



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización funcional de los reguladores de respuesta
CheY1, CheY2 y CheY5 en el sistema flagelar 2 de
Rhodobacter sphaeroides

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O
P R E S E N T A:

ANA KAREN GUEVARA GONZÁLEZ



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. GEORGES DREYFUS CORTÉS

2016

Ciudad Universitaria, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno

Guevara

González

Ana

Karen

55 51 11 95 71

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

307102427

2. Datos del tutor

Dr.

Georges

Dreyfus

Cortés

3. Datos del sinodal 1

Dr.

José Eduardo

Rodríguez

Bustamante

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Dimitris

Georgellis

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Rodolfo

García

Contreras

6. Datos del sinodal 4

M en C

Alfonso José

Vilchis

Peluyera

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización funcional de los reguladores de respuesta CheY1, CheY2 y CheY5 en el sistema flagelar 2 de Rhodobacter sphaeroides.

109 p.

2016

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Georges Dreyfus Cortés del departamento de Genética Molecular en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco al Dr. Francisco Javier de la Mora por su valiosa asistencia técnica, su estrecha colaboración y por todo el esfuerzo dedicado a este trabajo.

Agradezco la Q.F.B. Teresa Ballado Nava por su gran apoyo y asesoría técnica a lo largo de este trabajo.

A la Bióloga Mariela García Ramos por su preciada ayuda técnica.

Agradezco también a los miembros del jurado por la revisión del presente trabajo, a los doctores: José Eduardo Rodríguez Bustamante, Dimitris Georgellis, Rodolfo García Contreras y Georges Dreyfus Cortés así como al M. en C. Alfonso José Vilchis Peluyera.

A los miembros de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

A la Biblioteca “Armando Gómez Puoyou” del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

A la unidad de cómputo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM

Agradezco al CONACyT por otorgarme la beca de ayudante de investigador

Este trabajo fue financiado por el CONACyT con el donativo (106081) y por la DGAPA con el donativo del PAPIIT (IN204614).

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	6
EL FLAGELO BACTERIANO	8
Filamento	9
Gancho	12
Cuerpo Basal	13
EL MOTOR FLAGELAR	17
Rotor	18
Estator	19
PATRONES DE ROTACIÓN Y NADO	21
QUIMIOTAXIS	22
COMPORTAMIENTO QUIMITÁCTICO	23
Componentes del sistema de señalización quimiotáctica	26
Quimiotaxis en <i>E. coli</i>	33
Mecanismo de “switching”	35
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
ANTECEDENTES	38
HIPÓTESIS	39
OBJETIVOS	40
MATERIALES Y MÉTODOS	41
RESULTADOS	58
Purificación de la histidín cinasa CheA1	58
Fosforilación <i>in vitro</i> de CheA1 con adenosín trifosfato [γ ³² P]-ATP	60
Desfosforilación <i>in vitro</i> de CheA1 con adenosín trifosfato [γ ³² P]-ATP	61
Purificación de proteínas recombinantes CheY1 y CheY5	62

Fosforilación <i>in vitro</i> de CheY1 y CheY5 con acetil fosfato (Ac ³² P)	63
Fosfotransferencia <i>in vitro</i> de CheA1 a CheY1 y de CheA1 a CheY5	64
Obtención de la proteína CheY2	66
Puificación de MBP-CheY2	67
Fosfotransferencia <i>in vitro</i> de CheA1 a MBP-CheY2	69
Ensayos de competencia <i>in vitro</i> de CheA1 con MBP-CheY2 y CheY1 y de CheA1 con MBP-CheY2 y CheY5	70
DISCUSIÓN	73
Modelo de la función de los reguladores de respuesta CheY1, CheY2 y CheY5 en la vía de señalización quimiotáctica del sistema Fla2 de <i>R. sphaeroides</i>	79
CONCLUSIONES	80
PERSPECTIVAS	81
ANEXOS	82
REFERENCIAS	95

RESUMEN

Las bacterias son microorganismos sumamente complejos que han logrado adaptarse casi a cualquier ambiente. Dentro de sus múltiples adaptaciones destaca la capacidad de desplazarse a través de diferentes medios.

El flagelo es el organelo de locomoción más utilizado por las bacterias; esta estructura está formada por al menos 30 proteínas diferentes y confiere a las bacterias la capacidad de desplazarse por dos mecanismos diferentes: el nado (*swimming*) o el nado en enjambre (*swarming*). No obstante, el desplazamiento por sí solo no confiere a las bacterias ninguna ventaja adaptativa, la verdadera ventaja se las da el poder migrar hacia ambientes favorables o huir de condiciones desfavorables mediante un movimiento dirigido, conocido como taxis.

Existen diversos tipos de taxis, entre ellas destaca la quimiotaxis; este mecanismo es un sistema de dos componentes que regula la actividad flagelar. En esta vía de señalización se transmiten señales desde las proteínas quimiorreceptoras hacia el motor flagelar mediante un sistema de dos componentes que comprende a una proteína histidin-cinasa (HKP) y los aceptores de fosfato, CheY que generan la respuesta. A través de la vía de señalización quimiotáctica las bacterias pueden nadar y así encontrar mejores entornos de crecimiento, migrando hacia altas concentraciones de productos químicos favorables (atrayentes) o desplazándose lejos de sustancias químicas desfavorables (repelentes).

Rhodobacter sphaeroides es una bacteria púrpura no sulfurosa que pertenece al grupo de las α -proteobacterias. En su genoma se encuentran dos grupos de genes flagelares que codifican para dos flagelos funcionales. El primer grupo (Fla1) se expresa bajo condiciones de laboratorio en la cepa silvestre WS8N. Mientras que el segundo grupo (Fla2) se expresa en la cepa AM1.

La vía de señalización quimiotáctica en *R. sphaeroides* está compuesta por las siguientes proteínas: 13 quimiorreceptores (9 de los cuales son proteínas transmembranales y 4 citoplásmicas), 4 proteínas histidín-cinasas CheA, 4 proteínas adaptadoras CheW, 6 reguladores de respuesta CheY, 2 metil estererasas CheB, 3 metil transferasas CheR y 1

desamidasa CheD (a diferencia de *E. coli*, en nuestro modelo de estudio no hay homólogos de Che C, Che V o Che Z).

Los genes que codifican para dichas proteínas se encuentran dispuestos en tres *loci* diferentes: *cheOp1*, *cheOp2* y *cheOp3*. Se ha demostrado que *cheOp2* y *cheOp3* son esenciales para el control de la respuesta quimiotáctica del sistema Fla1. Estudios previos en el laboratorio demostraron que los reguladores de respuesta CheY1, CheY2 y CheY5 y la histidín cinasa CheA1 codificadas en el *cheOp1* son los responsables de controlar la vía de señalización quimiotáctica del sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides*.

Dado que la delección de *cheY1*, *cheY2* o *cheY5* afectan la motilidad en células que expresan el sistema Fla2, en el presente trabajo se analizó la función de los reguladores de respuesta CheY1, CheY2 y CheY5 a través de ensayos de fosforilación y de fosfotransferencia *in vitro* de la cinasa CheA1 en presencia de cada uno de estos reguladores usando ATP [γ -³²P]; con el fin de determinar la duración de la fosforilación y las diferencias en la afinidad de la cinasa por cada uno de los reguladores CheY.

INTRODUCCIÓN

Con la excepción de los virus, todos los organismos que habitan la Tierra pertenecen a dos categorías: procariontes o eucariontes (Lazcano-Araujo, 1989). Estos dos grupos se diferencian por una serie de características, de las cuales destaca la presencia de un núcleo en las células eucariontes. A pesar de que los organismos procariontes carecen de un núcleo, poseen características únicas que les han permitido habitar la Tierra desde sus inicios y hasta ahora.

Las bacterias son organismos procariontes que han logrado adaptarse a distintas condiciones ambientales y sobrevivir colonizando casi cualquier ambiente. Entre estas adaptaciones destaca la capacidad de desplazarse mediante diversos mecanismos permitiéndoles dar una respuesta pronta y eficiente a variaciones en el ambiente, tales como temperatura, luz, salinidad, osmolaridad, pH, entre otros. Los mecanismos de desplazamiento descritos para bacterias son variados, a continuación se describen algunos.

El “*gliding*”, se define como el desplazamiento activo sobre una superficie por un proceso que no involucra flagelos, este mecanismo se caracteriza por un movimiento suave (McBride, 2001).

Otro mecanismo de motilidad es el “*twitching*” en el cual las células se desplazan sobre una superficie sólida, utilizando un pili de tipo IV, que al crear cortas e intermitentes contracciones generan movimiento, en este mecanismo se requiere un número mínimo de células presentes (Bardy *et al.*, 2003).

Un tercer mecanismo es el “*sliding*” en el cual las células se desplazan pasivamente mediante fuerzas expansivas en un cultivo en crecimiento, que en combinación con propiedades superficiales específicas de las células ocasiona que haya una reducción de la fricción en el medio provocando que haya un deslizamiento (Henrichsen, 1972).

Un cuarto tipo de motilidad en bacteria es el conocido como “*darting*”; éste es una especie de translocación superficial producida por fuerzas expansivas presentes en un conjunto de células que se encuentran en crecimiento, cuando las fuerzas expansivas son

mayores a la fuerza requerida para mantener la cohesión del grupo algunas bacterias emergen disparadas de la colonia (Henrichsen, 1972).

Uno más de los mecanismos de motilidad es el uso de vesículas de gas. Algunas arqueas y bacterias acuáticas, que pueden ser flageladas, usan vesículas de gas, éstas les confieren flotabilidad, permitiendo que las células se desplacen dentro de una columna de agua (Jarrell *et al.*, 2008).

Todos los mecanismos anteriormente descritos no requieren de la presencia de un flagelo. No obstante, el mecanismo mayormente utilizado en el mundo bacteriano es el desplazamiento a través de un flagelo. Mediante este organelo las bacterias pueden desplazarse por dos mecanismos diferentes: el “*swimming*” o el “*swarming*”. El primero le permite a la célula desplazarse en ambientes líquidos, mientras que el “*swarming*” o movimiento en enjambre confiere a las células la capacidad de desplazarse en grupo sobre una superficie sólida donde son impulsados por la rotación de los flagelos (Patrick *et al.*, 2012)

Las bacterias están expuestas a cambios rápidos en su entorno y la adaptación eficiente es de crucial importancia para la sobrevivencia (Krell *et al.*, 2011). A pesar de que las bacterias poseen la capacidad de desplazarse utilizando diferentes estrategias, el desplazamiento por sí solo no les confiere ninguna ventaja adaptativa. Esta ventaja se las da el poder migrar hacia ambientes favorables o huir de condiciones desfavorables mediante un movimiento dirigido. A este mecanismo se le conoce como taxis.

Dentro de los tipos de taxis se encuentran la *termotaxis*, en la cual las células responden a variaciones en la temperatura; la *osmotaxis*, en donde las células se desplazan hacia diferentes concentraciones de osmolaridad; la *fototaxis*, se refiere al movimiento dirigido hacia la luz o al alejamiento de ésta; la *aerotaxis*, definida como la capacidad de desplazarse hacia el oxígeno o alejarse de él; otro tipo de taxis es la *magnetotaxis* mediante la cual las bacterias pueden orientarse conforme al campo magnético de la Tierra; finalmente se encuentra la *quimiotaxis*, que es la respuesta a estímulos químicos.

La quimiotaxis es el mecanismo de comportamiento unicelular mejor estudiado. A través del nado las células son capaces de seguir gradientes químicos en el medio ambiente

mediante la comparación temporal de las concentraciones de un ligando (Vladimirov *et al.*, 2009).

El flagelo bacteriano

El flagelo bacteriano (**Figura 1**) es una de las máquinas moleculares de autoensamblaje más sofisticadas que existen en la naturaleza (Zhao *et al.*, 2014). Está formado por al menos 30 proteínas diferentes con números de copias que van de unas cuantas hasta cientos de miles (Morimoto *et al.*, 2014).

Este organelo suele dividirse en tres grandes estructuras: el filamento, el gancho y el cuerpo basal. El filamento es una estructura alargada que se extiende al exterior de la célula (Kojima *et al.*, 2004); éste funciona como una hélice o propela que genera una fuerza mecánica que impulsa a la bacteria. El gancho, al igual que el filamento se encuentra en el exterior celular y funciona como conexión entre el filamento y el cuerpo basal. El cuerpo basal se encuentra embebido en la superficie de la célula y en él se ubican componentes estructurales tales como los anillos C, MS, L y P. Además alberga componentes funcionales como el aparato de exportación, el motor, el estator y el eje.

La estructura del flagelo se ha estudiado mayormente en las bacterias entéricas *Escherichia coli* y *Salmonella entérica* serovar Thyphimurium, motivo por el cual el contenido de esta introducción se basa en información recabada del estudio de ambas bacterias.

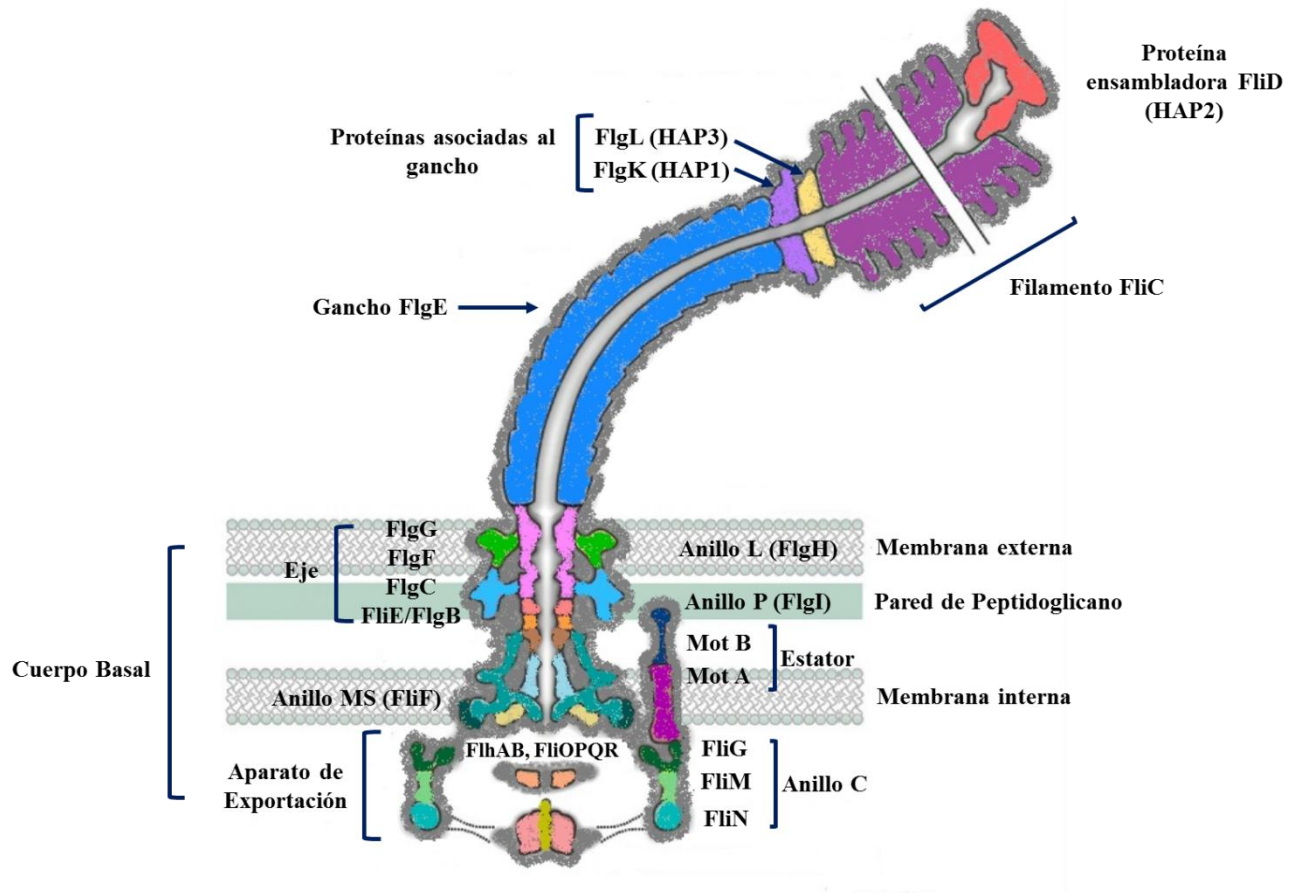


Figura 1. Representación esquemática del flagelo bacteriano. El esquema muestra al organelo que suele dividirse en tres estructuras: filamento, gancho y cuerpo basal. Dentro de cada estructura se señalan las proteínas que lo conforman. Imagen modificada de (Evans *et al.*, 2014)

Filamento

El filamento, igual que el gancho, es una larga estructura tubular formada por un conjunto helicoidal de algunas decenas de miles de copias de una sola proteína, FliC, también llamada flagelina (Samatey *et al.*, 2004). Esta proteína es la más abundante en el flagelo.

Esta estructura cilíndrica llega a medir hasta 15µm de largo y puede tener de 120-250 Å de diámetro. Se encuentra formada por una única proteína, la flagelina, la cual forma 11 subunidades por cada dos vueltas de la hélice. También puede describirse como una estructura tubular formada por 11 protofilamentos longitudinales, que integran una matriz helicoidal. La secuencia de residuos de flagelina así como la estructura cuaternaria del

filamento se encuentran altamente conservadas entre las especies bacterianas (Maki-Yonekura *et al.*, 2010). La estructura cristalográfica así como el análisis de la estructura criotomográfica de la flagelina (FliC) de *S. entérica*, muestran 4 dominios estructurales que conforman a esta proteína, los cuales han sido denominados como D0, D1, D2 y D3 (**Figura 2**).

La estructura del filamento puede adoptar diferentes formas helicoidales; a éste fenómeno se le conoce como polimorfismo (Asakura, 1970). El dominio D0 de la flagelina es de gran importancia para la polimerización y la estabilización del filamento (Vonderviszt *et al.*, 1989; Vonderviszt *et al.*, 1991) durante las transiciones polimórficas (Mimori-Kiyosue *et al.*, 1996).

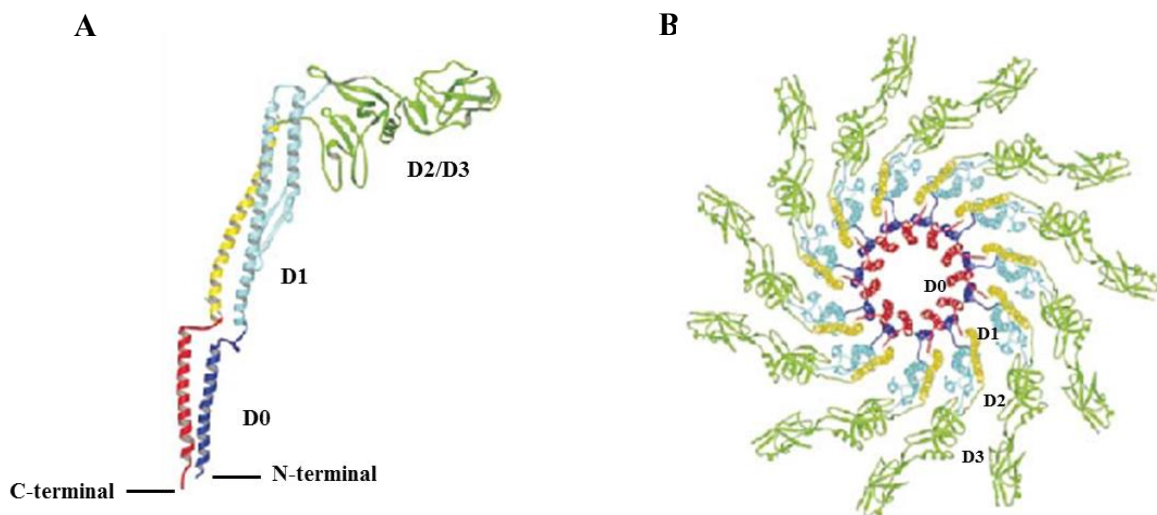


Figura 2. Estructura y arreglo de la flagelina. **A)** Diagrama de listones de la estructura terciaria de la flagelina, se muestran los dominios D0 formado por el carboxilo terminal (rojo) y el amino terminal (azul), D1 del N-terminal en cian, de los residuos 44-179, y D1 del C-terminal, en amarillo 406-454, D2 y D3 en verde residuos 179-406. **B)** Arreglo de las 11 subunidades de la flagelina vista desde el extremo distal. Los colores representan cada uno de los dominios. Modificado de (Yonekura *et al.*, 2003)

De acuerdo a las condiciones ambientales y a la especie de flagelina, las subunidades de esta última, en un flagelo, pueden adoptar dos conformaciones diferentes: del tipo L (“left”) o R (“right”) (Kamiya *et al.*, 1980). En los filamentos rectos de tipo L, todos los

protofilamentos están dispuestos hacia la izquierda, mientras que en los de tipo R, éstos se inclinan hacia la derecha (**Figura 3**). La formación de estructuras helicoidales, también conocidas como de mano izquierda o mano derecha, son producto del superenrollamiento causado por la mezcla de dos conformaciones distintas de los protofilamentos con simetrías helicoidales distintas (Maki-Yonekura *et al.*, 2010).

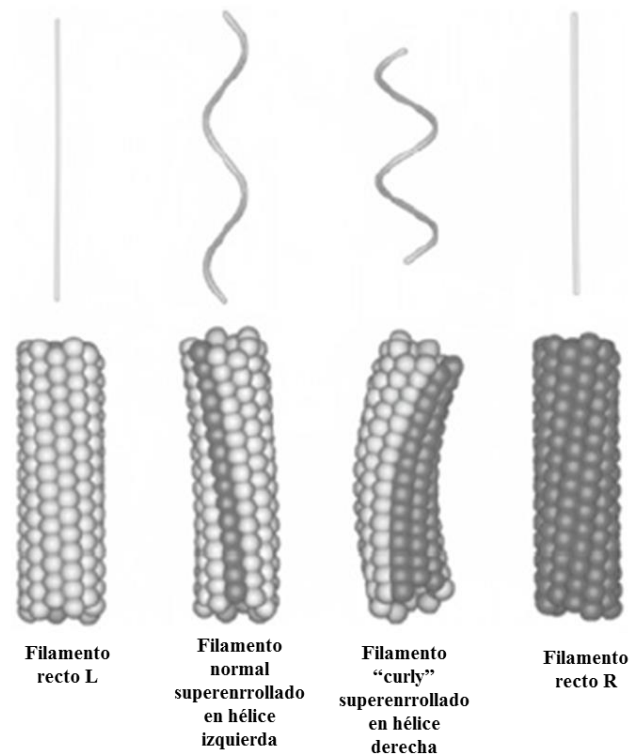


Figura 3. Estructuras polimórficas de los filamentos. De izquierda a derecha se muestran las estructuras de los filamentos rectos L; del filamento normal superenrollado en hélice izquierda; del filamento “curly” superenrollado en hélice derecha y finalmente los filamentos rectos R. Modificado de (Terashima *et al.*, 2008)

Los filamentos flagelares pasan por transiciones polimórficas similares *in vivo* e *in vitro* y se ha visto que estas transiciones pueden ser inducidas por cambios en el pH, en la fuerza iónica y por mutaciones (Macnab *et al.*, 1977; Maki-Yonekura *et al.*, 2010). De acuerdo a las diversas formas helicoidales encontradas bajo diferentes condiciones en solución así como a los diferentes grados de inclinación y a los distintos diámetros de la

hélice estas transiciones pueden clasificarse en “normal”, “coil”, “semicoil”, “curly I” y “curly II” (Maki-Yonekura *et al.*, 2010).

Gancho

Es una estructura corta, tubular, generalmente curvada que conecta en un extremo con el eje y por el otro con el filamento (**Figura 4 A y B**); el gancho se encuentra formado por aproximadamente 120 copias de una sola proteína, FlgE, también conocida como la proteína del gancho, (Samatey *et al.*, 2004) siendo ésta la segunda más abundante del flagelo. Tiene una longitud definida de 55 ± 7 nm (Hirano *et al.*, 1994).

Dada su estructura curvada y su alta capacidad de flexión, que lo diferencia de la estructura rígida del filamento, el gancho puede funcionar como conector universal que transmite la fuerza de torsión proveniente del motor hasta el filamento helicoidal. Además, permite la rotación sincronizada de varios filamentos durante el nado, así como la rotación descoordinada de cada filamento durante la reorientación de la célula (Samatey *et al.*, 2004). Estos últimos mecanismos (nado y reorientación) serán tratados más adelante.

Mediante estudios estructurales de ganchos rectos por criomicroscopía electrónica y reconstrucción de imágenes helicoidales (Shaikh *et al.*, 2005) se reveló que la proteína del gancho FlgE, está formada por tres dominios; D0, D1 y D2. Estos dominios se encuentran dispuestos radialmente desde el interior hacia la parte exterior de la estructura tubular del gancho. Al igual que la proteína del filamento FliC, la estructura es desordenada en solución y cuando polimerizan forman hélices entrelazadas. (Fujii *et al.*, 2009). La estructura tubular del gancho está formada por 11 subunidades por cada dos vueltas (**Figura 4C**).

Existen estructuras conocidas como proteínas asociadas al gancho, estas proteínas son FlgK, FliD, y FlgL también llamadas HAP's (HAP1, HAP2 y HAP3, respectivamente). La HAP2 o proteína FliD está unida al extremo distal del gancho (en forma de una capucha) hasta que éste alcanza una longitud de 55nm. Una vez que el gancho alcanza esta longitud la proteína se desprende de la punta del gancho (Ohnishi *et al.*, 1994). Cuando esto ocurre, HAP2 es sustituida por HAP1 (FlgK). El complejo gancho-HAP1-HAP3 y HAP2 se forma

momentáneamente antes de la polimerización de la flagelina a lo largo del filamento helicoidal (Homma *et al.*, 1985; Yonekura *et al.*, 2002).

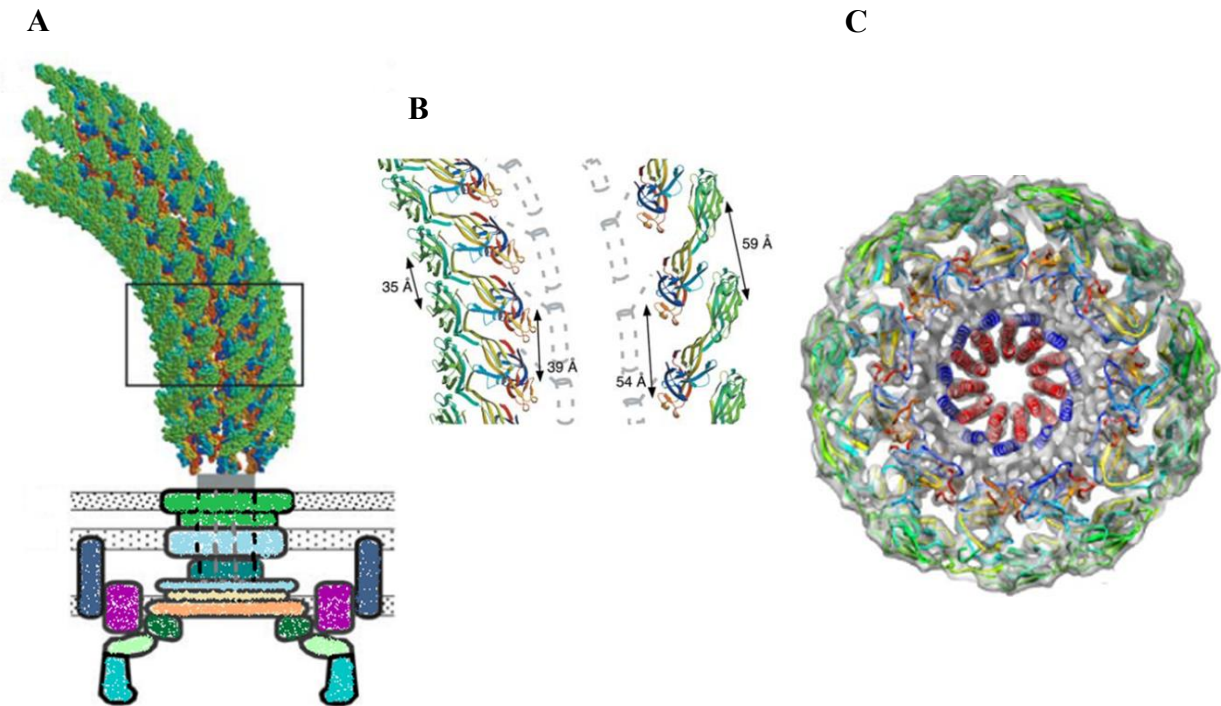


Figura 4. Estructuras del gancho flagelar **A)** Esquema del cuerpo basal unido al modelo atómico del gancho flagelar. **B)** Amplificación del recuadro de la figura A. Se muestra la estructura de los protofilamentos que forman al gancho **C)** Mapa de densidad tridimensional visto desde el extremo distal. Modificado de (Fujii *et al.*, 2009)

Cuerpo Basal

El cuerpo basal se encuentra formado por diversas estructuras, entre ellas el anillo MS que se encuentra anclado en la membrana, el anillo P que se encuentra situado en el periplasma, el anillo L que se encuentra en la membrana externa y el anillo C que se ensambla alrededor del poro de exportación. Entre cada anillo se encuentra una estructura conocida como eje o “rod” la cual atraviesa el espacio periplásmico. Además en esta gran estructura también se encuentran el aparato de exportación y el motor flagelar (**Figura 5**). El cuerpo

basal es una estructura pasiva, es decir, recibe la torca del motor y la transmite al eje, al gancho y luego al filamento (Macnab, 2003).

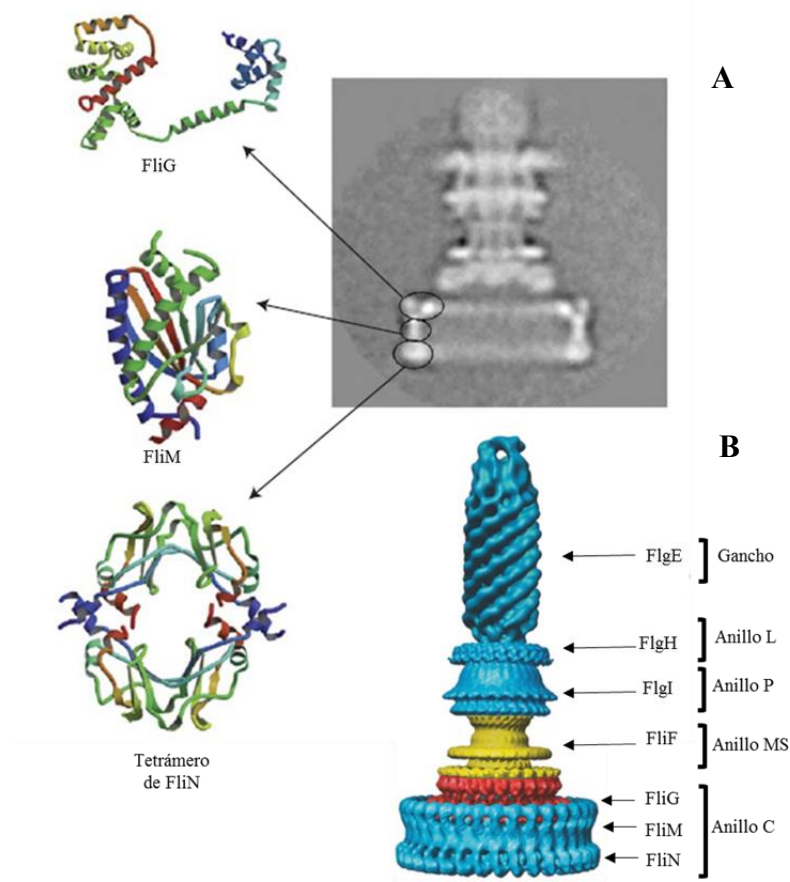


Figura 5. Estructura del cuerpo basal. De lado izquierdo se muestran las estructuras cristalográficas de las proteínas que forman el anillo C. **A)** Se muestra una imagen de criomicroscopía electrónica del cuerpo basal (HBB). **B)** Reconstrucción de un HBB obtenida a partir de microscopía electrónica de un cuerpo basal de *Salmonella*. Imagen modificada de (Erhardt *et al.*, 2010).

Aparato de exportación

El aparato de exportación flagelar se compone de seis proteínas integrales de membrana (FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ, FliR) que forman el canal de exportación dentro del anillo MS y tres componentes solubles (FliH, FliI (una ATPasa), FliJ) que interactúan

con el canal; éstas últimas pueden comportarse como proteínas periféricas de membrana bajo ciertas condiciones (Minamino *et al.*, 2008a; Terashima *et al.*, 2008)

Este complejo es el encargado de exportar los componentes axiales del flagelo (a las proteínas que componen al eje, al gancho y al filamento) a través de la membrana celular, en donde se incorporan hacia el extremo distal del flagelo naciente (Tsang *et al.*, 2014). Los componentes son sintetizados en el citoplasma y deben ser transportados al espacio periplásmico, la membrana externa o el espacio extracelular, en donde ocurre su ensamblaje. Además de las proteínas que componen al aparato de exportación existen otras proteínas citoplasmáticas (FlgN, FliA, FliS y FliT) que actúan como chaperonas sustrato-específico para facilitar la exportación de éstos (Minamino *et al.*, 2008a).

Los componentes que forman al aparato de exportación comparten similitudes a nivel de estructura y función con los componentes del inyectisoma presente en bacterias patógenas, a través del cual se exportan factores de virulencia. Los componentes de ambos aparatos se exportan a través de un sistema específico de secreción tipo III (SST3) (Erhardt *et al.*, 2010).

Anillo C

El anillo C se encuentra dentro del citoplasma celular; esta estructura está formada por un complejo de tres proteínas (**Figura 5**) FliG con 26 copias (Zhao *et al.*, 1996), FliM con 34 copias (Thomas *et al.*, 1999) y FliN con 136 (Jones *et al.*, 1990), las cuales se ensamblan alrededor del aparato de exportación (Tsang *et al.*, 2014). Este anillo tiene un papel en el cambio de dirección del flagelo además de desempeñar una función importante en la dirección de los sustratos proteicos a través del aparato de exportación (McMurry *et al.*, 2006).

Anillo MS

Este anillo (*Membrane Supramembrane*) es la base del motor flagelar se encuentra embebido en la membrana citoplásmica y se compone de 26 copias de la proteína FliF (Ueno *et al.*, 1992). De todas las estructuras que conforman al flagelo, es este anillo el que se

ensambla primero (DePamphilis *et al.*, 1971) y, como se mencionó previamente, dentro de esta estructura se encuentra el aparato de exportación.

Anillos L y P

Los anillos L y P se encuentran alojados dentro de la membrana externa (o pared de lipopolisacáridos (LPS) en bacterias gram negativas) y en la capa de peptidoglicano (PG), respectivamente. Estos anillos se encuentran interconectados por una pared cilíndrica y son resultado de la polimerización de alrededor de 26 subunidades de las proteínas FlgH (anillo L) y FlgI (anillo P) (Fernández *et al.*, 2000). Estas estructuras anulares forman el exterior de un cilindro por donde atraviesa el eje flagelar (Aizawa *et al.*, 1985; Stallmeyer *et al.*, 1989) y se cree que participan pasivamente en el mecanismo de rotación del flagelo (Jones *et al.*, 1989).

Eje

Es una estructura axial multiproteica compuesta por las proteínas FlgB, FliE, FlgC, FlgF y FlgG. Estas proteínas interactúan a través de alfa hélices que unen el extremo amino de una subunidad con el extremo carboxilo de la subunidad adyacente (Yonekura *et al.*, 2003; Samatey *et al.*, 2004). El eje se ensambla en la parte superior del canal abierto que forma el anillo MS, a través de interacciones hidrofóbicas (Zhao *et al.*, 2013).

Las proteínas FlgB, FlgC y FlgF forman la parte proximal del eje, mientras que 26 subunidades de FlgG forman el extremo distal (Homma *et al.*, 1990). La proteína FliE por su parte tiene una función importante en la exportación de susstratos pudiendo funcionar como un adaptador estructural entre la simetría anular del anillo MS y la simetría helicoidal del eje y las posteriores estructuras axiales (Minamino *et al.*, 2000)

La función del eje en el sistema flagelar es el transmitir la torca que genera el motor hacia el gancho y posteriormente al filamento.

EL MOTOR FLAGELAR

El motor del flagelo se encuentra formado por los complejos estructurales MotA/MotB en motores impulsados por iones H^+ o PomA/PomB en motores impulsados por Na^+ . Estos complejos se ubican en la membrana citoplasmática y se ensamblan alrededor del rotor, donde actúan en la generación de la torca por el paso de H^+ o de Na^+ (Terashima *et al.*, 2008). El motor opera por un mecanismo rotatorio y se puede subdividir en dos componentes principales: el rotor y el estator (Macnab, 2003) (**Figura 6A**).

Esta estructura representa una de las máquinas moleculares más grandes que existen en bacterias con una masa molecular de aproximadamente 11 MDa, ~13 diferentes proteínas, y alrededor de 25 proteínas adicionales son necesarias para su expresión y ensamblaje (Macnab, 1976). La función del motor es impulsar la rotación flagelar mediante gradientes iónicos transmembranales. Algunos motores como los de *E. coli* y *Salmonella* son motores bidireccionales que le permiten a las bacterias alternar entre una rotación en contra de las manecillas del reloj (CCW), y una rotación en sentido de las manecillas del reloj (CW) (Thormann *et al.*, 2010). No obstante, existen bacterias como *R. sphaeroides* que poseen un rotor unidireccional (Armitage *et al.*, 1987; Martínez-del Campo *et al.*, 2011). Hasta el momento dos iones de acoplamiento (H^+ y Na^+) (**Figura 7**) han sido descritos como fuente de energía para impulsar al motor (Thormann *et al.*, 2010).

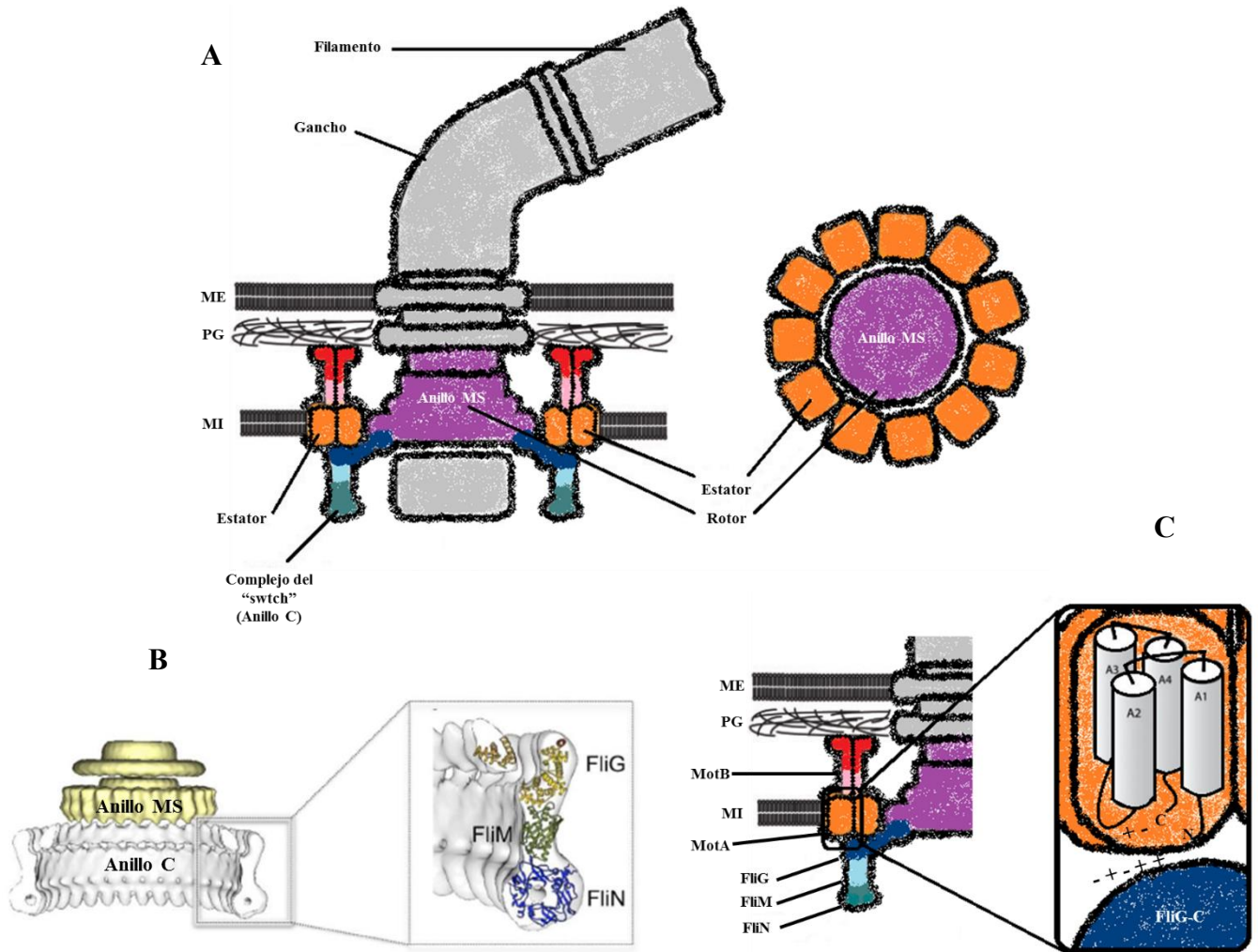


Figura 6. Esquema del motor flagela compuesto por el rotor y el estator. **A)** Se muestra al rotor (en morado) y a los estatores (en naranja) rodeando al motor. Modificado de (Thormann *et al.*, 2010) **B)** En este esquema se muestran los anillos MS y C, este último se encuentra formado por las proteínas FliG, FliM y FliN. Modificado de (Zhao *et al.*, 2014). **C)** Se muestra la interacción entre la proteína MotA y la subunidad FliG_C.

Rotor

El rotor está formado por los anillos MS y C (Morimoto *et al.*, 2014); como se mencionó anteriormente, el anillo MS está formado por 26 copias de la proteína FliF. Cuando esta estructura se encuentra ensamblada, funciona como una plataforma de montaje sobre la cual las proteínas FliG, FliM y FliN pueden ensamblarse para formar al anillo C, (**Figura 6B**) sobre la cara citoplasmática del anillo MS (Francis *et al.*, 1994).

FliG se asocia directamente con la cara citoplásmica del anillo MS con una estequiometría 1:1 con FliF (Francis *et al.*, 1992; Oosawa *et al.*, 1994). FliG posee tres dominios: FliG_N, FliG_M y FliG_C. El dominio FliG_N es el responsable de la unión al anillo MS (Kihara *et al.*, 2000) y por lo tanto debe formar el borde exterior de este anillo (Minamino *et al.*, 2008b). El dominio FliG_C es el encargado de la interacción con la proteína MotA (Zhou *et al.*, 1998), que forma parte del estator. Por otro lado, FliG_M interacciona con la proteína FliM (Brown *et al.*, 2007). Las proteínas FliM y FliN forman un complejo estable con una estequiometría 1 FliM:4 FliN, siendo estas proteínas las que conforman la mayor parte del anillo C (Brown *et al.*, 2005). FliG, FliM y FliN forman el complejo del “switch” (**Figura 6B**), son las proteínas responsables de la conmutación del rotor entre las direcciones CCW y CW o de paro (Morimoto *et al.*, 2014).

Estator

El motor bacteriano tiene la capacidad de rotar en dos sentidos: CCW y CW. La energía suministrada para que dicha rotación ocurra es proporcionada por un potencial electroquímico de iones específicos (H⁺ o Na⁺) que fluyen a través de la membrana citoplásmica (Ravid *et al.*, 1984). Con base en los iones de acoplamiento que utilizan los motores, éstos suelen dividirse en al menos dos tipos (**Figura 7**): los motores que utilizan iones H⁺, como los de *E. coli* y *Salmonella*, y los motores que utilizan iones Na⁺ como los del género *Vibrio* y *Bacillus* extremadamente alcalófilos (Hirota *et al.*, 1983). No obstante existen casos como el de *Bacillus alcalophilus* que posee un motor que utiliza Na⁺ y K⁺ como iones de acoplamiento para la rotación flagelar (Terahara *et al.*, 2012).

El estator está formado por las proteínas MotA y MotB (PomA y PomB en motores dependientes de Na⁺) (Minamino *et al.*, 2008b). Estas son proteínas integrales de membrana que forman un complejo con 4 copias de MotA y 2 copias de MotB (Berg, 2003). Estos complejos atraviesan la membrana citoplásmica para formar el canal de iones que proporcionan la energía para la generación de la torca (Stock *et al.*, 2012).

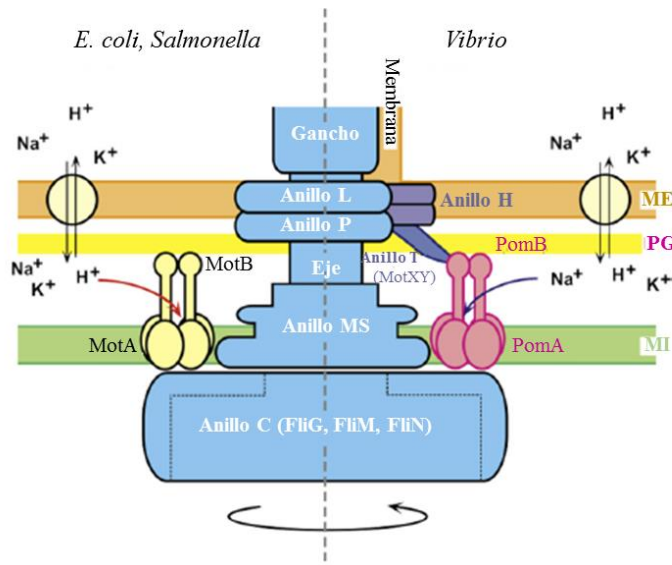


Figura 7. Esquema representativo de los dos tipos de motores flagelares. De lado izquierdo se muestra el rotor presente en *E. coli* y *Salmonella* el cual es impulsado por H^+ . De lado derecho se muestra un motor impulsado por iones Na^+ el cual se encuentra presente en el género *Vibrio*. En este segundo tipo de motores se encuentran anillos adicionales (anillo T y anillo H). MI: membrana interna, PG: pared de peptidoglicano, ME: membrana externa. Imagen modificada de (Yonekura *et al.*, 2011)

El número de estatores presentes en cada flagelo depende de la especie bacteriana; en *E. coli* 11 o 12 estatores (**Figura 6A**) pueden participar de forma sincronizada en la rotación flagelar (Reid *et al.*, 2006). Se ha postulado que dos subunidades de MotA y una subunidad de MotB forman un solo canal de iones de tal manera que cada complejo estator estaría formado por dos canales (Braun *et al.*, 2004). La subunidad B (MotB o PomB) posee un solo dominio transmembranal y un motivo de unión a la pared de peptidoglicano situado en el carboxilo terminal. Este motivo une el complejo a la pared celular y es esencial para la función del estator. Por otra parte, la subunidad A (MotA/PomA) posee cuatro dominios transmembranales y un “loop” citoplásmico que conecta los dominios transmembranales 2 y 3.

El proceso mediante el cual se genera la fuerza rotacional no se conoce claramente, sin embargo, existen varios modelos que proponen el mecanismo por el cual se genera la torca. El modelo más aceptado postula la interacción electrostática entre el motor y el estator, permitiendo así, la generación de movimiento. La translocación de protones en el complejo MotA/MotB induce cambios conformacionales en el “loop” citoplásmico de MotA,

permitiendo que residuos críticos cargados de este “loop” interaccionen con la proteína FlhG (Lloyd *et al.*, 1997; Yorimitsu *et al.*; 2003; Thormann *et al.*, 2010). La repulsión de cargas provocaría el movimiento del rotor, éste transmitiría la torca al eje quien a su vez, la comunicaría al gancho para finalmente hacerla llegar hasta el filamento (**Figura 6C**).

PATRONES DE ROTACIÓN Y NADO

La rotación del flagelo está dirigida por la fuerza protón motriz o sodio motriz a través de la membrana citoplasmática. En la naturaleza existen bacterias multiflageladas como *E. coli* que poseen un motor bidireccional o reversible (Silverman *et al.*, 1974); esto implica que el motor puede alternar entre dos tipos de rotación ya sea en sentido contrario a las manecillas del reloj CW (“clockwise”), o contraria a las manecillas del reloj, CCW (“counterclockwise”). Lo anterior ocasiona una modificación directa en los patrones de nado de la bacteria resultado de la estructura helicoidal del flagelo, este último reacciona de manera distinta ante los tipos de rotación.

Nado y Reorientación

Se han descrito al menos dos patrones de nado de acuerdo al tipo de rotación del motor; el primero de ellos corresponde al conocido como “run”. En este estado la célula es capaz de nadar porque posee múltiples flagelos helicoidales, cada uno de los cuales está unido a un gancho y a un eje y éste a su vez a un motor rotatorio dentro del cuerpo celular (Watari *et al.*, 2010). Cuando todos los motores giran en la misma dirección (CCW) se genera una fuerza rotacional que impulsa el cuerpo de la bacteria hacia adelante. Este impulso proviene de fuerzas hidrodinámicas y mecánicas que ocasionan que los flagelos alrededor de la célula se junten en un eje común (Macnab, 1977) formando una trenza (**Figura 8**). El segundo patrón de nado corresponde al fenómeno conocido como reorientación o “tumbly”. Durante este proceso la célula cambia de dirección mediante la inversión de al menos uno de los motores (Watari *et al.*, 2010) de un estado CCW hacia uno CW.

La estructura normal de los flagelos es una hélice izquierda; cuando el motor rota y cambia de dirección hacia CW, esta estructura de hélice izquierda cambia a una estructura

alternativa conocida como “*curly*”, que es una hélice derecha (Macnab *et al.*, 1977). Como se describió anteriormente, cuando al menos uno de los filamentos comienza a rotar hacia CW, se induce un cambio polimórfico que ocasiona que la trenza formada durante el nado se deshaga (**Figura 8**) provocando así, que todos los demás filamentos trabajen de manera no coordinada. Al haber trabajo mecánico independiente de cada uno de los flagelos se generan fuerzas que van hacia distintas direcciones, dando como resultado que no haya un desplazamiento neto de la célula (*tumble*).

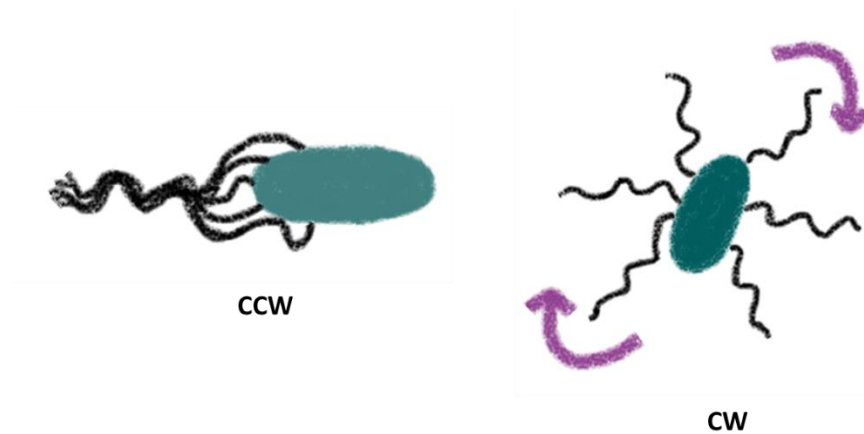


Figura 8. Patrón de nado en *E. coli*. Cuando los flagelos se encuentran girando hacia CCW se favorece la formación de una trenza, formada por los filamentos, y con ello el nado. Cuando uno de los flagelos comienza a rotar hacia el lado opuesto, CW, la trenza se deshace ocasionando un evento de reorientación.

QUMIOTAXIS

Las bacterias son organismos sumamente ingeniosos, por ello se han valido de diversos mecanismos para sobrevivir casi en cualquier nicho. La sobrevivencia bacteriana depende de la capacidad de responder y adaptarse a las cambiantes condiciones ambientales y, entre los desafíos que enfrentan se encuentran la escasez de nutrientes y la acumulación de sustancias tóxicas. (Porter *et al.*, 2011); este proceso se lleva a cabo mediante el control de un sistema de dos componentes que regula la actividad flagelar conocido como quimiotaxis.

A través de la vía de señalización quimiotáctica las bacterias pueden nadar y así encontrar mejores entornos de crecimiento; migrando hacia altas concentraciones de productos químicos favorables (atrayentes) o desplazándose lejos de sustancias químicas desfavorables (repelentes). La quimiotaxis es el sistema biológico más utilizado en bacterias.

La maquinaria molecular que controla esta vía de señalización es mucho más compleja que cualquier otro sistema de transducción de señales descrito en organismos procariontes. Tanto el origen como la variabilidad en este sistema son desconocidos; sin embargo, se sabe que el complejo multiprotéico que forma al sistema quimiotáctico está presente en la mayoría de las especies procariontes y que evolucionó de los sistemas de dos componentes más simples que controlan la transcripción en estos organismos. Estudios recientes de genómica evolutiva muestran la existencia de más de una docena de distintos tipos de sistemas de quimiotaxis, además de sistemas intermedios entre los sistemas de dos componentes y de señalización quimiotáctica (Wuichet *et al.*, 2010).

Dadas las características anteriores, el sistema quimiotáctico es el mecanismo biológico sensor-gradiente mejor estudiado en bacterias. Este sistema tiene propiedades notables tales como sensibilidad a concentraciones tan bajas como 3 ligandos por volumen celular (3nM), una amplitud de respuesta hasta cinco o seis órdenes de magnitud respecto a la concentración del ligando (Berg *et al.*, 1975; Segall *et al.* 1986; Kim *et al.*, 2001) así como la integración de señales múltiples incluidos el pH, la osmolaridad y la temperatura (Sourjik *et al.*, 2012).

COMPORTAMIENTO QUIMITÁCTICO

La capacidad de las bacterias para moverse bajo o sobre un gradiente es limitada por su talla y la naturaleza del ambiente. La mayoría de las bacterias miden 1-2 μ m de longitud, lo que hace imposible que puedan censar un gradiente a través del largo del cuerpo celular. Sin embargo, estos microorganismos pueden comparar las condiciones del entorno en el tiempo; esto significa que comparan el “ahora” con unos pocos segundos atrás procurando una respuesta a los cambios detectados (Armitage, 2007).

En ausencia de un estímulo (sin atrayente o repelente presente en el medio o con una concentración constante, es decir sin un gradiente) una bacteria nada durante unos segundos en línea suave y recta, movimiento conocido como “*smooth*” y posteriormente presenta eventos de reorientación para luego seguir nadando. En este caso, la bacteria no reconoce una dirección a la cual desplazarse por lo tanto no existe un desplazamiento neto (Berg *et al.*, 1972). A este movimiento carente de direccionalidad se le denomina como nado al azar (“*random walk*”) (Figura 9A).

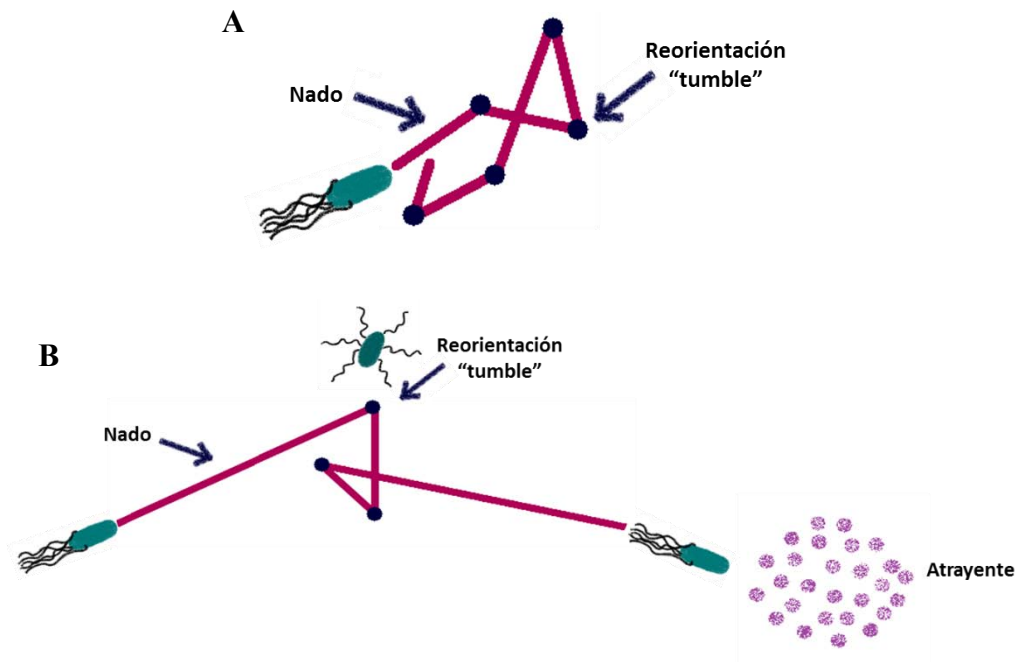


Figura 9. Comportamiento quimiotáctico de una bacteria en condiciones diferentes. **A)** Nado azaroso o “*random walk*”, las célula se desplaza aleatoriamente sin una dirección fija. **B)** Nado sesgado, la bacteria detecta un atrayente y se desplaza hacia esa dirección.

Cuando se encuentra presente un atrayente, o existe un gradiente en el medio, las trayectorias de nado son más largas y los eventos de paro o reorientación de la célula son menos frecuentes. En este segundo caso sí existe un desplazamiento hacia el atrayente o un distanciamiento de un repelente. A este tipo de nado en el cual la bacteria posee una direccionalidad se denomina nado sesgado o “*biased walk*” (Figura 9B).

En presencia de un atrayente, o el incremento de éste, ocasiona que los flagelos de la bacteria roten durante más tiempo hacia CCW y menos tiempo hacia CW ocasionando que

la bacteria nade. Sin embargo, cuando disminuye la concentración del atrayente, o se encuentra en el medio un repelente, los flagelos comienzan a rotar en dirección CW provocando que los eventos de reorientación de la célula sean más frecuentes (Adler, 1975; Koshland, 1981; Oosawa *et al.*, 1983) debido a que la célula intenta alejarse de sustancias nocivas o tóxicas y busca mejores condiciones para su crecimiento.

En cierto sentido, la quimiotaxis hacia atrayentes o el distanciamiento de los repelentes es determinado por el efecto acumulativo de las decisiones tomadas segundo a segundo de cada célula para continuar el nado o para reorientarse y cambiar de dirección (Baker *et al.*, 2006).

Adaptación

Las bacterias responden espacio temporalmente a los estímulos ambientales. La manera en que estos organismos detectan cambios en las concentraciones de atrayente se lleva a cabo mediante un mecanismo que comprende dos fases; una fase denominada periodo de excitación y una segunda fase conocida como de adaptación.

Cuando una bacteria detecta la presencia de un atrayente, ésta se desplaza hacia él mediante trayectorias de nado largas. Sin embargo, luego de un periodo de tiempo, la bacteria comienza a nadar y reorientarse del mismo modo en que lo haría cuando no hay un estímulo presente. En este pequeño intervalo de tiempo ocurren ambas fases (excitación y adaptación). La fase de excitación ocurre en el momento en que la célula detecta el estímulo y responde, mientras que la fase de adaptación se refiere al periodo en el cual la célula retorna gradualmente al comportamiento de nado y reorientación como cuando no hay estímulo.

La función del periodo de adaptación es crucial debido a que las bacterias poseen una alta sensibilidad hacia algunos atrayentes (concentraciones nanomolares a milimolares) aunado a que, la respuesta quimiotáctica se amplifica de cinco a seis órdenes de magnitud. En ausencia de la fase de adaptación, esta señal amplificada saturaría la respuesta del sistema (Vladimirov *et al.*, 2009) impidiendo que la célula vuelva a detectar cambios de concentración en ambiente futuros.

Componentes del sistema de señalización quimiotáctica

La vía de señalización quimiotáctica se encarga de traducir un estímulo extracelular en una señal intracelular que se traduce en una respuesta por parte de la célula, el nado. Este proceso sólo puede llevarse a cabo mediante la intervención de diversas proteínas y complejos proteicos que permiten que la señal viaje del exterior celular al interior de la misma. Dentro de la célula, la señal es amplificada de tal manera que la bacteria puede responder eficientemente al estímulo generado.

La quimiotaxis forma parte de una gama de mecanismos conocidos como sistemas de dos componentes o TCS (*two-component-system*). Estos sistemas generalmente se encuentran compuestos por una proteína censora histidín cinasa HPK (*histidine protein kinase*) y un regulador de respuesta RR (*response regulator*). Sin embargo, la vía de señalización quimiotáctica es un sistema aún más complejo debido a que no sólo está formada por las proteínas mencionadas; en la quimiotaxis participan al menos cinco proteínas más, de las cuales se describirá su función a continuación.

Quimiorreceptores

Los organismos móviles detectan y siguen gradientes químicos en su entorno mediante un tipo de quimiorreceptores transmembranales también conocidos como proteínas quimiotácticasceptoras de metilos MCP's (*methyl-accepting chemotaxis protein*). Estos quimiorreceptores median el comportamiento quimiotáctico en muchas especies de bacterias y arqueas (Parkinson *et al.*, 2015).

Los quimiorreceptores usualmente son proteínas diméricas transmembranales; poseen un dominio periplásmico al cual se une el ligando y un dominio citoplásmico de señalización (Porter *et al.*, 2011). El dominio periplásmico de cada uno de los quimiorreceptores es diferente debido a que se les unen diferentes quimioefectores. Un receptor convencional posee una estructura de homodímero (**Figura 10**) que contiene un dominio periplásmico sensor, una región helicoidal transmembranal, un dominio HAMP (encontrado normalmente en histidín cinasas, adenil ciclasas, proteínas quimiotácticas

ceptoras de metilos y fosfatasa (Aravind *et al.*, 1999)), una hélice de metilación (MH), una región flexible y una región de contacto con proteína (Bi *et al.*, 2015).

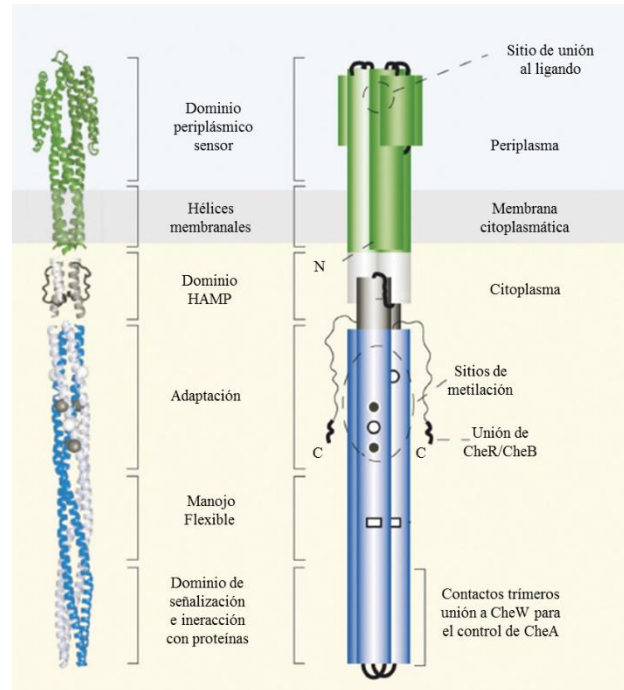


Figura 10. Estructura de un quimiorreceptor MCP. Del lado izquierdo se muestra un esquema de listones y del lado derecho un diagrama esquemático de los dominios que componen a un MCP. Modificado de (Hazelbauer *et al.*, 2008)

En *E. coli*, existen diversos receptores según el ligando que unen; los responsables de detectar cambios en la concentración de serina (Tsr), aspartato y ribosa (Tar), galactosa y maltosa (Trg) y dipéptidos (Tap). Tsr y Trg también son los responsables de la detección de cambios en la temperatura, pH y para dar respuesta a una amplia gama de repelentes. El número de receptores en la célula difiere, por ejemplo, Tsr y Tar se encuentran en mayor abundancia mientras que los receptores Trg y Tap se encuentran en baja concentración.

El número de receptores diferentes y de sustancias químicas detectadas por cada receptor varía mucho de una especie a otra y refleja el ambiente óptimo de cada especie (Armitage, 2007). Durante el proceso de adaptación, la actividad de los receptores

transmembranales MCP's es modulada por la modificación covalente de residuos específicos de glutamato (West *et al.*, 1995). Las enzimas CheR y CheB son las encargadas de metilar y desmetilar reversiblemente a los receptores en dichos residuos.

Proteína adaptadora

CheW es una proteína compuesta por dos dominios SH3 (dominios de 60 aminoácidos) que median el ensamblaje de complejos de proteínas específicas, a través de la unión a péptidos ricos en prolina. Estos dominios se encuentran presentes en proteínas implicadas en la transducción de señales e interacciones membrana-citoesqueleto (Wadhams *et al.*, 2004) que forman hojas beta. Cada dominio se compone de 5 hebras β -barril que forman un núcleo hidrofóbico interno para la interacción proteína-proteína (Vu *et al.*, 2012). De acuerdo a la estructura cristalográfica obtenida de CheW de *Thermotoga marítima* (Griswold *et al.*, 2002) esta proteína es similar al dominio P5 de CheA, siendo en este dominio donde ocurre la interacción CheW-CheA

CheW es una proteína pequeña, formada por 167 aminoácidos y pesa alrededor de 18kDa (Boukhvalova *et al.*, 2002). Desempeña un papel fundamental dentro de la señalización quimiotáctica debido a que interactúa con el dominio de señalización de MCP y con la histidín cinasa CheA a través del carboxilo terminal de esta última (Bourret *et al.*, 1993) formando el complejo MCP-CheW-CheA. CheW carece de actividad catalítica, por lo tanto se cree que funciona como una proteína de andamiaje que transduce las señales generadas por los quimiorreceptores haciéndolas llegar hasta CheA (Wadhams *et al.*, 2004).

Cinasa

La enzima CheA es la encargada de mediar la transferencia de información, captada por los quimiorreceptores, hacia el citoplasma (Surette, 1996). Es una proteína dimérica soluble capaz de autofosforilarse, pertenece a la superfamilia de cinasas de histidina que regulan diferentes procesos de transducción de señales en microorganismos y plantas (Stock *et al.*, 1988).

CheA se autofosforila en un residuo específico de histidina (His⁴⁸) utilizando ATP como fosfodoador. De esta manera, convierte la señal transducida por los quimiorreceptores a un flujo de grupos fosforilo que llegan hasta el citoplasma de la célula a través de la fosforilación de los reguladores de respuesta CheY y CheB. En presencia de estímulos negativos (aumento en la concentración de repelentes o disminución en la concentración de atrayentes) una corriente de grupos fosforilo, proveniente de CheA, es transferida al regulador de respuesta CheY, que al estar fosforilado interactúa directamente con el motor cambiando el patrón de rotación del flagelo. La corriente de grupos fosforilo también puede actuar como una señal de retroalimentación negativa mediante la fosforilación de CheB, cuya actividad de metil esterasa restablece la condición de los quimiorreceptores previa al estímulo (Wang *et al.*, 2012) (**Figura 11**).

La proteína CheA opera como un homodímero; cada subunidad contiene 5 dominios funcionales designados como P1-P5. El dominio P1 contiene el sitio de autofosforilación, His48, el dominio P2 es el dominio de unión de los reguladores de respuesta CheY/CheB, el dominio P3 es el dominio de dimerización, el dominio P4 es el dominio catalítico de unión a ATP y finalmente el dominio P5 que es el dominio regulatorio (Wang *et al.*, 2012; Nishiyama *et al.*, 2014).

CheA interactúa con tres dímeros de MCP y con dos monómeros de CheW formando complejos oligoméricos en los polos de la célula. El dominio P1 es un dominio estructural y funcionalmente homólogo a los dominios HPt presentes en cinasas híbridas como ArcB. En presencia de ATP y Mg²⁺ el dímero de CheA muestra un nivel basal de trans-autofosforilación, éste nivel aumenta significativamente en presencia de los quimiorreceptores. MCP y CheW se unen al dominio regulatorio P5 de CheA, estas proteínas pueden inhibir o activar la fosforilación, respecto al nivel basal, controlando el acceso al dominio P1 de un monómero a otro dominio de la cinasa (Bilwes *et al.*, 1999).

CheA muestra un aumento en la autofosforilación en respuesta a una disminución en la unión del atrayente o un incremento en la unión del repelente en los quimiorreceptores. Durante la autofosforilación de CheA ocurre una reacción de transfosforilación donde el dominio P4, previamente fosforilado con el fosfato γ del ATP, interacciona con el dominio

P1 de otra subunidad transfiriendo el grupo fosforilo al residuo conservado de histidina (His⁴⁸), presente en este último dominio (Zhao *et al.*, 2006).

Por otra parte CheY y CheB compiten por la unión al dominio P2 de la cinasa. El grupo fosforilo del dominio P1 puede ser transferido de la His⁴⁸ de CheA al aspártico (Asp⁵⁷) de CheY ó bien, al áspartico (Asp⁵⁶) de CheB (Li *et al.*, 1995; Wadhams *et al.*, 2004).

En general, las histidinas cinasas (HPK's) son capaces de autofosforilarse mediante un residuo de histidina conservado que se encuentra dentro del dominio conocido como Dhp (*dimerization and histidine phosphorylation*). La histidín cinasa CheA, difiere de las histidinas cinasas canónicas debido a que el residuo de histidina autofosforilable está presente en el dominio P1 ubicado en el extremo amino terminal de la proteína y no en el dominio Dhp (Scott *et al.*, 2010).

Regulador de respuesta: CheY

CheY es una enzima que desempeña una función como regulador de respuesta, ocupa un lugar único en la vía de señalización quimiotáctica debido a que es una molécula citoplasmática soluble que une dos complejos supramoleculares localizados en la membrana: a los grupos de quimiorreceptores localizados en los polos de la célula y a los 6 u 8 cuerpos basales flagelares que se encuentran distribuidos en la célula. La asociación de CheY con estos complejos está regulada por medio de la fosforilación de esta enzima (Djordjevic *et al.*, 1998). CheY puede ser activada rápidamente por fosforilación y más lentamente por acetilación; el resultado de cualquiera de estos dos modos de activación es un incremento en la probabilidad de que el motor flagelar gire hacia CW (**Figura 12**). El mecanismo de fosforilación del regulador de respuesta CheY está directamente involucrado en la quimiotaxis mientras que el papel de la acetilación en la señalización quimiotáctica aún se desconoce (Barak *et al.*, 2001; Barak *et al.*, 2006).

CheY es fosforilada por la histidín cinasa CheA y puede ser desfosforilada por la fosfatasa CheZ. La fosforilación de CheY afecta directamente la rotación flagelar debido a un aumento en la afinidad por la proteína FliM ubicada en el complejo de switch del motor (**Figuras 11 y 12**) (Barak *et al.*, 2006). En su estado no fosforilado CheY tiene mayor afinidad

por el dominio de unión de la cinasa CheA, aproximadamente 6 veces más que CheY fosforilada (Li *et al.*, 1995), mientras que ésta última tiene mayor afinidad que CheY no fosforilada, por la proteína FliM (Welch *et al.*, 1993; Djordjevic *et al.*, 1998).

La proteína CheY está compuesta por 128 aminoácidos y posee un solo dominio regulador. Todas las estructuras de CheY claramente muestran un doble enrollamiento de estructura α/β con 5 α -hélices que rodean a 5 hebras paralelas de láminas β . Los elementos de estructura secundaria alfa y beta alternan en la secuencia comenzando con $\beta 1\alpha A$ y terminando con $\beta 5\alpha E$. La topología de plegamiento es $\beta 2\beta 1\beta 3\beta 4\beta 5$, con las hélices A y E en un lado de la hoja y las hélices B, C y D en el otro lado.

El sitio de fosforilación de CheY (Asp⁵⁷) está localizado en el bucle entre $\beta 3$ y αC (Surette, 1996). Este sitio, así como otros residuos de aminoácidos (Asp¹², Asp¹³, Thr⁸⁷, Tyr¹⁰⁶ y Lys¹⁰⁹) se encuentran altamente conservados y forman el sitio activo para la catálisis, dependiente de Mg²⁺ (Djordjevic *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001). Los residuos Asp¹², Asp¹³ son necesarios para la unión del magnesio (Lukat *et al.*, 1991), los residuos Thr⁸⁷ y Lys¹⁰⁹ participan en eventos posteriores a la fosforilación (Lukat *et al.*, 1991; Appleby *et al.*, 1998), mientras que el residuo Tyr¹⁰⁶ ubicado en la posición rotamérica adyacente del sitio activo se relaciona con el estado de señalización de CheY (Zhu *et al.*, 1996).

Metiltransferasa

Los receptores que participan en la quimiotaxis, MCP's, contienen residuos de glutamato específicos dentro de sus dominios citoplásmicos que son metilados durante la adaptación. Estos grupos metilo se transfieren a los residuos de glutamato específicos en el extremo carboxilo terminal (entre cuatro y cinco residuos) de los MCP's (Koshland, 1988) a partir de S-adenosilmetionina por una metil transferasa constitutivamente activa, CheR (Martin *et al.*, 2001). La metilación de los quimiorreceptores contrarresta los efectos del ligando unido y contribuye al fenómeno de adaptación restableciendo la actividad de señalización de los receptores a pesar de la continua presencia del estímulo (Djordjevic *et al.*, 1997).

La enzima CheR forma parte de un grupo muy grande y diverso de enzimas que catalizan la transferencia de grupos metilo a partir de S-adenosilmetionina (AdoMet) a una amplia gama de sustratos incluyendo moléculas pequeñas, ácidos nucleicos y proteínas. A pesar del uso de un cofactor común, AdoMet, el mecanismo de transferencia de metilos no es conservado entre las metiltransferasas (Djordjevic *et al.*, 1997).

Metilesterasa

CheB es una proteína compuesta por dos dominios distintos (Simms *et al.*, 1985): un dominio regulador en el amino terminal, de aproximadamente 20 aminoácidos (homólogo al dominio fosfoceptor presente en la familia de los reguladores de respuesta, incluido CheY), y un dominio catalítico en el carboxilo terminal que cataliza la metilación y desamidación de los MCP's (Surette, 1996). CheB se activa por fosforilación de CheA en un residuo específico de aspartato (Asp⁵⁶) en su dominio amino terminal. El dominio carboxilo terminal de la enzima es el responsable de la desamidación o desmetilación de residuos de glutamato específicos, que se encuentran en el dominio citoplásmico de los quimiorreceptores (Jurica *et al.*, 1998). El dominio N-terminal o regulador desempeña un rol dual al inhibir la actividad de metilesterasa cuando no está fosforilada y al estimular su actividad cuando está fosforilada.

Fosfatasa

Un componente esencial de cualquier sistema de transducción de señales es el control de la duración de la respuesta celular a un estímulo. La vida útil de la molécula de señalización debe ser lo suficientemente larga para dar una respuesta eficaz, pero la terminación oportuna de la señal es necesaria para que la célula pueda ajustar su comportamiento al cambiar las condiciones (Silversmith, 2010).

La proteína CheZ estimula la desfosforilación del regulador de respuesta CheY por un mecanismo desconocido terminando así con la señal durante la vía de señalización quimiotáctica en *E. coli* (**Figura 11**). La co-estructura cristalográfica de CheZ y CheY-BeF₃⁻Mg²⁺ muestra que CheZ es un dímero (CheZ₂) compuesto por dos monómeros (Z₁ y Z₂) que

están unidos por un doble eje rotacional. La característica estructural predominante de CheZ₂ es un largo paquete de cuatro hélices (CheZ *core*) (Zhao *et al.*, 2002).

CheZ controla la desfosforilación de CheY-P mediante la tasa de actividad de la fosfatasa. Esta fosfatasa es un componente periférico del complejo receptor-señalización.

Quimiotaxis en *E. coli*

A través de los quimiorreceptores, la célula es capaz de detectar a los quimioefectores; la unión de estos ligandos induce un cambio conformacional que es transmitido hacia el dominio citoplasmático por un movimiento tipo pistón de la región transmembranal (Hazelbauer *et al.*, 2008; Amin *et al.*, 2010). En casi todas las bacterias, incluida *E. coli*, estos receptores se encuentran ubicados en los polos de la célula organizados en trímeros de dímeros los cuales forman complejos ternarios con la histidín cinasa CheA y con la proteína adaptadora CheW (Porter *et al.*, 2011). Interacciones alostéricas entre estos tres componentes permiten que la señal se amplifique, logrando así que las bacterias puedan responder a pequeños cambios en la concentración del quimioefector (periodo de excitación). En respuesta a la disminución de un atrayente, los quimiorreceptores de *E. coli* promueven un evento de *tumbling* mediante la activación de CheA por su autofosforilación (Segall *et al.*, 1986).

CheA en su estado fosforilado (CheA-P) actúa como un fosfodonor para los reguladores de respuesta CheY y CheB. Una vez fosforilada CheY (CheY-P) se libera del grupo polar y difunde hasta el motor flagelar donde se une a las proteínas del complejo de *switch* FliM y FliN. Esta unión, promueve un cambio en la dirección de la rotación del sentido contrario a las manecillas del reloj a un sentido en favor de las manecillas del reloj (**Figura 12**). Se estima que en el motor existen alrededor de 34 subunidades de FliM y la probabilidad de un evento de *switch* o cambio de dirección del motor aumenta de forma cooperativa a medida que se unen más unidades de CheY-P al motor (Delalez *et al.*, 2010). La terminación de la señal se produce por la desfosforilación de CheY-P. Este último evento sucede rápidamente con la finalidad de permitir a la célula la detección de un gradiente continuo del

medio. Esta desfosforilación es catalizada por la fosfatasa CheZ. En otras especies como *Bacillus subtilis* existe su homólogo CheC y FliY (Porter *et al.*, 2011).

Durante el periodo de adaptación CheB, quien también es fosforilada por CheA, reestablece el equilibrio entre el estado activo e inactivo del circuito de quimiotaxis permitiendo a las células monitorear cambios temporales en las concentraciones de quimioefectores. Este sistema de adaptación ajusta la salida del receptor a través de la modificación covalente de varios residuos de ácido glutámico ubicados en la región citoplásmica de los MCP's. La metiltransferasa CheR, interactúa con los receptores MCP's en su estado inactivo catalizando una reacción de metilación sobre los residuos de ácido glutámico ocasionando que los MCP's cambien de un estado inactivo a un estado activo. Por su parte la metilesterasa CheB, interactúa con los MCP's en su estado activo hidrolizando los residuos metilo a ácido glutámico ocasionando que los receptores pasen de un estado activo a un estado inactivo. La preferencia del estado inactivo por parte de la proteína CheR y la preferencia por el estado activo por parte de la proteína CheB representan el circuito de retroalimentación negativa del sistema de adaptación sensorial (**Figura 11**) (Parkinson *et al.*, 2015).

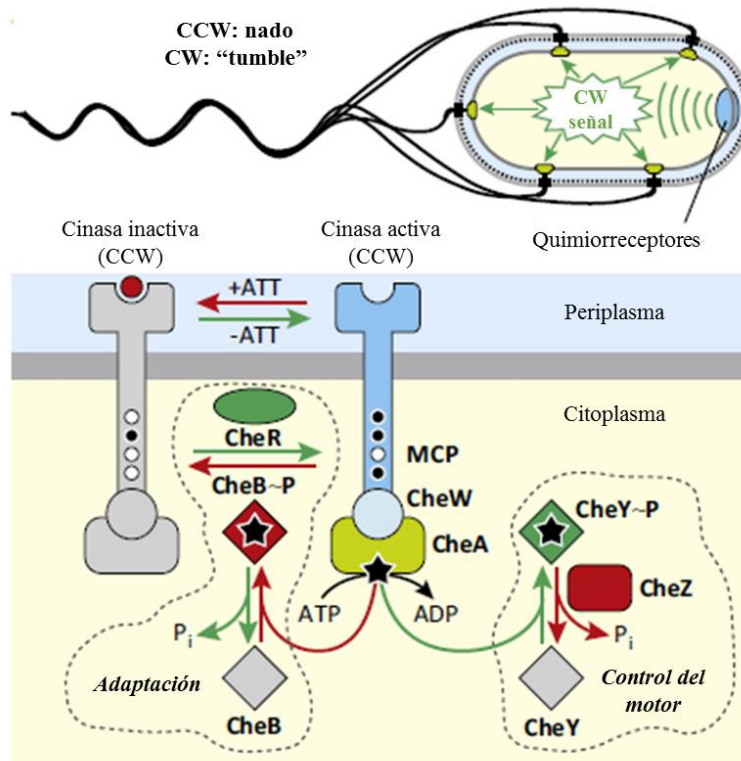


Figura 11. Vía de señalización quimiotáctica en *E. coli*. En la figura superior se muestra el esquema de una célula nadando (CCW) que al recibir una señal de los quimiorreceptores comienza a reorientarse (CW). En la figura inferior se muestran los componentes que conforman la vía de señalización, los estados activos e inactivos de cada una de las enzimas y las reacciones que ocurren durante la señalización. En gris claro se muestra al quimiorreceptor inactivo así como a las enzimas CheW, CheA, CheB y CheY inactivas. En azul se muestra a la MCP activa, en un azul más claro a la proteína adaptadora CheW activa, CheA activa se muestra en amarillo. Las enzimas CheY y CheR activas se muestran en verde mientras que CheZ y CheB activas se muestran en rojo. Con líneas punteadas se señalan los eventos de adaptación y del control del motor flagelar. Modificado de (Parkinson *et al.*, 2015)

Mecanismo de “switching”

Como se mencionó anteriormente el complejo de “switch” está formado por las proteínas FliM, FliN y FliG. La proteína CheY en su estado fosforilado (CheY-P) induce un cambio en la rotación del motor de CCW hacia CW, ocasionado por la unión de CheY-P a las proteínas FliM y FliN ubicadas en el rotor (**Figura 12**). Se ha propuesto (Paul *et al.*, 2011) que este cambio en el sentido de la rotación es generado debido a esta unión de CheY-P a las

proteínas FliN y FliM. Esta unión genera pequeños cambios de las subunidades FliM_C y de los tetrámeros de FliN alterando los contactos de la subunidad FliM_M con la subunidad FliG_C. Dichos movimientos alterarían la inclinación de estos dominios así como la rotación de los dominios FliG_C. Esto a su vez reorientaría 90° los sitios de interacción con el estator; este cambio en la orientación de FliG sería suficiente para cambiar el sentido de la rotación del motor.

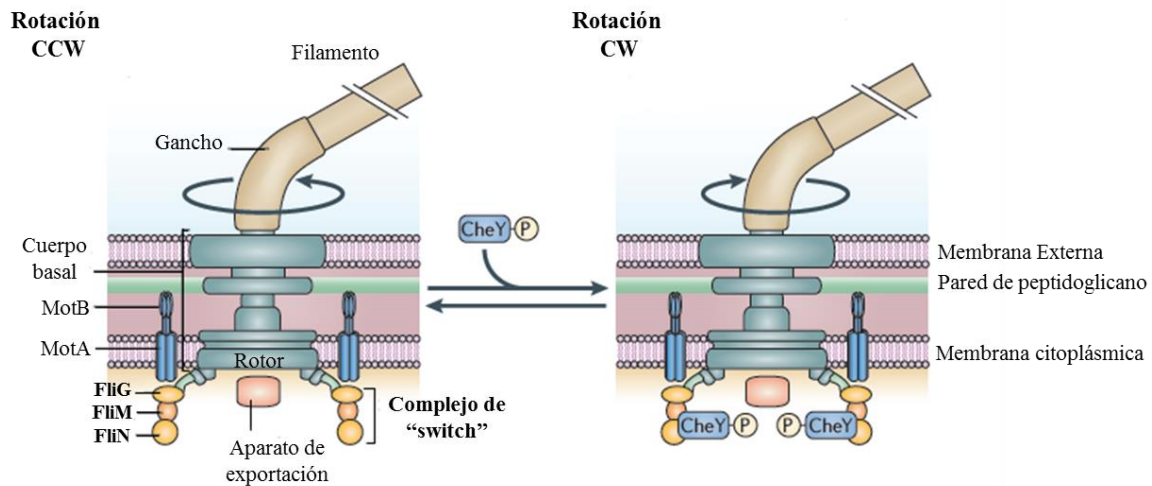


Figura 12. Mecanismo de “switching” en *E. coli*. Esquema representativo del mecanismo de *switching* en un motor bidireccional. En ausencia de CheY-P la rotación del motor es contrario a las manecillas del reloj (CCW). En este estado de rotación la bacterias se encuentra nadando (Figura de la izquierda). Sin embargo, cuando se encuentra presente CheY-P (Figura de la derecha) esta proteína incrementa su afinidad por las proteínas del complejo de *switch* FliM y FliN uniéndose a estas últimas ocasionando que el sentido de la rotación del motor cambie hacia el sentido de las manecillas del reloj (CW), lo que provoca que se genere un evento de reorientación de la célula (Porter *et al.*, 2011)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Rhodobacter sphaeroides es una bacteria púrpura no sulfurosa, que pertenece al grupo de las α - proteobacterias (gram negativa). Este organismo se utiliza como modelo de estudio de procesos como fotosíntesis, bioenergética, biología celular y transducción de señales como la quimiotaxis. Posee una gran capacidad y diversidad metabólica, además, responde a una amplia gama de estímulos ambientales incluyendo oxígeno, luz, algunos aminoácidos, carbohidratos y ácidos orgánicos tales como succinato y propionato, entre otros.

R. sphaeroides posee dos conjuntos de genes flagelares (*fla1* y *fla2*), cada conjunto codifica para un flagelo funcional (Porter *et al.*, 2011). La secuencia completa del genoma de *R. sphaeroides* revela además, la presencia de múltiples genes quimiotácticos dispuestos principalmente en tres *loci* diferentes: *cheOp1*, *cheOp2* y *cheOp3*. Evidencia bioquímica y genética sugiere que las proteínas codificadas por *cheOp2* y *cheOp3* son las responsables de controlar la respuesta quimiotáctica del flagelo Fla1, mientras que la supresión de *cheOp1* no tiene ningún efecto (Martinez-del Campo *et al.*, 2011). Por el contrario, en el sistema Fla2 la eliminación de genes de *cheOp1* sí ocasiona un efecto en el fenotipo de nado (Martinez-del Campo *et al.*, 2011).

El total de proteínas quimiotácticas descritas en *R. sphaeroides* son: 13 quimiorreceptores (9 de los cuales son proteínas transmembranales y 4 citoplásmicas), 4 proteínas histidín-cinasas CheA, 4 proteínas adaptadoras CheW, 6 reguladores de respuesta CheY, 2 metil estererasas CheB, 3 metil transferasas CheR y 1 desamidasa CheD (a diferencia de otras bacterias como *E. coli*, no hay homólogos de Che C, Che V o Che Z).

ANTECEDENTES

Previamente se describió en *R. sphaeroides*, que mutantes de Fla1 son capaces de nadar en medio líquido por medio de flagelos polares cuyos componentes estructurales son codificados por un segundo conjunto de genes (Fla2). En la cepa silvestre y bajo condiciones de laboratorio, este conjunto de genes no se expresa. Las células que expresan flagelos fla2 forman un halo en placas de nado en agar suave que contienen diferentes ácidos orgánicos. Esta respuesta quimiotáctica está mediada únicamente por los reguladores de respuesta CheY1, CheY2, y CheY5. Dado que estas proteínas están codificadas en el *cheOp1*, se cree que este *locus* debe controlar los flagelos expresados por el sistema Fla2 (Martinez-del Campo *et al.*, 2011).

Estudios previos en el laboratorio mostraron que en ausencia de *cheY1* las células no muestran un fenotipo diferente respecto a la cepa AM1 que expresa el sistema Fla2. En cambio, la ausencia de *cheY2* provoca que las células asuman pocos eventos de reorientación (fenotipo *smooth*). Por otro lado, la delección de *cheY5* ocasiona que las células tengan más eventos de reorientación (fenotipo *tumbly*) respecto a la cepa AM1.

Estos resultados sugieren que el regulador de respuesta CheY2 desempeña un papel importante en el motor del sistema Fla2. Teniendo en cuenta que mutantes en CheA1, CheW1 y CheY2 muestran el mismo fenotipo (Martinez-del Campo *et al.*, 2011), se sugiere que estas últimas comprenden la vía de señalización que controla el sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides* (Martinez-del Campo *et al.*, 2011).

HIPÓTESIS

Un posible mecanismo de regulación en el sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides*, dependería de que la histidín cinasa CheA1 transfiriera el grupo fosfato más rápido al regulador de respuesta CheY2, mientras que el regulador de respuesta CheY5 podría retener durante más tiempo al grupo fosfato implicando que esta proteína actúa como una poza de fosfatos.

OBJETIVOS

General

Caracterizar la función bioquímica de los reguladores de respuesta CheY1, CheY2 y CheY5 en la vía de señalización quimiotáctica del sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides*

Particulares

- Determinar las cinéticas de desfosforilación de cada una de las proteínas CheY1, CheY2 y CheY5 así como las de las fusiones GST-cheY1, GST-cheY2 y GST-cheY5.
- Comparar los ensayos de fosfotransferencia de CheA1 con cada uno de los reguladores de respuesta CheY para así, determinar las diferencias con base en el tiempo de retención o de transferencia del grupo fosfato de la histidín cinasa CheA1.
- Con base en los ensayos de fosfotransferencia, intentar determinar la función de cada uno de los reguladores de respuesta en la vía de señalización quimiotáctica del sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y plásmidos

En la siguiente tabla se enlistan las cepas y los plásmidos que fueron utilizados para la realización de este trabajo.

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Cepa o plásmido	Características Relevantes	Fuente o Referencia
Cepas de <i>E. coli</i>		
TOP10	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$ $\Phi80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <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
JM109	<i>hsdR17</i> $_{(lac\text{-}pro)}$ F_ <i>traD36</i> <i>proAB</i> <i>lacIqZ</i> _M15	(Ausubel, 1987)
BL21 (DE3)	<i>hsdS</i> <i>gal</i> ($\lambda cIts857$ <i>ind1</i> <i>Sam7</i> <i>nin5</i> <i>lacUV5</i> -t7 <i>gene1</i>)	(Studier <i>et al.</i> , 1986) Novagen
M15 [pREP 4]	<i>thi lac ara</i> ⁺ <i>gal mtl</i> F' <i>recA</i> ⁺ <i>uvr</i> ⁺ <i>lon</i> ⁺ ; plásmido pREP4 Kan ^r	Qiagen
Plásmidos		
pQE30	Expression vector; Apr, N-terminal His6 tag	Qiagen
pQE60	Expression vector; Apr, C-terminal His6 tag	Smith and
pGEX	Fusión con la proteína GST, Promotor inducible con IPTG; disponible con secuencia de escisión	Johnson (1988) Pharmacia New England
pMALc2x	Fusión con la proteína MBP, Promotor inducible con IPTG; secuencia señal MBP que facilita la exportación al periplasma	Este trabajo
pMALc2x MBP-CheY2		

Medios de Cultivo

LB (Bertani, 1951)

Triptona 10 g

Extracto de Levadura 5 g

NaCl 5 g

H₂O cbp 1 L

(cbp= cuanto baste para)

2YT

Triptona 16 g

Extracto de levadura 10 g

NaCl 5 g

H₂O cbp 1 L

Nota: Cuando se requirió medio sólido se agregaron 20 g de agar por cada litro.

Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio LB o en medio 2YT

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

Los cultivos con la cepa de interés de *E. coli* se crecieron en 10 ml de medio LB a 37°C con agitación constante (250 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica (D.O₅₅₀)=0.5; posteriormente se incubaron en hielo durante 5 minutos. Luego, se centrifugó el cultivo a 3,500 xg a 4°C por 6 minutos. Se decantó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en la mitad del volumen inicial (5 ml) con una solución fría y estéril de CaCl₂ 100 mM.

Las células se incubaron 20 minutos en hielo. Posteriormente, se centrifugaron en las mismas condiciones que en el paso anterior; se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en una décimo quinta fracción (666 µl) del volumen del cultivo inicial con la misma solución de CaCl₂.

Después, las células se dejaron en hielo durante 1 o 24 horas según fuera necesario (1 hora si se trataba de una transformación con DNA superhelicoidal o 24 horas si se trataba

de una transformación con inserto), se tomaron alícuotas de 200 μ l y se les agregó la cantidad deseada de DNA a transformar.

Las células competentes con el DNA se incubaron durante 1 hora en hielo, transcurrido el tiempo se les dio un choque de calor a 43°C por 2 minutos e inmediatamente después se pusieron en hielo por 5 minutos; luego se agregaron 800 μ l de medio LB. Posteriormente, las células se incubaron a 37°C por 1 hora para finalmente ser plaqueadas en medio selectivo.

Digestiones con enzimas de restricción

Los fragmentos de DNA y los plásmidos se cortaron con endonucleasas de restricción. Estas enzimas fueron adquiridas comercialmente de *New England Biolabs*, Promega o Invitrogen. Al utilizar cada enzima se siguieron las instrucciones del catálogo del fabricante.

Reacciones de ligación

Para este protocolo se utilizó la enzima T4 DNA ligasa de *New England Biolabs*. Se utilizó 1 μ l de la enzima en amortiguador 1x. Las reacciones se dejaron a 16°C durante 15 horas.

Purificación de plásmidos

Se recurrió al sistema QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) para purificar DNA plasmídico. El protocolo se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Extracción de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Para purificar y recuperar fragmentos de DNA que se encontraban dentro de un gel de agarosa se utilizó el kit QIAquick de *Gel Extraction* de Qiagen. A lo largo de todo el protocolo se siguieron las sugerencias del fabricante.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Con el fin de separar fragmentos de DNA, se prepararon geles de agarosa al 1% en amortiguador TE (acetato de sodio 5 mM, EDTA 1 mM, Tris-base 40 mM, y ácido acético 32 mM). Los geles se corrieron aproximadamente entre 80 y 100 V durante 1 hora, se incubaron durante 10 minutos en una solución de bromuro de etidio y se visualizaron utilizando una lámpara de luz ultravioleta.

Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes SDS-PAGE

La separación de proteínas se realizó utilizando geles de poliacrilamida, siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Se utilizaron geles con diferentes concentraciones de acrilamida de acuerdo al peso de la proteína de interés: 8.5, 12.5, 15 o 17.5%. Los geles se corrieron a aproximadamente 100 V durante 1.5 horas. Posteriormente, se tiñeron con una solución de Coomassie R250 al 2%, en 50% de metanol y 10% de ácido acético. Se utilizaron marcadores de peso molecular de *New England Biolabs*.

Cuantificación de Proteína

Para determinar la concentración, de cada una de las proteínas analizadas en este trabajo, se utilizó el método TCA-Lowry (Peterson, 1977). La fracción de proteína a cuantificar se disolvió en 1 ml de agua, se agregaron 100 µl de deoxicolato de sodio al 0.15% y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se añadieron 100 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 72% y se mezcló enérgicamente. Se centrifugó a 8,500 xg durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de una

solución de CuSO_4 0.04 mM, citrato de sodio 0.07 mM, Na_2CO_3 190 mM, y NaOH 100 mM. Posteriormente se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y transcurrido el tiempo se agregaron 100 μl de una solución de Folín (Sigma) 1:1. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 750 nm; para la curva estándar se utilizó albúmina sérica bovina (Sigma) a distintas concentraciones.

Precipitación de proteínas por el método metanol-cloroformo (Wessel *et al.*, 1984).

Este protocolo se llevó a cabo con la finalidad de eliminar sales, concentrar a las proteínas y posteriormente poder resolverlas en geles desnaturalizantes.

La muestra a precipitar se llevó a un volumen de 100 μl , se añadieron 400 μl de metanol y se mezclaron en el vórtex. Luego, se agregaron 100 μl de cloroformo y 300 μl de agua, nuevamente se agitaron en el vórtex y se centrifugó a 16,000 xg durante 6 minutos a temperatura ambiente, se desechó cuidadosamente la fase superior y se añadieron 300 μl de metanol. La mezcla se agitó en el vórtex y se centrifugó a 16,000 xg por 6 minutos; se decantó el sobrenadante y los restos de metanol se evaporaron a 60° C por 5 minutos. Finalmente, se agregó amortiguador de carga (glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.02% y Tris-base 62.5 mM pH 6.8) y las muestras se hirvieron durante 10 minutos.

Ensayos de Inmuno réplica tipo Western

Para poder realizar estos ensayos se requirió previamente haber hecho una electroforesis de proteína. Cuando se tuvo el gel resuelto, éste se transfirió a una membrana de nitrocelulosa con un poro de 0.22 μm . Este proceso se llevó a cabo utilizando una cámara de transferencia húmeda y con un amortiguador que contenía NaHCO_3 10 mM, Na_2CO_3 3 mM y metanol 20%. La transferencia se llevó a cabo a 350 mA durante 1 hora.

Luego de terminar la transferencia se incubó la membrana con amortiguador TTBS (Tris-base 2.4 mM, NaCl 0.5 M, Tween-20 0.05% pH 7.6) adicionado con 5% de leche libre de grasa (*svlty light* ®) durante 1 hora con agitación constante. Transcurrido el tiempo se lavó la membrana con 50 ml amortiguador TTBS durante 15, 10 y 5 minutos. Posteriormente

se incubó la membrana con el anticuerpo de interés en un volumen de 15 ml a la concentración necesaria (en caso de ser requerido se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa, marca *Armesham*). Finalmente se lavó la membrana con 50 ml de amortiguador TTBS durante los mismos tiempos y se reveló la membrana utilizando un kit quimioluminiscente (*Thermo Scientific Pierce ECL*). La reacción fue grabada utilizando placas radiográficas (*Kodak*).

Dicroísmo Circular

Para comprobar la integridad estructural de la proteína GST-CheY2, se utilizó un sistema de dicroísmo circular AVIV modelo 202-01. Se hicieron barridos de 260 a 190 nm/seg, los datos se colectaron en miligrados a 25°C y el ensayo se repitió 5 veces.

Síntesis de acetil fosfato (Ac³²P) (Stadtman, 1957)

Para los ensayos de fosforilación de los reguladores de respuesta se utilizó acetil fosfato radiactivo, mismo que se sintetizó siguiendo el siguiente protocolo.

Se mezcló acetato, ácido fosfórico, piridina y anhídrido acético, se incubó la solución durante 30 minutos con agitación constante. Luego, se agregó hidróxido de litio y se incubó nuevamente en hielo con agitación constante durante 15 minutos. Posteriormente se agregaron 900 µl de etanol frío, se mezcló la solución en un vórtex y se incubó durante una hora en hielo. Después de ese tiempo se centrifugó 10 minutos a 14,500 xg y se desechó el sobrenadante. Nuevamente, se agregaron 900 µl de etanol frío a la pastilla y se mezcló con el vórtex; se centrifugó bajo las mismas condiciones y se desechó el sobrenadante. El exceso de etanol se volatilizó utilizando una centrifuga de evaporación (HETO) durante 5 minutos al vacío. La pastilla se resuspendió en 400 µl de H₂O libre de proteasas (promega), se volvió a centrifugar y se tomó el sobrenadante. El acetil fosfato se congeló a -70°C.

Lavado de cuerpos de inclusión (Burgess, 2009)

Los cuerpos de inclusión se resuspendieron en 30 ml de PBS adicionado con Tritón 5%, luego se centrifugó durante 10 minutos a 14,500 xg a 4°C; el sobrenadante se decantó y se prosiguió con la pastilla. Se resuspendió en 30 ml de agua fría y filtrada y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Posteriormente, el precipitado se resuspendió en 20 ml de PBS con Tritón al 5%, nuevamente se centrifugó como en los anteriores pasos. De nuevo, se lavó el precipitado con los siguientes volúmenes de agua: 25 ml, 20 ml y 20 ml; entre cada lavado se centrifugó siguiendo las mismas condiciones.

Inducción y purificación de proteínas

- **CheA1**

La proteína se sobreexpresó en la cepa M15 [pREP4].

Se inocularon 500 ml de medio de cultivo LB adicionado con ampicilina [200 µg/ml] y con kanamicina [25 µg/ml], con 1/50 de volumen de un cultivo que se encontraba en fase estacionaria.

El cultivo se creció a 37°C con agitación constante (250-300 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.₆₀₀)= 0.7-0.8. A esta densidad se agregó el inductor IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1 mM. Luego se incubó el cultivo a 25°C durante 5 horas con agitación constante. Transcurridas las 5 horas, se centrifugó el cultivo durante 20 minutos a 3500 xg a 4°C. La pastilla se congeló a -20°C.

Posteriormente, se descongeló y se resuspendió en 20 ml de buffer de lisis (Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8) al que se le añadió 10% de glicerol y una tableta de inhibidores de proteasas (ROCHE). Después se agregaron 10 mg de lisozima y se incubó durante 30 minutos en hielo. Transcurrida la media hora, las células se sonicaron en un aparato Branson 250 con una intensidad de 50% y con una potencia de 4 a 5 por un minuto; se repitió el proceso durante 3 veces más incubando a las células en hielo todo momento.

El extracto celular se centrifugó a 30, 000 xg, durante 30 minutos a 4°C posteriormente se colectó el sobrenadante y se incubó con 800 µl de resina de agarosa

acoplada a Ni²⁺, NiNTA (Qiagen) durante 3 horas a 4°C con agitación constante. A continuación, la resina se lavó con 10 ml de amortiguador de lisis adicionado con glicerol 10% y posteriormente con 50 ml de amortiguador de lisis e imidazol en concentraciones diferentes (20, 40, 60, 80 y 100 mM).

La proteína His-CheA1 se eluyó con el mismo amortiguador que contenía glicerol al 10% e imidazol 400 mM. A la postre, se dializó en el siguiente amortiguador: HEPES 33 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 0.1 mM, EDTA 0.1 mM y glicerol 10% pH 8 utilizando una membrana de diálisis que impide el paso de moléculas mayores a 14 000 Da. Luego de obtener el dializado, se utilizó un sistema de concentración *Millipore* (Amicon Ultra), que impide la salida de moléculas de un peso molecular mayor a 30,000 daltones (*Molecular Weight Cutt Off*). En el volumen obtenido se cuantificó la proteína mediante un análisis TCA-Lowry.

- **CheY1**

Esta proteína se obtuvo a partir de su sobreexpresión en la cepa M15 [pREP4]

Se inocularon 500 ml de medio de cultivo LB adicionado con ampicilina [200 µg/ml] y con kanamicina [25 µg/ml], con 1/100 de volumen de un cultivo que se encontraba en fase estacionaria.

El cultivo se creció a 37°C con agitación constante (250-300 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica (D.O₆₀₀)= 0.5-0.6; en este momento se agregó el inductor IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 0.1 mM, después se incubó el cultivo a 37°C durante 4 horas con agitación constante. Luego, el cultivo se centrifugó durante 20 minutos a 3,500 xg a 4°C. La pastilla se congeló a -20°C hasta su posterior uso.

La pastilla celular se resuspendió en amortiguador TMNDG (Tris-HCl 50 mM pH 8, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM y glicerol 10%) con 20 mM de imidazol además, se añadió a una pastilla de inhibidores de proteasas (Roche) y el extracto se mantuvo en hielo. A continuación se sonicó utilizando un sonicador Branson 250 con una intensidad de 50% y con una potencia de 4 a 5 durante un minuto; el proceso se realizó seis veces.

El extracto celular se centrifugó a 30,000 xg, durante 30 minutos a 4°C posteriormente se colectó el sobrenadante y se incubó con 500 µl de resina de agarosa acoplada a Ni²⁺, NiNTA (Qiagen) durante toda la noche a 4°C con agitación constante.

La resina fue lavada con 20mM de imidazol y 0.1% de tritón, y después, con 40 mM de imidazol. La proteína CheY1 se eluyó con 200 mM de imidazol. Posteriormente se dializó a la proteína en amortiguador (HEPES 33 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, DTT 0.1 mM, EDTA 0.1 mM y glicerol 10%) y se concentró utilizando un sistema *Millipore* (Amicon ultra 30,000 MWCO).

- **CheY2**

Esta proteína se purificó en condiciones desnaturalizantes a partir de la cepa M15 [pREP4] que además contenía un vector inducible pQE30.

Para la inducción se creció un cultivo de 100 ml de LB (previamente inoculado con 1/100 de un cultivo que se encontraba en fase estacionaria) a 37°C con agitación constante y cuando éste alcanzó una densidad óptica (D.O₆₀₀)= 0.6 se agregó el inductor IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 0.1 mM. Posteriormente las células se cosecharon centrifugando el cultivo a 3,500 xg; el botón celular se congeló a -20°C hasta su uso.

Para purificar a la proteína se resuspendió el botón en amortiguador (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8, 1 mM DTT, pH 7.5) y posteriormente se sonicó (con un sonicador Branson) 4 veces por 1 minuto cada uno con una potencia de 5 y una intensidad de 50%. Inmediatamente después se centrifugó el extracto celular a 30, 000 xg, 30 minutos a 4°C. El sobrenadante fue desechado y la pastilla resultante se trató con el protocolo de lavado de cuerpos de inclusión descrito arriba.

Después de lavar los cuerpos de inclusión se resuspendió la pastilla en amortiguador PBS pH 7.3 y urea 8 M para desnaturalizar a la proteína. Se incubó durante toda la noche a 4°C con el propósito de resuspender los agregados de proteína. Posteriormente se incubaron 2.5 ml (previamente diluidos 1:2 en amortiguador con urea 8 M) con 700 µl de resina de agarosa acoplada a Ni²⁺ (marca Qiagen) a 4°C toda la noche. Al día siguiente se purificó la

proteína; el volumen se pasó por una columna y la resina se lavó con 10 ml de amortiguador PBS pH 7.3 y urea 8 M y posteriormente se adicionaron dos lavados con el mismo amortiguador adicionando 10 mM y 20 mM de imidazol.

Finalmente la proteína se eluyó con 3.5 ml del mismo amortiguador que contenía 250 mM de imidazol. La renaturalización se realizó por medio de una diálisis en un amortiguador que contenía: Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, glicerol 10%, L-arginina 0.5 M pH 8. Una vez renaturalizada se sometió a una segunda diálisis en el mismo amortiguador pero esta vez sin L-arginina. Luego se concentró utilizando un sistema *Millipore* (Amicon ultra 30,000 MWCO) para luego ser cuantificada por el método de TCA-Lowry.

- **CheY5**

Para la sobreexpresión de esta proteína se utilizó la cepa de *E. coli* JM109. Se inocularon 2 cultivos de 500 ml de medio 2YT (adicionado con ampicilina [200 µg/ml]) con 25 ml de un cultivo previamente crecido a 30°C durante toda una noche. Los cultivos se crecieron a 30°C ($D.O_{600}$)= 0.8. Una vez alcanzado este punto, se agregó 1 mM de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) y se volvió a incubar el cultivo a 30°C durante 4 horas más. Posteriormente se cosecharon las células centrifugando el cultivo a 3,500 xg y se congeló la pastilla a -20°C hasta su uso.

Para la purificación, se resuspendió la pastilla en 25 ml de amortiguador TMNDG (Tris-HCl 50 mM pH 8, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM y glicerol 10%) adicionado con 1 tableta de inhibidores de proteasas (Roche) y 20 mM de imidazol. Después se sonicó (en un sonicador Branson) 4 veces por 1 minuto cada uno con una potencia de 5 y una intensidad de 50%, luego se centrifugó 30 minutos a 30,000 xg. Se recuperó el sobrenadante y se incubó con 0.5 ml de resina acoplada a Ni²⁺, Ni-NTA (Qiagen) 1 hora a 4°C con agitación constante. Posteriormente se lavó la resina con 25 ml de amortiguador TMNDG con 0.1% de Tritón X-100 y 20 mM de imidazol, se realizaron dos lavados más con 10 ml del mismo amortiguador adicionado con 30 mM y 40 mM de imidazol.

La proteína se eluyó con 10 ml de amortiguador TMNDG con 100 mM de imidazol. Finalmente la proteína se dializó en el mismo amortiguador que las proteínas CheA1, CheY1, CheY2 y MBP-CheY2 (HEPES 33 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, DTT 0.1 mM, EDTA 0.1 mM y glicerol 10%) y se concentró utilizando un sistema *Millipore* (Amicon ultra 30,000 MWCO) para posteriormente ser cuantificada.

- **GST-CheY1**

Se inoculó un medio de 500 ml de medio 2YT adicionado con ampicilina [200 µg/ml] con 1/50 de un cultivo en fase estacionaria, El cultivo se creció a 30°C en agitación constante (250 rpm) hasta llegar a una densidad óptica (D.O.₆₀₀)= 0.6. Posteriormente se añadió inductor IPTG a una concentración final de 0.1 mM y el cultivo se creció a 25°C durante 2 horas y se centrifugó durante 20 minutos a 3500 xg a 4°C. La pastilla se congeló a -20°C.

Cada botón celular se resuspendió en 20 ml de amortiguador TMNDG (Tris-HCl 50 mM pH 8, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM y glicerol 10%) que contenía una pastilla de inhibidores de proteasas, posteriormente se sonicó 3 veces durante 20 segundos cada vez (a una intensidad de 100%). El extracto celular se centrifugó a 4°C durante 30 minutos a 30,000 xg y la fracción soluble se incubó con 0.8 ml de resina glutatión agarosa durante 30 minutos a 4°C con agitación constante. Después se lavó la resina 3 veces con 10 ml de amortiguador TMNDG cada vez. La proteína se eluyó con 10 ml de amortiguador TMNDG que además contenía 5 mM de glutatión reducido (GSH). Después de obtener a la proteína, ésta se dializó en amortiguador TMNDG del mismo modo que GST-CheY5.

- **GST-cheY5**

Se inoculó un cultivo de 500 ml de LB adicionado con ampicilina [200 µg/ml] con 1/50 de un cultivo en fase estacionaria. El cultivo se creció a 30°C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.₆₀₀)= 0.75-0.8. Al llegar a este punto, se agregó el inductor IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 0.1 mM. Después se incubó el cultivo a 25°C durante 2 horas con agitación constante. A continuación, el cultivo se centrifugó durante 20 minutos a 3500 xg a 4°C. La pastilla se congeló a -20°C.

El paquete celular se resuspendió en amortiguador PBS (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM) pH 7.3 complementado con una tableta de inhibidores de proteasas (Roche). El extracto se sonicó en utilizando un sonicador Branson 250 con una intensidad de 50% y con una potencia de 4 a 5 por un minuto en cuatro ocasiones. Se centrifugó a 30,000 xg, durante 30 minutos a 4°C, se colectó el sobrenadante y se incubó con 1.5 ml de resina de glutatión durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La resina se lavó con amortiguador PBS pH 7.4, luego se lavó nuevamente con PBS pH 7.4 más 0.5 mM de glutatión reducido y finalmente se eluyó a la fusión GST-CheY5 con Tris-base 50 mM pH 8 adicionado con 5 mM de glutatión reducido. Posteriormente, se dializó a la proteína purificada en amortiguador TMNDG (Tris 50 mM pH8, MgCl₂ 5 mM, NaCl 450 mM, DTT 1 mM y glicerol 10%) y se utilizó un sistema de concentración *Millipore* (Amicon Ultra, 10,000 *Molecular Weight Cut Off*).

Purificación GST-CheY2 en condiciones nativas

Se inoculó un cultivo de 2 litros de medio LB que contenía ampicilina [200 µg/ml] con 1/100 de un cultivo crecido previamente durante toda la noche. Se crecieron las células hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.₆₀₀)= 0.6-0.7 y posteriormente se indujo el cultivo con 1 mM de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a 25°C durante 1 hora con agitación constante. Posteriormente se cosecharon las células y se centrifugaron a 30,000 xg durante 20 minutos

Para la purificación de GST-cheY2 se incubó la fusión durante una hora a 4°C con 2 ml de una resina de glutatión (*Glutathione sepharose*); posteriormente la resina se lavó con 50 ml de amortiguador PBS (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM) pH 7.3. Finalmente la proteína se eluyó con un amortiguador que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8 y glutatión reducido 10 mM.

Purificación GST-CheY2 en condiciones desnaturalizantes

Se indujo un cultivo de 100 ml de LB adicionado con ampicilina [200 µg/ml] con 1/100 de un cultivo crecido previamente durante toda la noche. Las células se crecieron a 37°C con agitación constante (250 rpm) hasta una densidad óptica ($D.O_{600}$)=0.64. Al alcanzar esta densidad se agregó el inductor IPTG a una concentración final de 0.1 mM y nuevamente se incubó el cultivo a 37°C durante 4 horas. Las células se cosecharon centrifugando a 3,500 xg a 4°C para después congelar el paquete celular a -20°C para su posterior uso.

Para la purificación, se resuspendió la pastilla en 10 ml de amortiguador PBS (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM) pH 7.3 para después romper a las células por sonicación. Se sonicó 7 veces por 45 segundos cada vez, a una intensidad de 50%, luego se centrifugó el extracto celular a 30,000 xg por 10 minutos a 4°C. Se desechó la fracción soluble y se guardó la fracción insoluble a -70°C hasta su uso.

La pastilla se trató con el protocolo de lavado de cuerpos de inclusión antes mencionado. Una vez aplicado el tratamiento, la pastilla resultante se resuspendió en un amortiguador desnaturalizante (PBS pH 7.3, urea 8 M) y se incubó durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se ultracentrifugó durante 1 hora a 160,000 xg y la fracción soluble se diluyó 1:5 con amortiguador desnaturalizante. A continuación, se prosiguió a renaturalizar la proteína mediante una diálisis en el siguiente amortiguador: PBS pH 7.3, Tritón X-100 0.1% v/v, β-mercapto etanol 8 mM, glicerol 20%.

Al obtener a la proteína renaturalizada, ésta se incubó con 1 ml de resina glutatión sefarosa durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó la resina 3 veces con 10 ml de amortiguador PBS pH 7.3 y se eluyó a la proteína en el mismo amortiguador complementado con Tris-HCl 50 mM pH 8 y 10 mM de glutatión reducido. Luego de purificar a la proteína, ésta se dializó en amortiguador PBS pH 7.3 para su posterior digestión.

Digestión de GST-cheY2 utilizando la enzima trombina.

Se ha descrito que la proteína GST puede ser removida después de la purificación de una fusión mediante una escisión con proteasas específicas de un sitio. Este enfoque ha sido

muy útil para algunas proteínas de fusión que contienen el sitio de reconocimiento del factor X_a, o de colagenasa también conocido como trombina. No obstante, algunas veces ha sido ineficaz tal vez debido a la insolubilidad de las proteínas de fusión o la presencia de reactivos desnaturizantes. (Smith *et al.*, 1988).

Con el objetivo de separar la fusión GST-CheY2 y obtener así sólo al regulador de respuesta CheY2 seguimos un protocolo para la separación de la fusión utilizando al factor X_a. Esta enzima reconoce la secuencia específica Leu Val Pro Arg Gly Ser.

Sobreexpresión y purificación de la fusión MBP-CheY2

Para la sobreexpresión de esta fusión se utilizó a la cepa de *E. coli* JM109. Una vez inoculado un cultivo se siguió una curva en el tiempo tomando alícuotas de células.

Se puso un cultivo de 100 ml de LB adicionado con ampicilina [200 µg/ml] inoculado con 1/100 de un cultivo en fase estacionaria. Cuando alcanzó una (D.O.₆₀₀)=0.6 se agregó el inductor IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 0.1 mM. El cultivo se creció a 37°C durante 3.5 horas. Posteriormente se cosecharon las células y se congelaron a -20°C hasta su uso.

Para la purificación, la pastilla celular (proveniente de una inducción de 100 ml) se resuspendió en 10 ml de buffer TNE (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM) adicionado con una pastilla con inhibidores de proteasas (Roche). Luego se sonicó durante 15 segundos por 6 veces y posteriormente se centrifugó 10 minutos a 30,000 xg. El sobrenadante se incubó durante 2 horas con 200 µl de resina de amilosa a 4°C con agitación constante.

Posteriormente la resina se lavó con 10 ml de buffer TNE dos veces y la proteína se eluyó con 5 ml del buffer TNE adicionado con 10 mM de maltosa. Se tomaron alícuotas de la purificación y se analizaron en un gel SDS-PAGE 17.5%.

Fosforilación de los reguladores de respuesta CheY1, CheY2, CheY5 y las fusiones GST-cheY1, GST-cheY2 y GST-cheY5 con Ac³²P (Ferré *et al.*, 2004)

Una vez purificadas las proteínas se hicieron fosforilaciones de cada regulador de respuesta (CheY1, CheY2 y CheY5) y de cada fusión (GST-CheY1, GST-CheY2 y GST-CheY5) utilizando acetil fosfato radioactivo (Ac³²P) como donador de fosfatos, para intentar determinar el comportamiento de fosforilación mediante el cálculo de las vidas medias.

Para estos ensayos se utilizó cada proteína a una concentración de 10mM, se incubó con acetil fosfato radioactivo durante una hora y posteriormente se agregó AcP no marcado radiactivamente para observar el fenómeno de desfosforilación en el tiempo. Una vez agregado el acetil fosfato no marcado se tomaron alícuotas de 10 µl cada 5 segundos durante 1 minuto y se resuspendieron en buffer de carga. Las muestras fueron analizadas en geles 17.5% de acrilamida que posteriormente se tiñeron durante 15 minutos con una solución de azul de Coomassie R-250 y se destiñeron utilizando una solución de ácido acético 25% v/v y metanol 50% v/v. Luego de obtener los geles desteñidos, se procedió a secarlos y exponerlos toda la noche en placas de fosfoimagen que posteriormente fueron reveladas utilizando un equipo Thyphoon.

Ensayos de Autofosforilación *in vitro* de CheA1 con [γ -³²P]-ATP (Alvarez *et al.*, 2010)

Los ensayos se realizaron utilizando [γ -³²P]-ATP. Después de obtener a la proteína purificada, dializada y concentrada se incubó a la proteína a una concentración de 3 µM con [γ -³²P]-ATP. Una vez adicionada la marca, se tomaron alícuotas de 10 µl a distintos tiempos durante 15 minutos. Las muestras fueron analizadas en geles de acrilamida 17.5% corridos a 100V durante 1.5 horas. Posteriormente se tiñeron durante 15 minutos utilizando una solución de azul de Coomassie R-250 y se destiñeron utilizando una solución de metanol/ácido acético. Luego de desteñir los geles, se procedió a secarlos y exponerlos toda la noche en placas de fosfoimagen que posteriormente fueron reveladas utilizando un equipo Thyphoon.

Ensayos de Desfosforilación *in vitro* de CheA1 con [γ - 32 P]-ATP

Para estos ensayos se incubó la histidín cinasa a una concentración de 3 μ M con [γ - 32 P]-ATP durante una hora, transcurrido el tiempo se pasó por una columna de Penefsky* con el objetivo de eliminar el fosfato no incorporado a la proteína. Inmediatamente después se tomaron alícuotas a distintos tiempos durante 30 minutos. Las muestras fueron procesadas de la misma manera que en los ensayos anteriores.

Ensayos de fosfotransferencia *in vitro* de CheA1-CheY1, CheA1-CheY2 y CheA1-CheY5 con [γ - 32 P]-ATP

Los ensayos se realizaron utilizando [γ - 32 P]-ATP. Cada uno de los ensayos se llevó a cabo utilizando una relación 1:2 de proteína, es decir, 1 de CheA1 y 2 de CheY (1, 2 o 5).

Una vez purificada y dializada la proteína CheA1, se incubó con [γ - 32 P]-ATP durante una hora. Luego se pasó por una columna de Penefsky* para eliminar la marca no incorporada a la proteína. Posteriormente se agregó el regulador de respuesta CheY, y a partir de ese momento se tomaron alícuotas de 10 μ l cada 5 segundos durante 5 minutos. Estas muestras se resuspendieron en 5 μ l de buffer de carga y se resolvieron en un gel de acrilamida 17.5%. Los gels fueron procesados de la misma manera que los ensayos de fosforilación.

*Columna de Penefsky: se hace utilizando una jeringa de insulina, se le quita el émbolo y se introduce una esfera hecha con lana de vidrio de aproximadamente 1cm de diámetro, esta esfera funciona como filtro. Una vez anclada la pequeña esfera en el fondo de la jeringa ésta se rellena con 1ml de resina sephadex G50 previamente equilibrada en el amortiguador de CheA1; se centrifuga para eliminar los restos de buffer y queda lista para utilizarse.

Ensayos de Competencia *in vitro* de CheA1/CheY1/MBP-CheY2 y CheA1/CheY5/MBP-CheY2 utilizando [γ - 32 P]-ATP.

Para la realización de estos ensayos también se utilizó [γ - 32 P]-ATP como donador de fosfatos. Una vez pre incubada la histidín cinasa CheA1 con la marca durante una hora, la

muestra se pasó por una columna de Penefsky y posteriormente se agregó una combinación de dos reguladores de respuesta (MBP-CheY2/CheY1 o MBP-CheY2/CheY5) según fuera el caso. Una vez agregados los reguladores de respuesta se procedió a tomar alícuotas de 10 μ l de muestra y se resuspendieron en 5 μ l de buffer de carga. Las muestras se resolvieron en geles 17.5% de acrilamida y se procesaron de la misma manera que en los ensayos anteriores. Luego, se expusieron en placas de fosfoimagen y se revelaron en un equipo Thyphoon.

Análisis densitométricos y estadísticos

Una vez realizados los ensayos de fosforilación, fosfotransferencia y competencias se procedió a analizar mediante el programa *imageJ*, cada una de las placas de fosfoimagen obtenidas durante estos ensayos para así determinar las densitometrías de estas placas. Luego de obtener los datos de las densitometrías, se calcularon los porcentajes de saturación de las marcas obtenidas tomando siempre como el 100% a CheA1; para ello se utilizó el programa *Excel (versión 2013)*. Posteriormente se introdujeron los datos porcentuales en el programa *GraphPad Prism (versión 4)* para poder obtener los datos estadísticos finales, así como las gráficas presentadas en este trabajo.

RESULTADOS

Purificación de las proteínas recombinantes CheA1, CheY1 y CheY5.

En organismos vivos, los sistemas de dos componentes son los encargados de desencadenar una vía de señalización en respuesta a un estímulo. Están formados por una proteína cinasa con capacidad de autofosforilarse que en su estado fosforilado es capaz de donar un grupo fosforilo a un regulador de respuesta. Resultados previos (Martinez-del Campo *et al.*, 2011) sugieren que el *cheOp1* es el encargado de controlar la regulación del sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides*. Este operón es un operón quimiotáctico en el cual se encuentran los genes que codifican para las proteínas CheY5, McpB, Tlps, McpA, CheD, CheY1, CheA1, CheW1, CheR1, CheY2 y un marco de lectura abierta RSP2431. Sin embargo, este trabajo sólo se enfoca en el estudio de la histidín cinasa CheA1 y los reguladores de respuesta CheY1, CheY2 y CheY5.

Con el fin de sustentar aún más estos resultados se decidió analizar la función de la histidín cinasa CheA1 y cada uno de los reguladores de respuesta CheY1, CheY2 y CheY5 a través de un enfoque bioquímico.

Purificación de la histidín cinasa CheA1

Se comenzó con la proteína CheA1, para ello se purificó siguiendo el protocolo previamente descrito en los materiales y métodos con el cual la proteína se obtiene en condiciones nativas. Esta proteína se encuentra clonada en el vector de sobreexpresión pQE30 en la cepa M15 [pREP4] y es inducida con 1mM de IPTG a 25°C. **(Figura 13).**

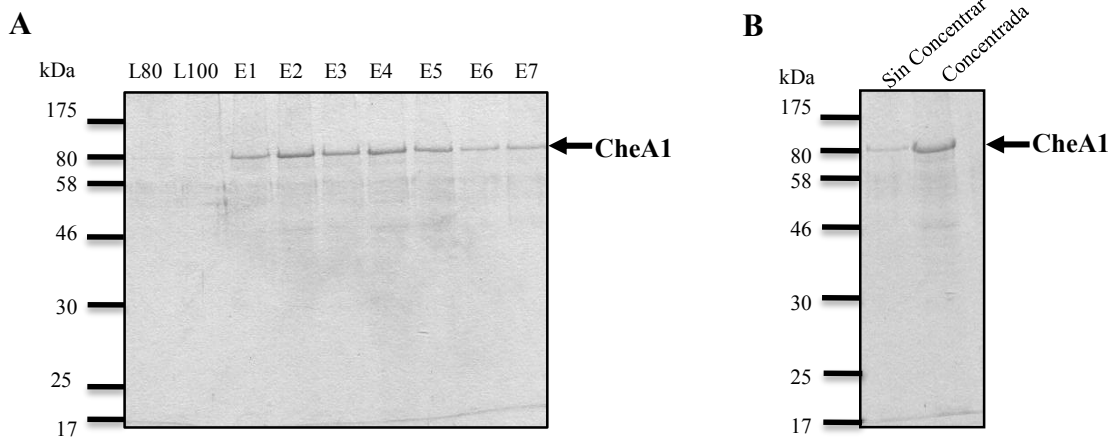


Figura 13. Purificación de la histidín cinasa CheA1. **A)** Gel SDS-PAGE 12.5% teñido con azul de Coomassie, se muestran los lavados con 80 mM y 100 mM de imidazol así como las eluciones obtenidas de la purificación de CheA1. **B)** Gel SDS-PAGE 12.5% teñido con azul de coomassie se observa en el carril izquierdo a la proteína sin concentrar y en el carril derecho a la proteína concentrada con 0.01% de tritón X-100.

En el gel puede observarse que la proteína eluye en un peso de aproximadamente 80 kilodaltones, aunque su peso real es de (76 133 Da). También se puede ver que no se encuentra del todo limpia, además de que se purifica muy poca debido a que el pegado a la resina es muy ineficiente a pesar de que la proteína se induce bien. Para poder concentrarla (**Figura 13, panel B**) fue necesario incubarla previamente a la proteína con 0.1% v/v de Tritón X-100 a 4°C. El tritón es un tensoactivo no iónico que ayuda a solubilizar a las proteínas, en el caso de esta proteína, cuando no se añade el tritón la proteína se agrega durante el proceso de concentración.

Para tener la certeza de que nuestra proteína era la que eluía en el peso aproximado de 80 kDa se decidió hacer un ensayo de inmuno réplica tipo Western blot. Para este ensayo se corrió un gel 12.5% de acrilamida, posteriormente se transfirió a una membrana de nitrocelulosa; ésta se incubó con el anticuerpo α -His a una dilución de 1:10,000 y se reveló mediante una reacción de quimioluminiscencia (**Figura 14**). En el radiograma puede observarse la banda correspondiente a la proteína CheA1; sin embargo, también se observan otras bandas las cuales pueden ser producto de degradación, una versión corta de CheA1 o bien, proteínas contaminantes que co-eluyen durante la purificación.

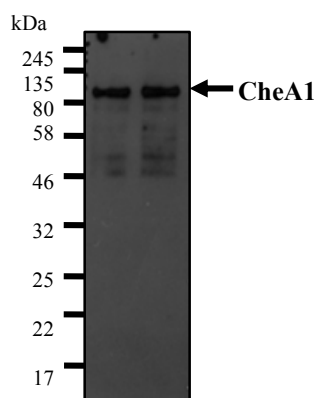


Figura 14. Inmunoréplica tipo Western blot. Anticuerpo α -His dilución 1:10,000. Gel SDS-PAGE 12.5%. En el radiograma se muestran fracciones de la proteína CheA1 concentrada de dos purificaciones independientes.

Fosforilación *in vitro* de CheA1 con adenosín trifosfato [γ - 32 P]-ATP

Después de haber obtenido a la proteína pura y dializada en amortiguador (HEPES 33 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 0.1 mM, EDTA 0.1 mM y glicerol 10%) y concentrada se prosiguió a realizar curvas de fosforilación y desfosforilación *in vitro* utilizando [γ - 32 P]-ATP. Para ello se utilizó a la proteína a una concentración de 3 μ M.

Para los ensayos de fosforilación se incubó a la proteína con [γ - 32 P]-ATP. Una vez adicionada y mezclada la marca, se tomaron alícuotas de 10 μ l a diferentes tiempos y se resuspendieron en 5 μ l de amortiguador de carga para detener la reacción de fosforilación. Posteriormente las muestras se resolvieron en un gel SDS-PAGE 17.5%, éste se tiñó durante 15 minutos en una solución de azul de Coomassie y se destiñó durante 15 minutos en una solución de ácido acético 25% v/v y metanol 50% v/v. Posteriormente el gel se secó y se expuso durante toda la noche en una placa de fosfoimagen que después fue revelada mediante un escáner láser sensible a marcadores radioisotópicos (**Figura 15**).

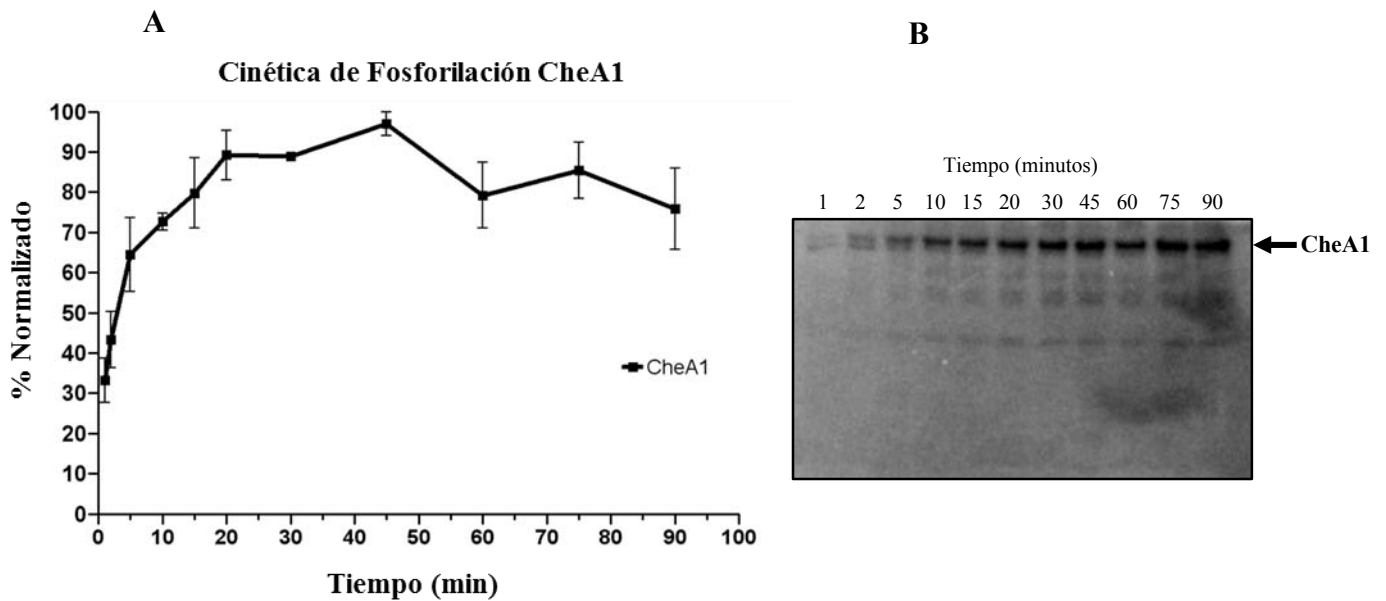


Figura 15. Cinética de Fosforilación *in vitro* de CheA1 con $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. **A)** Cinética obtenida al graficar todos los ensayos realizados. **B)** Placa de fosfoimagen obtenida a partir de la exposición de un gel SDS-PAGE 17.5% con muestras marcadas radiactivamente.

En la gráfica obtenida (**Figura 15, panel A**), a partir del análisis densitométrico de las placas de fosfoimagen (**Figura 15, panel B**), se puede observar que la proteína comienza a fosforilarse desde el minuto 1 donde alcanza hasta un 30% de fosforilación, a los 20 minutos se alcanza hasta un 80%, mientras que su máximo punto se encuentra alrededor de los 45 minutos con un 95% de fosforilación aproximadamente. A partir de ese tiempo, se observa un decaimiento, sin embargo éste no parece ser muy drástico.

Desfosforilación *in vitro* de CheA1 con adenosin trifosfato $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$

Tras realizar los ensayos de fosforilación se prosiguió con los ensayos de desfosforilación *in vitro* (**Figura 16**). Para estos ensayos se incubó a la proteína, previamente dializada y concentrada, con $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ durante una hora. La proteína se utilizó a una concentración de 3 μM . Al término de la hora, ésta se pasó por una columna de Penefsky (ver materiales y métodos) para eliminar el fosfato no incorporado a la proteína y se tomaron alícuotas de 10 μl a diferentes tiempos que luego se resuspendieron en amortiguador de carga para detener la reacción. Estas muestras se resolvieron en un gel desnaturante de

poliacrilamida que posteriormente siguió el mismo tratamiento que los ensayos de fosforilación.

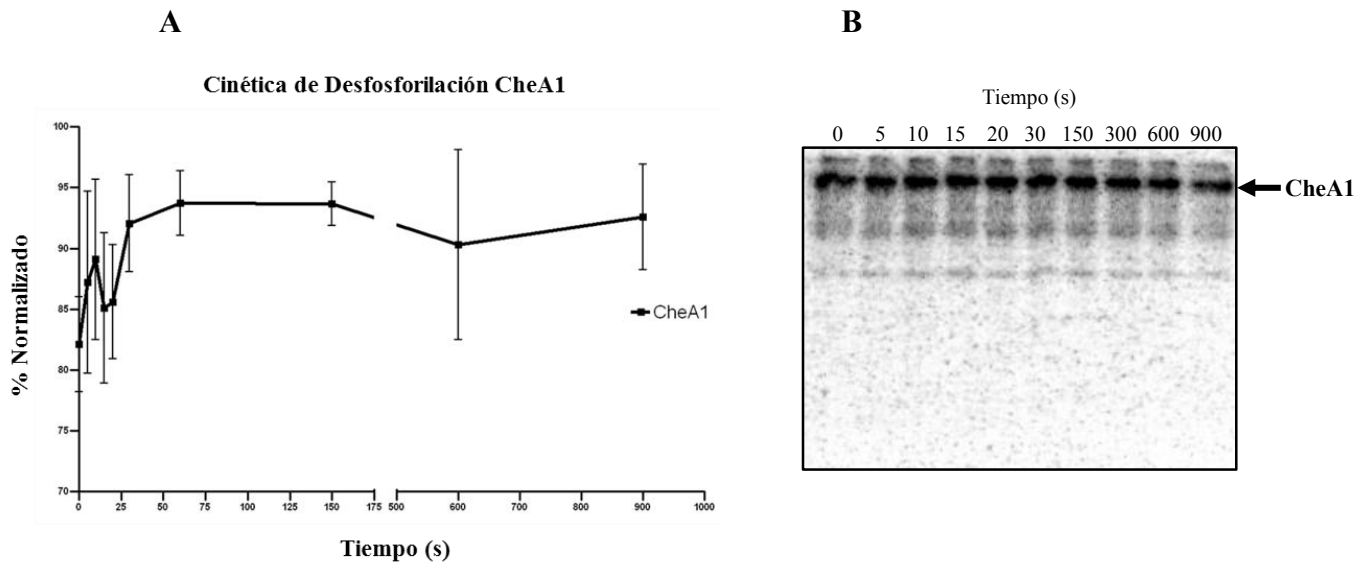


Figura 16. Cinética de Desfosforilación *in vitro* de CheA1 con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. **A)** Cinética obtenida al graficar todos los ensayos realizados. **B)** Placa de fosfoimagen obtenida a partir de la exposición de un gel SDS-PAGE 17.5% con muestras marcadas radiactivamente.

En la gráfica y en la placa puede observarse que luego de eliminar el fosfato no incorporado a la proteína mediante la columna de Penefsky, la proteína se mantiene fosforilada incluso hasta por 15 minutos más (900 segundos). La proteína fosforilada es muy estable.

Purificación de proteínas recombinantes CheY1 y CheY5

Posteriormente se prosiguió con la purificación de los reguladores de respuesta CheY1 y CheY5. El gen que codifica para la proteína CheY1 se encuentra clonado en la cepa M15 [pREP4] pQE30, mientras que la proteína CheY5 se sobreexpresa a partir de la cepa JM109 pQE30. Estas dos proteínas se purificaron de manera similar, las pastillas celulares

se resuspenden en el buffer TMNDG (descrito en materiales y métodos) con 20 mM de imidazol y una pastilla de inhibidores de proteasas, se sonica y se centrifuga como se describió en la sección de materiales y métodos. El sobrenadante se incuba con 1 ml de resina de agarosa acoplada a Ni²⁺; ambas se obtienen solubles. En la **Figura 17** se pueden observar fracciones de cada una de las purificaciones.

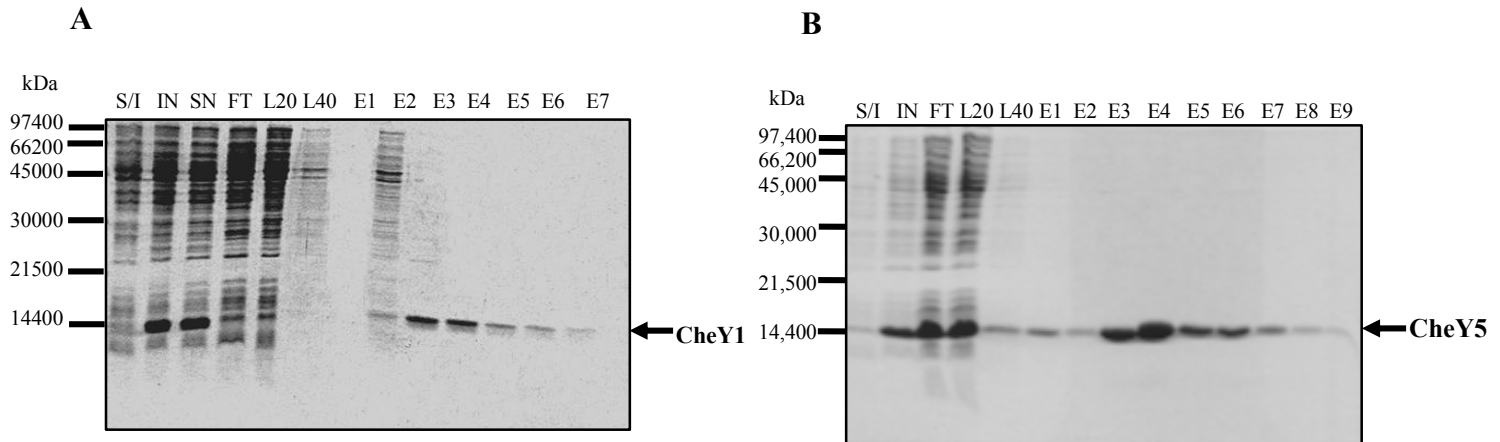


Figura 17. A) Purificación de CheY1. **B)** Purificación de CheY5. Geles SDS-PAGE 17.5%. En ambos geles se muestra una fracción antes de la inducción de la proteína (S/I), una muestra de la proteína inducida (IN), la fracción soluble incubada con la resina (SN), las proteínas que no se pegaron a la resina (FT), los lavados a la resina con 20mM (L20) y 40Mm (L40) de imidazol. Así como las eluciones de cada proteína obtenidas.

Fosforilación *in vitro* de CheY1 y CheY5 con acetil fosfato (Ac³²P)

Una vez obtenidas las proteínas CheY1 y CheY5, éstas se dializaron en el amortiguador TMNDG (Ferré *et al.*, 2004). Posteriormente se hicieron ensayos de fosforilación *in vitro* utilizando Ac³²P (**Figura 18**). Tras concentrar las proteínas, éstas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con Ac³²P. Luego, se agregó a cada una AcP (no marcado radiactivamente) a una concentración de 100 mM con el fin de intercambiar el fosfato radioactivo por el no marcado y así poder observar la desfosforilación de las proteínas.

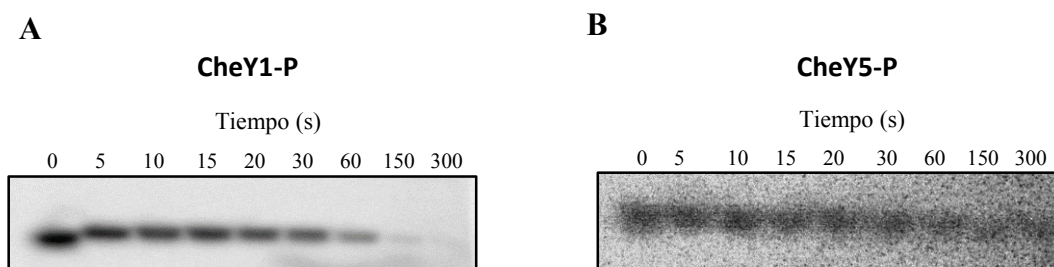


Figura 18. Cinéticas de Desfosforilación *in vitro* con Ac^{32}P de CheY1 y CheY5. Placas de fosfoimagen obtenidas a partir de la exposición de geles SDS-PAGE 17.5% con muestras marcadas radiactivamente. **A)** CheY1 fosforilada, **B)** CheY5 fosforilada

Fosfotransferencia *in vitro* de CheA1 a CheY1 y de CheA1 a CheY5

Después de obtener puras a las proteínas CheA1, CheY1 y CheY5 se dializaron en el mismo amortiguador (HEPES 33 mM, KCl 50 mM, MgCl_2 5 mM, DTT 0.1 mM, EDTA 0.1 mM y glicerol 10% pH 8). Para las proteínas CheY fue necesario adicionar NaCl 150 mM.

La proteína CheA1 se incubó con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ durante una hora, posteriormente se pasó por una columna de Penefsky y se tomó la cantidad requerida para que en la reacción con CheY1 o CheY5 quedara a una relación 1:2. Luego de agregar CheA1 a algún regulador de respuesta CheY, se tomaron alícuotas de 10 μl de muestra y se resuspendieron en 5 μl de mezcla de carga. Las muestras se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, se tiñeron, destiñeron y secaron para finalmente exponerse en placas de fosfoimagen y revelarse en un escáner Thyphoon (**Figura 19**).

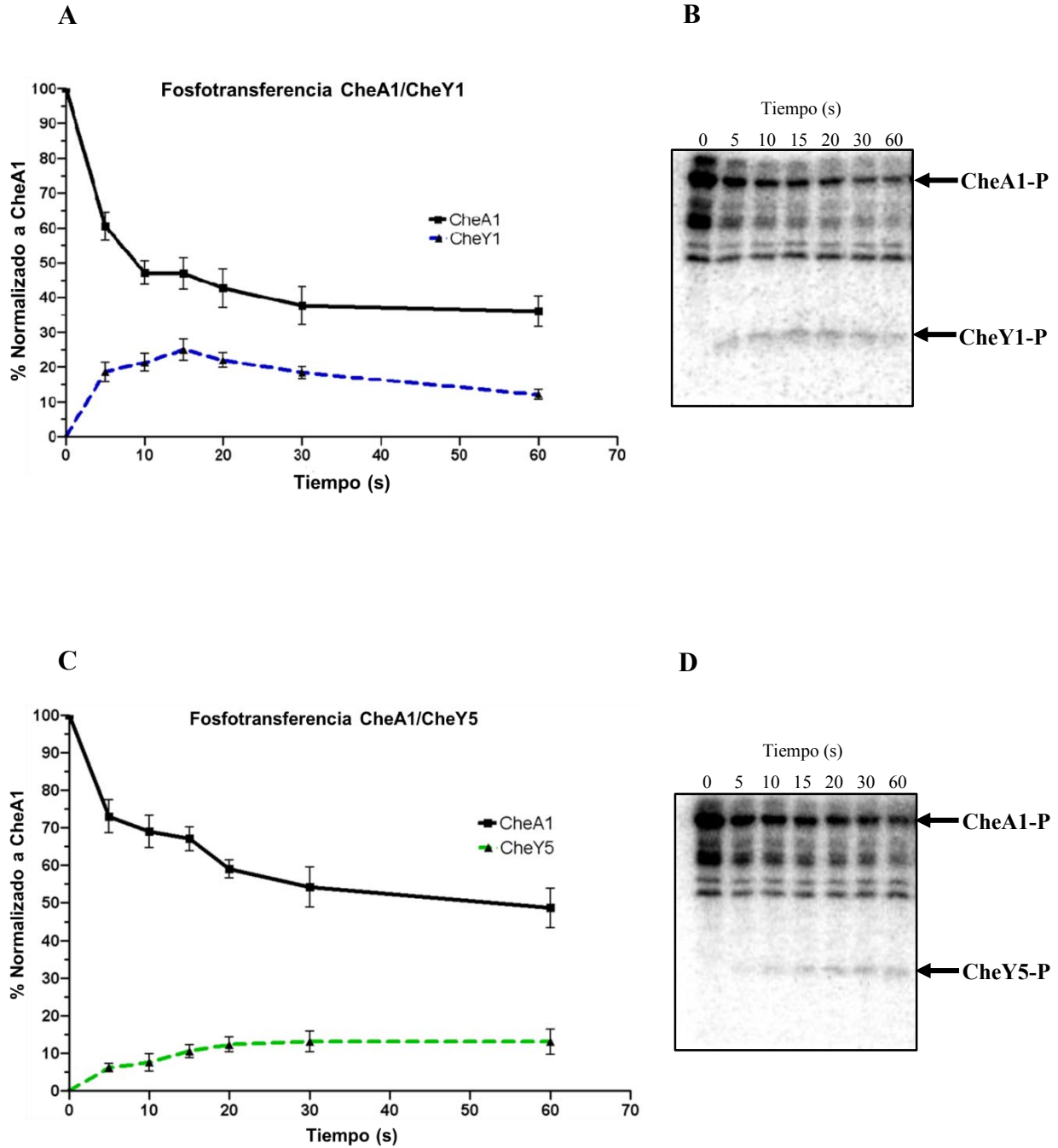


Figura 19. Cinéticas de Fosfotransferencia *in vitro* con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. **A)** Cinética de fosfotransferencia de CheA1 a CheY1 obtenida a partir del análisis de 4 ensayos. **B)** Placas de fosfoimagen de CheA1 a CheY1 obtenida a partir de la exposición de un gel SDS-PAGE 17.5% con proteínas marcadas radiactivamente. **C)** Cinética de fosfotransferencia de CheA1 a CheY5 obtenida a partir del análisis de 4 ensayos. **D)** Fosfoimagen de la fosfotransferencia de CheA1 a CheY5 obtenida a partir de la exposición de un gel SDS-PAGE 17.5% con proteínas marcadas radiactivamente.

Obtención de la proteína CheY2

Debido a que los reguladores de respuesta CheY1, CheY2 y CheY5 poseen el mismo peso molecular (13 905 Da) se decidió trabajar con fusiones con la proteína glutatión S-transferasa (GST) para posteriores ensayos de competencia en los cuales se requería distinguir a los reguladores de respuesta por peso molecular.

La fusión GST-CheY2 era crucial para la realización de este trabajo debido a que el regulador de respuesta CheY2 no había podido purificarse por medio de los protocolos probados en el laboratorio. Además, en estudios previos (Martinez-del Campo *et al.*, 2011) se observó que la delección del gen que codifica para esta proteína ocasiona un fenotipo con un cambio muy drástico en el patrón de nado de *R. sphaeroides*. Cuando *cheY2* no está presente la bacteria es incapaz de nadar. Por tales motivos fue necesario enfocarse en la purificación de la fusión GST-CheY2 ya que una vez purificada se podría intentar separar la fusión mediante enzimas de corte específico y así obtener sólo a la proteína CheY2.

Previamente en el laboratorio se establecieron las condiciones de purificación para las fusiones GST-CheY1 y GST-CheY5 a partir de las construcciones BL21 pGEX GST-CheY1 y BL21 pGEX GST-CheY5, las cuales se obtienen en su forma nativa (**ver anexos**). Sin embargo, para la fusión GST-CheY2 no se pudo establecer un protocolo de purificación en condiciones nativas debido a que la fusión es muy inestable. Desde el momento de la inducción se observa muy poca fusión presente, motivo por el cual al purificarla se obtiene una cantidad ínfima de ésta. Aunado a los problemas anteriores, se observó que la fusión se degrada en muy poco tiempo quedando una gran cantidad de GST libre y una fracción casi inexistente de la fusión GST-CheY2 (**ver anexos, Figura 27**).

Debido a los anteriores problemas se decidió purificar la fusión a partir de cuerpos de inclusión. Después de varias pruebas, se establecieron las condiciones favorables para su renaturalización y posterior purificación. Una vez purificada, se evaluó el contenido de estructura secundaria mediante dicroísmo circular (**ver anexos, Figura 30**).

El siguiente paso fue encontrar las condiciones óptimas de digestión con la enzima de corte, trombina. Luego de establecer estas condiciones, se intentó remover la enzima utilizando perlas de benzamidina a las cuales la trombina puede unirse y así evitar que siga

actuando. De esta manera y volviendo a realizar una purificación con la resina de glutatión sefarosa se separaron a las proteínas GST y CheY2, conservando ésta última para posteriores ensayos de fosforilación, fosfotransferencia y competencia.

Al seguir esta estrategia se obtuvieron resultados positivos hasta el protocolo de la digestión; sin embargo fue imposible remover a la Trombina y luego de unas horas, la proteína CheY2 se dejaba de ver (**ver anexos, Figura 32**). Este resultado sugiere que una vez que la proteína CheY2 es separada de GST, es muy inestable y se probablemente se agrega.

Dados los anteriores resultados se resolvió intentar purificar a la proteína CheY2 a partir de la construcción pQE30 CheY2/M15 [pREP4]. Las cinéticas de inducción mostraron que toda la proteína formaba cuerpos de inclusión por lo que se estableció un protocolo de purificación en condiciones desnaturizantes. Después de romper las células por sonicación se centrifugó y la pastilla se lavó siguiendo el protocolo de lavado de cuerpos de inclusión (Burgess, 2009). Posteriormente, se desnaturizó a la proteína utilizando urea 8 M y se purificó incubando a la proteína desnaturizada con resina de agarosa Ni-NTA. Se lavó la resina con diferentes concentraciones de imidazol para eliminar proteínas contaminantes y la proteína se eluyó con 250 mM de imidazol. (**Materiales y métodos**).

Después se renaturalizó a la proteína mediante diálisis en un amortiguador que contenía NaCl 150mM, Tris-HCl pH 8 50mM, DTT 1mM, Glicerol 10% v/v y L-arginina 0.5M. A pesar de que la proteína parecía haberse renaturalizado no adquirió su estructura ya que al probar su actividad mediante un ensayo de fosforilación *in vitro* con Ac³²P, ésta fue incapaz de fosforilarse.

Nota: Consultar los anexos para ver los resultados y los materiales y métodos para mayor detalle de los protocolos.

Puificación de MBP-CheY2

Al no tener resultados favorables con la purificación de la fusión GST-CheY2, con la obtención de la proteína CheY2 a partir de la fusión y tampoco con la purificación de CheY2 a partir de la cepa M15 [pREP4] se decidió hacer otra fusión, esta vez con la proteína *Maltose*

Binding Protein (MBP). Para ello se clonó el gen que codifica para la proteína CheY2 en el vector pMALc2x, el cual tiene la secuencia que codifica para la proteína MBP y una resistencia a ampicilina. Una vez clonado el gen se transformó en las cepas de *E. coli* TOP-10, BL21 (DE3), M15 [pREP4] Y JM109. Al realizar las cinéticas de inducción se resolvió quedarse con la sobreexpresión a partir de la cepa JM109 (**Figura 20, panel B**).

En la **figura 20 (panel A)** se muestra la inducción del plásmido vacío en el cual, al agregar el inductor IPTG, se observa la proteína MBP; esta proteína pesa 42,482 daltones. Esta inducción se realizó como un control ya que al insertar el gen de cheY2 en el vector, al inducir se muestra un ligero aumento correspondiente a CheY2 (13, 905 Da).

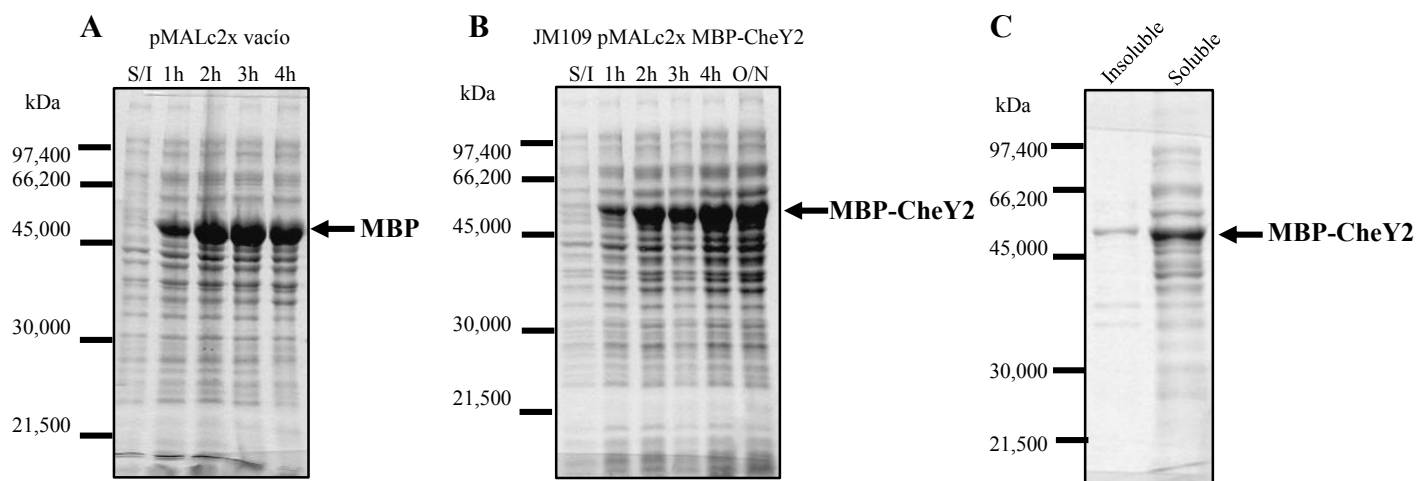


Figura 20. Geles SDS-PAGE 17.5% teñidos con azul de coomassie. **A)** Cinética de Inducción del plásmido pMALc2x en la cepa TOP-10 con 1mM de IPTG A 37°C. **B)** Cinética de inducción de la fusión MBP-CheY2 a partir de la construcción JM109 pMALc2x MBP-CheY2, se indujo con 0.1mM de IPTG a 37°C. **C)** Análisis de solubilidad de la fusión MBP-CheY2 luego de inducir con 0.1mM de IPTG a 37 °C durante 4 horas.

Posteriormente se prosiguió a analizar si la proteína se encontraba soluble o formaba cuerpos de inclusión (**Figura 20, panel C**). Si bien, una pequeña fracción forma cuerpos de inclusión, la mayor parte de la proteína se encontró en la fracción soluble. Con estos resultados se prosiguió a establecer el protocolo de purificación (materiales y métodos) para el cual se resuspendió el paquete celular en amortiguador TNE (Tris-HCl 50 mM pH 7.4,

NaCl 200 mM, EDTA 1 mM), las células se rompieron por sonicación y posteriormente se centrifugó para separar la fracción soluble. Esta fracción se incubó con resina de amilosa por 2 horas a 4°C y luego se realizaron dos lavados de 10 ml con amortiguador TNE para finalmente eluir con TNE y 10 mM de maltosa.

Debido a que la fusión migraba en un peso menor al esperado se decidió hacer una inmunoréplica tipo Western blot α -CheY2 para corroborar la presencia de nuestra proteína (**Figura 21**).

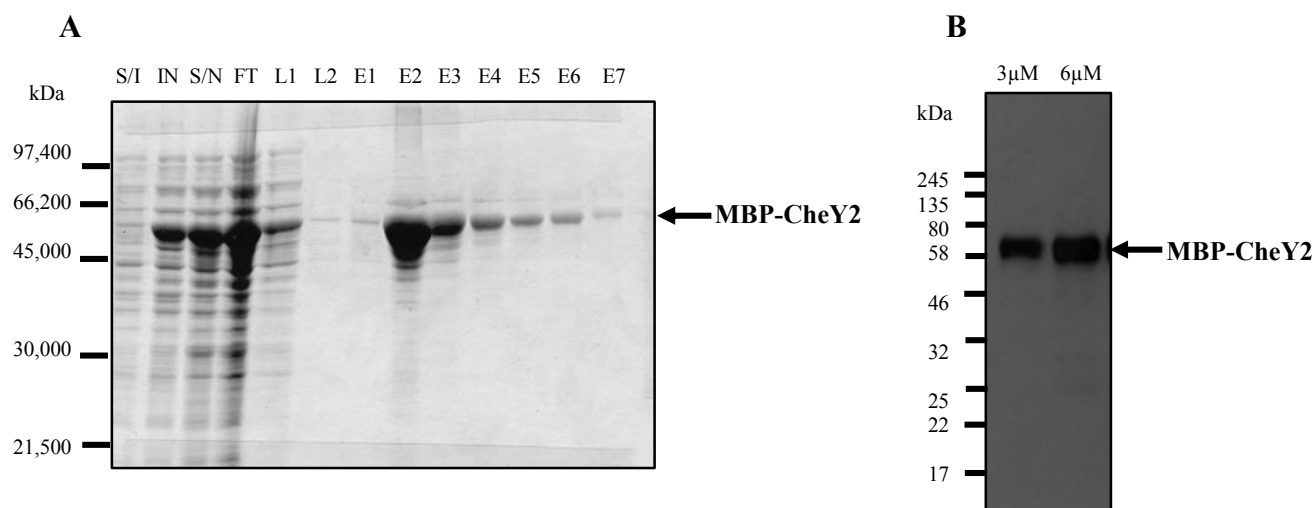


Figura 21. Gel SDS-PAGE 17.5% teñido con azul de coomassie y Western Blot α -CheY2. **A)** Purificación MBP-CheY2 se muestran fracciones antes de la inducción, de la fracción soluble incubada con la resina así como los lavados con amortiguador TNE y las eluciones de la proteína. **B)** Inmunoréplica tipo Western-blot α -CheY2 1:5000, la proteína se cargó a dos distintas concentraciones.

Fosfotransferencia *in vitro* de CheA1 a MBP-CheY2

Antes de realizar este ensayo se intentó fosforilar a la fusión con Ac^{32}P , no obstante y a pesar de varios intentos, fue imposible obtener a la proteína fosforilada mediante este ensayo. Por ello, se resolvió realizar un ensayo de fosfotransferencia utilizando la cinasa CheA1 como donador de fosfatos. La primera vez que se realizó el ensayo (**Figura 22, paneles A y B**) se tomaron tiempos de hasta 30 minutos (equivalente a 1,800 segundos); no

obstante, se observó que después de 60 segundos se pierde la señal de la fusión MBP-CheY2, mientras que la señal de CheA1 es casi nula. En el tiempo 0 (**Figura 22 paneles B y D**) además de CheA1 fosforilada, se aprecian otras proteínas contaminantes que también se fosforilan; una de las cuales migra a la altura de la fusión MBP-CheY2. Sin embargo,

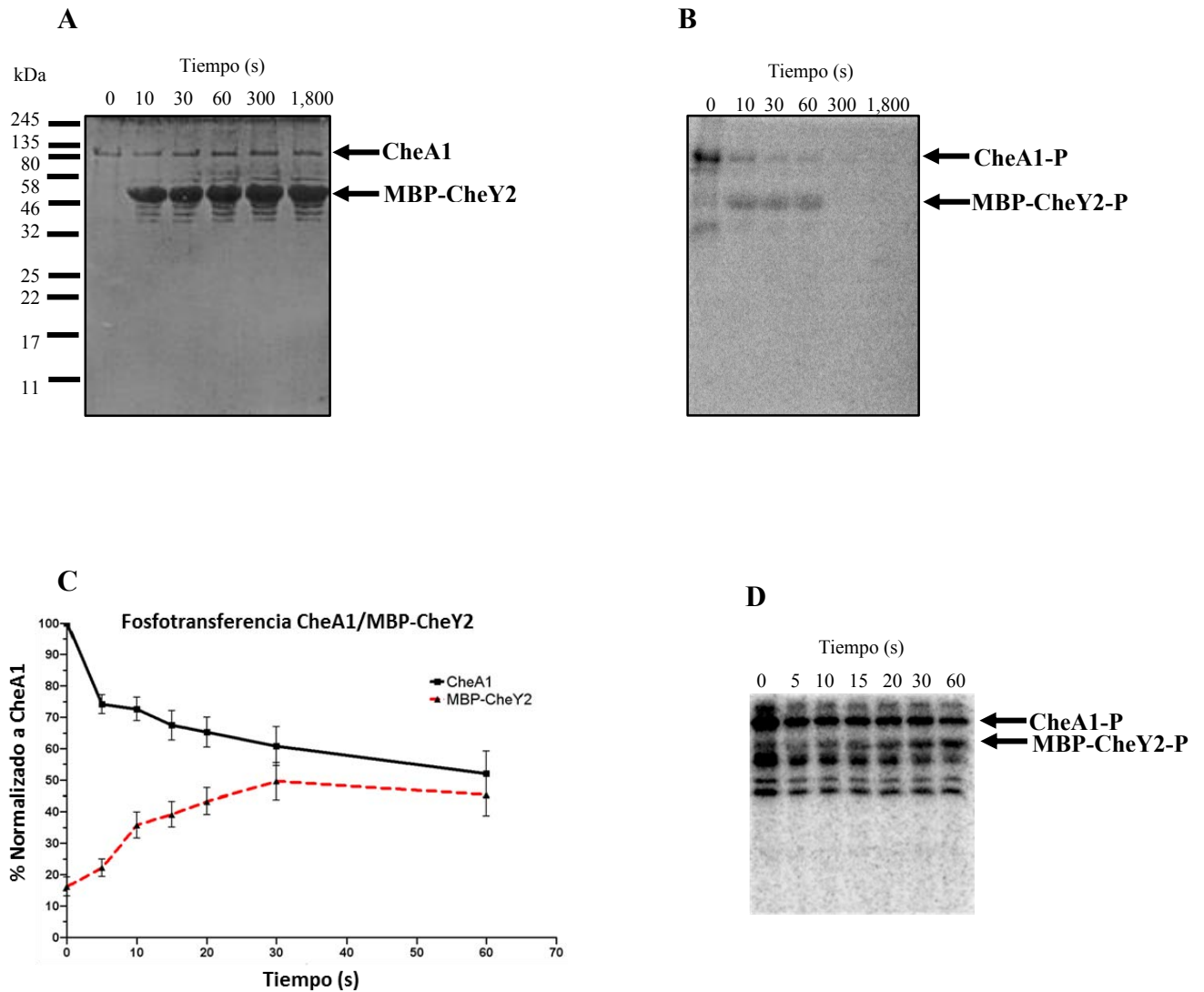


Figura 22. Cinética de Fosfotransferencia *in vitro* con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. **A)** Gel SDS-PAGE 15% teñido con azul de Coomassie; se muestra el patrón de las bandas correspondientes a CheA1 y a MBP-CheY2. **B)** Placa de fosfoimagen obtenida a partir de la exposición del gel de la figura A; se muestran las proteínas CheA1 y MBP-CheY2 fosforiladas. **C)** Cinética de fosfotransferencia de CheA1 a MBP-CheY2 obtenida a partir del análisis de 4 ensayos. **D)** Placa de fosfoimagen de la fosfotransferencia de CheA1 a MBP-CheY2 obtenida a partir de la exposición de un gel SDS-PAGE 17.5% con proteínas marcadas radiactivamente.

A pesar de que fue imposible fosforilar a la fusión MBP-CheY2 con Ac^{32}P , con las fosfotransferencias se obtuvieron resultados alentadores y la fusión fue capaz de transfosforilarse. La **figura 22 (paneles C y D)** muestra la cinética de fosfotransferencia de CheA1 a MBP-CheY2. En la figura puede observarse que CheA1 comienza a desfosforilarse una vez que se agrega la fusión MBP-CheY2, ésta a su vez comienza a fosforilarse inmediatamente y, conforme aumenta el tiempo también se incrementa la fosforilación de esta fusión; a pesar de esto CheA1 no parece desfosforilarse completamente.

Ensayos de competencia *in vitro* de CheA1 con MBP-CheY2 y CheY1 y de CheA1 con MBP-CheY2 y CheY5

Para estos ensayos se siguió una estrategia similar a los ensayos de fosfotransferencia. Una vez que se fosforiló a la cinasa CheA1 durante 1 hora con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ a temperatura ambiente, se eliminó el fosfato no incorporado mediante una columna de Penefsky. Posteriormente, se agregó la cantidad requerida de CheA1 a una mezcla de dos reguladores de respuesta previamente incubados, ya sea MBP-CheY2 con CheY1 o MBP-CheY2 con CheY5 en una relación 1:2 (1 molécula de CheA1 por dos moléculas de cada CheY) y se tomaron muestras de 10 μl que luego se resuspendieron en 5 μl de mezcla de carga (**Figura 23**).

En la **figura 23 (panel A y B)** se muestran los ensayos de competencia entre los reguladores de respuesta CheY1 y la fusión MBP-CheY2, en este caso puede observarse que la cinasa CheA1 cede de inmediato los grupos fosfato y comienza a desfosforilarse, sin embargo, no parece tener ninguna preferencia evidente por alguno de los dos reguladores, CheY1 o CheY2. Contrario a lo que ocurre en la competencia entre los reguladores CheY1 y CheY2, en presencia de CheY2 y CheY5 sí parece haber una clara preferencia de la cinasa por el regulador de respuesta CheY2, en cambio CheY5 muestra una deficiente fosforilación **Figura 23 (paneles C y D)**.

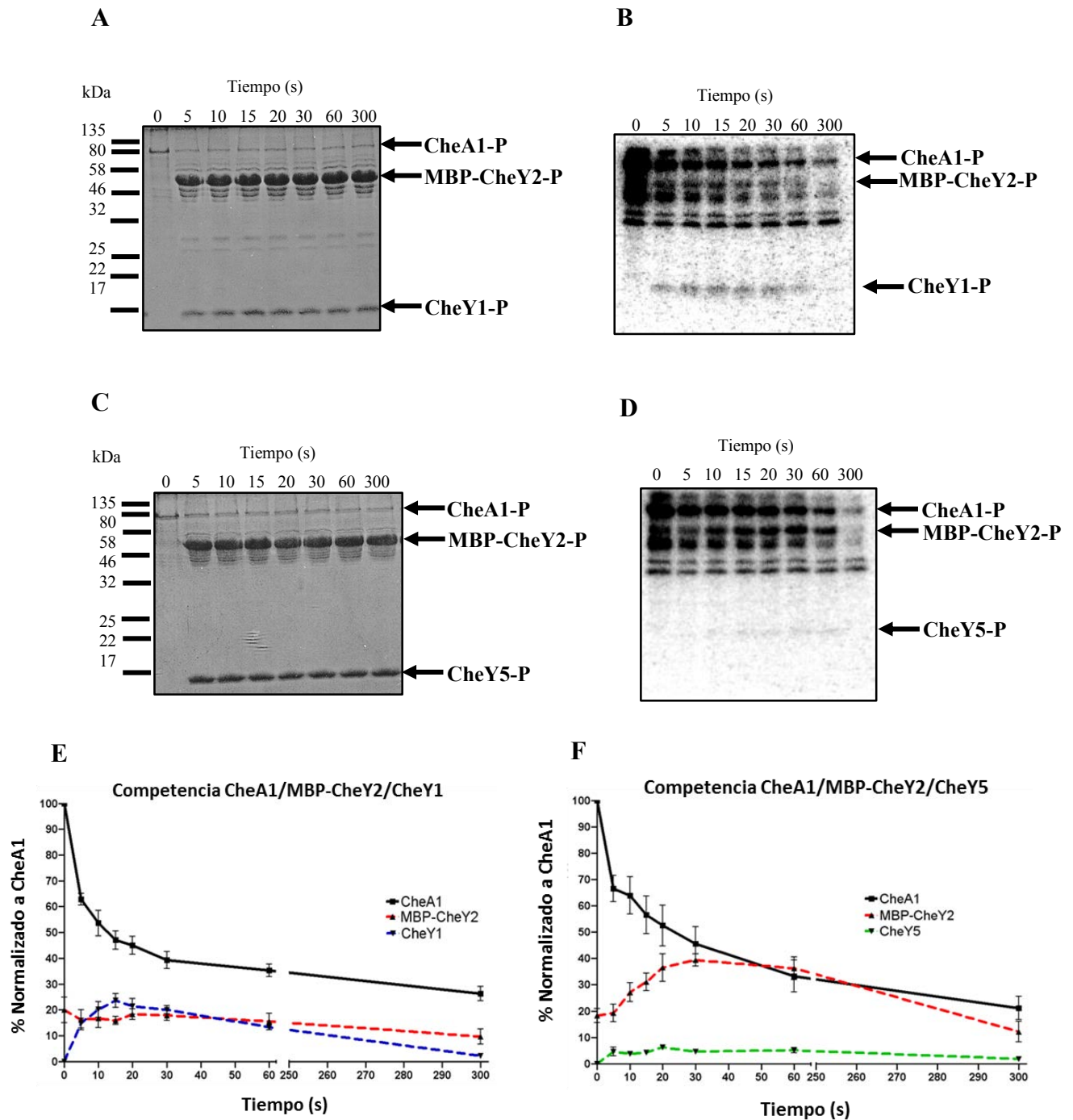


Figura 23. Ensayos de competencia mediante transfosforilación *in vitro* con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. **A)** Gel SDS-PAGE 17.5% teñido con azul de Coomassie; se muestra el patrón de las bandas correspondientes a CheA1 a MBP-CheY2 y CheY1 **B)** Placa de fosfoimagen de la transfosforilación de CheA1 en presencia de MBP-CheY2 y CheY1 obtenida a partir de la exposición de un gel SDS-PAGE 17.5% con proteínas marcadas radiactivamente. **C)** Gel SDS-PAGE 17.5% teñido con azul de Coomassie; se muestran las proteínas CheA1, MBP-CheY2 y CheY1 **D)** Placa de fosfoimagen de la transfosforilación de CheA1 en presencia de MBP-CheY2 y CheY5 obtenida a partir de la exposición de un gel SDS-PAGE 17.5% con proteínas marcadas radiactivamente. **E)** Cinética de transfosforilación de CheA1 en presencia de MBP-CheY2 y CheY1 (N=4 ensayos). **F)** Cinética de transfosforilación de CheA1 en presencia de MBP-CheY2 y CheY5 (N=4).

DISCUSIÓN

Evidencia genética señala que el operón quimiotáctico 1 (*cheOp1*) es el encargado de controlar la vía de señalización quimiotáctica en el sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides* (Martinez-del Campo *et al.*, 2011). Si bien, existen trabajos previos al presente en donde se analiza, mediante ensayos *in vitro*, el comportamiento de cada uno de los reguladores de respuesta CheY ante la presencia de la histidín cinasa CheA1 (Porter *et al.*, 2002), los resultados obtenidos en esta tesis difieren con lo que se reporta por este grupo de trabajo. Estas diferencias van desde la obtención de la proteína CheY2 hasta el comportamiento de cada uno de los reguladores de respuesta CheY en presencia de CheA1 además de cambios en la fosforilación de la propia CheA1 en presencia de los reguladores de respuesta.

En este trabajo se analiza por primera vez, desde un enfoque bioquímico, la función de los reguladores de respuesta CheY1, CheY2 y CheY5 en el sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides*. A pesar de que se realizaron ensayos de fosforilación y de fosfotransferencia *in vitro* ya reportados (Porter *et al.*, 2002), en el presente trabajo se mejoraron las condiciones experimentales dando un mayor soporte a los resultados obtenidos. Además, cabe resaltar que en este trabajo se realizaron ensayos de competencia que no se han reportado hasta el momento. Finalmente, (y no por ello es menos importante) tras varios intentos, se logró purificar a la proteína CheY2 mediante una fusión con una proteína que une maltosa (MBP). Como se mencionó anteriormente, existen reportes en donde se obtiene a la proteína CheY2 en su forma nativa (Porter *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2001); sin embargo, a pesar de haber intentado obtener a la proteína en su conformación nativa, siguiendo los protocolos reportados, fue imposible replicar esos resultados.

Con los resultados obtenidos de la fosforilación y desfosforilación *in vitro* de CheA1 (**figuras 15 y 16**) se lograron determinar las condiciones óptimas para los ensayos de fosfotransferencia. En la cinética de fosforilación (**figura 15**), se observó que alrededor de 2 o 3 minutos luego de incubarse con [γ - 32 P]-ATP, la proteína CheA1 ya está fosforilada en un 50 %, a los 20 minutos obtiene hasta un 90% de fosforilación, mientras que a los 45 minutos ya se ha fosforilado en un 100%. Luego de 90 minutos aún se encuentra fosforilada hasta en un 80%.

No obstante, se decidió determinar qué tan estable era la proteína una vez que se eliminaba el fosfato libre, es decir, el que no se incorporó a CheA1 durante la fosforilación. Para ello se utilizó una columna de Penefsky con la cual se eliminó el fosfato libre luego de que CheA1 se fosforiló durante una hora. Con este resultado se determinó que luego de 15 minutos la proteína se mantiene fosforilada hasta un 90%, esto implica que aún después de eliminarse el fosfato libre, CheA1 es muy estable y es capaz de retener el fosfato incorporado durante un largo periodo.

A diferencia de los resultados publicados referentes a la desfosforilación de CheA1 (Porter *et al.*, 2002; Porter *et al.*, 2007), en el presente trabajo se implementó el uso de la columna de Penefsky para asegurarnos de que el efecto observado se debiera puramente al comportamiento de la cinasa y no se debiera a que la proteína se estuviera fosforilando todo el tiempo debido a la disponibilidad de fosfato en el medio. (**Figura 16**). Cabe mencionar que además de la cinasa CheA1 fosforilada, se observaron otras proteínas contaminantes que también se fosforilan (**Figuras 15 y 16**); sin embargo, la señal de la cinasa es la que se muestra con mayor intensidad. Por tal motivo, los análisis densitométricos sólo se centraron en la actividad de CheA1.

Lamentablemente no se pudieron determinar las vidas medias de los reguladores de respuesta mediante los ensayos de fosforilación *in vitro* con Ac^{32}P , debido a complicaciones en el método (el método de secado utilizado entonces no era el óptimo y las marcas de fosforilación obtenidas, en la mayor parte de los experimentos, aparecían como marcas difusas las cuales dificultaban el análisis densitométrico). Sin embargo, estos ensayos realizados con CheY1 y CheY5 (la fusión MBP-CheY2 no pudo fosforilarse en estas condiciones), muestran una clara diferencia en cuanto al tiempo en que permanecen fosforiladas, siendo CheY5 la proteína que retiene durante más tiempo el fosfato. A los 2.5 minutos desaparece la señal en CheY1, mientras que para CheY5 aún a los 5 minutos la proteína se encuentra fosforilada (**Figura18**).

Mediante los ensayos de fosfotransferencia se pudo determinar que CheA1 se comporta de manera diferente ante la presencia de cada regulador de respuesta CheY1, CheY2 o CheY5. En presencia de CheY1 (**Figura 19, panel A**), la cinasa decae de un 100% de fosforilación hasta un 60% a los 5 segundos, mientras que a los 8 segundos la fosforilación

ha decaído en un 50%. A partir de los 30 segundos y hasta los 60 segundos la fosforilación ya no decae y se mantiene en aproximadamente 35%. En presencia de CheY5 (**Figura 19, panel C**), se observa que a los 5 segundos la fosforilación de CheA1 sólo decae en un 30% (la mitad de lo que decae en presencia de CheY1) y que a los 60 segundos apenas ha decaído un 50%. Por otro lado, en presencia de la fusión MBP-CheY2 (**Figura 22, panel A**) se observa que a los 5 segundos CheA1 se encuentra fosforilada hasta en un 75 %; es decir, que solo ha decaído un 25%. A los 60 segundos la fosforilación de esta proteína apenas ha decaído en un 50%, fenómeno similar a lo ocurrido en presencia de CheY5.

A diferencia de datos publicados (Porter *et al.*, 2002), en nuestros ensayos, ya sea en presencia de CheY1, MBP-CheY2 o CheY5, la cinasa CheA1 no se desfosforila completamente a pesar de haberse removido el fosfato libre.

Además del comportamiento diferencial de desfosforilación de CheA1 en presencia de los diferentes reguladores de respuesta CheY, destaca el hecho de que la cinasa CheA1 fosforila de manera distinta a cada uno de los reguladores de respuesta, teniendo una mayor preferencia por el regulador de respuesta MBP-CheY2 con un pico máximo de fosforilación de 50% a los 30 segundos (**Figura 22, paneles C y D**). En segundo lugar de preferencia está CheY1, con un pico máximo de fosforilación de 25% a los 15 segundos (**Figura 19, panel A**). En último lugar se encuentra CheY5 (**Figura 19, panel B**), con un pico máximo de aproximadamente 12% a los 30 segundos.

Finalmente, con los ensayos de competencia (**Figura 23**) se observó que en presencia de CheY1 y MBP-CheY2, CheA1 pareciera dosificar el fosfato entre los dos reguladores. Si bien, CheY1 mantiene su máximo pico de fosforilación en 25% a los 15 segundos, luego de pasar este punto decae drásticamente hasta llegar a 0 (**Figura 23, panel A**); fenómeno que no ocurrió cuando sólo se encontraba CheY1 en el ensayo (después de 60 segundos CheY1 aún se mantenía fosforilada hasta un 10%, (**Figura 19, panel A**)). MBP-CheY2 a su vez, es incapaz de llegar a su máximo punto de fosforilación; en competencia con CheY1, la fosforilación de MBP-CheY2 disminuye de 50% (observado en las fosfotransferencias (**Figura 22, panel A**)) a sólo un 20%. Sin embargo, comparada con CheY1, MBP-CheY2 parece retenir durante más tiempo el fosfato.

En presencia de CheY5 y CheY2, se observa una clara preferencia de CheA1 por MBP-CheY2 (**Figura 23, panel C**) fosforilándola hasta en un 40% a los 30 segundos, muy parecido a los resultados observados en las fosfotransferencias. Sin embargo, la proteína CheY5 sólo alcanza un 5% de fosforilación, nivel que se mantiene hasta los 60 segundos para posteriormente decaer hasta 0.

Estos resultados confirman lo reportado previamente en el laboratorio (Martinez-del Campo *et al.*, 2011) en donde se observó que sólo la mutante en *cheY2* posee un fenotipo “smooth” (no hay eventos de paro) lo que implica que la proteína MBP-CheY2, en su forma fosforilada, es la que interactúa directamente con el motor induciendo así los eventos de paro. La mutante en *cheY1* no muestra fenotipo alguno, por lo que se descarta que sea este regulador de respuesta quien se pegue al motor.

Los resultados de las fosfotransferencias parecen apoyar esta idea, ya que se observó que CheA1 parece fosforilar mejor a MBP-CheY2. Sin embargo, en los resultados obtenidos a partir de la competencia entre CheY1 y MBP-CheY2 se observa que CheA1 parece reconocer de igual manera a los dos reguladores. No obstante, al no haber un fenotipo en la mutante en *cheY1*, y pese a que CheY1 es capaz de fosforilarse, se cree que este regulador no tiene la capacidad de pegarse al motor. Por otro lado, en este mismo estudio (Martinez-del Campo *et al.*, 2011) se demostró que la mutante en *cheY5* presenta un fenotipo “tumbly” que se traduce como un aumento en la frecuencia de paros o eventos de reorientación. En este escenario, se propuso que CheY5 estaría actuando como una poza de fosfatos mediante un mecanismo similar descrito para *Sinorhizobium meliloti* (Sourjik *et al.*, 1998). No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo no concuerdan del todo con esta hipótesis. En el presente trabajo se sugiere que, probablemente CheY5 sí podría estar actuando como una poza de fosfatos aunque no de manera convencional. Los resultados demuestran que este regulador es capaz de fosforilarse y transfosforilarse, pero probablemente una vez que adquiere el fosfato lo pierde muy rápidamente. Con el objetivo de develar más información acerca de la función de CheY5 y completar el esquema del ensayo de competencia se planea hacer la fusión MBP-CheY5 para entonces realizar una competencia entre esta proteína y CheY1.

Respecto a la fusión MBP-CheY2 permanecen algunas dudas. Con los resultados obtenidos a partir de las fosfotransferencias y ensayos de competencia no se puede demostrar contundentemente que la proteína señalada como MBP-CheY2, a lo largo de dichos ensayos, pertenezca realmente a esta proteína, debido a que CheA1 no parece estar del todo pura y una de las proteínas contaminantes migra exactamente a la misma altura que la fusión.

Evidencia como la inmunoréplica α -CheY2, así como los primeros ensayos de fosfotransferencia (**Figura 22, paneles A y B**) muestran que si bien esta proteína contaminante se observa fosforilada desde el tiempo 0, sólo cuando se agrega la fusión MBP-CheY2 hay un cambio en el patrón de fosforilación; dicho cambio se observa como un incremento en la fosforilación; sugiriendo así, que es la fusión la que está actuando. A diferencia de lo que se observa en las fosforilaciones de CheA1 (**Figuras 15 y 16**), así como en las fosfotransferencias con CheY1 y CheY5 (**Figura 19**), en ausencia de MBP-CheY2 la proteína contaminante no se observa de manera muy definida ni con una fosforilación intensa después del tiempo 0; contrario a lo que se observa una vez que MBP-CheY2 se encuentra en los ensayos. Estos resultados sugieren también, que es la fusión la que se está fosforilando.

Por otro lado, cabe la posibilidad de que la proteína MBP pudiera estar causando algún efecto sobre el regulador de respuesta CheY2, que a su vez tendría implicaciones en la fosfotransferencia. Sin embargo, no existen reportes que señalen que esta proteína (MBP), al estar fusionada a otra, afecte negativamente a esta última. Contrariamente, existen reportes en donde se demuestra que al ser una proteína altamente soluble mejora la solubilidad de la proteína fusionada, promoviendo su correcto plegamiento (Nallamsetty *et al.*, 2006). En estos estudios se evaluó la actividad biológica de la estructura nativa de algunas proteínas, posteriormente se volvió a evaluar la actividad una vez que habían sido fusionadas y no se observaron diferencias en la actividad biológica de las proteínas fusionadas. Se concluyó entonces, que MBP desempeña un papel pasivo en el plegamiento de sus parejas de fusión.

A diferencia de los resultados para CheY1 y CheY5, la fosforilación de MBP-CheY2 comienza con un nivel basal de aproximadamente 20% (**Figura 22, panel C**). Debido a que en el tiempo 0 (donde sólo está presente la cinasa fosforilada) pareciera haber una señal que pudiera corresponder a la fusión MBP-CheY2-P. Esto se debe a que la proteína CheA1 posee pequeñas cantidades de contaminantes fosforilables (Porter *et al.*, 2002), que justamente

migran a la altura de la fusión MBP-CheY2. En un principio se decidió restar el valor del tiempo 0 a cada uno de los siguientes valores, sin embargo, al ser un producto fosforilable implica que también decae conforme transcurre el tiempo. Al desconocer en qué medida lo hace, se decidió gráficar con ese 20% inicial de fosforilación.

De acuerdo al patrón de migración, cabe la posibilidad de que este producto fosforilable sea una versión corta de CheA1. Existen reportes para *E. coli* que demuestran la existencia de una CheA_L larga o CheA y una CheA corta o CheA_S (Wang *et al.*, 1996; Hao *et al.*, 2009; Hao *et al.*, 2009). La CheA_L (71 kDa) es la responsable de fosforilar al regulador de respuesta CheY, mientras que CheA_S (66 kDa) es la que interactúa directamente con la fosfatasa CheZ (proteína encargada de desfosforilar a CheY). Se sabe que la localización de CheZ requiere de CheA_S; esta última interactúa con CheZ a través del fragmento C-terminal del dominio P1 de CheA_S, también conocido como dominio de unión a CheZ (O'Connor *et al.*, 2009).

Curiosamente se observó que, en presencia de cualquiera de los tres reguladores de respuesta, o en combinaciones de estos reguladores, estas proteínas contaminates fosforilables, presentes en CheA1, cambian su patrón de fosforilación y pareciera que se intensifican (**Figuras 19 (paneles B y D), 22 (panel B) y 23 (paneles B y D)**). Fenómeno que no se observa cuando se encuentra la cinasa sola.

Con base en los resultados genéticos, obtenidos previamente en el laboratorio (Martinez-del Campo *et al.*, 2011), y en los ensayos de competencia *in vitro* se generó un modelo (**Figura 24**). En éste se propone que una vez que un ligando se une al quimiorreceptor McpA, se traduce una señal que viaja a hasta la cinasa CheA1 a través de la proteína adaptadora CheW1; luego de que CheA1 recibe la señal, ésta se activa autofosforilándose. Cuando en el medio se encuentran sólo los reguladores CheY1 y CheY2 (equivalente a una mutante en *cheY5*), CheA1 fosforilaría a ambos reguladores de respuesta, sin embargo, tendría una mayor preferencia o por CheY2 (**Figura 23, paneles A y B**). Dado que la mutante *cheY1* no afecta el tado (Martinez-del Campo *et al.*, 2011), CheY2 estaría actuando mediante una unión al motor ocasionando el fenotipo “*tumbly*” (**Figura 24, panel A**).

En presencia de los reguladores CheY2 y CheY5 (equivalente a una mutante en *cheY1*), de igual manera CheA1 fosforilaría a ambas proteínas. No obstante, tendría una

mayor preferencia por CheY2 (de acuerdo al ensayo de competencia *in vitro* entre estos dos reguladores (**figura 23, paneles C y D**). CheY2 fosforilada sería muy afin al rotor, sin embargo CheY5, en su estado fosforilado tendría algún efecto negativo ya sea sobre CheY2 o directamente en el motor lo que impediría que CheY2 se uniera al motor. De esta manera, y al no haber ningún regulador de respuesta unido al motor, el fenotipo de nado se mantiene como en la cepa AM1 (**Figura24, panel B**).

Al no tener a las fusiones MBP-CheY1 o MBP-CheY5 (para poder distinguir a los reguladores) no se logró realizar el ensayo de competencia *in vitro* correspondiente. Sin embargo, para este ensayo proponemos que al estar presentes sólo CheY1 y CheY5 (equivalente a una mutante en *cheY2*), CheA1 tendría una preferencia por la fosforilación de CheY1. No obstante, la evidencia genética sugiere que ésta es incapaz de pegarse al motor. En este esquema CheY5 sola, o en conjunto con CheY1, estarían actuando de alguna forma ocasionando que el fenotipo de nado cambie a “*smooth*” (**Figura 24, panel C**).

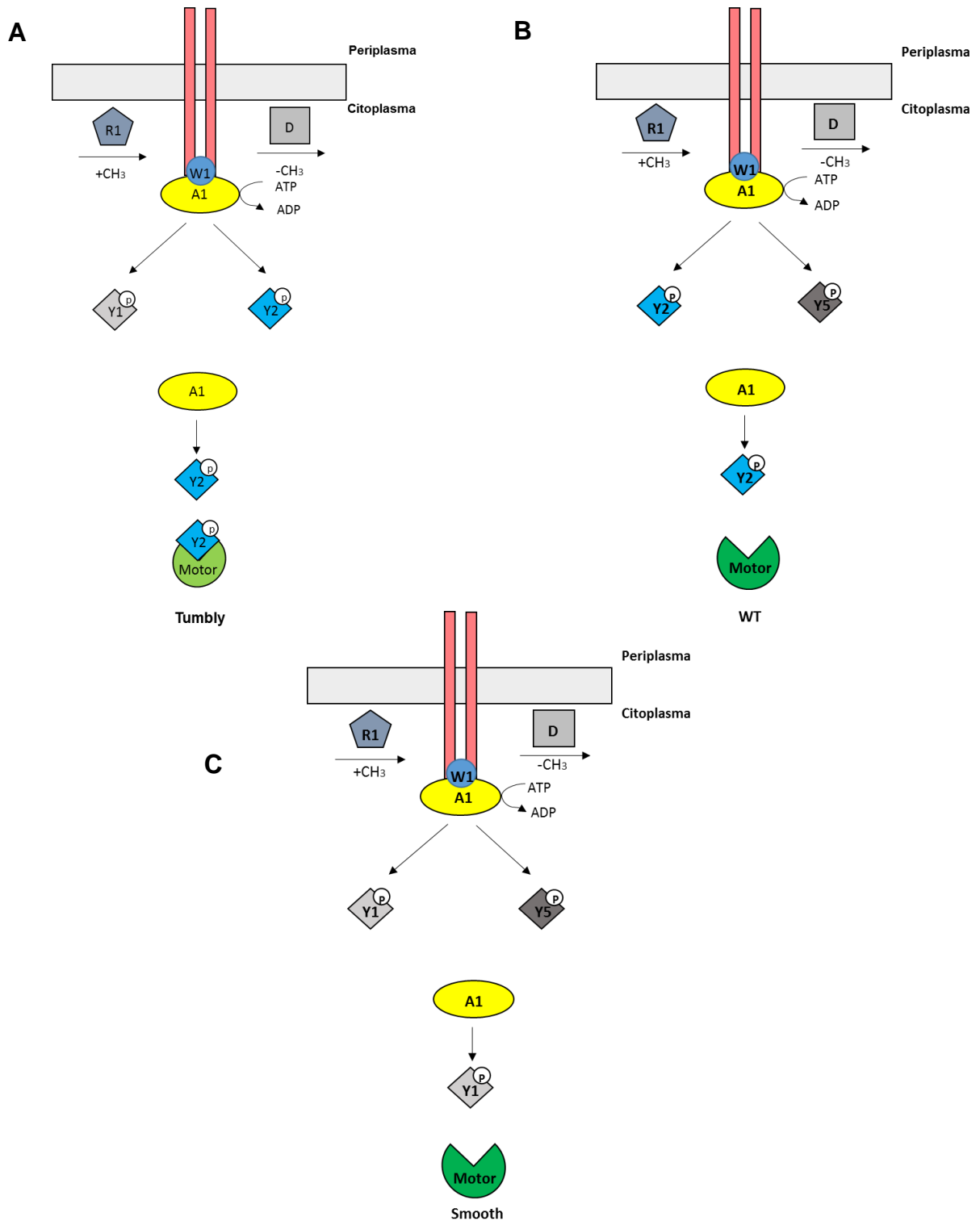


Figura 24. Modelo propuesto, con base a estudios genéticos y ensayos de fosforilación *in vitro*, de la función de los reguladores CheY1, CheY2 y CheY5 en la vía de señalización quimiotáctica en el sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides*. **A)** En presencia de CheY1 y CheY2, la cinasa CheA1 fosforila de manera similar a cada regulador de respuesta, sin embargo, evidencia genética señala que sólo CheY2 es capaz de unirse al motor. **B)** En presencia de CheY2 y CheY5, CheA1 fosforila mejor a CheY2 pero bajo estas condiciones, CheY2 es incapaz de acoplarse al motor. **C)** En presencia de CheY1 y CheY5, la cinasa prefiere al regulador CheY1, no obstante éste no puede interactuar con el motor. Modificado de (Martinez-del Campo *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

Con estos resultados podemos concluir que:

- La histidín cinasa CheA1 fosforila de manera distinta a cada uno de los reguladores de respuesta CheY1, CheY2 y CheY5.
- En presencia de los reguladores CheY1 y CheY2, CheA1 no parece tener preferencia única por alguno de los dos; sin embargo, CheY2 es capaz de retener el fosfato por un periodo de tiempo más largo.
- En presencia de CheY2 y CheY5, CheA1 tiene una clara preferencia por el regulador CheY2.

PERSPECTIVAS

- Hacer las fusiones MBP-CheY1 y MBP-CheY5, analizar su comportamiento por medio de transfosforilaciones con el objetivo de determinar si este es parecido al de las proteínas CheY1 y CheY5.
- Una vez determinado lo anterior, realizar ensayos de competencia utilizando a estas nuevas fusiones.
- Realizar ensayos de interacción de cada uno de los reguladores de respuesta con la proteína del “switch” FliM2 para determinar si existe algún nivel de interacción con esta proteína.
- Analizar la expresión de cada uno de los genes *cheY1*, *cheY2* y *cheY5* para determinar si su expresión equivale o si existe regulación a este nivel.
- Intentar otra técnica de purificación de CheA1, tal como FPLC.

ANEXOS

Antes de obtener la fusión MBP-CheY2 se probaron diversos protocolos con la finalidad de obtener al regulador de respuesta CheY2 y así proceder con los ensayos de fosforilación *in vitro*, sin embargo y a pesar de los múltiples esfuerzos por obtener a esta proteína no logramos purificarla de otra manera.

A continuación se muestran los resultados de las diversos protocolos probados que incluyen una fusión con la proteína glutatión sefarosa, GST, motivo por el cual también se incluyen resultados de las fusiones GST-CheY1 y GST-CheY5. Además se muestran resultados de las purificaciones en condiciones desnaturalizantes de la proteína CheY2 y de la fusión GST-CheY2, así como los respectivos resultados de la renaturalización de las mismas.

Purificación de las fusiones GST-CheY1 y GST-CheY5

Estas proteínas se purificaron a partir de las construcciones BL21 pGEX GST-CheY1 y BL21 pGEX GST-CheY5. Ambas proteínas se obtienen en condiciones solubles. Una vez fragmentadas las células por sonicación y luego de centrifugar, la fracción soluble se incubó durante 30 minutos a 4°C mientras que para la fusión GST-CheY5 se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente ambas con la resina glutatión sefarosa. Posteriormente se lavó la resina con 45 ml de amortiguador PBS pH 7.3 seguido de otro lavado de 1 ml de PBS pH 7.3 con 0.5 mM de glutatión reducido. La proteína se eluyó con Tris-HCl pH 8 50 mM + 5 mM de glutatión reducido (**Figura 25**).

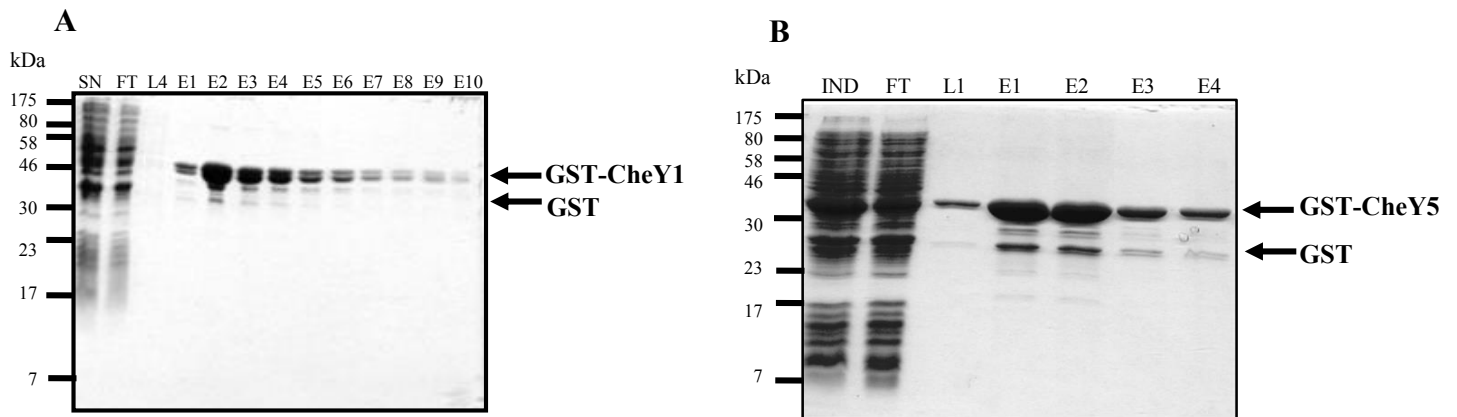


Figura 25. Purificación de GST-CheY1 y GST-CheY5. Geles SDS-PAGE 15% de acrilamida teñidos con azul de Coomassie A) GST-CheY1, se muestran la fracción soluble de la proteína (S/N), los lavados de durante la purificación y las eluciones de la proteína. B) Muestra los resultados de la purificación de GST-CheY5; una muestra de la inducción, el primer lavado y las eluciones.

Cinéticas de desfosforilación de GST-CheY1 y GST-CheY5 con acetil fosfato (Ac^{32}P)

Después de obtener puras a las fusiones GST-CheY1 y GST-CheY5 éstas se dializaron en buffer TMNDG para posteriormente hacer ensayos de fosforilación *in vitro* empleando acetil fosfato radiactivo (**Figura 26**). Para estos ensayos se utilizaron cada una de las proteínas a una concentración de $10 \mu\text{M}$. Cada proteína se incubó con acetil fosfato durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregó acetil fosfato no marcado radiactivamente a una concentración de 100 mM con el objetivo de observar el patrón de desfosforilación de cada una de las fusiones y posteriormente poder calcular sus vidas medias.

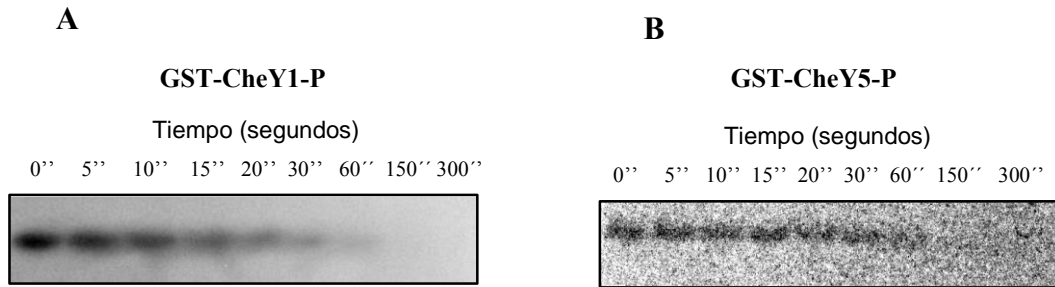


Figura 26. Cinéticas de desfosforilación *in vitro* con $Ac^{32}P$ de GST-CheY1 y GST-CheY5. Placas de fosfoimagen obtenidas a partir de la exposición de un geles SDS-PAGE 17.5% con muestras marcadas radiactivamente. A) GST-CheY1, B) GST-CheY5

Fosfotransferencia *in vitro* de CheA1 a GST-CheY1 y de CheA1 a GST-CheY5

Después de obtener los resultados de las fosforilaciones de las fusiones GST-CheY1 y GST-CheY5 se decidió realizar ensayos de fosfotransferencia con el fin de determinar si estas fusiones serían útiles para ensayos posteriores. Tras varios intentos no se logró transfosforilar a las fusiones (resultado no mostrado) por lo que a partir de estos resultados se descartó el utilizarlas para los ensayos de competencia, en donde era necesario poder distinguir a los reguladores de respuesta por peso molecular.

A pesar de estos resultados negativos se decidió continuar trabajando en la purificación de la fusión GST-CheY2 con la expectativa de poder obtener al regulador CheY2 puro, debido a que como se mencionó antes, no se había podido purificar de ninguna forma posible.

Purificación GST-CheY2 en condiciones nativas.

Con la finalidad de poder obtener al regulador de respuesta CheY2 se purificó la fusión GST-CheY2 a partir de la cepa de *E. coli* BL21 pGEX GST-CheY2 utilizando una resina de glutatión sefarosa (**Figura 27**). Se tomaron varias muestras a lo largo de la purificación y se analizaron en un gel desnaturante de acrilamida. Se incubó la fracción soluble, obtenida luego de romper a las células y de centrifugarlas, con resina de glutatión

sefariosa durante 1 hora a 4°C. Posteriormente la resina se lavó con 50 ml de buffer PBS 1X, la proteína se eluyó con 5 ml de amortiguador que contenía Tris 50 mM y glutatión reducido 10 mM.

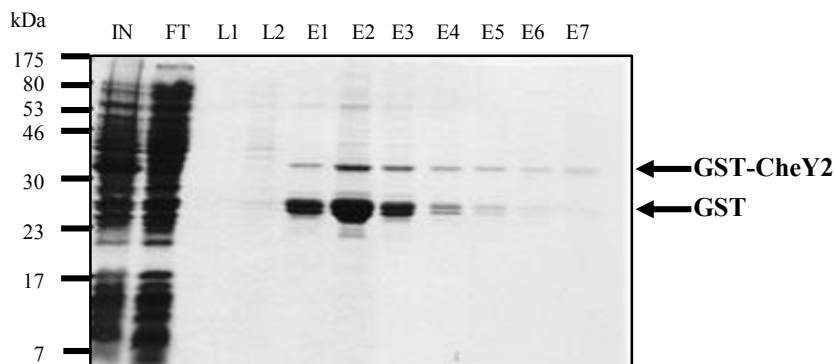


Figura 27. Purificación de la fusión GST-CheY2 en condiciones nativas. SDS-PAGE 15% teñido con azul de Coomassie. En el gel se muestran fracciones de la inducción, de los lavados de la resina y de cada una de las eluciones durante la purificación.

En el gel se observa que se recupera muy poco de la fusión GST-CheY2, mientras que la cantidad de GST recuperada es mayor. Además una vez purificada la fusión ésta es poco estable y al cabo de unos días a 4°C terminaba degradándose quedando sólo GST (no se muestra el gel). Dado que la fusión obtenida en condiciones nativas no fue suficiente para los ensayos requeridos, y que además se obtenía a GST como proteína contaminante, se decidió seguir un protocolo de purificación en condiciones desnaturalizantes.

Purificación de la fusión GST-CheY2 a partir de cuerpos de Inclusión

Con el propósito de poder obtener una mayor cantidad de la fusión GST-CheY2 se decidió purificarla a partir de cuerpos de inclusión utilizando la misma construcción (BL21 pGEX GST-cheY2). Una vez obtenida la pastilla celular ésta se resuspendió en amortiguador PBS pH 7.3; luego de sonicar y centrifugar se prosiguió con el lavado de los cuerpos de inclusión (Burgess, 2009) con el fin de eliminar membranas y otras proteínas. Tras el lavado fue necesario desnaturalizar a la proteína utilizando un amortiguador de PBS con urea a una concentración de 8 M. Se realizaron pruebas de dilución debido a que la cantidad de proteína presente en los cuerpos de inclusión era demasiada; se observó que al diluirla con

amortiguador PBS pH 7.3 con urea 8 M previo al proceso de renaturalización, se obtenía una mayor cantidad de proteína renaturalizada. (**Figura 28**).

La renaturalización se llevó a cabo por medio de una diálisis en un amortiguador que contenía PBS pH 7.3, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 8 mM y tritón 0.1%.

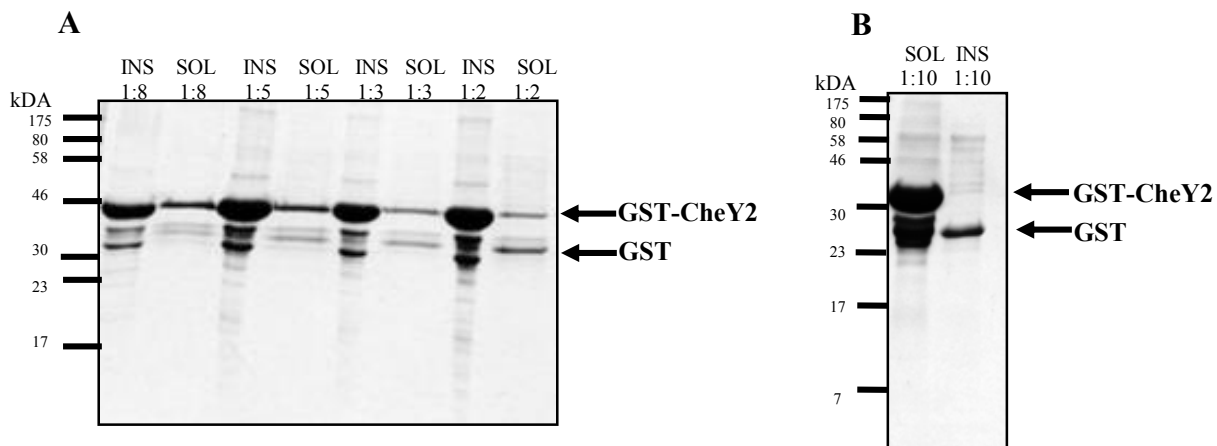


Figura 28. Análisis de dilución de la fusión GST-CheY2 desnaturalizada con Urea 8M. Geles SDS-PAGE 17.5% teñidos con azul de coomassie. Se muestran las fracciones solubles e insolubles luego de renaturalizar a la fusión GST-CheY2 previamente diluida en amortiguador PBS pH 7.3 y Urea 8M. A) Diluciones 1:8, 1:5, 1:3 y 1:2 donde 1 corresponde al volumen de la proteína diluida. B) Dilución 1:10.

Con estos resultados se decidió que la proteína debía diluirse 1:5, aunque en esta concentración la proteína renaturalizada parece ser poca comparada con la dilución 1:10, sin embargo, fue suficiente para nuestros posteriores ensayos. Después de obtener a la proteína renaturalizada se separó la fracción insoluble de la fracción soluble, ésta última se incubó con resina de glutatión sefarosa toda la noche a 4°C. Luego se hicieron dos lavados a la resina cada uno con 10 ml de amortiguador PBS pH 7.3 y la proteína se eluyó con amortiguador PBS pH 7.3 con Tris-HCl 50 mM pH 8 y 10 mM de glutatión reducido (**Figura 29**).

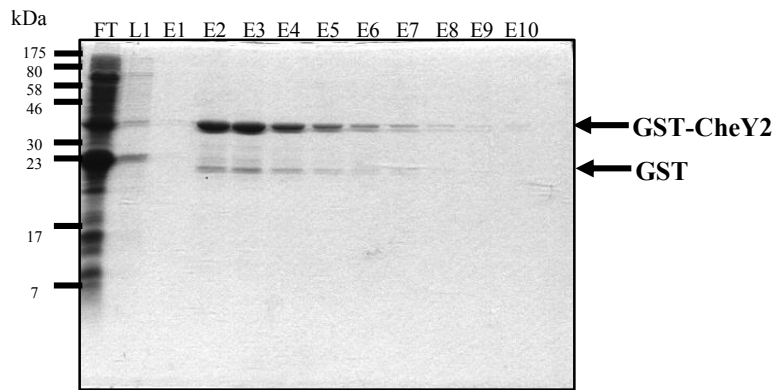


Figura 29. Purificación de GST-CheY2 en condiciones desnaturizantes. Se muestra una fracción de las proteínas que no se unieron a la resina (Ft) así como una fracción de un lavado a la resina con amortiguador PBS pH 7.3 y fracciones de las eluciones de la proteína una vez que se agregaron Tris-HCl 50 mM pH 8 y glutatión 10 mM.

Con el objetivo de determinar si una vez renaturalizada y purificada la fusión GST-CheY2 adquirió elementos de estructura secundaria que sugirieran un correcto plegamiento se realizó un ensayo de dicroísmo circular (**Figura 30**). Los datos obtenidos en miligrados muestran un patrón típico de contenido de estructura secundaria, lo cual sugiere que la proteína se encuentra bien plegada.

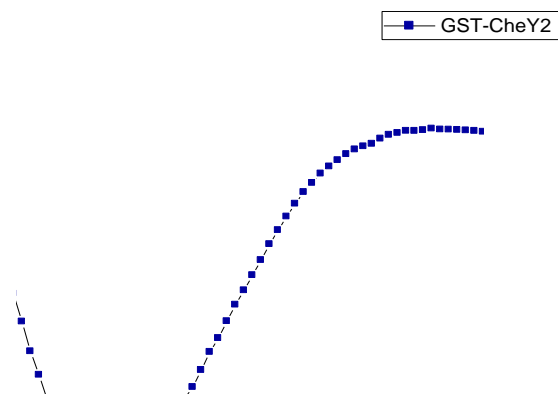


Figura 30. Gráfico obtenido a partir de los datos del ensayo de dicroísmo circular de GST-CheY2 purificada en condiciones desnaturizantes.

Digestión de la fusión GST-CheY2 con la enzima trombina y su remoción

Tras la obtención de la fusión purificada, se prosiguió a intentar separar a la fusión en las proteínas GST y CheY2 mediante la proteasa trombina. Para ello se incubó la fusión, previamente dializada en amortiguador PBS pH 7.3, con 1 μ l de trombina a 22°C durante 3 horas (**Figura 31**). Con este ensayo se determinó que entre las 2 y 3 horas de incubación se obtiene la mayor cantidad de CheY2 a pesar de que desde la primera hora de incubación con la enzima ya no se observa fusión GST-CheY2.

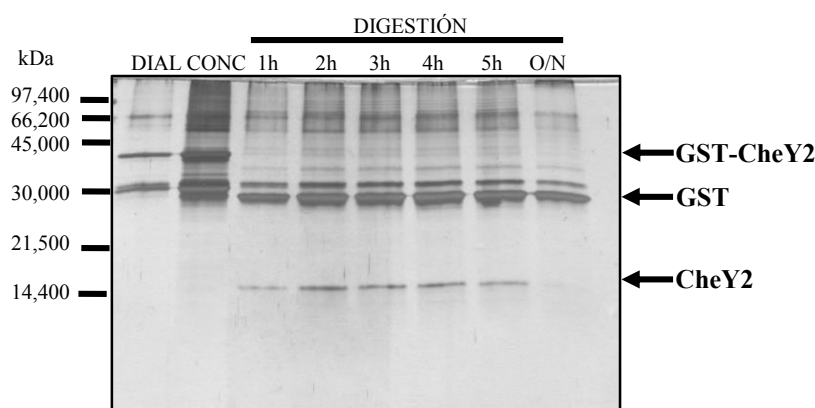


Figura 31. Curva temporal de digestión con la enzima de corte trombina. Gel SDS-PAGE 17.5% teñido con plata. En el gel se muestra una fracción de la proteína dializada y una fracción de la proteína concentrada que posteriormente fue digerida con trombina y de la cual se muestran alícuotas a distintos tiempos.

Remoción de la trombina utilizando perlas de benzamidina

Una vez que se determinó el tiempo en el que obteníamos la mayor cantidad de CheY2, se prosiguió a remover a la trombina utilizando una resina de benzamidina (**Figura 32**). Para ello, una vez digerida la fusión GST-CheY2 durante 2.5 horas con 1 μ l de trombina, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con 20 μ l de perlas de benzamidina. Luego, se centrifugó para precipitar las perlas y quedarnos con la fracción soluble.

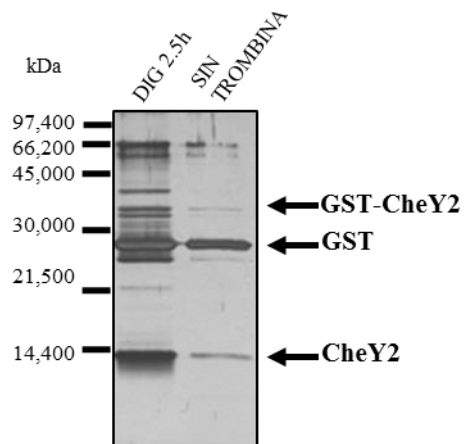


Figura 32. Curva de digestión en el tiempo con la enzima de corte trombina. Gel SDS-PAGE 17.5% teñido con plata. Se muestra una fracción de la proteína digerida durante 2.5 horas a 22°C y una fracción de la proteína después de haber retirado la trombina con las perlas de benzamidina.

Como se puede observar, después de retirar la trombina sigue habiendo una degradación tanto de la poca fusión que permanecía luego de digerir durante 2.5 horas, así como de la proteína CheY2 libre. Estos resultados sugieren que la enzima de corte no se retiró por completo y que luego de cierto tiempo comienza a degradar incluso a la proteína CheY2. Una segunda interpretación sugeriría que una vez liberada la CheY2, esta pudiera ser muy inestable y comenzara a degradarse por sí sola.

Fosfotransferencia *in vitro* de CheA1 a la fusión GST-CheY2 parcialmente digerida

Debido a los resultados negativos obtenidos con la fusión GST-CheY2 y a pesar de que se intentó mejorar las condiciones para poder retirar la enzima de corte trombina, no se obtuvieron resultados satisfactorios, por ello se decidió transfosforilar a la proteína, una vez que esta se digirió por 2.5 horas (**Figura 33**). Se siguió el mismo protocolo de fosfotransferencia descrito previamente para CheY1 y CheY5. Esta vez no sólo se encontraba presente el regulador de respuesta CheY2, además estaban la GST liberada (incapaz de fosforilarse, por lo tanto no se observa en la placa), así como un primer producto de corte de la fusión GST-CheY2, que incrementa su fosforilación en el tiempo (por el peso molecular

sabemos que no es la fusión la que está siendo fosforilada ya que este nuevo producto migra más abajo que la fusión GST-CheY2).

Debido a que la fusión ya digerida no fue sometida a una remoción de la trombina, esta enzima de corte también se encontraba presente (esta enzima no es capaz de fosforilarse por lo tanto tampoco se observa en la placa).

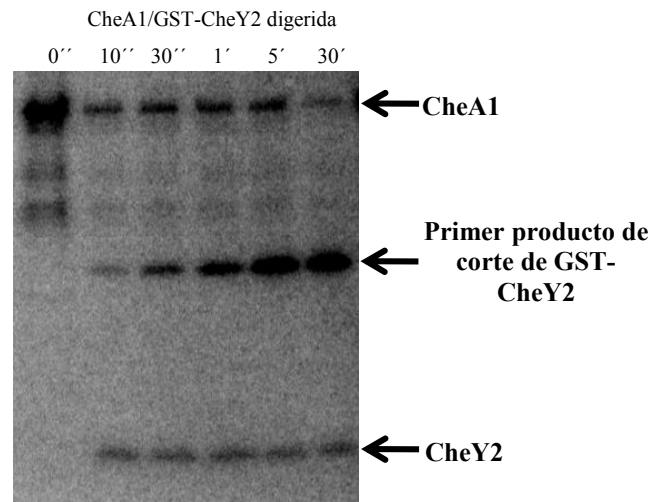


Figura 33. Fosfotransferencia *in vitro* con $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ de CheA1 a CheY2 a partir de la fusión GST-CheY2 previamente digerida. Placa de fosfoimagen, muestra la transfosforilación a distintos tiempos de la proteína CheA1 a CheY2 así como la transfosforilación de un producto de corte intermedio de la fusión GST-CheY2.

Inducción de CheY2 en la cepa M15 [pREP4]

Si bien, el poder transfosforilar a la proteína CheY2 fue un resultado alentador, el trabajar con esta mezcla de proteínas en solución (producto intermedio de corte de la fusión GST-CheY2, GST, CheY2 y trombina) iba a ser muy complicado y difícil de interpretar. Por ello, y a pesar de que antes ya se había intentado, se decidió purificar a la proteína CheY2 en condiciones desnaturalizantes. Esta proteína se sobreexpresa a partir del vector inducible pQE30, el cual agrega una etiqueta de histidinas.

Primero se establecieron las condiciones de la inducción (**Figura 34, panel A**); se realizaron curvas de inducción a 37°C con 1 mM de IPTG (dato no mostrado) y a la misma

temperatura con 0.1 mM de IPTG. Una vez realizado esto se rompió a las células por sonicación y se centrifugaron para posteriormente analizar la fracción insoluble y soluble para determinar en donde se encontraba la proteína (**Figura 34, panel B**).

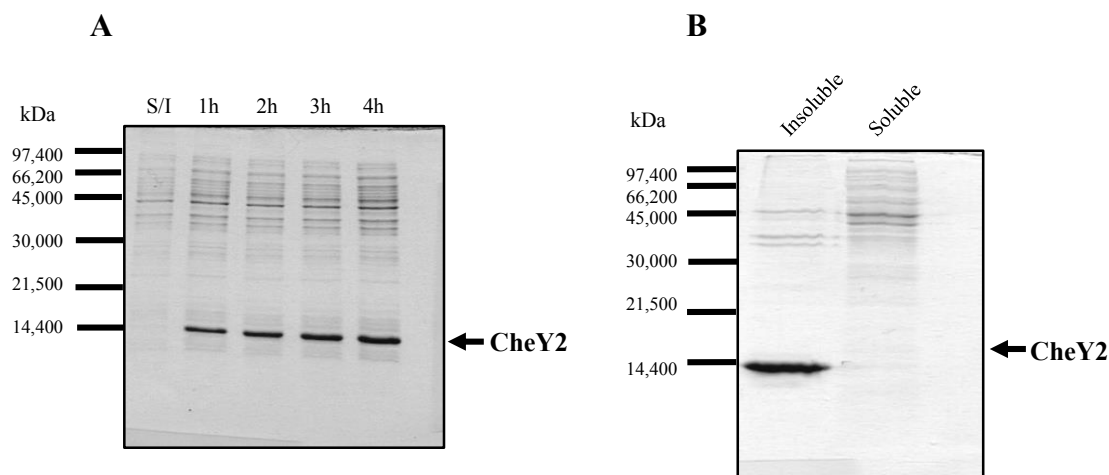


Figura 34. Geles SDS-PAGE 17.5% teñidos con azul de Coomassie. A) Cinética de Inducción del plásmido pMALc2x en la cepa TOP-10 con 1 mM de IPTG A 37°C. B) Cinética de inducción de la fusión MBP-CheY2 a partir de la construcción JM109 pMALc2x MBP-CheY2, se indujo con 0.1 mM de IPTG a 37°C. C) Análisis de solubilidad de la fusión MBP-CheY2 luego de inducir con 0.1 mM de IPTG a 37 °C durante 4 horas.

Con estos resultados se estableció el protocolo de sobreexpresión (descrito en los materiales y métodos) para posteriormente pasar a la purificación y finalmente a la renaturalización de la proteína. Cabe mencionar que se realizaron modificaciones como temperatura y concentración de IPTG al protocolo de inducción con el fin de obtener una pequeña fracción de la proteína soluble, sin embargo no fue posible obtenerla (dato no mostrado).

Purificación de CheY2 en condiciones desnaturalizantes

Una vez inducido el cultivo durante 1.5 horas con 0.1 mM de IPTG se rompieron las células y se centrifugaron. Luego, se recuperó la pastilla y se trató con el protocolo de lavado

de cuerpos de inclusión (Burgess, 2009). Se desnaturalizó a la proteína en amortiguador con urea 8 M; posteriormente se incubó a la proteína desnaturalizada con resina acoplada a níquel (Ni-NTA) y se purificó (**Figura 35**). En esta figura se puede observar que la proteína se purifica muy bien en cuanto a pureza y cantidad, por ello se prosiguió con la renaturalización.

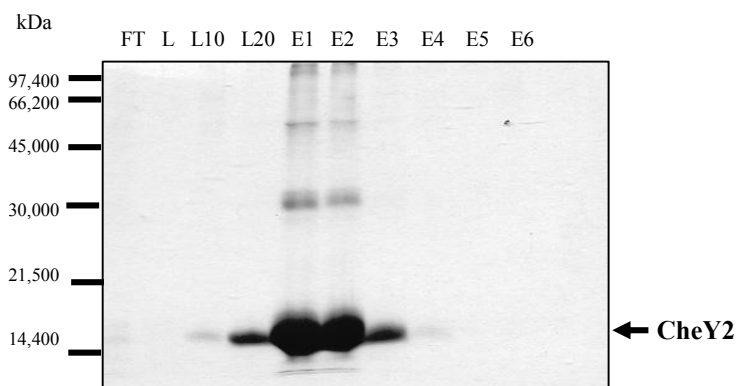


Figura 35. Purificación CheY2 en condiciones desnaturalizantes. Gel SDS-PAGE 17.5% teñido con azul de coomassie. Se observa la purificación de la proteína luego de incubar con la resina, se muestra una fracción de las proteínas que no se unieron a la resina (Ft), un la vado con amortiguador con Urea 8 M, lavados con amortiguador con Urea 8M adicionado con 10 mM y 20 mM de imidazol así como las eluciones de la proteína con 250 mM de imidazol.

Purificación de CheY2 en condiciones desnaturalizantes

Para la renaturalización se probaron distintos amortiguadores incluido el reportado para la purificación de la proteína CheY2 en su forma nativa (Porter *et al.*, 2006) (Martin *et al.*, 2001), sin embargo, no hubo resultados favorables. Luego de varias pruebas se estableció el siguiente amortiguador: Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, glicerol 10%, L-arginina 0.5 M pH 8. En estas condiciones la proteína se renaturalizó en su gran mayoría (**Figura 36**).

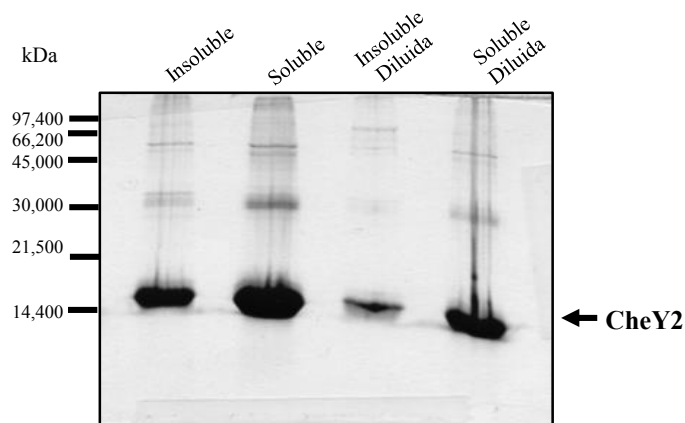


Figura 36. Purificación CheY2 en condiciones desnaturalizantes. Gel SDS-PAGE 17.5% teñido con azul de Coomassie. Se observa la purificación de la proteína luego de incubar con la resina, se muestra una fracción de las proteínas que no se unieron a la resina (Ft), un lavado con amortiguador con urea 8 M, lavados con amortiguador con urea 8 M adicionado con 10 mM y 20 mM de imidazol, así como las eluciones de la proteína con 250 mM de imidazol.

Como se puede observar, en este amortiguador, más del 50% de la proteína se encontró en la fracción soluble. Tal y como lo hicimos con la fusión GST-CheY2 decidimos diluir a la proteína 1:2 en amortiguador desnaturalizante para determinar, si del mismo modo que con esa proteína, la fracción soluble aumenta mientras que la insoluble disminuye. En el gel se observa que de hecho, hay un efecto al diluir a la proteína previa a la diálisis; se puede ver que la fracción insoluble disminuye, sin embargo, la fracción soluble no muestra un enriquecimiento significativo.

Después de obtener a la proteína renaturalizada, ésta se sometió a una nueva diálisis en el mismo amortiguador pero esta vez no se añadió L-arginina. Tras este procedimiento y al obtener a la proteína dializada se centrifugó y se analizó en un gel desnaturalizante de poliacrilamida 17.5%. En el gel se observó que la cantidad de proteína soluble se abatió drásticamente, quedando una fracción muy pobre en la fracción soluble. Posteriormente esta proteína se fosforiló *in vitro* con Ac^{32}P y tras varios intentos, la proteína fue incapaz de fosforilarse.

Estos resultados sugieren que aunque la proteína pudo renaturalizarse el plegamiento adquirido durante el proceso no fue el correcto y sólo en presencia de L-arginina se mantuvo esa aparente solubilidad.

Debido a todos los anteriores resultados negativos se decidió trabajar en la fusión MBP-CheY2 (**descrito previamente en la sección de resultados**).

REFERENCIAS

- Adler, J. (1975). Chemotaxis in bacteria. *Annu Rev Biochem* **44**, 341-356.
- Aizawa, S.I., Dean, G.E., Jones, C.J., Macnab, R.M. and Yamaguchi, S. (1985). Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **161**, 836-849.
- Alvarez, A.F. and Georgellis, D. (2010). In vitro and in vivo analysis of the ArcB/A redox signaling pathway. *Methods Enzymol* **471**, 205-228.
- Amin, D.N. and Hazelbauer, G.L. (2010). The chemoreceptor dimer is the unit of conformational coupling and transmembrane signaling. *J Bacteriol* **192**, 1193-1200.
- Appleby, J.L. and Bourret, R.B. (1998). Proposed signal transduction role for conserved CheY residue Thr87, a member of the response regulator active-site quintet. *J Bacteriol* **180**, 3563-3569.
- Aravind, L. and Ponting, C.P. (1999). The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol Lett* **176**, 111-116.
- Armitage, J.P. (2007) Bacterial Taxis. In *Encyclopedia Life Sciences*.
- Armitage, J.P. and Macnab, R.M. (1987). Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **169**, 514-518.
- Asakura, S. (1970). Polymerization of flagellin and polymorphism of flagella. *Adv Biophys* **1**, 99-155.
- Ausubel, F.M. (1987), R.E.K. R. Brent, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A., Smith, and K. Struhl (eds.).
John
Wiley & Sons, Inc. N.Y., Current Protocols in Molecular Biology. New York
- Baker, M.D., Wolanin, P.M. and Stock, J.B. (2006). Signal transduction in bacterial chemotaxis. *Bioessays* **28**, 9-22.

- Barak, R. and Eisenbach, M. (2001). Acetylation of the response regulator, CheY, is involved in bacterial chemotaxis. *Mol Microbiol* **40**, 731-743.
- Barak, R., Yan, J., Shainskaya, A. and Eisenbach, M. (2006). The chemotaxis response regulator CheY can catalyze its own acetylation. *J Mol Biol* **359**, 251-265.
- Bardy, S.L., Ng, S.Y. and Jarrell, K.F. (2003). Prokaryotic motility structures. *Microbiology* **149**, 295-304.
- Berg, H.C. (2003). The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem* **72**, 19-54.
- Berg, H.C. and Brown, D.A. (1972). Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature* **239**, 500-504.
- Berg, H.C. and Tedesco, P.M. (1975). Transient response to chemotactic stimuli in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3235-3239.
- Bi, S. and Lai, L. (2015). Bacterial chemoreceptors and chemoeffectors. *Cell Mol Life Sci* **72**, 691-708.
- Bilwes, A.M., Alex, L.A., Crane, B.R. and Simon, M.I. (1999). Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* **96**, 131-141.
- Boukhvalova, M., VanBruggen, R. and Stewart, R.C. (2002). CheA kinase and chemoreceptor interaction surfaces on CheW. *J Biol Chem* **277**, 23596-23603.
- Bourret, R.B., Davagnino, J. and Simon, M.I. (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., Al-Mawsawi, L.Q., Kojima, S. and Blair, D.F. (2004). Arrangement of core membrane segments in the MotA/MotB proton-channel complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **43**, 35-45.
- Brown, P.N., Mathews, M.A., Joss, L.A., Hill, C.P. and Blair, D.F. (2005). Crystal structure of the flagellar rotor protein FliN from *Thermotoga maritima*. *J Bacteriol* **187**, 2890-2902.

- Brown, P.N., Terrazas, M., Paul, K. and Blair, D.F. (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.
- Burgess, R.R. (2009). Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods Enzymol* **463**, 259-282.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. and Hsu, L. (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.
- Delalez, N.J., Wadhams, G.H., Rosser, G., Xue, Q., Brown, M.T., Dobbie, I.M., *et al.* (2010). Signal-dependent turnover of the bacterial flagellar switch protein FliM. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11347-11351.
- DePamphilis, M.L. and Adler, J. (1971). Attachment of flagellar basal bodies to the cell envelope: specific attachment to the outer, lipopolysaccharide membrane and the cytoplasmic membrane. *J Bacteriol* **105**, 396-407.
- Djordjevic, S. and Stock, A.M. (1997). Crystal structure of the chemotaxis receptor methyltransferase CheR suggests a conserved structural motif for binding S-adenosylmethionine. *Structure* **5**, 545-558.
- Djordjevic, S. and Stock, A.M. (1998). Structural analysis of bacterial chemotaxis proteins: components of a dynamic signaling system. *J Struct Biol* **124**, 189-200.
- Erhardt, M., Namba, K. and Hughes, K.T. (2010). Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000299.
- Evans, L.D., Hughes, C. and Fraser, G.M. (2014). Building a flagellum in biological outer space. *Microb Cell* **1**, 64-66.
- Fernández, L.A. and Berenguer, J. (2000). Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 21-44.
- Ferré, A., De La Mora, J., Ballado, T., Camarena, L. and Dreyfus, G. (2004). Biochemical study of multiple CheY response regulators of the chemotactic pathway of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **186**, 5172-5177.

- Francis, N.R., Irikura, V.M., Yamaguchi, S., DeRosier, D.J. and Macnab, R.M. (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., Sosinsky, G.E., Thomas, D. and DeRosier, D.J. (1994). Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J Mol Biol* **235**, 1261-1270.
- Fujii, T., Kato, T. and Namba, K. (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.
- Griswold, I.J. and Dahlquist, F.W. (2002). The dynamic behavior of CheW from *Thermotoga maritima* in solution, as determined by nuclear magnetic resonance: implications for potential protein-protein interaction sites. *Biophys Chem* **101-102**, 359-373.
- Hao, S., Hamel, D., Zhou, H. and Dahlquist, F.W. (2009). Structural basis for the localization of the chemotaxis phosphatase CheZ by CheAS. *J Bacteriol* **191**, 5842-5844.
- Hazelbauer, G.L., Falke, J.J. and Parkinson, J.S. (2008). Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem Sci* **33**, 9-19.
- Henrichsen, J. (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* **36**, 478-503.
- Hirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K. and Aizawa, S. (1994). Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**, 5439-5449.
- Hirota, N. and Imae, Y. (1983). Na⁺-driven flagellar motors of an alkalophilic *Bacillus* strain YN-1. *J Biol Chem* **258**, 10577-10581.
- Homma, M. and Iino, T. (1985). Locations of hook-associated proteins in flagellar structures of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **162**, 183-189.
- Homma, M., Kutsukake, K., Hasebe, M., Iino, T. and Macnab, R.M. (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.

- Jarrell, K.F. and McBride, M.J. (2008). The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol* **6**, 466-476.
- Jones, C.J., Homma, M. and Macnab, R.M. (1989). L-, P-, and M-ring proteins of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*: gene sequences and deduced protein sequences. *J Bacteriol* **171**, 3890-3900.
- Jones, C.J., Macnab, R.M., Okino, H. and Aizawa, S. (1990). Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **212**, 377-387.
- Jurica, M.S. and Stoddard, B.L. (1998). Mind your B's and R's: bacterial chemotaxis, signal transduction and protein recognition. *Structure* **6**, 809-813.
- Kamiya, R., Asakura, S. and Yamaguchi, S. (1980). Formation of helical filaments by copolymerization of two types of 'straight' flagellins. *Nature* **286**, 628-630.
- Kihara, M., Miller, G.U. and Macnab, R.M. (2000). Deletion analysis of the flagellar switch protein FliG of *Salmonella*. *J Bacteriol* **182**, 3022-3028.
- Kim, C., Jackson, M., Lux, R. and Khan, S. (2001). Determinants of chemotactic signal amplification in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **307**, 119-135.
- Kojima, S. and Blair, D.F. (2004). The bacterial flagellar motor: structure and function of a complex molecular machine. *Int Rev Cytol* **233**, 93-134.
- Koshland, D.E. (1981). Biochemistry of sensing and adaptation in a simple bacterial system. *Annu Rev Biochem* **50**, 765-782.
- Koshland, D.E. (1988). Chemotaxis as a model second-messenger system. *Biochemistry* **27**, 5829-5834.
- Krell, T., Lacal, J., Muñoz-Martínez, F., Reyes-Darias, J.A., Cadirci, B.H., García-Fontana, C. and Ramos, J.L. (2011). Diversity at its best: bacterial taxis. *Environ Microbiol* **13**, 1115-1124.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lazcano-Araujo, A. (1989) El origen de la vida: evolución química y evolución biológica, 3a edición, Trillas, México.p.p 107, p 79.

- Lee, S.Y., Cho, H.S., Pelton, J.G., Yan, D., Berry, E.A. and Wemmer, D.E. (2001). Crystal structure of activated CheY. Comparison with other activated receiver domains. *J Biol Chem* **276**, 16425-16431.
- Li, J., Swanson, R.V., Simon, M.I. and Weis, R.M. (1995). The response regulators CheB and CheY exhibit competitive binding to the kinase CheA. *Biochemistry* **34**, 14626-14636.
- Lloyd, S.A. and Blair, D.F. (1997). Charged residues of the rotor protein FliG essential for torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **266**, 733-744.
- Lukat, G.S., Lee, B.H., Mottonen, J.M., Stock, A.M. and Stock, J.B. (1991). Roles of the highly conserved aspartate and lysine residues in the response regulator of bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* **266**, 8348-8354.
- Macnab, R.M. (1976). Examination of bacterial flagellation by dark-field microscopy. *J Clin Microbiol* **4**, 258-265.
- 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. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annual review of microbiology* **57**, 77-100.
- Macnab, R.M. and Ornston, M.K. (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.
- Maki-Yonekura, S., Yonekura, K. and Namba, K. (2010). Conformational change of flagellin for polymorphic supercoiling of the flagellar filament. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 417-422.
- Martin, A.C., Wadhams, G.H., Shah, D.S., Porter, S.L., Mantotta, J.C., Craig, T.J., *et al.* (2001). CheR- and CheB-dependent chemosensory adaptation system of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **183**, 7135-7144.
- Martinez-del Campo, A., Ballado, T., Camarena, L. and Dreyfus, G. (2011). In *Rhodobacter sphaeroides*, chemotactic operon 1 regulates rotation of the flagellar system 2. *Journal of bacteriology* **193**, 6781-6786.

- McBride, M.J. (2001). Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annual review of microbiology* **55**, 49-75.
- McMurry, J.L., Murphy, J.W. and González-Pedrajo, B. (2006). The FliN-FliH interaction mediates localization of flagellar export ATPase FliI to the C ring complex. *Biochemistry* **45**, 11790-11798.
- Mimori-Kiyosue, Y., Vonderviszt, F., Yamashita, I., Fujiyoshi, Y. and Namba, K. (1996). Direct interaction of flagellin termini essential for polymorphic ability of flagellar filament. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15108-15113.
- Minamino, T., Imada, K. and Namba, K. (2008a). Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly. *Mol Biosyst* **4**, 1105-1115.
- Minamino, T., Imada, K. and Namba, K. (2008b). Molecular motors of the bacterial flagella. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 693-701.
- Minamino, T., Yamaguchi, S. and Macnab, R.M. (2000). Interaction between FliE and FlgB, a proximal rod component of the flagellar basal body of *Salmonella*. *J Bacteriol* **182**, 3029-3036.
- Morimoto, Y.V. and Minamino, T. (2014). Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor. *Biomolecules* **4**, 217-234.
- Nallamsetty, S. and Waugh, D.S. (2006). Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role in the folding of their fusion partners. *Protein Expr Purif* **45**, 175-182.
- Nishiyama, S., Garzón, A. and Parkinson, J.S. (2014). Mutational analysis of the P1 phosphorylation domain in *Escherichia coli* CheA, the signaling kinase for chemotaxis. *J Bacteriol* **196**, 257-264.
- O'Connor, C., Matsumura, P. and Campos, A. (2009). The CheZ binding interface of CheAS is located in alpha-helix E. *J Bacteriol* **191**, 5845-5848.
- Ohnishi, K., Ohto, Y., Aizawa, S., Macnab, R.M. and Iino, T. (1994). FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**, 2272-2281.

- Oosawa, K. and Imae, Y. (1983). Glycerol and ethylene glycol: members of a new class of repellents of *Escherichia coli* chemotaxis. *J Bacteriol* **154**, 104-112.
- Oosawa, K., Ueno, T. and Aizawa, S. (1994). Overproduction of the bacterial flagellar switch proteins and their interactions with the MS ring complex in vitro. *J Bacteriol* **176**, 3683-3691.
- Parkinson, J.S., Hazelbauer, G.L. and Falke, J.J. (2015). Signaling and sensory adaptation in *Escherichia coli* chemoreceptors: 2015 update. *Trends Microbiol* **23**, 257-266.
- Patrick, J.E. and Kearns, D.B. (2012). Swarming motility and the control of master regulators of flagellar biosynthesis. *Mol Microbiol* **83**, 14-23.
- Paul, K., Brunstetter, D., Titen, S. and Blair, D.F. (2011). A molecular mechanism of direction switching in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 17171-17176.
- Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**, 346-356.
- Porter, S.L. and Armitage, J.P. (2002). Phosphotransfer in *Rhodobacter sphaeroides* chemotaxis. *J Mol Biol* **324**, 35-45.
- Porter, S.L., Wadhams, G.H. and Armitage, J.P. (2007). In vivo and in vitro analysis of the *Rhodobacter sphaeroides* chemotaxis signaling complexes. *Methods Enzymol* **423**, 392-413.
- Porter, S.L., Wadhams, G.H. and Armitage, J.P. (2011). Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nat Rev Microbiol* **9**, 153-165.
- Porter, S.L., Wadhams, G.H., Martin, A.C., Byles, E.D., Lancaster, D.E. and Armitage, J.P. (2006). The CheYs of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Biol Chem* **281**, 32694-32704.
- Ravid, S. and Eisenbach, M. (1984). Minimal requirements for rotation of bacterial flagella. *J Bacteriol* **158**, 1208-1210.
- Reid, S.W., Leake, M.C., Chandler, J.H., Lo, C.J., Armitage, J.P. and Berry, R.M. (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.

- Samatey, F.A., Matsunami, H., Imada, K., Nagashima, S., Shaikh, T.R., Thomas, D.R., *et al.* (2004). Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. *Nature* **431**, 1062-1068.
- Scott, K.A., Porter, S.L., Bagg, E.A., Hamer, R., Hill, J.L., Wilkinson, D.A. and Armitage, J.P. (2010). Specificity of localization and phosphotransfer in the CheA proteins of *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **76**, 318-330.
- Segall, J.E., Block, S.M. and Berg, H.C. (1986). Temporal comparisons in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8987-8991.
- Shaikh, T.R., Thomas, D.R., Chen, J.Z., Samatey, F.A., Matsunami, H., Imada, K., *et al.* (2005). A partial atomic structure for the flagellar hook of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1023-1028.
- Silverman, M. and Simon, M. (1974). Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature* **249**, 73-74.
- Silversmith, R.E. (2010). Auxiliary phosphatases in two-component signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **13**, 177-183.
- Simms, S.A., Keane, M.G. and Stock, J. (1985). Multiple forms of the CheB methyltransferase in bacterial chemosensing. *J Biol Chem* **260**, 10161-10168.
- Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- Sourjik, V. and Schmitt, R. (1998). Phosphotransfer between CheA, CheY1, and CheY2 in the chemotaxis signal transduction chain of *Rhizobium meliloti*. *Biochemistry* **37**, 2327-2335.
- Sourjik, V. and Wingreen, N.S. (2012). Responding to chemical gradients: bacterial chemotaxis. *Curr Opin Cell Biol* **24**, 262-268.
- Stadtman, E.R. (1957) Preparation and assay of acetylphosphate. *Methods Enzymology*, pp. 228-231.
- Stallmeyer, M.J., Aizawa, S., Macnab, R.M. and DeRosier, D.J. (1989). Image reconstruction of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **205**, 519-528.

- Stock, A., Chen, T., Welsh, D. and Stock, J. (1988). CheA protein, a central regulator of bacterial chemotaxis, belongs to a family of proteins that control gene expression in response to changing environmental conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 1403-1407.
- Stock, D., Namba, K. and Lee, L.K. (2012). Nanorotors and self-assembling macromolecular machines: the torque ring of the bacterial flagellar motor. *Curr Opin Biotechnol* **23**, 545-554.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-130.
- Surette, J.B.S.a.M.G. (1996) Chemotaxis. In *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology, F.C. Neidhardt (ed.) second edn. Washington, D.C., pp. 3000.
- Terahara, N., Sano, M. and Ito, M. (2012). A *Bacillus* flagellar motor that can use both Na⁺ and K⁺ as a coupling ion is converted by a single mutation to use only Na⁺. *PLoS One* **7**, e46248.
- Terashima, H., Kojima, S. and Homma, M. (2008). Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Int Rev Cell Mol Biol* **270**, 39-85.
- Thomas, D.R., Morgan, D.G. and DeRosier, D.J. (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.
- Thormann, K.M. and Paulick, A. (2010). Tuning the flagellar motor. *Microbiology* **156**, 1275-1283.
- Tsang, J. and Hoover, T.R. (2014). Themes and Variations: Regulation of RpoN-Dependent Flagellar Genes across Diverse Bacterial Species. *Scientifica (Cairo)* **2014**, 681754.
- Ueno, T., Oosawa, K. and Aizawa, S. (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.
- Vladimirov, N. and Sourjik, V. (2009). Chemotaxis: how bacteria use memory. *Biol Chem* **390**, 1097-1104.
- Vonderviszt, F., Aizawa, S. and Namba, K. (1991). Role of the disordered terminal regions of flagellin in filament formation and stability. *J Mol Biol* **221**, 1461-1474.
- Vonderviszt, F., Kanto, S., Aizawa, S. and Namba, K. (1989). Terminal regions of flagellin are disordered in solution. *J Mol Biol* **209**, 127-133.

- Vu, A., Wang, X., Zhou, H. and Dahlquist, F.W. (2012). The receptor-CheW binding interface in bacterial chemotaxis. *J Mol Biol* **415**, 759-767.
- Wadhams, G.H. and Armitage, J.P. (2004). Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 1024-1037.
- Wang, H. and Matsumura, P. (1996). Characterization of the CheAS/CheZ complex: a specific interaction resulting in enhanced dephosphorylating activity on CheY-phosphate. *Mol Microbiol* **19**, 695-703.
- Wang, X., Vu, A., Lee, K. and Dahlquist, F.W. (2012). CheA-receptor interaction sites in bacterial chemotaxis. *J Mol Biol* **422**, 282-290.
- Watari, N. and Larson, R.G. (2010). The hydrodynamics of a run-and-tumble bacterium propelled by polymorphic helical flagella. *Biophys J* **98**, 12-17.
- Welch, M., Oosawa, K., Aizawa, S. and Eisenbach, M. (1993). Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8787-8791.
- Wessel, D. and Flugge, U.I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical biochemistry* **138**, 141-143.
- West, A.H., Martinez-Hackert, E. and Stock, A.M. (1995). Crystal structure of the catalytic domain of the chemotaxis receptor methylesterase, CheB. *J Mol Biol* **250**, 276-290.
- Wuichet, K. and Zhulin, I.B. (2010). Origins and diversification of a complex signal transduction system in prokaryotes. *Sci Signal* **3**, ra50.
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. and Homma, M. (2011). Structure of the flagellar motor protein complex PomAB: implications for the torque-generating conformation. *J Bacteriol* **193**, 3863-3870.
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. and Namba, K. (2002). Growth mechanism of the bacterial flagellar filament. *Res Microbiol* **153**, 191-197.
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. and Namba, K. (2003). Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* **424**, 643-650.

- Yorimitsu, T., Mimaki, A., Yakushi, T. and Homma, M. (2003). The conserved charged residues of the C-terminal region of FliG, a rotor component of the Na⁺-driven flagellar motor. *J Mol Biol* **334**, 567-583.
- Zhao, J. and Parkinson, J.S. (2006). Mutational analysis of the chemoreceptor-coupling domain of the *Escherichia coli* chemotaxis signaling kinase CheA. *J Bacteriol* **188**, 3299-3307.
- Zhao, R., Amsler, C.D., Matsumura, P. and Khan, S. (1996). FliG and FliM distribution in the *Salmonella typhimurium* cell and flagellar basal bodies. *J Bacteriol* **178**, 258-265.
- Zhao, R., Collins, E.J., Bourret, R.B. and Silversmith, R.E. (2002). Structure and catalytic mechanism of the *E. coli* chemotaxis phosphatase CheZ. *Nat Struct Biol* **9**, 570-575.
- Zhao, X., Norris, S.J. and Liu, J. (2014). Molecular architecture of the bacterial flagellar motor in cells. *Biochemistry* **53**, 4323-4333.
- Zhao, X., Zhang, K., Boquoi, T., Hu, B., Motaleb, M.A., Miller, K.A., *et al.* (2013). Cryoelectron tomography reveals the sequential assembly of bacterial flagella in *Borrelia burgdorferi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 14390-14395.
- Zhou, J., Lloyd, S.A. and Blair, D.F. (1998). Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6436-6441.
- Zhu, X., Amsler, C.D., Volz, K. and Matsumura, P. (1996). Tyrosine 106 of CheY plays an important role in chemotaxis signal transduction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**, 4208-4215.