosforilación de CheY2-P.
- Determinar si CheY1, CheY2 y CheY5 y su forma fosforilada interactúan con la proteína del “switch” FliM2.
- Examinar con otro tipo de ensayos (tubos capilares) a las mutantes *cheY1*, *tlpS* y *RSP2432* para poder entender más sobre su función.
- Caracterizar detalladamente a CheD para poder determinar si posee actividad de desamidasa y/o metilesterasa, y cuál su función durante la fase de adaptación.
- Investigar la posible participación de otros genes quimiotácticos codificados en los *loci* *cheOp2* y *cheOp3* en la vía de señalización quimiotáctica del flagelo 2.
- Establecer las relaciones filogenéticas entre las múltiples copias de genes quimiotácticos.

REFERENCIAS

- Adler, J., (1975) Chemotaxis in bacteria. *Annu Rev Biochem* **44**: 341-356.
- Akiba, T., H. Yoshimura y K. Namba, (1991) Monolayer crystallization of flagellar L-P rings by sequential addition and depletion of lipid. *Science* **252**: 1544-1546.
- Allen, J. P. y J. C. Williams, (2011) The evolutionary pathway from anoxygenic to oxygenic photosynthesis examined by comparison of the properties of photosystem II and bacterial reaction centers. *Photosynth Res* **107**: 59-69.
- Alon, U., L. Camarena, M. G. Surette, B. Aguera y Arcas, Y. Liu, S. Leibler y J. B. Stock, (1998) Response regulator output in bacterial chemotaxis. *EMBO J* **17**: 4238-4248.
- Alon, U., M. G. Surette, N. Barkai y S. Leibler, (1999) Robustness in bacterial chemotaxis. *Nature* **397**: 168-171.
- Anand, G. S. y A. M. Stock, (2002) Kinetic basis for the stimulatory effect of phosphorylation on the methylesterase activity of CheB. *Biochemistry* **41**: 6752-6760.
- Armitage, J. P. y M. C. W. Evans, (1981) The reaction centre in the phototactic and chemotactic response of photosynthetic bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **11**: 89-92.
- Armitage, J. P., P. Keighley y M. C. W. Evans, (1979) Chemotaxis in photosynthetic bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **6**: 99-102.
- Armitage, J. P. y R. M. Macnab, (1987) Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **169**: 514-518.
- Armitage, J. P., T. P. Pitta, M. A. Vigeant, H. L. Packer y R. M. Ford, (1999) Transformations in flagellar structure of *Rhodobacter sphaeroides* and possible relationship to changes in swimming speed. *J Bacteriol* **181**: 4825-4833.
- Asai, Y., S. Kojima, H. Kato, N. Nishioka, I. Kawagishi y M. Homma, (1997) Putative channel components for the fast-rotating sodium-driven flagellar motor of a marine bacterium. *J Bacteriol* **179**: 5104-5110.
- Asakura, S., (1970) Polymerization of flagellin and polymorphism of flagella. *Adv Biophys* **1**: 99-155.
- Atsumi, T., Y. Maekawa, H. Tokuda y Y. Imae, (1992a) Amiloride at pH 7.0 inhibits the Na(+)-driven flagellar motors of *Vibrio alginolyticus* but allows cell growth. *FEBS Lett* **314**: 114-116.
- Atsumi, T., L. McCarter y Y. Imae, (1992b) Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion-motive forces. *Nature* **355**: 182-184.
- Baker, M. D., P. M. Wolanin y J. B. Stock, (2006) Signal transduction in bacterial chemotaxis. *Bioessays* **28**: 9-22.
- Ballado, T., L. Camarena, B. González-Pedrajo, E. Silva-Herzog y G. Dreyfus, (2001) The hook gene (*flgE*) is expressed from the *flgBCDEF* operon in *Rhodobacter sphaeroides*: study of an *flgE* mutant. *J Bacteriol* **183**: 1680-1687.
- Ballado, T., A. Campos, L. Camarena y G. Dreyfus, (1996) Flagellar genes from *Rhodobacter sphaeroides* are homologous to genes of the *fliF* operon of *Salmonella typhimurium* and to the type-III secretion system. *Gene* **170**: 69-72.

- Barnakov, A. N., L. A. Barnakova y G. L. Hazelbauer, (1999) Efficient adaptational demethylation of chemoreceptors requires the same enzyme-docking site as efficient methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10667-10672.
- Berg, H. C., (2003) The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem* **72**: 19-54.
- Berg, H. C. y R. A. Anderson, (1973) Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. *Nature* **245**: 380-382.
- Berg, H. C. y D. A. Brown, (1974) Chemotaxis in *Escherichia coli* analyzed by three-dimensional tracking. *Antibiot Chemother* **19**: 55-78.
- Berry, R. M. y J. P. Armitage, (2000) Response kinetics of tethered *Rhodobacter sphaeroides* to changes in light intensity. *Biophys J* **78**: 1207-1215.
- Bertani, G., (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**: 293-300.
- Bilwes, A. M., L. A. Alex, B. R. Crane y M. I. Simon, (1999) Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* **96**: 131-141.
- Bilwes, A. M., C. M. Quezada, L. R. Croal, B. R. Crane y M. I. Simon, (2001) Nucleotide binding by the histidine kinase CheA. *Nat Struct Biol* **8**: 353-360.
- Bischoff, D. S. y G. W. Ordal, (1991) Sequence and characterization of *Bacillus subtilis* CheB, a homolog of *Escherichia coli* CheY, and its role in a different mechanism of chemotaxis. *J Biol Chem* **266**: 12301-12305.
- Bischoff, D. S. y G. W. Ordal, (1992) Identification and characterization of FliY, a novel component of the *Bacillus subtilis* flagellar switch complex. *Mol Microbiol* **6**: 2715-2723.
- Blair, D. F. y H. C. Berg, (1990) The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor. *Cell* **60**: 439-449.
- Blat, Y. y M. Eisenbach, (1994) Phosphorylation-dependent binding of the chemotaxis signal molecule CheY to its phosphatase, CheZ. *Biochemistry* **33**: 902-906.
- Blat, Y. y M. Eisenbach, (1996) Conserved C-terminus of the phosphatase CheZ is a binding domain for the chemotactic response regulator CheY. *Biochemistry* **35**: 5679-5683.
- Borkovich, K. A. y M. I. Simon, (1990) The dynamics of protein phosphorylation in bacterial chemotaxis. *Cell* **63**: 1339-1348.
- Boukhvalova, M., R. VanBruggen y R. C. Stewart, (2002) CheA kinase and chemoreceptor interaction surfaces on CheW. *J Biol Chem* **277**: 23596-23603.
- Bourret, R. B., J. Davagnino y M. I. Simon, (1993) The carboxy-terminal portion of the CheA kinase mediates regulation of autophosphorylation by transducer and CheW. *J Bacteriol* **175**: 2097-2101.
- Braun, T. F., L. Q. Al-Mawsawi, S. Kojima y D. F. Blair, (2004) Arrangement of core membrane segments in the MotA/MotB proton-channel complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **43**: 35-45.
- Bren, A. y M. Eisenbach, (1998) The N terminus of the flagellar switch protein, FliM, is the binding domain for the chemotactic response regulator, CheY. *J Mol Biol* **278**: 507-514.
- Bren, A., M. Welch, Y. Blat y M. Eisenbach, (1996) Signal termination in bacterial chemotaxis: CheZ mediates dephosphorylation of free rather than switch-bound CheY. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10090-10093.

- Briegel, A., H. J. Ding, Z. Li, J. Werner, Z. Gitai, D. P. Dias, R. B. Jensen y G. J. Jensen, (2008) Location and architecture of the *Caulobacter crescentus* chemoreceptor array. *Mol Microbiol* **69**: 30-41.
- Briegel, A., D. R. Ortega, E. I. Tocheva, K. Wuichet, Z. Li, S. Chen, A. Müller, C. V. Iancu, G. E. Murphy, M. J. Dobro, I. B. Zhulin y G. J. Jensen, (2009) Universal architecture of bacterial chemoreceptor arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 17181-17186.
- Brown, P. N., C. P. Hill y D. F. Blair, (2002) Crystal structure of the middle and C-terminal domains of the flagellar rotor protein FliG. *EMBO J* **21**: 3225-3234.
- Brown, P. N., M. A. Mathews, L. A. Joss, C. P. Hill y D. F. Blair, (2005) Crystal structure of the flagellar rotor protein FliN from *Thermotoga maritima*. *J Bacteriol* **187**: 2890-2902.
- Brown, P. N., M. Terrazas, K. Paul y D. F. Blair, (2007) Mutational analysis of the flagellar protein FliG: sites of interaction with FliM and implications for organization of the switch complex. *J Bacteriol* **189**: 305-312.
- Butler, S. M. y A. Camilli, (2004) Both chemotaxis and net motility greatly influence the infectivity of *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 5018-5023.
- Calldine, C. R., (1978) Change of waveform in bacterial flagella: The role of mechanics at the molecular level. *Journal of Molecular Biology* **118**: 457-479.
- Cantwell, B. J., R. R. Draheim, R. B. Weart, C. Nguyen, R. C. Stewart y M. D. Manson, (2003) CheZ phosphatase localizes to chemoreceptor patches via CheA-short. *J Bacteriol* **185**: 2354-2361.
- Castillo, D. J., T. Ballado, L. Camarena y G. Dreyfus, (2009) Functional analysis of a large non-conserved region of FlgK (HAP1) from *Rhodobacter sphaeroides*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **95**: 77-90.
- Chao, X., T. J. Muff, S. Y. Park, S. Zhang, A. M. Pollard, G. W. Ordal, A. M. Bilwes y B. R. Crane, (2006) A receptor-modifying deamidase in complex with a signaling phosphatase reveals reciprocal regulation. *Cell* **124**: 561-571.
- Cho, H. S., S. Y. Lee, D. Yan, X. Pan, J. S. Parkinson, S. Kustu, D. E. Wemmer y J. G. Pelton, (2000) NMR structure of activated CheY. *J Mol Biol* **297**: 543-551.
- Choudhary, M., Y. X. Fu, C. Mackenzie y S. Kaplan, (2004) DNA sequence duplication in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: evidence of an ancient partnership between chromosomes I and II. *J Bacteriol* **186**: 2019-2027.
- Chun, S. Y. y J. S. Parkinson, (1988) Bacterial motility: membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein. *Science* **239**: 276-278.
- Clayton, R. K. y W. R. Sistrom, (1978) *The photosynthetic bacteria*. Plenum Press.
- Cluzel, P., M. Surette y S. Leibler, (2000) An ultrasensitive bacterial motor revealed by monitoring signaling proteins in single cells. *Science* **287**: 1652-1655.
- Cohen, S. N., A. C. Chang y L. Hsu, (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 2110-2114.
- Cornelis, G. R., (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**: 811-825.
- Da Re, S. S., D. Deville-Bonne, T. Tolstykh, M. Vron y J. B. Stock, (1999) Kinetics of CheY phosphorylation by small molecule phosphodonors. *FEBS Lett* **457**: 323-326.

- Davis, J., T. J. Donohue y S. Kaplan, (1988) Construction, characterization, and complementation of a Puf- mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **170**: 320-329.
- de la Mora, J., T. Ballado, B. González-Pedrajo, L. Camarena y G. Dreyfus, (2007) The flagellar muramidase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **189**: 7998-8004.
- De Mot, R. y J. Vanderleyden, (1994) The C-terminal sequence conservation between OmpA-related outer membrane proteins and MotB suggests a common function in both gram-positive and gram-negative bacteria, possibly in the interaction of these domains with peptidoglycan. *Mol Microbiol* **12**: 333-334.
- del Campo, A. M., T. Ballado, J. de la Mora, S. Poggio, L. Camarena y G. Dreyfus, (2007) Chemotactic control of the two flagellar systems of *Rhodobacter sphaeroides* is mediated by different sets of CheY and FliM proteins. *J Bacteriol* **189**: 8397-8401.
- DePamphilis, M. L. y J. Adler, (1971) Purification of intact flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **105**: 376-383.
- Djordjevic, S., P. N. Goudreau, Q. Xu, A. M. Stock y A. H. West, (1998) Structural basis for methylesterase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1381-1386.
- Djordjevic, S. y A. M. Stock, (1998) Structural analysis of bacterial chemotaxis proteins: components of a dynamic signaling system. *J Struct Biol* **124**: 189-200.
- Ellefson, D. D., U. Weber y A. J. Wolfe, (1997) Genetic analysis of the catalytic domain of the chemotaxis-associated histidine kinase CheA. *J Bacteriol* **179**: 825-830.
- Fahrner, K. A., S. M. Block, S. Krishnaswamy, J. S. Parkinson y H. C. Berg, (1994) A mutant hook-associated protein (HAP3) facilitates torsionally induced transformations of the flagellar filament of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **238**: 173-186.
- Fan, F. y R. M. Macnab, (1996) Enzymatic characterization of FliI. An ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **271**: 31981-31988.
- Ferré, A., J. De La Mora, T. Ballado, L. Camarena y G. Dreyfus, (2004) Biochemical study of multiple CheY response regulators of the chemotactic pathway of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **186**: 5172-5177.
- Francis, N. R., V. M. Irikura, S. Yamaguchi, D. J. DeRosier y R. M. Macnab, (1992) Localization of the *Salmonella typhimurium* flagellar switch protein FliG to the cytoplasmic M-ring face of the basal body. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 6304-6308.
- Francis, N. R., G. E. Sosinsky, D. Thomas y D. J. DeRosier, (1994) Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J Mol Biol* **235**: 1261-1270.
- Fredrick, K. L. y J. D. Helmann, (1994) Dual chemotaxis signaling pathways in *Bacillus subtilis*: a sigma D-dependent gene encodes a novel protein with both CheW and CheY homologous domains. *J Bacteriol* **176**: 2727-2735.
- Fujii, T., T. Kato y K. Namba, (2009) Specific arrangement of alpha-helical coiled coils in the core domain of the bacterial flagellar hook for the universal joint function. *Structure* **17**: 1485-1493.

- Fukuoka, H., Y. Inoue, H. Takahashi y A. Ishijima, (2013) Direct imaging of CheY-binding to a functioning bacterial flagellar motor. In: Bacterial locomotion and signal transduction XII. Tucson, Arizona, pp. 5.
- Gao, R. y A. M. Stock, (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* **63**: 133-154.
- García, N., A. Campos, A. Osorio, S. Poggio, B. González-Pedrajo, L. Camarena y G. Dreyfus, (1998) The flagellar switch genes *fliM* and *fliN* of *Rhodobacter sphaeroides* are contained in a large flagellar gene cluster. *J Bacteriol* **180**: 3978-3982.
- Gauden, D. E. y J. P. Armitage, (1995) Electron transport-dependent taxis in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **177**: 5853-5859.
- Goldman, D. J. y G. W. Ordal, (1981) Sensory adaptation and deadaptation by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **147**: 267-270.
- Goldman, D. J. y G. W. Ordal, (1984) In vitro methylation and demethylation of methyl-accepting chemotaxis proteins in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **23**: 2600-2606.
- González, Y., D. Venegas, G. Mendoza-Hernandez, L. Camarena y G. Dreyfus, (2010) Na(+)- and H(+)-dependent motility in the coral pathogen *Vibrio shilonii*. *FEMS Microbiol Lett* **312**: 142-150.
- González-Pedrajo, B., T. Ballado, A. Campos, R. E. Sockett, L. Camarena y G. Dreyfus, (1997) Structural and genetic analysis of a mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 deficient in hook length control. *J Bacteriol* **179**: 6581-6588.
- González-Pedrajo, B., J. de la Mora, T. Ballado, L. Camarena y G. Dreyfus, (2002) Characterization of the *flgG* operon of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 and its role in flagellum biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1579**: 55-63.
- González-Pedrajo, B., T. Minamino, M. Kihara y K. Namba, (2006) Interactions between C ring proteins and export apparatus components: a possible mechanism for facilitating type III protein export. *Mol Microbiol* **60**: 984-998.
- Grishanin, R. N., D. E. Gauden y J. P. Armitage, (1997) Photoresponses in *Rhodobacter sphaeroides*: role of photosynthetic electron transport. *J Bacteriol* **179**: 24-30.
- Griswold, I. J., H. Zhou, M. Matison, R. V. Swanson, L. P. McIntosh, M. I. Simon y F. W. Dahlquist, (2002) The solution structure and interactions of CheW from *Thermotoga maritima*. *Nat Struct Biol* **9**: 121-125.
- Götz, R. y R. Schmitt, (1987) *Rhizobium meliloti* swims by unidirectional, intermittent rotation of right-handed flagellar helices. *J Bacteriol* **169**: 3146-3150.
- Hall, P. G. y N. R. Krieg, (1983) Swarming of *Azospirillum brasilense* on solid media. *Canadian Journal of Microbiology* **29**: 1592-1594.
- Hamblin, P. A., N. A. Bourne y J. P. Armitage, (1997a) Characterization of the chemotaxis protein CheW from *Rhodobacter sphaeroides* and its effect on the behaviour of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **24**: 41-51.
- Hamblin, P. A., B. A. Maguire, R. N. Grishanin y J. P. Armitage, (1997b) Evidence for two chemosensory pathways in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **26**: 1083-1096.
- Harrison, D. M., J. Skidmore, J. P. Armitage y J. R. Maddock, (1999) Localization and environmental regulation of MCP-like proteins in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **31**: 885-892.
- Hazelbauer, G. L., J. J. Falke y J. S. Parkinson, (2008) Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem Sci* **33**: 9-19.

- Hess, J. F., K. Oosawa, N. Kaplan y M. I. Simon, (1988) Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. *Cell* **53**: 79-87.
- Hirano, T., S. Yamaguchi, K. Oosawa y S. Aizawa, (1994) Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 5439-5449.
- Hirota, N. y Y. Imae, (1983) Na⁺-driven flagellar motors of an alkalophilic *Bacillus* strain YN-1. *J Biol Chem* **258**: 10577-10581.
- Homma, M., H. Fujita, S. Yamaguchi y T. Iino, (1984a) Excretion of unassembled flagellin by *Salmonella typhimurium* mutants deficient in hook-associated proteins. *J Bacteriol* **159**: 1056-1059.
- Homma, M. y T. Iino, (1985) Locations of hook-associated proteins in flagellar structures of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **162**: 183-189.
- Homma, M., Y. Komeda, T. Iino y R. M. Macnab, (1987) The flaFIX gene product of *Salmonella typhimurium* is a flagellar basal body component with a signal peptide for export. *J Bacteriol* **169**: 1493-1498.
- Homma, M., K. Kutsukake, M. Hasebe, T. Iino y R. M. Macnab, (1990) FlgB, FlgC, FlgF and FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **211**: 465-477.
- Homma, M., K. Kutsukake, T. Iino y S. Yamaguchi, (1984b) Hook-associated proteins essential for flagellar filament formation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **157**: 100-108.
- Hotani, H., (1982) Micro-video study of moving bacterial flagellar filaments. III. Cyclic transformation induced by mechanical force. *J Mol Biol* **156**: 791-806.
- Hueck, C. J., (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.
- Ibuki, T., K. Imada, T. Minamino, T. Kato, T. Miyata y K. Namba, (2011) Common architecture of the flagellar type III protein export apparatus and F- and V-type ATPases. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 277-282.
- Ingham, C. J. y J. P. Armitage, (1987) Involvement of transport in *Rhodobacter sphaeroides* chemotaxis. *J Bacteriol* **169**: 5801-5807.
- Ito, M., N. Terahara, S. Fujinami y T. A. Krulwich, (2005) Properties of motility in *Bacillus subtilis* powered by the H⁺-coupled MotAB flagellar stator, Na⁺-coupled MotPS or hybrid stators MotAS or MotPB. *J Mol Biol* **352**: 396-408.
- Jeziore-Sassoon, Y., P. A. Hamblin, C. A. Bootle-Wilbraham, P. S. Poole y J. P. Armitage, (1998) Metabolism is required for chemotaxis to sugars in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology* **144** (Pt 1): 229-239.
- Jones, C. J., R. M. Macnab, H. Okino y S. Aizawa, (1990) Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **212**: 377-387.
- Jones, M. R., (2009) The petite purple photosynthetic powerpack. *Biochem Soc Trans* **37**: 400-407.
- Kamiya, R. y S. Asakura, (1976) Helical transformations of *Salmonella* flagella in vitro. *J Mol Biol* **106**: 167-186.
- Kamiya, R., S. Asakura, K. Wakabayashi y K. Namba, (1979) Transition of bacterial flagella from helical to straight forms with different subunit arrangements. *J Mol Biol* **131**: 725-742.

- Karatan, E., M. M. Saulmon, M. W. Bunn y G. W. Ordal, (2001) Phosphorylation of the response regulator CheV is required for adaptation to attractants during *Bacillus subtilis* chemotaxis. *J Biol Chem* **276**: 43618-43626.
- Kawagishi, I., Y. Maekawa, T. Atsumi, M. Homma y Y. Imae, (1995) Isolation of the polar and lateral flagellum-defective mutants in *Vibrio alginolyticus* and identification of their flagellar driving energy sources. *J Bacteriol* **177**: 5158-5160.
- Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi y D. Trollinger, (1988) Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* **70**: 191-197.
- Kehry, M. R. y F. W. Dahlquist, (1982) Adaptation in bacterial chemotaxis: CheB-dependent modification permits additional methylations of sensory transducer proteins. *Cell* **29**: 761-772.
- Kehry, M. R., T. G. Doak y F. W. Dahlquist, (1985) Sensory adaptation in bacterial chemotaxis: regulation of demethylation. *J Bacteriol* **163**: 983-990.
- Khursigara, C. M., X. Wu y S. Subramaniam, (2008) Chemoreceptors in *Caulobacter crescentus*: trimers of receptor dimers in a partially ordered hexagonally packed array. *J Bacteriol* **190**: 6805-6810.
- Kim, K. K., H. Yokota y S. H. Kim, (1999) Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor. *Nature* **400**: 787-792.
- Kirby, J. R., C. J. Kristich, M. M. Saulmon, M. A. Zimmer, L. F. Garrity, I. B. Zhulin y G. W. Ordal, (2001) CheC is related to the family of flagellar switch proteins and acts independently from CheD to control chemotaxis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **42**: 573-585.
- Kirsch, M. L., P. D. Peters, D. W. Hanlon, J. R. Kirby y G. W. Ordal, (1993a) Chemotactic methylesterase promotes adaptation to high concentrations of attractant in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **268**: 18610-18616.
- Kirsch, M. L., A. R. Zuberi, D. Henner, P. D. Peters, M. A. Yazdi y G. W. Ordal, (1993b) Chemotactic methyltransferase promotes adaptation to repellents in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **268**: 25350-25356.
- Kobayashi, K., T. Saitoh, D. S. Shah, K. Ohnishi, I. G. Goodfellow, R. E. Sockett y S. I. Aizawa, (2003) Purification and characterization of the flagellar basal body of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **185**: 5295-5300.
- Kofoed, E. C. y J. S. Parkinson, (1991) Tandem translation starts in the *cheA* locus of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**: 2116-2119.
- Kojima, M., R. Kubo, T. Yakushi, M. Homma y I. Kawagishi, (2007) The bidirectional polar and unidirectional lateral flagellar motors of *Vibrio alginolyticus* are controlled by a single CheY species. *Mol Microbiol* **64**: 57-67.
- Kojima, S. y D. F. Blair, (2003) Rotary motors (bacterial). In: McGraw-Hill Yearbook of Science/Technology 2003. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc., pp. 363-366.
- Kojima, S. y D. F. Blair, (2004) Solubilization and purification of the MotA/MotB complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **43**: 26-34.
- Koyasu, S. y Y. Shirakihara, (1984) *Caulobacter crescentus* flagellar filament has a right-handed helical form. *J Mol Biol* **173**: 125-130.
- Kristich, C. J. y G. W. Ordal, (2002) *Bacillus subtilis* CheD is a chemoreceptor modification enzyme required for chemotaxis. *J Biol Chem* **277**: 25356-25362.
- Lambert, C., K. J. Evans, R. Till, L. Hopley, M. Capeness, S. Rendulic, S. C. Schuster, S. Aizawa y R. E. Sockett, (2006) Characterizing the flagellar filament and the

- role of motility in bacterial prey-penetration by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Mol Microbiol* **60**: 274-286.
- Larsen, S. H., J. Adler, J. J. Gargus y R. W. Hogg, (1974a) Chemomechanical coupling without ATP: the source of energy for motility and chemotaxis in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: 1239-1243.
- Larsen, S. H., R. W. Reader, E. N. Kort, W. W. Tso y J. Adler, (1974b) Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in *Escherichia coli*. *Nature* **249**: 74-77.
- Le Moual, H., T. Quang y D. E. Koshland, (1997) Methylation of the *Escherichia coli* chemotaxis receptors: intra- and interdimer mechanisms. *Biochemistry* **36**: 13441-13448.
- Levit, M. N., T. W. Grebe y J. B. Stock, (2002) Organization of the receptor-kinase signaling array that regulates *Escherichia coli* chemotaxis. *J Biol Chem* **277**: 36748-36754.
- Levit, M. N., Y. Liu y J. B. Stock, (1999) Mechanism of CheA protein kinase activation in receptor signaling complexes. *Biochemistry* **38**: 6651-6658.
- Levit, M. N. y J. B. Stock, (2002) Receptor methylation controls the magnitude of stimulus-response coupling in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* **277**: 36760-36765.
- Li, G. y R. M. Weis, (2000) Covalent modification regulates ligand binding to receptor complexes in the chemosensory system of *Escherichia coli*. *Cell* **100**: 357-365.
- Li, J., R. V. Swanson, M. I. Simon y R. M. Weis, (1995) The response regulators CheB and CheY exhibit competitive binding to the kinase CheA. *Biochemistry* **34**: 14626-14636.
- Li, M. y G. L. Hazelbauer, (2004) Cellular stoichiometry of the components of the chemotaxis signaling complex. *J Bacteriol* **186**: 3687-3694.
- Li, N., S. Kojima y M. Homma, (2011) Sodium-driven motor of the polar flagellum in marine bacteria *Vibrio*. *Genes Cells* **16**: 985-999.
- Liu, J. D. y J. S. Parkinson, (1989) Role of CheW protein in coupling membrane receptors to the intracellular signaling system of bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 8703-8707.
- Lloyd, S. A. y D. F. Blair, (1997) Charged residues of the rotor protein FliG essential for torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **266**: 733-744.
- Lloyd, S. A., H. Tang, X. Wang, S. Billings y D. F. Blair, (1996) Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: evidence of a direct role for FliG but not for FliM or FliN. *J Bacteriol* **178**: 223-231.
- Lowder, B. J., M. D. Duyvesteyn y D. F. Blair, (2005) FliG subunit arrangement in the flagellar rotor probed by targeted cross-linking. *J Bacteriol* **187**: 5640-5647.
- Lowe, G., M. Meister y H. C. Berg, (1987) Rapid rotation of flagellar bundles in swimming bacteria. **325**: 637-640.
- Lukat, G. S., B. H. Lee, J. M. Mottonen, A. M. Stock y J. B. Stock, (1991) Roles of the highly conserved aspartate and lysine residues in the response regulator of bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* **266**: 8348-8354.
- Lukat, G. S., A. M. Stock y J. B. Stock, (1990) Divalent metal ion binding to the CheY protein and its significance to phosphotransfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry* **29**: 5436-5442.

- Mackenzie, C., M. Choudhary, F. W. Larimer, P. F. Predki, S. Stilwagen, J. P. Armitage, R. D. Barber, T. J. Donohue, J. P. Hosler, J. E. Newman, J. P. Shapleigh, R. E. Sockett, J. Zeilstra-Ryalls y S. Kaplan, (2001) The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Photosynth Res* **70**: 19-41.
- Macnab, R. M., (1977) Bacterial flagella rotating in bundles: a study in helical geometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 221-225.
- Macnab, R. M. y M. K. Ornston, (1977) Normal-to-curly flagellar transitions and their role in bacterial tumbling. Stabilization of an alternative quaternary structure by mechanical force. *J Mol Biol* **112**: 1-30.
- Maddock, J. R. y L. Shapiro, (1993) Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science* **259**: 1717-1723.
- Maki, S., F. Vonderviszt, Y. Furukawa, K. Imada y K. Namba, (1998) Plugging interactions of HAP2 pentamer into the distal end of flagellar filament revealed by electron microscopy. *J Mol Biol* **277**: 771-777.
- Manson, M. D., P. Tedesco, H. C. Berg, F. M. Harold y C. Van der Drift, (1977) A protonmotive force drives bacterial flagella. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 3060-3064.
- Mao, H., P. S. Cremer y M. D. Manson, (2003) A sensitive, versatile microfluidic assay for bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5449-5454.
- Martin, A. C., U. Nair, J. P. Armitage y J. R. Maddock, (2003) Polar localization of CheA2 in *Rhodobacter sphaeroides* requires specific Che homologs. *J Bacteriol* **185**: 4667-4671.
- Martin, A. C., G. H. Wadhams y J. P. Armitage, (2001a) The roles of the multiple CheW and CheA homologues in chemotaxis and in chemoreceptor localization in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **40**: 1261-1272.
- Martin, A. C., G. H. Wadhams, D. S. Shah, S. L. Porter, J. C. Mantotta, T. J. Craig, P. H. Verdult, H. Jones y J. P. Armitage, (2001b) CheR- and CheB-dependent chemosensory adaptation system of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **183**: 7135-7144.
- Martinez, R. J., A. T. Ichiki, N. P. Lundh y S. R. Tronick, (1968) A single amino acid substitution responsible for altered flagellar morphology. *J Mol Biol* **34**: 559-564.
- Merino, S., J. G. Shaw y J. M. Tomás, (2006) Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. *FEMS Microbiol Lett* **263**: 127-135.
- Milburn, M. V., G. G. Privé, D. L. Milligan, W. G. Scott, J. Yeh, J. Jancarik, D. E. Koshland y S. H. Kim, (1991) Three-dimensional structures of the ligand-binding domain of the bacterial aspartate receptor with and without a ligand. *Science* **254**: 1342-1347.
- Miller, L. D., C. K. Yost, M. F. Hynes y G. Alexandre, (2007) The major chemotaxis gene cluster of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is essential for competitive nodulation. *Mol Microbiol* **63**: 348-362.
- Minamino, T., R. Chu, S. Yamaguchi y R. M. Macnab, (2000) Role of FliJ in flagellar protein export in *Salmonella*. *J Bacteriol* **182**: 4207-4215.
- Minamino, T., K. Imada y K. Namba, (2008) Molecular motors of the bacterial flagella. *Curr Opin Struct Biol* **18**: 693-701.
- Minamino, T. y R. M. Macnab, (1999) Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J Bacteriol* **181**: 1388-1394.

- Minamino, T. y R. M. MacNab, (2000a) FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. *Mol Microbiol* **37**: 1494-1503.
- Minamino, T. y R. M. MacNab, (2000b) Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Mol Microbiol* **35**: 1052-1064.
- Minamino, T. y K. Namba, (2008) Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature* **451**: 485-488.
- Mourey, L., S. Da Re, J. D. Pédelacq, T. Tolstykh, C. Faurie, V. Guillet, J. B. Stock y J. P. Samama, (2001) Crystal structure of the CheA histidine phosphotransfer domain that mediates response regulator phosphorylation in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* **276**: 31074-31082.
- Mowbray, S. L. y D. E. Koshland, (1987) Additive and independent responses in a single receptor: aspartate and maltose stimuli on the tar protein. *Cell* **50**: 171-180.
- Muff, T. J. y G. W. Ordal, (2007) The CheC phosphatase regulates chemotactic adaptation through CheD. *J Biol Chem* **282**: 34120-34128.
- Muff, T. J. y G. W. Ordal, (2008) The diverse CheC-type phosphatases: chemotaxis and beyond. *Mol Microbiol* **70**: 1054-1061.
- Murphy, G. E., J. R. Leadbetter y G. J. Jensen, (2006) *In situ* structure of the complete *Treponema primitia* flagellar motor. *Nature* **442**: 1062-1064.
- Müller, V., C. J. Jones, I. Kawagishi, S. Aizawa y R. M. Macnab, (1992) 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* **174**: 2298-2304.
- Namba, K. y F. Vonderviszt, (1997) Molecular architecture of bacterial flagellum. *Q Rev Biophys* **30**: 1-65.
- O'Brien, E. J. y P. M. Bennett, (1972) Structure of straight flagella from a mutant *Salmonella*. *J Mol Biol* **70**: 133-152.
- Oosawa, K., T. Ueno y S. Aizawa, (1994) Overproduction of the bacterial flagellar switch proteins and their interactions with the MS ring complex in vitro. *J Bacteriol* **176**: 3683-3691.
- Ottemann, K. M., W. Xiao, Y. K. Shin y D. E. Koshland, (1999) A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor. *Science* **285**: 1751-1754.
- Packer, H. L., D. M. Harrison, R. M. Dixon y J. P. Armitage, (1994) The effect of pH on the growth and motility of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 and the nature of the driving force of the flagellar motor. *Biochim Biophys Acta* **1188**: 101-107.
- Park, S. Y., X. Chao, G. Gonzalez-Bonet, B. D. Beel, A. M. Bilwes y B. R. Crane, (2004) Structure and function of an unusual family of protein phosphatases: the bacterial chemotaxis proteins CheC and CheX. *Mol Cell* **16**: 563-574.
- Park, S. Y., B. Lowder, A. M. Bilwes, D. F. Blair y B. R. Crane, (2006) Structure of FliM provides insight into assembly of the switch complex in the bacterial flagella motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11886-11891.
- Parkinson, J. S., (2010) Signaling mechanisms of HAMP domains in chemoreceptors and sensor kinases. *Annu Rev Microbiol* **64**: 101-122.
- Parkinson, J. S. y S. E. Houts, (1982) Isolation and behavior of *Escherichia coli* deletion mutants lacking chemotaxis functions. *J Bacteriol* **151**: 106-113.

- Paul, K. y D. F. Blair, (2006) Organization of FliN subunits in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 2502-2511.
- Paul, K., D. Brunstetter, S. Titen y D. F. Blair, (2011a) A molecular mechanism of direction switching in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 17171-17176.
- Paul, K., G. Gonzalez-Bonet, A. M. Bilwes, B. R. Crane y D. Blair, (2011b) Architecture of the flagellar rotor. *EMBO J* **30**: 2962-2971.
- Pilizota, T., M. T. Brown, M. C. Leake, R. W. Branch, R. M. Berry y J. P. Armitage, (2009) A molecular brake, not a clutch, stops the *Rhodobacter sphaeroides* flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 11582-11587.
- Platzer, J., W. Sterr, M. Hausmann y R. Schmitt, (1997) Three genes of a motility operon and their role in flagellar rotary speed variation in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **179**: 6391-6399.
- Poggio, S., C. Abreu-Goodger, S. Fabela, A. Osorio, G. Dreyfus, P. Vinuesa y L. Camarena, (2007) A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **189**: 3208-3216.
- Poggio, S., C. Aguilar, A. Osorio, B. González-Pedrajo, G. Dreyfus y L. Camarena, (2000) sigma(54) Promoters control expression of genes encoding the hook and basal body complex in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **182**: 5787-5792.
- Poggio, S., A. Osorio, G. Corkidi, G. Dreyfus y L. Camarena, (2001) The N terminus of FliM is essential to promote flagellar rotation in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **183**: 3142-3148.
- Poggio, S., A. Osorio, G. Dreyfus y L. Camarena, (2005) The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins. *Mol Microbiol* **58**: 969-983.
- Poole, P. S. y J. P. Armitage, (1989) Role of metabolism in the chemotactic response of *Rhodobacter sphaeroides* to ammonia. *J Bacteriol* **171**: 2900-2902.
- Poole, P. S., M. J. Smith y J. P. Armitage, (1993) Chemotactic signalling in *Rhodobacter sphaeroides* requires metabolism of attractants. *J Bacteriol* **175**: 291-294.
- Porter, S. L. y J. P. Armitage, (2002) Phosphotransfer in *Rhodobacter sphaeroides* chemotaxis. *J Mol Biol* **324**: 35-45.
- Porter, S. L. y J. P. Armitage, (2004) Chemotaxis in *Rhodobacter sphaeroides* requires an atypical histidine protein kinase. *J Biol Chem* **279**: 54573-54580.
- Porter, S. L., M. A. Roberts, C. S. Manning y J. P. Armitage, (2008a) A bifunctional kinase-phosphatase in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 18531-18536.
- Porter, S. L., G. H. Wadhams y J. P. Armitage, (2008b) *Rhodobacter sphaeroides*: complexity in chemotactic signalling. *Trends Microbiol* **16**: 251-260.
- Porter, S. L., G. H. Wadhams y J. P. Armitage, (2011a) Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nat Rev Microbiol* **9**: 153-165.
- Porter, S. L., G. H. Wadhams, A. C. Martin, E. D. Byles, D. E. Lancaster y J. P. Armitage, (2006) The CheYs of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Biol Chem* **281**: 32694-32704.
- Porter, S. L., A. V. Warren, A. C. Martin y J. P. Armitage, (2002) The third chemotaxis locus of *Rhodobacter sphaeroides* is essential for chemotaxis. *Mol Microbiol* **46**: 1081-1094.

- Porter, S. L., D. A. Wilkinson, E. D. Byles, G. H. Wadhams, S. Taylor, N. J. Saunders y J. P. Armitage, (2011b) Genome sequence of *Rhodobacter sphaeroides* Strain WS8N. *J Bacteriol* **193**: 4027-4028.
- Quandt, J. y M. F. Hynes, (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**: 15-21.
- Ragatz, L., Z. Y. Jiang, C. E. Bauer y H. Gest, (1995) Macroscopic phototactic behavior of the purple photosynthetic bacterium *Rhodospirillum centenum*. *Arch Microbiol* **163**: 1-6.
- Ramírez-Cabrera, V., S. Poggio, C. Domenzain, A. Osorio, G. Dreyfus y L. Camarena, (2012) A novel component of the *Rhodobacter sphaeroides* Fla1 flagellum is essential for motor rotation. *J Bacteriol* **194**: 6174-6183.
- Rao, C. V., G. D. Glekas y G. W. Ordal, (2008) The three adaptation systems of *Bacillus subtilis* chemotaxis. *Trends Microbiol* **16**: 480-487.
- Reid, S. W., M. C. Leake, J. H. Chandler, C. J. Lo, J. P. Armitage y R. M. Berry, (2006) The maximum number of torque-generating units in the flagellar motor of *Escherichia coli* is at least 11. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 8066-8071.
- Roberts, M. A., G. H. Wadhams, K. A. Hadfield, S. Tickner y J. P. Armitage, (2012) ParA-like protein uses nonspecific chromosomal DNA binding to partition protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 6698-6703.
- Rosario, M. M., K. L. Fredrick, G. W. Ordal y J. D. Helmann, (1994) Chemotaxis in *Bacillus subtilis* requires either of two functionally redundant CheW homologs. *J Bacteriol* **176**: 2736-2739.
- Rosario, M. M., J. R. Kirby, D. A. Bochar y G. W. Ordal, (1995) Chemotactic methylation and behavior in *Bacillus subtilis*: role of two unique proteins, CheC and CheD. *Biochemistry* **34**: 3823-3831.
- Samatey, F. A., H. Matsunami, K. Imada, S. Nagashima, T. R. Shaikh, D. R. Thomas, J. Z. Chen, D. J. Derosier, A. Kitao y K. Namba, (2004) Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. *Nature* **431**: 1062-1068.
- Sanders, D. A., B. L. Gillece-Castro, A. M. Stock, A. L. Burlingame y D. E. Koshland, (1989) Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. *J Biol Chem* **264**: 21770-21778.
- Sarkar, M. K., K. Paul y D. Blair, (2010a) Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 9370-9375.
- Sarkar, M. K., K. Paul y D. F. Blair, (2010b) Subunit organization and reversal-associated movements in the flagellar switch of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **285**: 675-684.
- Schoenhals, G. J. y R. M. Macnab, (1996) Physiological and biochemical analyses of FlgH, a lipoprotein forming the outer membrane L ring of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **178**: 4200-4207.
- Scott, K. A., S. L. Porter, E. A. Bagg, R. Hamer, J. L. Hill, D. A. Wilkinson y J. P. Armitage, (2010) Specificity of localization and phosphotransfer in the CheA proteins of *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **76**: 318-330.
- Segall, J. E., S. M. Block y H. C. Berg, (1986) Temporal comparisons in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 8987-8991.

- Shah, D. S., S. L. Porter, D. C. Harris, G. H. Wadhams, P. A. Hamblin y J. P. Armitage, (2000a) Identification of a fourth cheY gene in *Rhodobacter sphaeroides* and interspecies interaction within the bacterial chemotaxis signal transduction pathway. *Mol Microbiol* **35**: 101-112.
- Shah, D. S., S. L. Porter, A. C. Martin, P. A. Hamblin y J. P. Armitage, (2000b) Fine tuning bacterial chemotaxis: analysis of *Rhodobacter sphaeroides* behaviour under aerobic and anaerobic conditions by mutation of the major chemotaxis operons and cheY genes. *EMBO J* **19**: 4601-4613.
- Shinoda, S. y K. Okamoto, (1977) Formation and function of *Vibrio parahaemolyticus* lateral flagella. *J Bacteriol* **129**: 1266-1271.
- Silverman, M. y M. Simon, (1974) Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature* **249**: 73-74.
- Simon, R., U. Priefer y A. Puhler, (1983) A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. **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., J. P. Armitage y M. C. Evans, (1987) Methylation-independent and methylation-dependent chemotaxis in *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol* **169**: 5808-5814.
- Sockett, R. E., J. C. A. Foster y A. J.P., (1990) Molecular biology of *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. In: FEMS Symp. pp. 473-479.
- Sourjik, V. y J. P. Armitage, (2010) Spatial organization in bacterial chemotaxis. *EMBO J* **29**: 2724-2733.
- Sourjik, V. y H. C. Berg, (2002a) Binding of the *Escherichia coli* response regulator CheY to its target measured in vivo by fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 12669-12674.
- Sourjik, V. y H. C. Berg, (2002b) Receptor sensitivity in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 123-127.
- Sourjik, V. y R. Schmitt, (1996) Different roles of CheY1 and CheY2 in the chemotaxis of *Rhizobium meliloti*. *Mol Microbiol* **22**: 427-436.
- Sourjik, V. y R. Schmitt, (1998) Phosphotransfer between CheA, CheY1, and CheY2 in the chemotaxis signal transduction chain of *Rhizobium meliloti*. *Biochemistry* **37**: 2327-2335.
- Springer, W. R. y D. E. Koshland, (1977) Identification of a protein methyltransferase as the cheR gene product in the bacterial sensing system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 533-537.
- Stewart, R. C., (1997) Kinetic characterization of phosphotransfer between CheA and CheY in the bacterial chemotaxis signal transduction pathway. *Biochemistry* **36**: 2030-2040.
- Stewart, R. C., K. Jahreis y J. S. Parkinson, (2000) Rapid phosphotransfer to CheY from a CheA protein lacking the CheY-binding domain. *Biochemistry* **39**: 13157-13165.
- Stock, A. M., J. M. Mottonen, J. B. Stock y C. E. Schutt, (1989) Three-dimensional structure of CheY, the response regulator of bacterial chemotaxis. *Nature* **337**: 745-749.

- Suaste-Olmos, F., C. Domenzain, J. C. Mireles-Rodríguez, S. Poggio, A. Osorio, G. Dreyfus y L. Camarena, (2010) The flagellar protein FliL is essential for swimming in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **192**: 6230-6239.
- Sugiyama, S., E. J. Cragoe y Y. Imae, (1988) Amiloride, a specific inhibitor for the Na⁺-driven flagellar motors of alkalophilic *Bacillus*. *J Biol Chem* **263**: 8215-8219.
- Surette, M. G., M. Levit, Y. Liu, G. Lukat, E. G. Ninfa, A. Ninfa y J. B. Stock, (1996) Dimerization is required for the activity of the protein histidine kinase CheA that mediates signal transduction in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* **271**: 939-945.
- Surette, M. G. y J. B. Stock, (1996) Role of alpha-helical coiled-coil interactions in receptor dimerization, signaling, and adaptation during bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* **271**: 17966-17973.
- Swanson, R. V., S. C. Schuster y M. I. Simon, (1993) Expression of CheA fragments which define domains encoding kinase, phosphotransfer, and CheY binding activities. *Biochemistry* **32**: 7623-7629.
- Szurmant, H., M. W. Bunn, V. J. Cannistraro y G. W. Ordal, (2003) *Bacillus subtilis* hydrolyzes CheY-P at the location of its action, the flagellar switch. *J Biol Chem* **278**: 48611-48616.
- Szurmant, H., T. J. Muff y G. W. Ordal, (2004) *Bacillus subtilis* CheC and FliY are members of a novel class of CheY-P-hydrolyzing proteins in the chemotactic signal transduction cascade. *J Biol Chem* **279**: 21787-21792.
- Szurmant, H. y G. W. Ordal, (2004) Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 301-319.
- Terwilliger, T. C., E. Bogonez, E. A. Wang y D. E. Koshland, (1983) Sites of methyl esterification on the aspartate receptor involved in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* **258**: 9608-9611.
- Thoelke, M. S., J. R. Kirby y G. W. Ordal, (1989) Novel methyl transfer during chemotaxis in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **28**: 5585-5589.
- Thomas, D., D. G. Morgan y D. J. DeRosier, (2001) Structures of bacterial flagellar motors from two FliF-FliG gene fusion mutants. *J Bacteriol* **183**: 6404-6412.
- Thomas, D. R., D. G. Morgan y D. J. DeRosier, (1999) Rotational symmetry of the C ring and a mechanism for the flagellar rotary motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10134-10139.
- Thomas, J., G. P. Stafford y C. Hughes, (2004) Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 3945-3950.
- Thompson, S. R., G. H. Wadhams y J. P. Armitage, (2006) The positioning of cytoplasmic protein clusters in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 8209-8214.
- Turner, L., W. S. Ryu y H. C. Berg, (2000) Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments. *J Bacteriol* **182**: 2793-2801.
- Ueno, T., K. Oosawa y S. Aizawa, (1992) M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF. *J Mol Biol* **227**: 672-677.
- Vaknin, A. y H. C. Berg, (2008) Direct evidence for coupling between bacterial chemoreceptors. *J Mol Biol* **382**: 573-577.
- Wadhams, G. H. y J. P. Armitage, (2004) Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 1024-1037.

- Wadhams, G. H., A. C. Martin y J. P. Armitage, (2000) Identification and localization of a methyl-accepting chemotaxis protein in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **36**: 1222-1233.
- Wadhams, G. H., A. C. Martin, S. L. Porter, J. R. Maddock, J. C. Mantotta, H. M. King y J. P. Armitage, (2002) TlpC, a novel chemotaxis protein in *Rhodobacter sphaeroides*, localizes to a discrete region in the cytoplasm. *Mol Microbiol* **46**: 1211-1221.
- Wadhams, G. H., A. C. Martin, A. V. Warren y J. P. Armitage, (2005) Requirements for chemotaxis protein localization in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **58**: 895-902.
- Wadhams, G. H., A. V. Warren, A. C. Martin y J. P. Armitage, (2003) Targeting of two signal transduction pathways to different regions of the bacterial cell. *Mol Microbiol* **50**: 763-770.
- Wagenknecht, T., D. J. DeRosier, S. Aizawa y R. M. Macnab, (1982) Flagellar hook structures of *Caulobacter* and *Salmonella* and their relationship to filament structure. *J Mol Biol* **162**: 69-87.
- Wang, H. y P. Matsumura, (1996) Characterization of the CheAS/CheZ complex: a specific interaction resulting in enhanced dephosphorylating activity on CheY-phosphate. *Mol Microbiol* **19**: 695-703.
- Ward, M. J., A. W. Bell, P. A. Hamblin, H. L. Packer y J. P. Armitage, (1995a) Identification of a chemotaxis operon with two *cheY* genes in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **17**: 357-366.
- Ward, M. J., D. M. Harrison, M. J. Ebner y J. P. Armitage, (1995b) Identification of a methyl-accepting chemotaxis protein in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **18**: 115-121.
- Welch, M., K. Oosawa, S. Aizawa y M. Eisenbach, (1993) Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 8787-8791.
- West, M. A. y G. Dreyfus, (1997) Isolation and ultrastructural study of the flagellar basal body complex from *Rhodobacter sphaeroides* WS8 (wild type) and a polyhook mutant PG. *Biochem Biophys Res Commun* **238**: 733-737.
- Woese, C. R., E. Stackebrandt, W. G. Weisburg, B. J. Paster, M. T. Madigan, V. J. Fowler, C. M. Hahn, P. Blanz, R. Gupta, K. H. Nealson y G. E. Fox, (1984) The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Syst Appl Microbiol* **5**: 315-326.
- Wu, J., J. Li, G. Li, D. G. Long y R. M. Weis, (1996) The receptor binding site for the methyltransferase of bacterial chemotaxis is distinct from the sites of methylation. *Biochemistry* **35**: 4984-4993.
- Yakushi, T., J. Yang, H. Fukuoka, M. Homma y D. F. Blair, (2006) Roles of charged residues of rotor and stator in flagellar rotation: comparative study using H⁺-driven and Na⁺-driven motors in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 1466-1472.
- Yeh, J. I., H. P. Biemann, G. G. Privé, J. Pandit, D. E. Koshland y S. H. Kim, (1996) High-resolution structures of the ligand binding domain of the wild-type bacterial aspartate receptor. *J Mol Biol* **262**: 186-201.
- Yonekura, K., S. Maki, D. G. Morgan, D. J. DeRosier, F. Vonderviszt, K. Imada y K. Namba, (2000) The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science* **290**: 2148-2152.

- Yonekura, K., S. Maki-Yonekura y K. Namba, (2002) Growth mechanism of the bacterial flagellar filament. *Res Microbiol* **153**: 191-197.
- Yonekura, K., S. Maki-Yonekura y K. Namba, (2003) Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* **424**: 643-650.
- Yuan, W., G. D. Glekas, G. M. Allen, H. E. Walukiewicz, C. V. Rao y G. W. Ordal, (2012) The importance of the interaction of CheD with CheC and the chemoreceptors compared to its enzymatic activity during chemotaxis in *Bacillus subtilis*. *PLoS One* **7**: e50689.
- Zhang, P., C. M. Khursigara, L. M. Hartnell y S. Subramaniam, (2007) Direct visualization of *Escherichia coli* chemotaxis receptor arrays using cryo-electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 3777-3781.
- Zhao, R., E. J. Collins, R. B. Bourret y R. E. Silversmith, (2002) Structure and catalytic mechanism of the *E. coli* chemotaxis phosphatase CheZ. *Nat Struct Biol* **9**: 570-575.
- Zhao, R., N. Pathak, H. Jaffe, T. S. Reese y S. Khan, (1996) FliN is a major structural protein of the C-ring in the *Salmonella typhimurium* flagellar basal body. *J Mol Biol* **261**: 195-208.
- Zhou, H. y F. W. Dahlquist, (1997) Phosphotransfer site of the chemotaxis-specific protein kinase CheA as revealed by NMR. *Biochemistry* **36**: 699-710.
- Zhou, J. y D. F. Blair, (1997) Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for torque generation in the bacterial flagellar motor. *J Mol Biol* **273**: 428-439.
- Zhou, J., R. T. Fazzio y D. F. Blair, (1995) Membrane topology of the MotA protein of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **251**: 237-242.
- Zhou, J., S. A. Lloyd y D. F. Blair, (1998a) Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6436-6441.
- Zhou, J., L. L. Sharp, H. L. Tang, S. A. Lloyd, S. Billings, T. F. Braun y D. F. Blair, (1998b) Function of protonatable residues in the flagellar motor of *Escherichia coli*: a critical role for Asp 32 of MotB. *J Bacteriol* **180**: 2729-2735.
- Zimmer, M. A., J. Tiu, M. A. Collins y G. W. Ordal, (2000) Selective methylation changes on the *Bacillus subtilis* chemotaxis receptor McpB promote adaptation. *J Biol Chem* **275**: 24264-24272.

In *Rhodobacter sphaeroides*, Chemotactic Operon 1 Regulates Rotation of the Flagellar System 2

Ana Martínez-del Campo, Teresa Ballado, Laura Camarena and Georges Dreyfus
J. Bacteriol. 2011, 193(23):6781. DOI: 10.1128/JB.05933-11.
Published Ahead of Print 23 September 2011.

Updated information and services can be found at:
<http://jb.asm.org/content/193/23/6781>

SUPPLEMENTAL MATERIAL

These include:

[Supplemental material](#)

REFERENCES

This article cites 55 articles, 29 of which can be accessed free at: <http://jb.asm.org/content/193/23/6781#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

NOTE

In *Rhodobacter sphaeroides*, Chemotactic Operon 1 Regulates Rotation of the Flagellar System 2^{∇†}

Ana Martínez-del Campo,¹ Teresa Ballado,¹ Laura Camarena,² and Georges Dreyfus^{1*}

*Instituto de Fisiología Celular¹ and Instituto de Investigaciones Biomédicas,²
Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico DF, Mexico*

Received 4 August 2011/Accepted 15 September 2011

***Rhodobacter sphaeroides* is able to assemble two different flagella, the subpolar flagellum (Fla1) and the polar flagella (Fla2). In this work, we report the swimming behavior of *R. sphaeroides* Fla2⁺ cells lacking each of the proteins encoded by chemotactic operon 1. A model proposing how these proteins control Fla2 rotation is presented.**

Chemotaxis is a complex response that allows bacteria to swim toward favorable stimuli and away from repellents. A network of proteins which transmit a signal from the chemoreceptors to the flagellar motor controls this process.

In *Escherichia coli*, membrane chemoreceptors, or MCPs (methyl-accepting chemotaxis proteins), are coupled to CheA through CheW. The kinase activity of CheA is controlled by the ligand occupancy state of the MCP (for reviews, see references 1, 7, 17, 28, 46, and 49). When activated, CheA promotes its own phosphorylation; this phosphate is transferred to a specific Asp residue on CheY (18, 36, 53). The phosphorylated form of CheY (CheY-P) suffers a conformational change that increases its affinity for FliM (51, 52). FliM, FliG, and FliN constitute the C-ring or switch apparatus (12, 13, 20–22, 55). Binding of CheY-P to FliM and FliN changes flagellar rotation from counterclockwise (CCW) to clockwise (CW) (5, 37, 53). When the flagellar motor is rotating CCW, cells swim in a linear trajectory, known as a run. However, when the motor switches to the CW direction, swimming is interrupted by a tumbling event (48). Tumbling events are short-lived given the rapid dephosphorylation of CheY-P, caused by the phosphatase activity of CheZ (8, 18, 53).

During adaptation, CheA kinase activity is reset to prestimulus levels. This step involves the reversible methylation of the MCPs that is carried out by the constitutively active methyltransferase CheR (43) and the methylesterase CheB (44). When CheB is phosphorylated by CheA, methylesterase activity increases about 100-fold (3, 23). An increase in methylation counteracts the inhibitory signal generated by attractant binding (6, 14, 26, 47).

Many nonenteric bacterial species show multiple homo-

logues of the chemotactic genes, suggesting that more complex chemosensory pathways are frequently present (16, 54). *Rhodobacter sphaeroides* has become an interesting model with which to study these pathways. The complete genome sequence of *R. sphaeroides* revealed the presence of multiple chemotactic genes arranged mainly in three different loci: *cheOp*₁, *cheOp*₂, and *cheOp*₃ (for a review, see reference 32).

R. sphaeroides swims in liquid medium using a single subpolar flagellum (Fla1) that rotates unidirectionally to produce smooth swimming. Reorientation occurs when flagellar rotation stops briefly. Brownian motion and the slow rotation of the filament coil reorient the cell body before smooth swimming is resumed (4, 29). Genetic and biochemical evidence suggests that the proteins encoded by *cheOp*₂ and *cheOp*₃ are responsible for the control of the chemotactic response of Fla1 flagella (15, 24, 25), whereas deletion of *cheOp*₁ does not have any effect in this system (15, 50). In particular, CheY6 plus CheY3 or CheY4 is required to stop the flagellar motor (33).

We have previously shown that pseudorevertants from a Fla1⁻ mutant are able to swim in liquid medium by means of multiple polar flagella whose structural components are encoded by a second set of genes (*fla2*). This set is not expressed in the wild-type strain under any laboratory conditions tested so far (30). Cells expressing Fla2 flagella form a ring in swimming plates containing different organic acids. This chemotactic response is mediated only by CheY1, CheY2, and CheY5 (11). Given that these proteins are encoded by *cheOp*₁, we hypothesized that this locus must control Fla2 flagella.

In this work, we isolated nonpolar mutants for each of the chemotactic genes present in *cheOp*₁. From the behavioral analysis, we conclude that the majority of the proteins encoded by *cheOp*₁ are involved in controlling Fla2. A model of the signal-processing circuit controlling Fla2 rotation is presented below.

Bacterial strains and plasmids are listed in Table 1. *R. sphaeroides* (40) was grown in liquid or solid Siström's minimal medium (39) as described previously (30).

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Ap. Postal 70-243, Mexico DF, 04510, Mexico. Phone: (5255) 5622-5618. Fax: (5255) 5622-5611. E-mail: gdreyfus@ifc.unam.mx.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jb.asm.org/>.

[∇] Published ahead of print on 23 September 2011.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
TOP10	Cloning strain	Invitrogen
S17-1	<i>recA endA thi hsdR</i> RP4-2 Tc::Mu-Kn::Tn7 Tp ^r Sm ^r	38
<i>R. sphaeroides</i>		
WS8-N	Wild type, spontaneous Nal ^r	40
RS1Y5	WS8-N derivative, <i>cheY5::aadA</i>	This study
RS1B	WS8-N derivative, <i>mcpB::aadA</i>	This study
RS1S	WS8-N derivative, <i>tlpS::aadA</i>	This study
RS1A	WS8-N derivative, <i>mcpA::aadA</i>	This study
RS1D	WS8-N derivative, <i>cheD::aadA</i>	This study
RS1Y1	WS8-N derivative, <i>cheY1::aadA</i>	This study
RS1A1	WS8-N derivative, <i>cheA1::aadA</i>	This study
RS1W1	WS8-N derivative, <i>cheW1::aadA</i>	This study
RS1R1	WS8-N derivative, <i>cheR1::aadA</i>	This study
RS1Y2	WS8-N derivative, <i>cheY2::aadA</i>	This study
RS12432	WS8-N derivative, RSP2432:: <i>aadA</i>	This study
AM1	SP13 derivative, <i>fla2</i> ⁺	11
RS2Y5	AM1 derivative, <i>cheY5::aadA</i>	11
RS2B	AM1 derivative, <i>mcpB::aadA</i>	This study
RS2S	AM1 derivative, <i>tlpS::aadA</i>	This study
RS2A	AM1 derivative, <i>mcpA::aadA</i>	This study
RS2D	AM1 derivative, <i>cheD::aadA</i>	This study
RS2Y1	AM1 derivative, <i>cheY1::aadA</i>	11
RS2A1	AM1 derivative, <i>cheA1::aadA</i>	This study
RS2W1	AM1 derivative, <i>cheW1::aadA</i>	This study
RS2R1	AM1 derivative, <i>cheR1::aadA</i>	This study
RS2Y2	AM1 derivative, <i>cheY2::aadA</i>	11
RS22432	AM1 derivative, RSP2432:: <i>aadA</i>	This study
Plasmids		
pTZ19R	Cloning vector; pUC derivative; Ap ^r	Pharmacia
pJQ200mp18	Suicide vector used for gene replacement; Gm ^r	34
pRK415	pRK404 derivative, used for expression in <i>R. sphaeroides</i> ; Tc ^r	19
pRKtlpS	pRK415 derivative expressing <i>tlpS</i>	This study
pRKmcpA	pRK415 derivative expressing <i>mcpA</i>	This study
pRKcheD	pRK415 derivative expressing <i>cheD</i>	This study
pRKcheA1	pRK415 derivative expressing <i>cheA1</i>	This study
pRKcheW1	pRK415 derivative expressing <i>cheW1</i>	This study
pRKcheR1	pRK415 derivative expressing <i>cheR1</i>	This study
pRK2432	pRK415 derivative expressing RSP2432	This study

Rotation and energy source of Fla2 flagella. To analyze the rotational bias of Fla2 flagella, AM1 cells (Fla1⁻ Fla2⁺) were tethered to a microscope slide using anti-flagellin antibodies. Cells were recorded using a digital camera attached to a high-intensity dark-field microscope (Olympus BH-2). Video recordings of tethered cells were analyzed using CellTrak 1.5 (Motion Analysis Corp., Santa Rosa, CA). A total of 40 cells were analyzed for at least 10 s, and results from a single representative cell are shown in Fig. 1. The orientation (measured in degrees) accumulates as a function of time, suggesting that Fla2 flagella rotate only in one direction and in a stop-go fashion, as has been shown for the Fla1 system (4). Additionally, we investigated the energy source of the Fla2 motor. AM1 cells were grown on Sistro's minimal medium devoid of succinate under photoheterotrophic conditions. When the culture

reached an optical density at 600 nm of approximately 0.3, a 500- μ l aliquot of cells was removed and treated with the protonophore carbonyl cyanide 3-chloro-phenylhydrazone (CCCP) or with the sodium channel blocker amiloride. We added 10 μ M CCCP or 0.5 mM amiloride to the cell culture, as described previously (27, 45). Motility was completely inhibited by CCCP (see Movie S1 in the supplemental material). In contrast, cells continued swimming in the presence of amiloride. These results demonstrate that Fla2 flagella rotate unidirectionally and that the proton motive force is responsible for motor rotation.

Isolation and swimming phenotype of *cheOp*₁ mutants. The *cheOp*₁ locus (Fig. 2A) contains 11 genes, including one unassigned open reading frame and genes encoding the following putative proteins: three response regulators, one sensor kinase, one methyltransferase, one adaptor protein, two membrane chemoreceptors, one cytoplasmic chemoreceptor, and one receptor deamidase. We mutated each gene, with the exception of the *cheY* genes, which were mutated previously (11). Mutants were generated by the amplification of the desired gene followed by the insertion of a nonpolar Spc^r cassette (11). These fragments were subcloned into the suicide plasmid pJQ200mp18 (34) and mobilized into WS8-N (Fla1⁺ Fla2⁻) and AM1 (Fla1⁻ Fla2⁺) by conjugation with the S17-1 strain (10, 38). The Spc^r Gm^s transconjugants were selected, and the allelic exchange was confirmed by PCR.

Analysis of the chemotactic behavior of the *cheOp*₁ mutants in soft agar swimming plates revealed that strains RS2Y5, RS2S, RS2A, RS2D, RS2Y1, RS2A1, RS2W1, RS2R1, RS2Y2, and RS22432 showed a smaller swimming ring than AM1 (Fig. 2B). This result is consistent with the idea that the proteins encoded by *cheOp*₁ control the chemotactic response of Fla2. The same mutations in the genetic background where only the Fla1 flagellum is expressed have no significant effect on chemotaxis, as reported previously (data not shown) (11, 15, 24, 25, 33, 50).

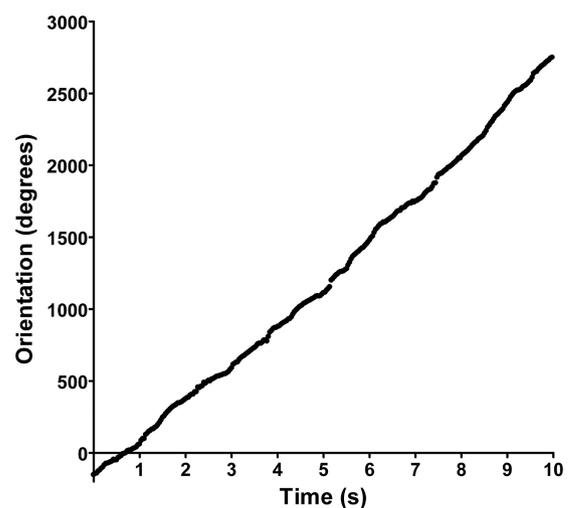


FIG. 1. Tethered-cell analysis of Fla2 flagella from *Rhodospirillum rubrum*. Cells were analyzed using CellTrak 1.5 to determine the rotational bias of flagella. The direction of orientation of individual cells is measured in degrees and given as a function of time in seconds. As cells rotate in one direction, the orientation value increases linearly. Results for an individual representative cell are shown in this graph.

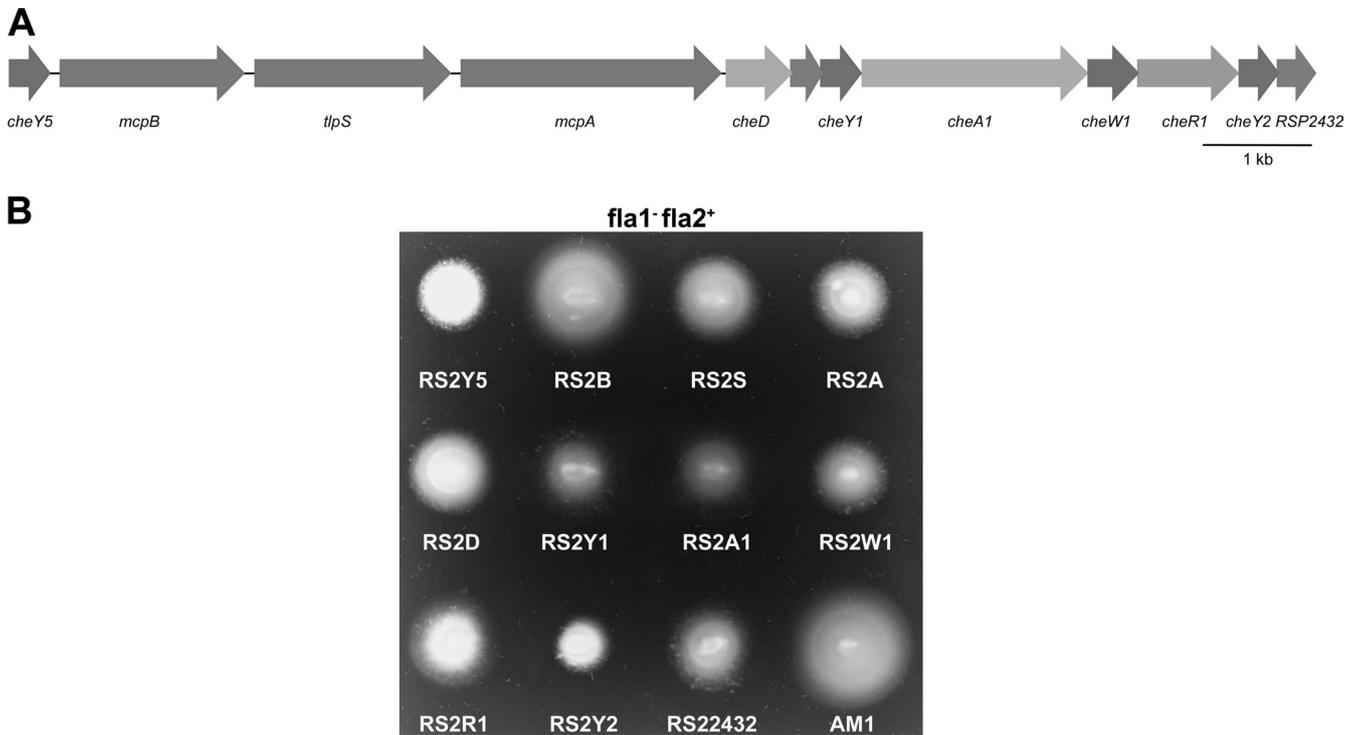


FIG. 2. (A) Organization of the *cheOp*₁ locus of *R. sphaeroides*. The arrows represent genes and their direction of transcription. (B) Phenotypic analysis of the *cheOp*₁ mutants in the *fla1*⁻ *fla2*⁺ genetic background. Soft agar motility assays were carried out in 0.25% agar supplemented with 100 μM succinate. Cells were grown under aerobic conditions at 30°C for 48 h.

In order to demonstrate that the observed phenotypes in the Fla1⁻ Fla2⁺ background were due only to the absence of each of the *cheOp*₁ genes, we carried out a complementation test introducing the wild-type gene cloned into pRK415 (19). Figure 3 shows that all the strains were complemented by the corresponding wild-type gene, except for the mutant strain RS2A, which was partially complemented, indicating that the

impairment in motility produced by each mutation was recovered.

Characterization of swimming motility. To better characterize the *cheOp*₁ mutants, we analyzed free-swimming behavior. Swimming paths were obtained with CellTrak software by analyzing video recordings of motile cultures of *R. sphaeroides* strains as described above. The stopping frequency and aver-

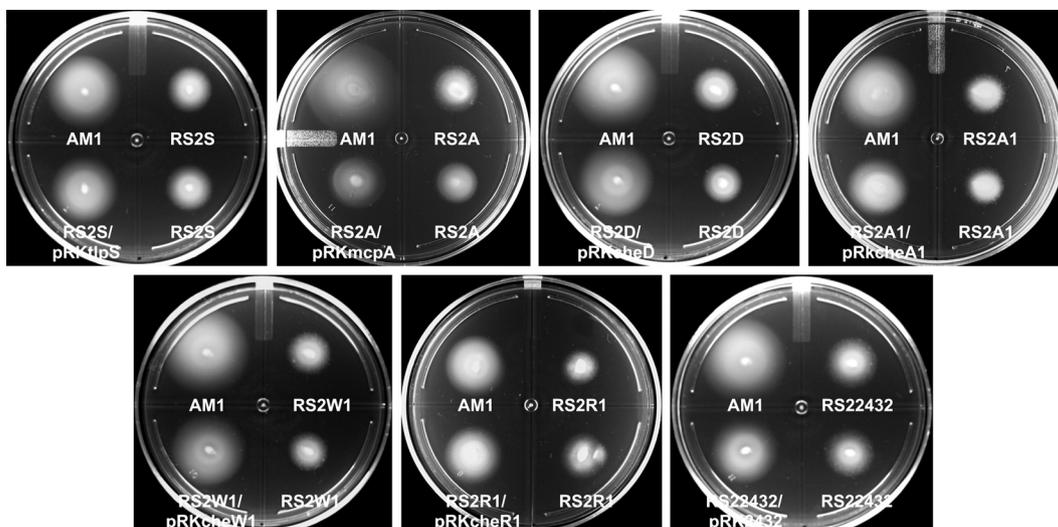


FIG. 3. Complementation of each *cheOp*₁ mutant by the corresponding wild-type gene cloned in pRK415. Soft agar motility assays were carried out in 0.25% agar supplemented with 100 μM succinate. Cells were grown under aerobic conditions at 30°C for 48 h.

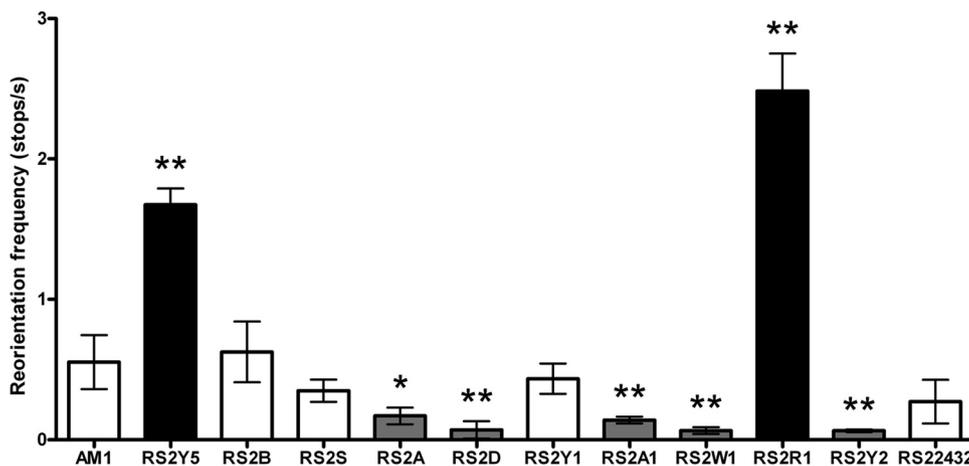


FIG. 4. Reorientation frequency of free-swimming cells. Values are means \pm standard deviations from 100 cells. Significance was assessed by one-way analysis of variance; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

age run velocity were determined by analyzing for 100 cells from three independent cultures for 2 s. As shown in Fig. 4, AM1 cells reorient under these conditions approximately once every 2 s (0.55 stop/s). Mutant strains RS2A (*mcpA*), RS2D (*cheD*), RS2A1 (*cheA1*), RS2W1 (*cheW1*), and RS2Y2 (*cheY2*) showed a lower reorientation frequency, which is equivalent to a smooth swimming bias. In contrast, RS2Y5 (*cheY5*) and RS2R1 (*cheR1*) stop at a higher frequency, similar to a tumbling behavior. Furthermore, strains RS2Y1 (*cheY1*), RS2B (*mcpB*), RS2S (*tlpS*), and RS22432 (RSP2432) had essentially the same reorientation frequency as the parent strain. This suggests that under this particular condition, none of these products participate in the Fla2 chemotaxis signaling pathway.

From these results we propose that CheY2 is mainly responsible for stopping the Fla2 flagellar motor. Given that RS2A1 and RS2W1 show the same phenotype as RS2Y2, it could be assumed that CheA1, CheW1, and CheY2 comprise the signal transduction pathway that controls Fla2 (Fig. 5). In agreement with this idea, it has been shown *in vitro* that CheA1 is able to phosphorylate the response regulators encoded by *cheOp*₁ (CheY1, CheY2, and CheY5) (31). Therefore, it is likely that the phosphorylated form of CheY2 (CheY2-P) is the signal that stops the Fla2 flagellar motor. Moreover, we observed that the absence of *mcpA* also reduces the stopping frequency significantly; hence, it is possible that this MCP together with CheW1 modulates CheA1 activity.

Conversely, in the absence of CheY5, a marked increase of the stopping frequency was detected, suggesting that the intracellular concentration of CheY2-P was increased. Given that the phenotype shown by RS2Y5 cells evokes that observed for *cheZ* mutants in *E. coli*, it is tempting to suggest that CheY5 could act as a phosphate sink. A similar situation occurs in *Sinorhizobium meliloti*, which has two different CheY proteins and no CheZ. In this case, CheA phosphorylates both CheYs, but only CheY2 binds to the flagellar motor to control rotation. The response is terminated when CheY2-P transfers its phosphate group back to CheA, and then it is transferred to CheY1 (41, 42). In this regard, CheY5 in *R. sphaeroides* could play a role similar to that of CheY1 in *S. meliloti* (Fig. 5).

Another strain that showed a high reorientation frequency is

the *cheR1* mutant (strain RS2R1), indicating that CheR1 is a relevant component of the chemotactic pathway that controls the Fla2 motor.

In *E. coli*, an attractant detected by an MCP inhibits CheA activity, and the reduction in the concentration of CheY-P allows bacteria to swim toward the attractant; in the adaptation phase, CheR methylates the MCP, and in this state, CheA autophosphorylation is reactivated (6, 26). In *Bacillus subtilis*, a

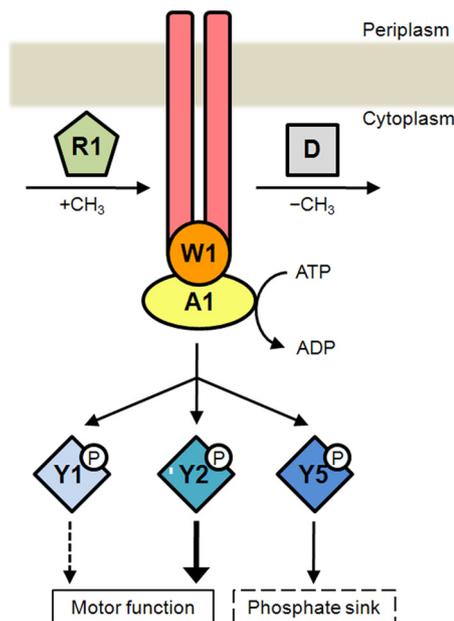


FIG. 5. Chemotactic control of Fla2 flagella is mediated by the proteins encoded in *cheOp*₁. In this model, a chemoreceptor, which could be *McpA*, controls the kinase activity of CheA1. When the MCP is methylated by the product of CheR1, autophosphorylation of CheA1 is inhibited and flagella rotate continuously for a longer time. CheD could demethylate the chemoreceptor and promote CheA1 activation, bringing about the phosphorylation of CheY1, CheY2, and CheY5. The accumulation of CheY2-P, in turn, increases the probability of reorientation, whereas CheY5 could modulate the intracellular levels of CheY2-P by acting as a phosphate sink.

TABLE 2. Free-swimming behavior of *R. sphaeroides* *cheOp*₁ mutants

Strain	Run speed ($\mu\text{m/s}$) ^a
AM1.....	61.35 \pm 7.98
RS2Y5.....	51.67 \pm 0.91
RS2B.....	62.62 \pm 5.94
RS2S.....	53.92 \pm 2.97
RS2A.....	55.83 \pm 6.13
RS2D.....	61.24 \pm 8.34
RS2Y1.....	61.40 \pm 2.19
RS2A1.....	64.42 \pm 2.68
RS2W1.....	62.57 \pm 5.53
RS2R1.....	39.51 \pm 7.73 ^b
RS2Y2.....	57.53 \pm 3.39
RS22432.....	55.37 \pm 3.19

^a Values are averages \pm standard deviations for 100 cells from three independent experiments.

^b $P < 0.01$; significance was assessed by one-way analysis of variance.

more complex situation has been observed, given that methylation of some residues of certain MCPs inhibits CheA, whereas methylation of other residues activates it (35). In our case, the phenotype of RS2R1 (Fig. 4) leads us to propose that methylation of a yet-unknown receptor (that may be McpA) inhibits CheA1 activity (Fig. 5).

Under our experimental conditions, the absence of CheR and McpA produced a bias in flagellar rotation, whereas the absence of McpB did not. This finding could indicate that McpB senses different signals that were absent under these conditions.

Adaptation also requires a methyltransferase that counteracts the methylating activity of CheR. In *E. coli*, CheB accomplishes this function, although in other bacteria, such as *Thermotoga maritima*, the protein CheD could act as a methyltransferase (9). In *R. sphaeroides*, the absence of CheD induces a reduction in the stopping frequency, which is in agreement with the possibility that a demethylated receptor would activate CheA1, whereas a methylated receptor would inhibit its activity (Fig. 5).

The average run speed, measured as the average velocity between stops, for each one of these mutants was determined. Table 2 shows that RS2Y5 and RS2R1 were the only strains with a lower swimming speed value than AM1. This reduction in swimming speed correlates with the fact that these strains show a very high stopping frequency, so it is possible that maximal speed cannot be reached between stops. A similar effect was observed in *E. coli*, where overexpression of CheY-P not only caused an increase in the tumbling frequency but also affected the swimming speed negatively (2).

Intriguingly, the stop frequencies and swimming speeds of RS2Y1 (*cheY1*), RS2S (*tIpS*), and RS22432 (RSP2432) are similar to those of AM1 (Fig. 4 and Table 2); nonetheless, in a swimming plate, these mutants showed a different phenotype (Fig. 2B). It is possible that chemotactic signals in soft agar plates could be stronger than in liquid medium (due to different diffusion rates), so it is still possible that CheY1, TlpS, and RSP2432 may control Fla2 flagella when the chemotactic stimulus is strong. Further research will determine if this hypothesis is adequate to explain the observed phenotypes.

Based on the results obtained in this work, we propose the model shown in Fig. 5.

We thank Aurora Osorio and Javier de la Mora for helpful technical assistance, the IFC Molecular Biology Unit for sequencing facilities, and Bertha González-Pedrajo, Sebastian Poggio, and Diego González-Halphen for critically reading the manuscript.

A.M.-D.C. was supported by a fellowship from CONACyT (215775). This work was supported by grants from CONACyT (106081) and DGAPA/UNAM (IN206811-3).

REFERENCES

- Alexander, R. P., and I. B. Zhulin. 2007. Evolutionary genomics reveals conserved structural determinants of signaling and adaptation in microbial chemoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**:2885–2890.
- Alon, U., et al. 1998. Response regulator output in bacterial chemotaxis. *EMBO J.* **17**:4238–4248.
- Anand, G. S., and A. M. Stock. 2002. Kinetic basis for the stimulatory effect of phosphorylation on the methyltransferase activity of CheB. *Biochemistry* **41**:6752–6760.
- Armitage, J. P., and R. M. Macnab. 1987. Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **169**:514–518.
- Barak, R., and M. Eisenbach. 1992. Correlation between phosphorylation of the chemotaxis protein CheY and its activity at the flagellar motor. *Biochemistry* **31**:1821–1826.
- Borkovich, K. A., N. Kaplan, J. F. Hess, and M. I. Simon. 1989. Transmembrane signal transduction in bacterial chemotaxis involves ligand-dependent activation of phosphate group transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**:1208–1212.
- Bourret, R. B., and A. M. Stock. 2002. Molecular information processing: lessons from bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **277**:9625–9628.
- Bren, A., M. Welch, Y. Blat, and M. Eisenbach. 1996. Signal termination in bacterial chemotaxis: CheZ mediates dephosphorylation of free rather than switch-bound CheY. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**:10090–10093.
- Chao, X., et al. 2006. A receptor-modifying deamidase in complex with a signaling phosphatase reveals reciprocal regulation. *Cell* **124**:561–571.
- Davis, J., T. J. Donohue, and S. Kaplan. 1988. Construction, characterization, and complementation of a Puf⁻ mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **170**:320–329.
- del Campo, A. M., et al. 2007. Chemotactic control of the two flagellar systems of *Rhodobacter sphaeroides* is mediated by different sets of CheY and FliM proteins. *J. Bacteriol.* **189**:8397–8401.
- Francis, N. R., V. M. Irikura, S. Yamaguchi, D. J. DeRosier, and R. M. Macnab. 1992. Localization of the *Salmonella typhimurium* flagellar switch protein FliG to the cytoplasmic M-ring face of the basal body. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:6304–6308.
- Francis, N. R., G. E. Sosinsky, D. Thomas, and D. J. DeRosier. 1994. Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J. Mol. Biol.* **235**:1261–1270.
- Goy, M. F., M. S. Springer, and J. Adler. 1977. Sensory transduction in *Escherichia coli*: role of a protein methylation reaction in sensory adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**:4964–4968.
- Hamblin, P. A., B. A. Maguire, R. N. Grishanin, and J. P. Armitage. 1997. Evidence for two chemosensory pathways in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* **26**:1083–1096.
- Hamer, R., P. Y. Chen, J. P. Armitage, G. Reinert, and C. M. Deane. 2010. Deciphering chemotaxis pathways using cross species comparisons. *BMC Syst. Biol.* **4**:3.
- Hazelbauer, G. L., J. J. Falke, and J. S. Parkinson. 2008. Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem. Sci.* **33**:9–19.
- Hess, J. F., K. Oosawa, N. Kaplan, and M. I. Simon. 1988. Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. *Cell* **53**:79–87.
- Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* **70**:191–197.
- Khan, I. H., T. S. Reese, and S. Khan. 1992. The cytoplasmic component of the bacterial flagellar motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:5956–5960.
- Khan, S., I. H. Khan, and T. S. Reese. 1991. New structural features of the flagellar base in *Salmonella typhimurium* revealed by rapid-freeze electron microscopy. *J. Bacteriol.* **173**:2888–2896.
- Khan, S., R. Zhao, and T. S. Reese. 1998. Architectural features of the *Salmonella typhimurium* flagellar motor switch revealed by disrupted C-rings. *J. Struct. Biol.* **122**:311–319.
- Lupas, A., and J. Stock. 1989. Phosphorylation of an N-terminal regulatory domain activates the CheB methyltransferase in bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **264**:17337–17342.
- Martin, A. C., G. H. Wadhams, and J. P. Armitage. 2001. The roles of the multiple CheW and CheA homologues in chemotaxis and in chemoreceptor localization in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* **40**:1261–1272.
- Martin, A. C., et al. 2001. CheR- and CheB-dependent chemosensory adaptation system of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **183**:7135–7144.
- Ninfa, E. G., A. Stock, S. Mowbray, and J. Stock. 1991. Reconstitution of the

- bacterial chemotaxis signal transduction system from purified components. *J. Biol. Chem.* **266**:9764–9770.
27. Packer, H. L., D. M. Harrison, R. M. Dixon, and J. P. Armitage. 1994. The effect of pH on the growth and motility of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 and the nature of the driving force of the flagellar motor. *Biochim. Biophys. Acta* **1188**:101–107.
 28. Parkinson, J. S., P. Ames, and C. A. Studdert. 2005. Collaborative signaling by bacterial chemoreceptors. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:116–121.
 29. Pilizota, T., et al. 2009. A molecular brake, not a clutch, stops the *Rhodobacter sphaeroides* flagellar motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:11582–11587.
 30. Poggio, S., et al. 2007. A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **189**:3208–3216.
 31. Porter, S. L., and J. P. Armitage. 2002. Phosphotransfer in *Rhodobacter sphaeroides* chemotaxis. *J. Mol. Biol.* **324**:35–45.
 32. Porter, S. L., G. H. Wadhams, and J. P. Armitage. 2011. Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**:153–165.
 33. Porter, S. L., et al. 2006. The CheYs of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Biol. Chem.* **281**:32694–32704.
 34. Quandt, J., and M. F. Hynes. 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene* **127**:15–21.
 35. Rao, C. V., G. D. Glekas, and G. W. Ordal. 2008. The three adaptation systems of *Bacillus subtilis* chemotaxis. *Trends Microbiol.* **16**:480–487.
 36. Sanders, D. A., B. L. Gillece-Castro, A. M. Stock, A. L. Burlingame, and D. E. Koshland, Jr. 1989. Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. *J. Biol. Chem.* **264**:21770–21778.
 37. Sarkar, M. K., K. Paul, and D. Blair. 2010. Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**:9370–9375.
 38. Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. 1982. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* **1**:784–791.
 39. Siström, W. R. 1962. The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas spheroides*. *J. Gen. Microbiol.* **28**:607–616.
 40. Sockett, R. E., R. M. Foster, and J. P. Armitage. 1990. Molecular biology of the *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. *FEMS Symp.* **53**:473–479.
 41. Sourjik, V., and R. Schmitt. 1996. Different roles of CheY1 and CheY2 in the chemotaxis of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* **22**:427–436.
 42. Sourjik, V., and R. Schmitt. 1998. Phosphotransfer between CheA, CheY1, and CheY2 in the chemotaxis signal transduction chain of *Rhizobium meliloti*. *Biochemistry* **37**:2327–2335.
 43. Springer, W. R., and D. E. Koshland, Jr. 1977. Identification of a protein methyltransferase as the *cheR* gene product in the bacterial sensing system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**:533–537.
 44. Stock, J. B., and D. E. Koshland, Jr. 1978. A protein methylesterase involved in bacterial sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**:3659–3663.
 45. Sugiyama, S., E. J. Cragoe, Jr., and Y. Imae. 1988. Amiloride, a specific inhibitor for the Na⁺-driven flagellar motors of alkaliphilic *Bacillus*. *J. Biol. Chem.* **263**:8215–8219.
 46. Szurmant, H., and G. W. Ordal. 2004. Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:301–319.
 47. Toews, M. L., and J. Adler. 1979. Methanol formation *in vivo* from methylated chemotaxis proteins in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **254**:1761–1764.
 48. Turner, L., W. S. Ryu, and H. C. Berg. 2000. Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments. *J. Bacteriol.* **182**:2793–2801.
 49. Wadhams, G. H., and J. P. Armitage. 2004. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**:1024–1037.
 50. Ward, M. J., A. W. Bell, P. A. Hamblin, H. L. Packer, and J. P. Armitage. 1995. Identification of a chemotaxis operon with two *cheY* genes in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* **17**:357–366.
 51. Welch, M., K. Oosawa, S. Aizawa, and M. Eisenbach. 1993. Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**:8787–8791.
 52. Welch, M., K. Oosawa, S. I. Aizawa, and M. Eisenbach. 1994. Effects of phosphorylation, Mg²⁺, and conformation of the chemotaxis protein CheY on its binding to the flagellar switch protein FliM. *Biochemistry* **33**:10470–10476.
 53. Wolfe, A. J., M. P. Conley, T. J. Kramer, and H. C. Berg. 1987. Reconstitution of signaling in bacterial chemotaxis. *J. Bacteriol.* **169**:1878–1885.
 54. Wuichet, K., and I. B. Zhulin. 2010. Origins and diversification of a complex signal transduction system in prokaryotes. *Sci. Signal.* **3**:ra50.
 55. Zhao, R., N. Pathak, H. Jaffe, T. S. Reese, and S. Khan. 1996. FliN is a major structural protein of the C-ring in the *Salmonella typhimurium* flagellar basal body. *J. Mol. Biol.* **261**:195–208.