



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Identificación de los elementos regulatorios en *cis* y en *trans*
que modulan la expresión de los genes flagelares *fla2* de
*Rhodobacter sphaeroides***

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

PRESENTA:
BIOL. ANET RIVERA OSORIO

DIRECTOR DE TESIS
DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR
DR. GEORGES DREYFUS CORTÉS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DR. ROBERTO CORIA ORTEGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO 2022



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.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Este estudio es parte de los requisitos para obtener el grado de Doctor de **Anet Rivera Osorio (Doctorado en Ciencias Biomédicas UNAM)**, y se contó con el apoyo de la beca de **CONACyT 239738**.

Este trabajo se desarrolló en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, en el Departamento de Biología Molecular bajo la asesoría de la Dra. Rosa Laura Camarena.

Este trabajo se desarrolló en diferentes momentos gracias al apoyo de los donativos **DGAPA-UNAM (PAPIIT IN204317, IG200420)** y del **CONACyT (CB2014-235996)**.

A mi tutora la Dra. Rosa Laura Camarena Mejía, por ser ejemplo, por ser guía por escucharme y por aferrarse siempre a sacar lo mejor de nosotros sus estudiantes, gracias por que gracias a ti soy quien soy.

A mi comité tutorial, el Dr. George Dreyfus Cortés y el Dr. Roberto Coria Ortega, gracias a sus comentarios y sugerencias, este trabajo salió adelante. Gracias por siempre tener mucho que aportar durante la realización de este proyecto.

ÍNDICE

Resumen	pág. 5
Abstract	pág. 6
Introducción	pág. 9
• El flagelo bacteriano	
• Regulación genética del flagelo bacteriano	
• <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	
• Regulación genética de los genes flagelares de <i>R. sphaeroides</i>	
• Regulación genética de los genes dependientes de CtrA	
Objetivo general	pág. 42
Objetivos particulares	pág. 42
Material y Métodos	pág. 43
• Cepas y plásmidos	
• Medios y condiciones de crecimiento	
• Reactivos	
• Identificación de los sitios de unión de CtrA	
• Técnicas de biología molecular	
○ Aislamiento de la cepa mutante AR1	
○ Fusión de los promotores flagelares al gen reportero <i>uidA</i>	
○ Ensayo de β -glucuronidasa	
○ Mutagénesis dirigida	
○ Búsqueda de los sitios de inicio de la transcripción mediante 5'-RACE (5' rapid amplification of cDNA ends)	

- Purificación de His6X-CtrA y producción de anticuerpos
- Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)
- PCR semicuantitativa

Resultados pág. 53

- Construcción de plásmidos reporteros que contienen seleccionados promotores *fla2*
- Determinación del sitio de inicio de la transcripción de los genes *fliL2p*, *fliF2p*, *flgB2p*, *fliI2p* y *flgE2p*
- Mutagénesis dirigida de los promotores *fla2*
- Unión de CtrA a los promotores *flgB2p* y *fliI2p*
- Análisis de la región intercistrica de *flgB-fliI* en otras α -proteobacterias

Discusión pág. 68

Conclusiones pág. 72

Anexo 1 pág. 73

Referencias..... pág. 74

RESUMEN

Rhodobacter sphaeroides es una α -proteobacteria púrpura, no sulfurosa, fotótrofa facultativa, fijadora de nitrógeno con potenciales aplicaciones en áreas como la biotecnología y la biosíntesis de compuestos de interés médico e industrial. En esta bacteria se han descrito dos sistemas genéticos flagelares, Fla1 y Fla2, los cuales son responsables de la síntesis de dos estructuras flagelares diferentes. La expresión de los genes *fla2* está bajo el control del regulador transcripcional CtrA. En otras especies de α -proteobacterias se ha descrito que CtrA es indispensable para la expresión de los genes flagelares; sin embargo, la arquitectura de los promotores dependientes de CtrA solo se ha estudiado a detalle en *Caulobacter crescentus*. En muchos casos la expresión de los genes *fla*, se origina a partir de promotores divergentes separados por una pocas pares de bases, lo que podría sugerir una disposición particular de los sitios regulatorios que actúan en *cis*.

En este trabajo, caracterizamos varias regiones regulatorias de los genes *fla2* de *R. sphaeroides* y particularmente estudiamos dos regiones que contienen los promotores divergentes *flgB2p-fliI2p* y *fliL2p-fliF2p*. Los sitios de unión para CtrA de estos promotores se identificaron *in silico* y se probaron mediante experimentos de mutagénesis dirigida. Los resultados de estos estudios nos llevaron a concluir que cada una de las regiones promotoras estudiadas tiene una disposición particular la cual puede contener un único sitio de unión para CtrA, como en el caso de la activación de los genes *fliL2p* y *fliF2p*, o bien, dos sitios de unión independientes para la activación de *flgB2p* y *fliI2p*. Además, experimentos de inmunoprecipitación

de la cromatina (ChIP) confirmaron que CtrA se une a la región de control que contiene los promotores *flgB2* y *fliI2*, reforzando la idea de que CtrA regula directamente la expresión de los genes *fla2*.

Los genes *flgB* y *fliI* son sinténicos y muestran una región intercistrónica corta en especies bacterianas estrechamente relacionadas. Al analizar estas regiones se encontró que el número y la disposición de los sitios de unión de CtrA varía, consistente con la propuesta de que la activación mediada por CtrA promueve la activación transcripcional en más de una arquitectura.

ABSTRACT

Rhodobacter sphaeroides is a purple, non-sulfur, facultative phototrophic, nitrogen-fixing α -proteobacterium with potential applications in areas such as biotechnology and the biosynthesis of compounds of medical and industrial interest. Two flagellar genetic systems have been described in this bacterium, Fla1 and Fla2, which are responsible for the synthesis of two different flagellar structures. The expression of the *fla2* genes is under the control of the transcriptional regulator CtrA. In other species of α -proteobacteria, it has been described that CtrA is essential for the expression of flagellar genes; however, the architecture of CtrA-dependent promoters has only been studied in detail in *Caulobacter crescentus*. In many cases, the expression of *fla* genes originates from divergent promoters separated by a few base pairs, which could suggest a particular arrangement of cis-acting regulatory sites.

In this work, we characterize several regulatory regions of the *fla2* genes of *R. sphaeroides* and particularly we study two regions that contain the divergent promoters *flgB2p-flil2p* and *fliL2p-fliF2p*. The CtrA binding sites of these promoters were identified in silico and tested by site-directed mutagenesis experiments. The results of these studies led us to conclude that each of the promoter regions studied has a particular arrangement which may contain a single binding site for CtrA, as in the case of the activation of the *fliL2* and *fliF2* genes, or else, two independent binding sites for activation of *flgB2* and *flil2*. Furthermore, chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments confirmed that CtrA binds to the control

region containing the *flgB2* and *fliI2* promoters, reinforcing the idea that CtrA directly regulates the expression of *fla2* genes.

The *flgB* and *fliI* genes are syntenic and show a short intercistronic region in closely related bacterial species. Analyzing these regions, it was found that the number and arrangement of CtrA binding sites vary, consistent with the proposal that CtrA-mediated activation promotes transcriptional activation in more than one architecture.

INTRODUCCIÓN

El nado bacteriano mediado por flagelo representa una estrategia eficiente que permite el desplazamiento de la célula tanto en medios líquidos como en ambientes semisólidos o viscosos; en este último caso, el flagelo favorece la colonización de ciertas superficies como la mucosa intestinal u otros sustratos (1-4).

El flagelo es un complejo multi proteico que funciona gracias a un motor rotatorio impulsado por el potencial electroquímico (5-7). Dependiendo de la especie el número y posición de los flagelos puede variar, siendo los patrones de flagelación monótricos (un solo flagelo), lofótricos (varios flagelos en uno de los polos), anfítricos (uno o varios flagelos en ambos polos) y perítricos (varios flagelos distribuidos a todo lo largo del cuerpo celular) (8). La importancia del flagelo en la supervivencia de las bacterias en diferentes ambientes, en el establecimiento y el desarrollo de relaciones interespecíficas (por ejemplo, como factor de virulencia o promotor de relaciones simbióticas) y también como un modelo para la caracterización de un motor molecular complejo han favorecido su estudio en los diferentes aspectos que atañen a su síntesis, ensamblaje, funcionamiento y regulación.

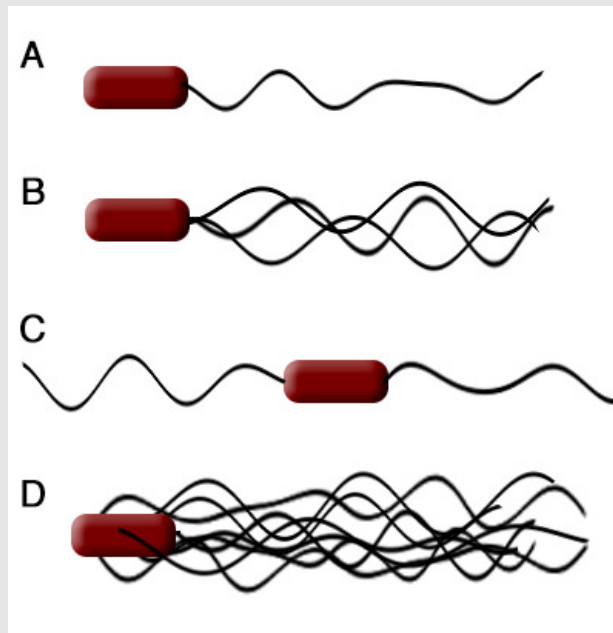


Figura 1. Patrones de flagelación en bacterias. A. monótricos, B. lofótricos, C. anfítricos, y D. perítricos.

El flagelo bacteriano

Estructuralmente, el flagelo bacteriano es una compleja máquina molecular compuesta por tres partes: el cuerpo basal, que contiene el motor molecular y las proteínas estructurales necesarias para sostener la estructura del flagelo; el filamento que es una hélice extracelular cuya rotación impulsa el cuerpo celular; y una estructura conocida como gancho o acoplamiento universal, que es la parte que transmite el torque generado en el motor y une el cuerpo basal con el filamento (9, 10) (Figura 2).

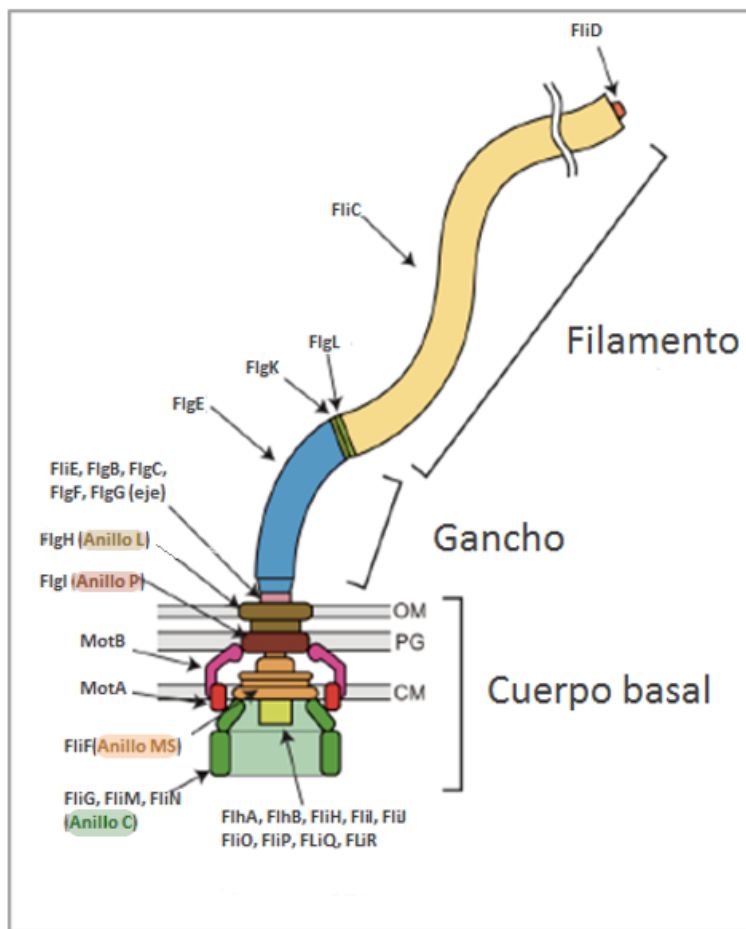


Figura 2. Esquema general de la estructura flagelar presente en *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*. Modificado de (10).

El cuerpo basal es la estructura más compleja del flagelo, se extiende desde la membrana interna hasta la membrana externa y dependiendo de la especie bacteriana, consta de tres o más anillos y un eje axial; el cuerpo basal incluye el rotor y el aparato de exportación flagelar. En la mayoría de las bacterias Gram negativas el cuerpo basal incluye cuatro anillos: MS, C, L, y P (Figura 2).

El anillo MS se ensambla en la membrana interna a partir de 34 subunidades de la proteína FliF, la cual posee dos cruces transmembranales (11-14). Este anillo se expande desde el citoplasma hacia el periplasma, en donde sirve como base para la formación del eje; en la parte citoplásmica el anillo MS se asocia con las proteínas FliG, FliM y FliN que forman el anillo C y cuyas funciones principales son generar el torque y actuar como blanco de las proteínas del sistema quimiotáctico que controlan el patrón de rotación del motor (15, 16). Al centro del anillo MS se organiza el sistema de secreción flagelar que consta de varias proteínas membranales y de proteínas solubles (17) (Figura 2).

La parte periplásmica del anillo MS sirve como base para la formación del eje (18, 19) (Figura 3). El eje se expande en el espacio periplásmico, cruza la pared de peptidoglicano y alcanza la membrana externa. La formación del eje requiere de 5 proteínas que se ensamblan de forma secuencial formando un tubo hueco que en su cara interna apila las hélices NH₂ y COOH de las diferentes subunidades del eje (20, 21). En esta estructura 11 subunidades dan lugar a dos vueltas de la hélice que forma el eje, de este modo 6 subunidades de la proteína FliE son las primeras en ser ensambladas y estas contactan el anillo MS al igual que 5 subunidades de la proteína FlgB. Posteriormente, 6 y 5 subunidades de las proteínas FlgC y FlgF, respectivamente, completan el eje proximal. Finalmente, el eje distal se forma con 26 subunidades de la proteína FlgG que dan lugar a cuatro vueltas en la estructura que alcanza la membrana externa (22-24) (Figura 3).

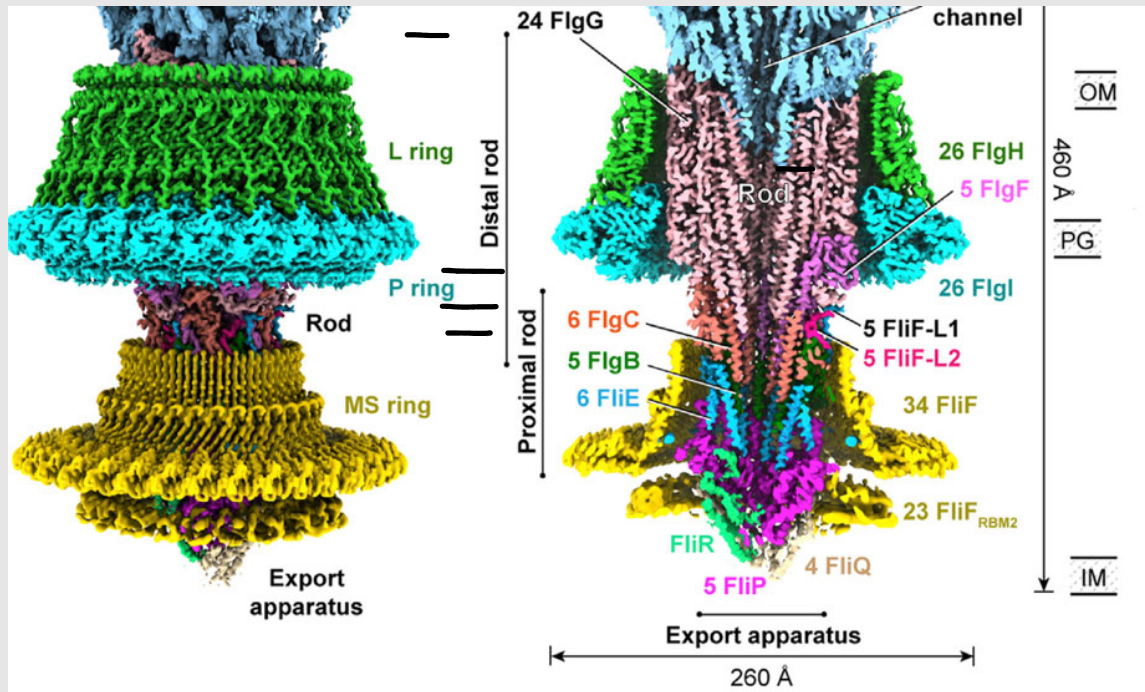


Figura 3. Estructura del cuerpo basal obtenida por criomicroscopía electrónica y reconstrucción de imágenes, refinada a 3.6 Å de resolución. A la derecha se muestra la vista de un corte longitudinal que revela el arreglo de diferentes subunidades dentro de las diferentes estructuras del cuerpo basal, la clave de colores se encuentra asociada al nombre de las proteínas, excepto en el caso de FlgG (eje distal) que el nombre se mantiene en negro en vez de estar en rosa. La extensión que cubre el eje proximal y el eje distal se muestra a la izquierda con una línea con dos puntas de flecha a cada lado. A la derecha: IM, membrana interna; PG, pared de peptidoglicano; OM, membrana externa. Se observan también el aparato de exportación y el anillo MS formado por subunidades de FliF. Tomado de (23).

Los anillos L y P formados por 26 subunidades de las proteínas FlgH y FlgI, respectivamente, rodean al eje y se postula que actúan como rodamientos o bujes que permiten la libre rotación del flagelo cuando éste cruza la membrana externa y la pared de peptidoglicano, respectivamente (25, 26). Ambas proteínas, a diferencia del resto de los componentes axiales, son exportados por el sistema general de secreción (27, 28).

La formación del anillo L requiere de la lipoproteína FlgH, la cual se inserta en la membrana externa formando un barril β de dos capas mientras que la región N-terminal de la proteína forma la superficie externa del anillo L, y en su parte distal forma la región inferior del anillo que contacta la parte superior del anillo P.

La proteína FlgI adopta una estructura de V y forma un anillo con tres subregiones distintivas, la región interna superior e inferior (o subanillos superior e inferior) y la región externa (subanillo exterior) (23, 29) (Figura 4). Debido al parecido estructural de la región externa de anillo P con otras proteínas periplásmicas que interactúan con la capa de peptidoglicanos (*v. gr.* InvG, MotX), se cree que esta región se encuentra en estrecho contacto con dicha estructura celular.

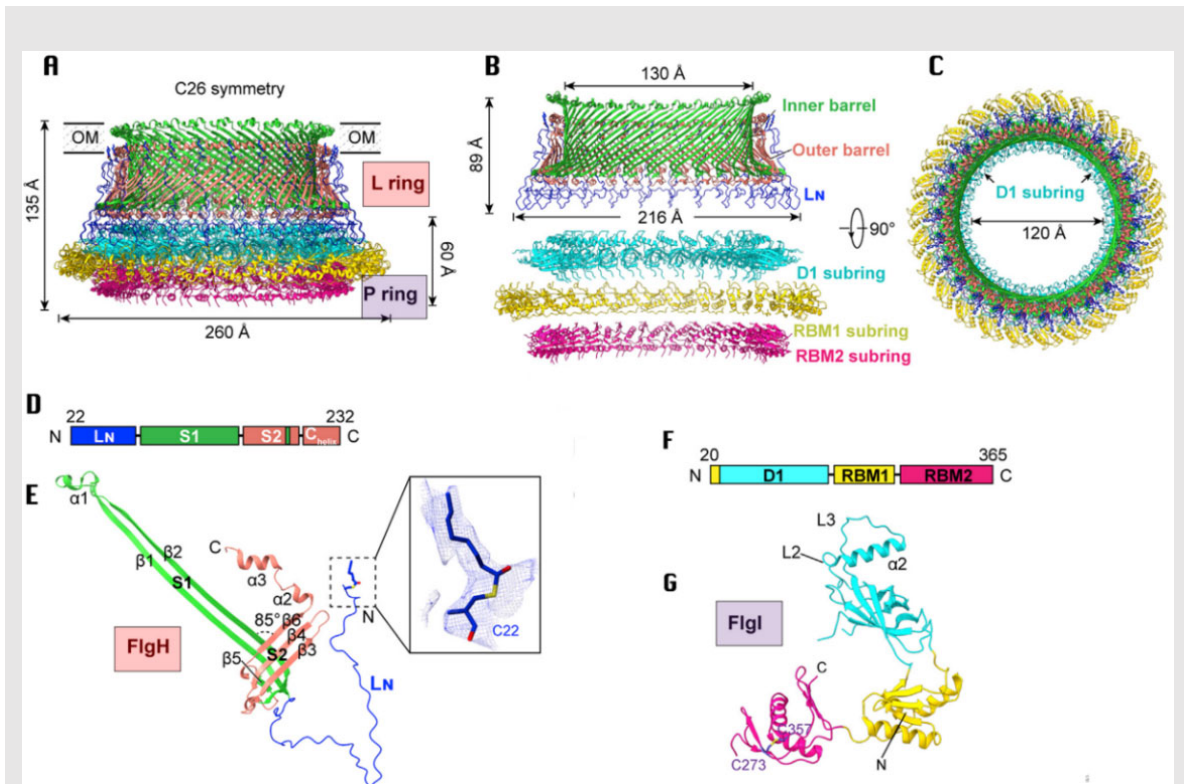


Figura 4. Estructura de los anillos flagelares L y P. A, Estructura global de los anillos L y P obtenida mediante criomicroscopía electrónica: Se indica la posición de la membrana externa y tamaños estimados para ambas estructuras. B, Corte longitudinal y vista de los componentes que conforman el anillo L (barril interno, externo y el dominio LN) y el anillo P (subanillos L, RMB1 [ring building motif] y RMB2). C, Vista superior de la estructura formada por los anillos L y P, en el centro se ensambla el eje, que en la imagen no se muestra. D y E, se muestran los dominios y la estructura de la proteína FlgH, respectivamente; el código de colores que ilustra los colores de la proteína se mantiene en las imágenes correspondientes a las estructuras representadas en los paneles previos. F y G dominios y la estructura de la proteína FlgI, respectivamente; el código de colores que ilustra los colores de la proteína se mantiene en las imágenes correspondientes a las estructuras representadas en los paneles previos. Modificado de (23).

La formación del eje requiere de la proteína FlgJ, esta proteína no se encuentra presente en la estructura final del flagelo, pero es necesaria para la morfogénesis del eje. En *S. enterica* y *E. coli* la proteína FlgJ posee dos dominios con actividades independientes, la región NH₂-terminal es necesaria

como un andamiaje para la formación del eje, mientras que el dominio COOH posee actividad de glucosaminidasa, necesaria para que el eje penetre a través de la capa de peptidoglicano (30, 31). En otras especies bacterianas, las actividades de andamiaje y de hidrólisis de FlgJ se encuentran separadas en dos polipéptidos independientes, por un lado la proteína FlgJ que solo conserva el dominio de andamiaje y por el otro, una transglicosilasa lítica (32).

Una vez que el flagelo penetra la membrana externa, inicia la formación del gancho que es ensamblado con aproximadamente 130 subunidades de la proteína FlgE (22). La longitud del gancho se encuentra estrictamente regulada a través de un mecanismo parcialmente caracterizado que involucra a la proteína FliK y a una de las proteínas del aparato de exportación flagelar. Las subunidades de FlgE se ensamblan siguiendo un patrón helicoidal con 11 subunidades cada dos vueltas, dichas subunidades al igual que las subunidades del filamento forman una estructura tubular de 11 protofilamentos en los cuales las regiones N y C-terminal de las subunidades se encuentran empacadas de forma compacta mientras que el resto de los dominios de la proteína se encuentran empacadas de forma laxa dentro del protofilamento, esta característica es esencialmente responsable de la flexibilidad del gancho (Figura 5). En las bacterias peritricas como *E. coli* y *S. enterica*, la flexibilidad del gancho permite que durante la rotación del motor las hélices de los filamentos puedan coalescer y formar una trenza en uno de los extremos del cuerpo celular (33-37).

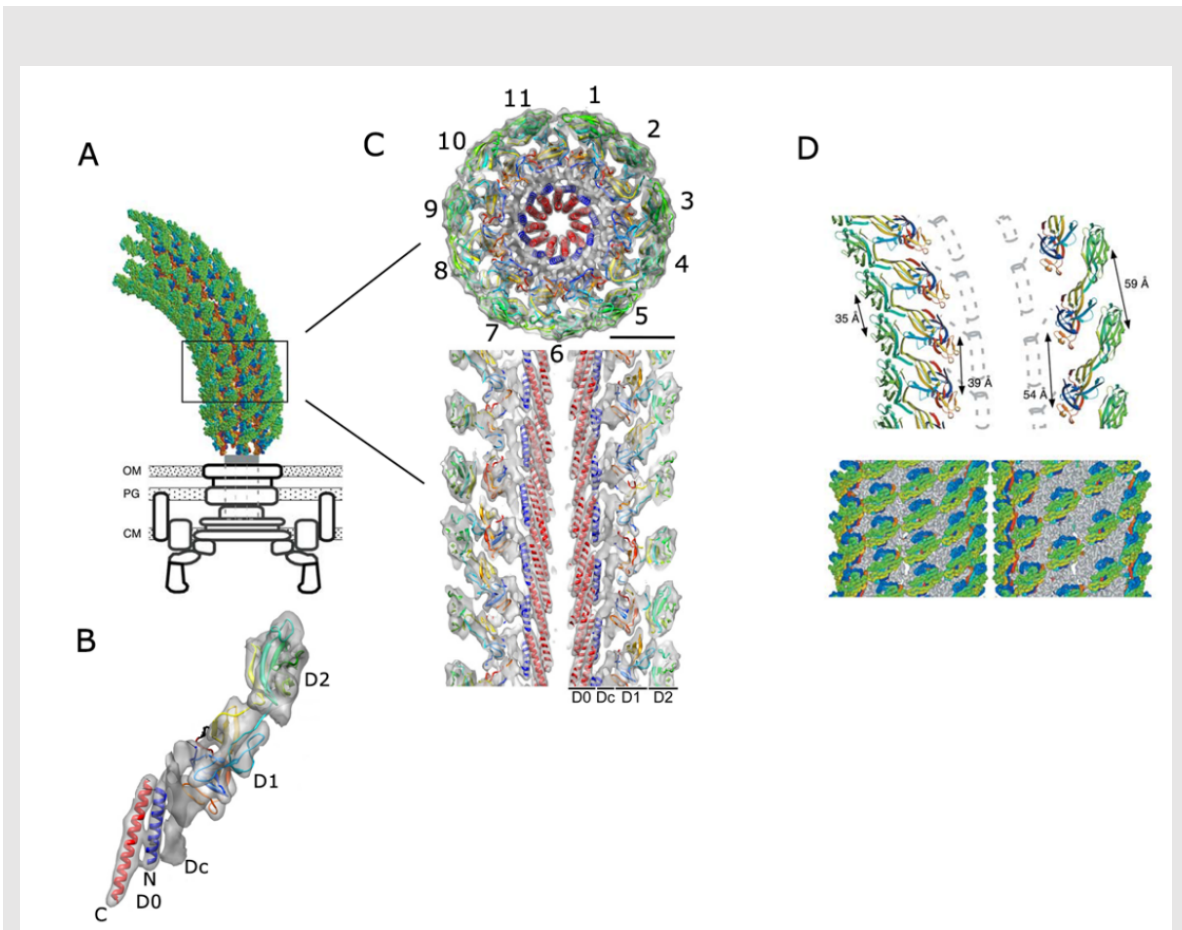


Figura 5. Modelo atómico del gancho. A, modelo del gancho con un diagrama del cuerpo basal. B, Estructura de la proteína FlgE coloreada con tonalidades de arcoíris a partir de NH₂ terminal en azul, al C-terminal en rojo. Se indican los dominios presentes en la subunidad (D0, DC, D1, D2), cuya disposición en la estructura tubular se indica en el panel C. C. Vista del gancho en un corte transversal en donde se aprecia la disposición de las subunidades de FlgE (11 cada 2 vueltas), y de las hélices NH₂ y C-terminales formando el tubo central de 18 Å, y en donde las interacciones de las α -hélices son esenciales para el ensamblaje. En la parte inferior se muestra un corte longitudinal donde se aprecia la disposición de los dominios de FlgE desde la parte interna densamente empaquetada hasta la cara exterior con interacciones mas laxas. D, Amplificación de la sección del gancho indicada en panel A, y conservando el código de color solo para el dominio D2 (verde). Se muestra la disposición de las subunidades de FlgE en la superficie del gancho en la cara compacta (imagen a la izquierda, arriba y abajo) y en la superficie de la cara extendida (imagen a la derecha). En gris se representa el canal central. Tomado de (34, 37).

El filamento está formado por más de 30,000 unidades de flagelina organizadas de forma super-enrollada de en sentido contrario de las manecillas del reloj que puede llegar a medir hasta 15 mm de largo. La rigidez de la super-hélice permite que durante la rotación el líquido circundante sea desplazado impulsando el cuerpo celular en una trayectoria recta (1) (Figura 6).

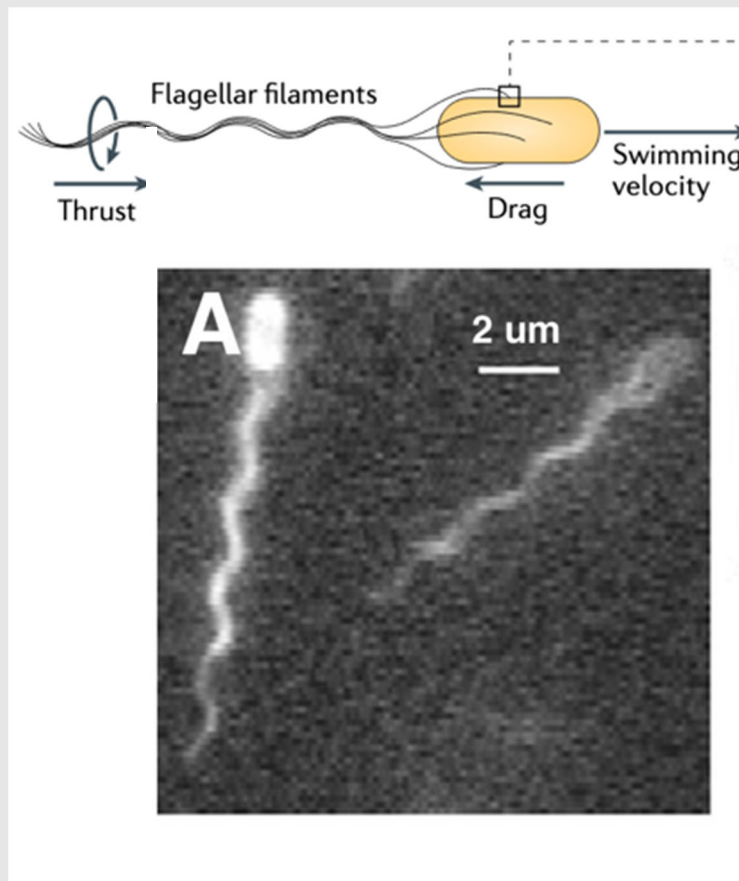
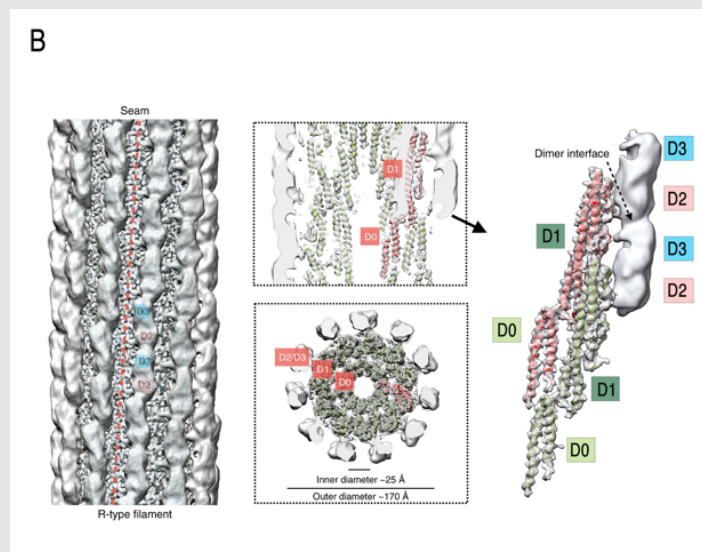
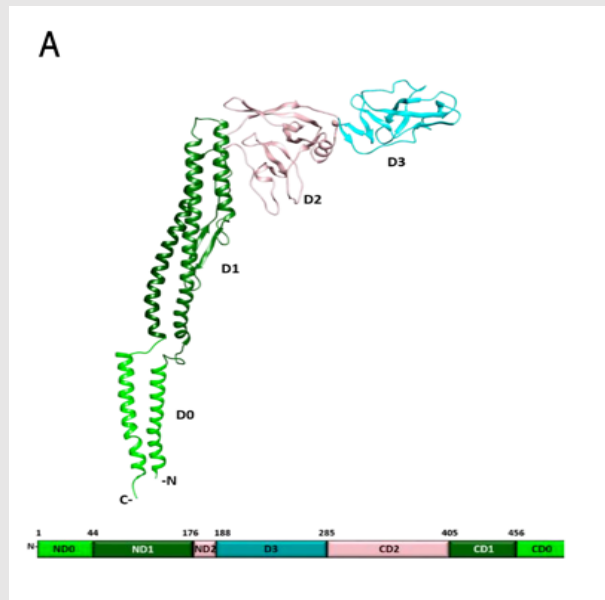


Figura 6. A. Desplazamiento de una célula de *E. coli*, que nada mediante la rotación de los filamentos helicoidales en el medio líquido generando el empuje para impulsar el cuerpo celular en contra del arrastre provocado por la viscosidad del medio. A. Dos imágenes de epifluorescencia que muestra la trenza de filamentos que se organiza al rotar los flagelos en dirección contraria a las manecillas del reloj (CCW). Tomado de (38, 39).

Las subunidades de flagelina se ensamblan siguiendo un patrón helicoidal con 11 subunidades cada dos vueltas formando una estructura tubular de 11 protofilamentos. Las subunidades se ensamblan adoptando dos conformaciones (L y R) que permiten que el protofilamento pueda ser más corto o largo, de este modo en la superhélice los protofilamentos más cortos se forman dentro y los más largos fuera de esta (40-45) (Figura 7).



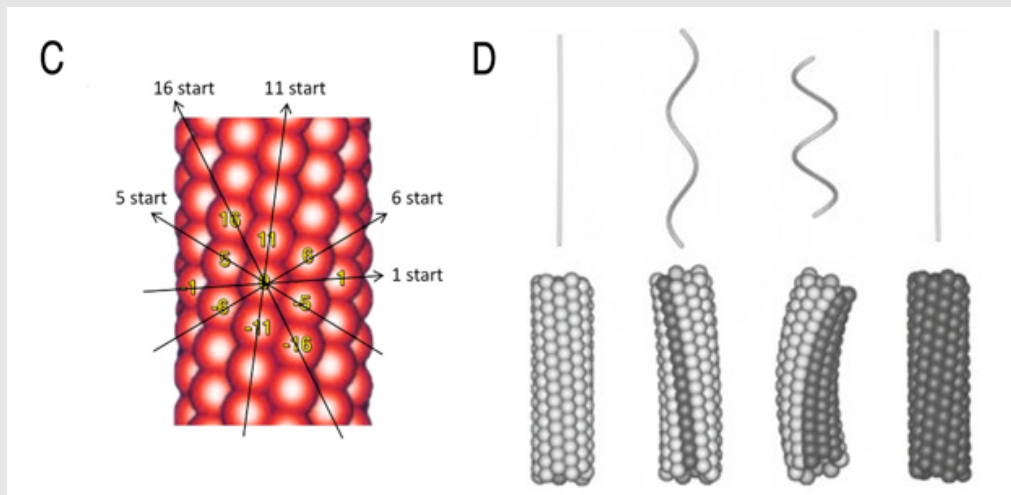
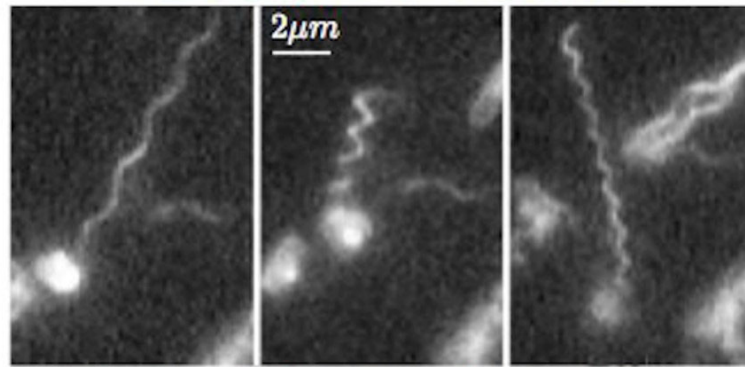


Figura 7. Estructura de la flagelina y del filamento. A. Estructura de la subunidad de flagelina (FliC) de *Salmonella* con los cuatro dominios distintivos: Dominios D0, en verde claro formado por los extremos N y C-terminales (ND0 y CD0). Dominios D1, coloreados en verde oscuro, adyacentes a los dominios D0. Dominios D2, coloreados en rosa (ND2 y CD2), y dominio D3 conformado por una secuencia continua de aminoácidos en el centro del polipéptido. Tomado de (46). B. Estructura del filamento flagelar, se resaltan en colores azul y rosa los dominios D3 y D2 que se ubican en la cara externa del filamento, en la imagen se resaltan los dominios D3 y D2 de dos diferentes subunidades. Al centro del panel se observa el corte longitudinal en donde los dominios D0 y D1 están coloreados en verde y en rojo para resaltar el arreglo entre dos subunidades apiladas. Abajo, la vista del corte transversal del filamento en donde se observa el lumen rodeado de los dominios D0, seguidos de D1, y en la parte exterior se ubican los dominios D2 y D3. A la izquierda en el panel se muestra el arreglo de dos subunidades de FliC de la forma en la cual se apilan en el filamento, se indica con una flecha la interfaz del dímero. Tomado de (47). C. Arreglo de las subunidades de FliC en el filamento. Se indican las principales simetrías helicoidales con flechas. La línea helicoidal marcada como 11-start comprende el protofilamento. Tomado de (48) D. Estructura polimórfica del filamento flagelar, los filamentos del tipo L, de conformación, recta, normal, enroscada (*curly*) y de tipo R recto, se muestran de izquierda a derecha en ese orden. Tomado y modificado de (9).

Debido a que existen 11 protofilamentos cada uno de estos puede adoptar 12 diferentes estados de superenrollamiento de la hélice, en donde 11 cortos u 11 largos dan lugar a filamentos rectos, se ha predicho que en el filamento normal existen 9L/2R (Figura 8) (44).

Unbundling two polymorphic changes



normal → *semi-coiled* → *curly*

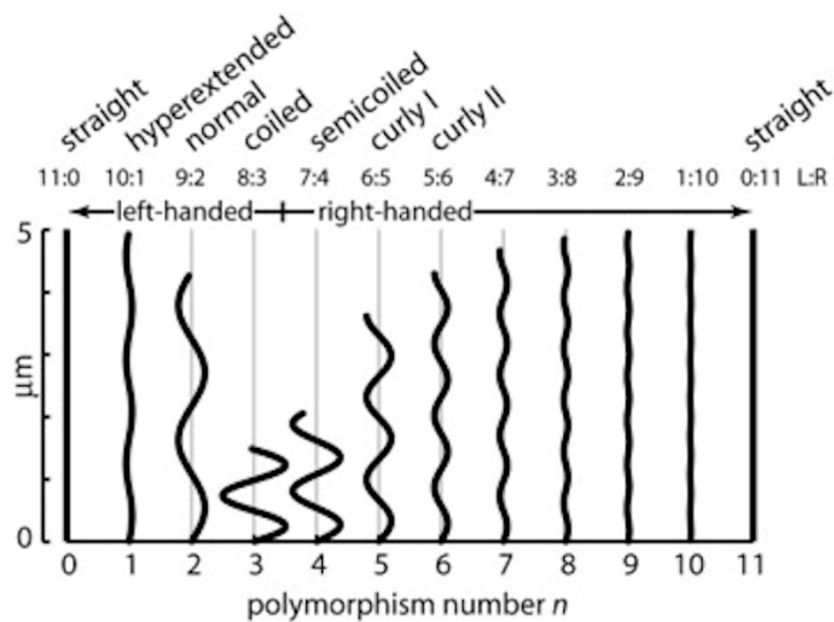
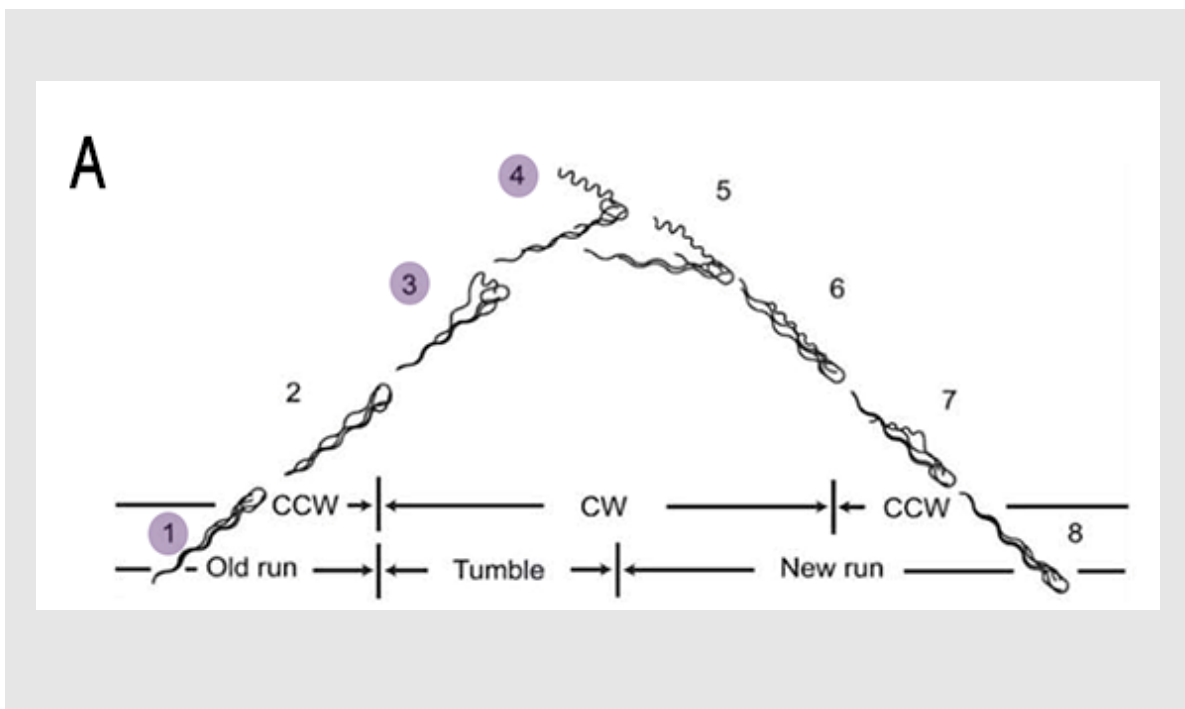


Figura 8. Formas polimórficas de la hélice flagelar predichas por la combinación de diferentes proporciones de subunidades en conformación L y R. De las 12 formas predichas, 4 son de mano izquierda (L). Tomado de (49). A la derecha se muestran dos de las formas helicoidales para un solo filamento, detectadas in vivo mediante tinción de las células con AlexaFluor y microscopia de epifluorescencia. Tomado y modificado de (39).

En la célula, las transiciones polimórficas en la estructura del filamento surgen por la fuerza de rotación del motor sobre la superhélice normal del filamento, cuando el motor gira en dirección en el sentido contrario de las manecillas del reloj (CCW) los filamentos en su conformación normal coalescen en una trenza, y cuando el motor cambia la dirección de rotación (CW) la fuerza de torsión provoca la formación de hélices de mano derecha. Dichos cambios son esenciales para determinar el patrón de desplazamiento de la célula, el cual consiste en periodos de nado recto interrumpidos por breves periodos de reorientación (tumble, en inglés) provocados por el movimiento descoordinado de los flagelos; a nivel molecular la frecuencia de los eventos de reorientación (rotación CW del flagelo) están controlados por el sistema quimiotáctico (39, 50-53) (Figura 9).



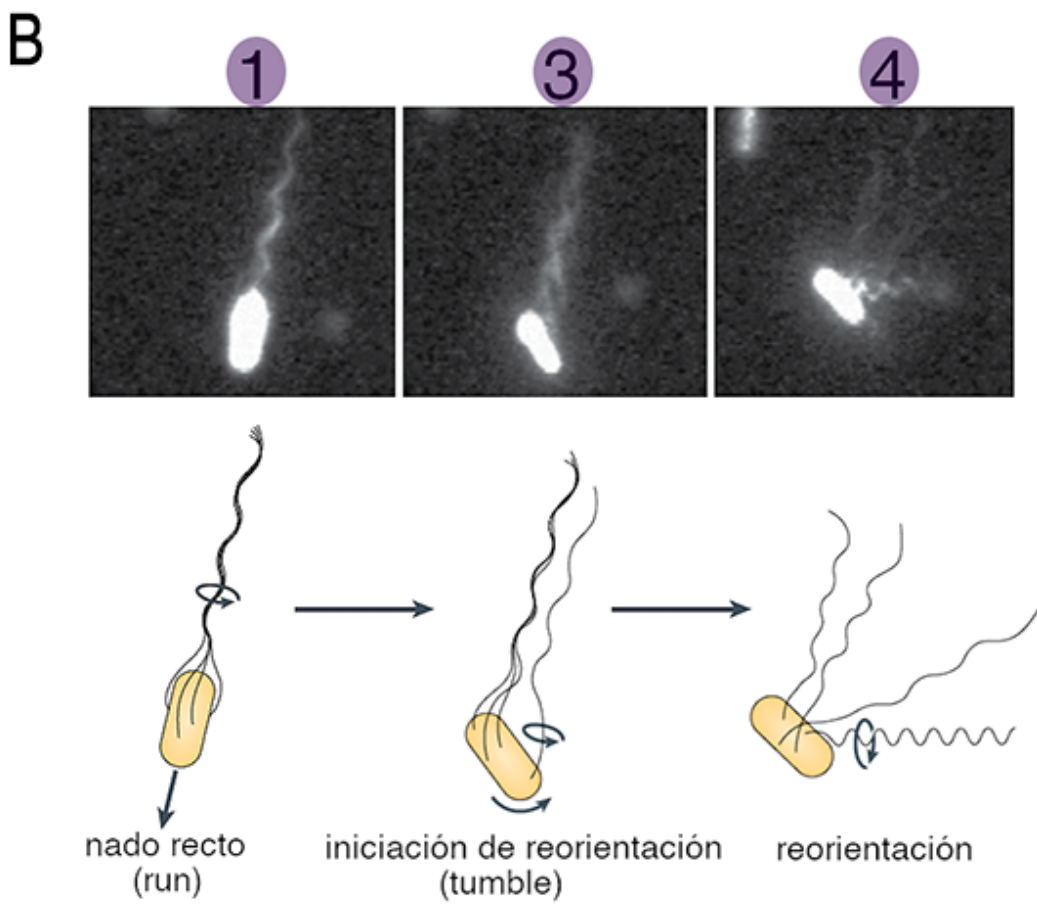


Figura 9. A. Esquema de la secuencia de eventos durante el nado de *E. coli* que llevan a la reorientación de una trayectoria determinada. En la parte baja se indica la dirección de rotación del motor flagelar que se asocia con la formación de la trenza de filamentos (en sentido de las manecillas del reloj, CW), o su desorganización causada por la rotación de un cierto número de motores en dirección CCW (contraria a las manecillas del reloj). En 1, la célula desplazándose en una determinada trayectoria en la cual los filamentos muestran una forma helicoidal normal. 2 y 3 inicio del evento de reorientación con un motor que al cambiar la dirección de rotación inicia la desorganización de la trenza. 4, evento de reorientación con un filamento que claramente ha sufrido una transición a una hélice de mano derecha denominada semi-enroscada (semi-coiled) (causada por la rotación del motor en sentido CCW). B. Serie de imágenes de una preparación de células de *E. coli* teñidas con Alexa-Fluor y observadas mediante microscopia de epifluorescencia. Dicha preparación permite la observación de las células desplazándose activamente, se muestran los momentos que representan las etapas esquematizadas en el panel A. En la parte baja del panel B, se esquematizan los tres momentos representados en las imágenes de epifluorescencia. Tomado y modificado de (38, 54).

Para construir el flagelo las bacterias cuentan con un sistema de exportación que transloca las proteínas desde el citoplasma hacia la porción distal del crecimiento axial. Este sistema de exportación, denominado sistema de secreción tipo III (T3SS) consiste en un complejo transmembranal de compuerta dependiente de la fuerza protón motriz (PMF) y de un complejo citoplásmico con actividad ATPasa, formado por las proteínas FliI, FliH y FliJ (55, 56). Las proteínas transmembranales FliA, FliB, FliP, FliQ y FliR forman la compuerta del aparato de secreción el cual se ubica en la parte central del anillo MS (57-61).

Dentro de este complejo, la proteína FliA forma un canal iónico que es activado por la interacción del extremo C-terminal de FliA con la proteína FliJ, siendo esta interacción favorecida por la hidrólisis de ATP mediada por FliI y por el potencial electroquímico de membrana. Una vez activado el canal iónico, los sustratos son exportados de forma eficiente (56, 62, 63).

De forma adicional, el anillo C favorece la exportación debido a la interacción de FliH con la proteína FliN del anillo C (64, 65) (Figura 10).

de unión a la pared de peptidoglicano que mantiene fijos los complejos MotA/MotB durante la rotación (71-74). La proteína MotA tiene 4 cruces transmembranales y una larga región citoplásmica entre las hélices 2 y 3, que se ubica en la interfaz con la región C-terminal de FliG. Esta interfaz contiene varios residuos conservados cuya carga es importante para la generación de torque (75, 76). Se ha propuesto que el flujo de protones a través de MotB genera un cambio conformacional en la hélice citoplásmica de MotA y la repulsión/atracción entre las cargas de MotA/FliG generan la rotación del flagelo (75, 77). En bacterias marinas, los complejos estatores son dependientes del gradiente de sodio, y las proteínas se denominan PomA/PomB (Figura 11).

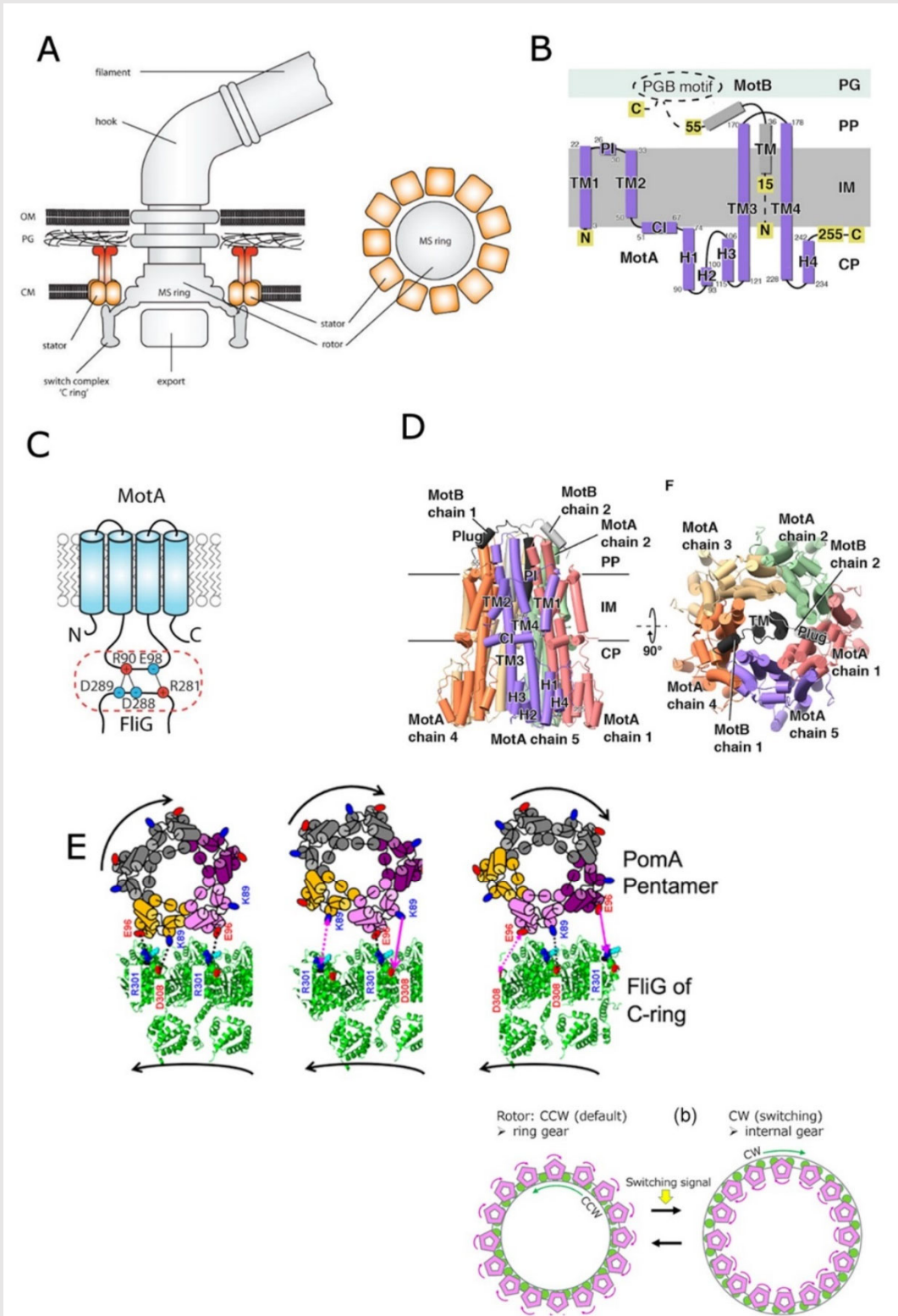


Figura 11. Complejos estatores MotA/MotB. A, esquema simplificado del motor flagelar en la vista lateral y transversal. Los estatores se representan en color naranja para MotA y rojo para MotB. En el esquema de la vista transversal se denota la presencia de 11 complejos estatores rodeando el anillo MS. Tomado de (78). B, Topología y organización de MotA (púrpura) y MotB (gris). El dominio que contiene el motivo de unión a peptidoglicano (PGB) está representado como una elipse. Las hélices transmembranales de MotA se indican de, TM1 a TM4. Las hélices citoplásmicas de MotA se indican de H1 a H4. Tomado de (69). C, Esquema de las interacciones electrostáticas entre los aminoácidos cargados presentes en el asa citoplásmica de MotA y los aminoácidos cargados de FliG. Tomado de (79). D, Esquema de la vista lateral y transversal de un complejo estator formado por 5 subunidades de MotA representadas en diferentes colores (púrpura, naranja, amarillo, verde y rosa) y dos subunidades de MotB (gris) ubicadas al centro del arreglo de las subunidades de MotA. Tomado de (69). E, Esquema del modelo propuesto para la generación de torque que resulta de la rotación del pentámero de MotA alrededor del dímero de MotB, asociado con el transporte de protones. La rotación de los complejos impulsa el giro del rotor mediante las interacciones electrostáticas con FliG (representado en verde). En la parte baja del panel se representa el modelo propuesto para el cambio de dirección en la rotación del motor, en el cual el cambio conformacional de FliG (subunidades representadas en color verde) provoca una interacción diferente con los estatores (pentámero rosa) que permanecen rotando en la misma dirección. Tomado de (80).

Regulación genética del flagelo bacteriano

La expresión y regulación de los genes flagelares ha sido estudiada en diferentes especies bacterianas. Para el inicio del ensamblaje del flagelo, en *E. coli* y *S. enterica* se requiere que el activador transcripcional FlhD/FlhC promueva la expresión de los genes flagelares tempranos de clase II que codifican para las proteínas que forman el cuerpo basal y el gancho del flagelo. Los genes que codifican para el factor σ FliA, su factor anti- σ específico y FlgM pertenecen también a esta clase. Una vez que el cuerpo basal y el gancho están

ensamblados, FlgM es exportado fuera de la célula y FliA se asocia con el núcleo (core) de la RNA polimerasa para el reconocimiento de los promotores de los genes de clase III (Figura 12) (81).

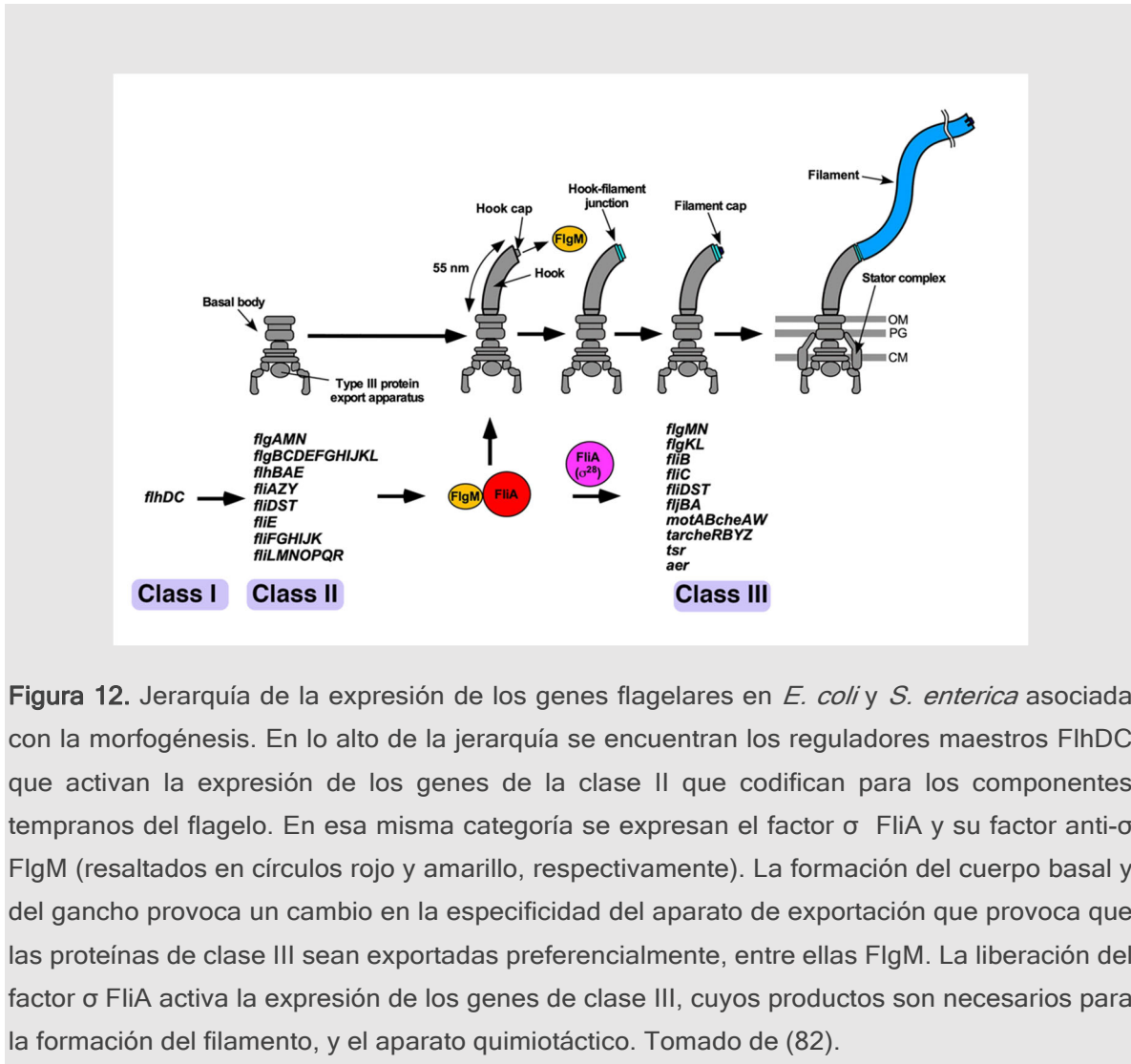


Figura 12. Jerarquía de la expresión de los genes flagelares en *E. coli* y *S. enterica* asociada con la morfogénesis. En lo alto de la jerarquía se encuentran los reguladores maestros FlhDC que activan la expresión de los genes de la clase II que codifican para los componentes tempranos del flagelo. En esa misma categoría se expresan el factor σ FliA y su factor anti- σ FlgM (resaltados en círculos rojo y amarillo, respectivamente). La formación del cuerpo basal y del gancho provoca un cambio en la especificidad del aparato de exportación que provoca que las proteínas de clase III sean exportadas preferencialmente, entre ellas FlgM. La liberación del factor σ FliA activa la expresión de los genes de clase III, cuyos productos son necesarios para la formación del filamento, y el aparato quimiotáctico. Tomado de (82).

En otras γ -proteobacterias (por ejemplo, *Vibrio sp.* y *Pseudomonas sp.*), la expresión jerárquica de los genes flagelares presenta una arquitectura diferente. En estas especies, el factor σ^{54} (RpoN) junto con una proteína activadora promueven la expresión de los genes flagelares tempranos, mientras

que la expresión de los genes tardíos es dependiente de FliA. En estos sistemas, la expresión de los genes tardíos requiere de la exportación de FlgM (83) (Figura 13).

Solo algunos ejemplos de expresión jerárquica de genes flagelares se han descrito para las α -proteobacterias; sin embargo, es evidente la variación sustancial que existe al comparar las diferentes redes de control. Por ejemplo, en *S. meliloti* dos miembros de la familia LuxR, VisN y VisR son responsables de la expresión del gen *rem*, el cual codifica un activador transcripcional de tipo OmpR que promueve la expresión de los genes flagelares de clase II (84). La expresión de los genes flagelares de clase III que incluyen los genes de flagelina *flaA*, *flaB* y *flaC*, así como varios genes que codifican receptores quimiotácticos, son activados directamente por el regulador transcripcional CtrA (85). En *S. meliloti*, el mecanismo que enciende la expresión de los genes de clase III es aún desconocido. En *C. crescentus*, la jerarquía flagelar ha sido minuciosamente estudiada. En este caso la proteína CtrA activa la expresión de los genes flagelares de clase II en donde se encuentran codificadas las proteínas del anillo MS y el aparato de exportación, así como también la proteína regulatoria FliD. Una vez que se ha completado el ensamblaje del aparato de exportación y el anillo MS, FliD es fosforilada por una cinasa desconocida que en conjunto con el factor σ RpoN promueven la transcripción de los genes de clase III/IV, cuyos productos dan lugar a la formación del eje, los anillos L y O, el gancho y el filamento flagelar (83, 86) (Figura 13).

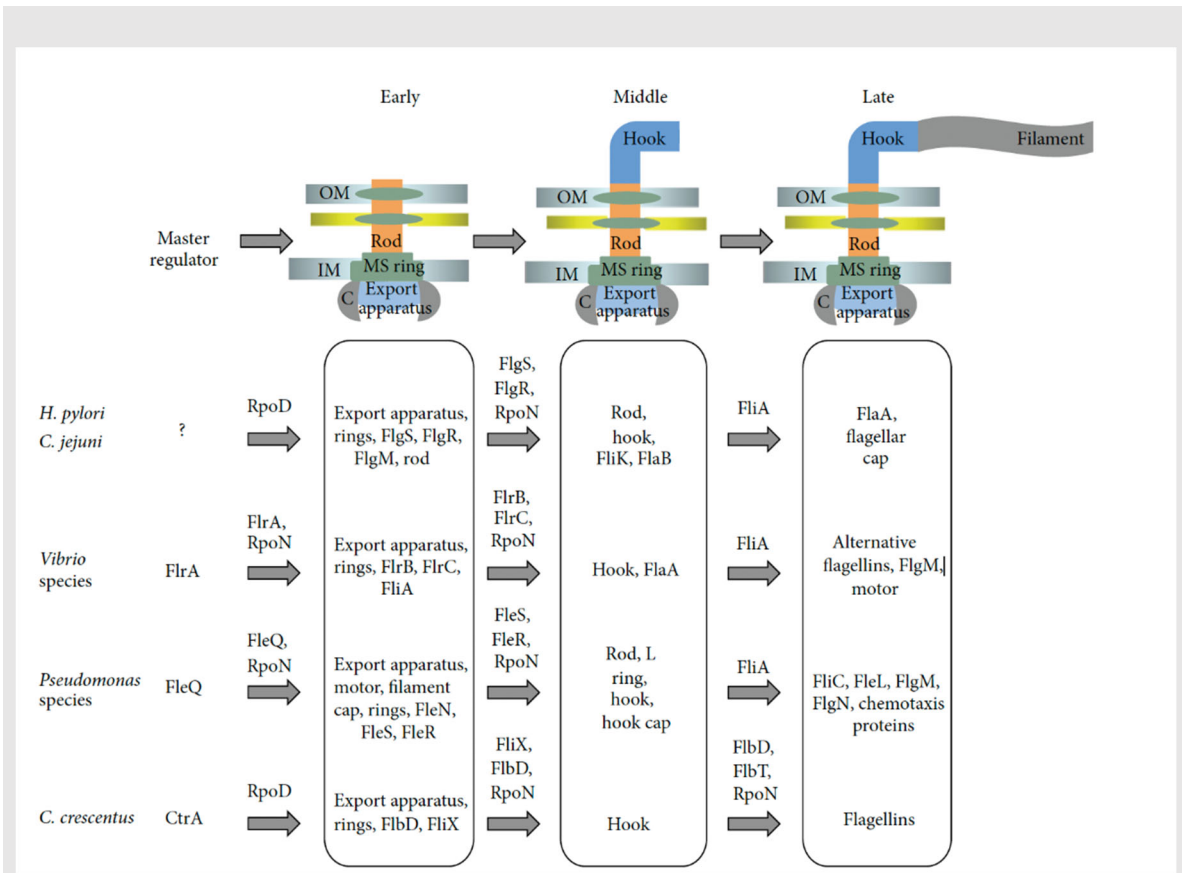


Figura 13. Diversidad de las jerarquías transcripcionales flagelares. En la figura se muestran las jerarquías caracterizadas en las ϵ -proteobacterias *Helicobacter pylori* y *C. jejuni*, en *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Caulobacter crescentus*. Arriba de las flechas grises se muestran las proteínas regulatorias y los factores σ involucrados en expresar el siguiente grupo de genes en la jerarquía. Tomado de (83).

Rhodobacter sphaeroides

R. sphaeroides es una α -proteobacteria púrpura no sulfurosa cuyo hábitat natural son los ambientes acuáticos, es bien conocida y estudiada por su amplio y versátil repertorio metabólico, ya que puede crecer de forma aerobia o anaerobia dependiendo de la disponibilidad de los recursos energéticos. *R. sphaeroides* es una bacteria fotótrofa facultativa que puede realizar fotosíntesis de forma autótrofa

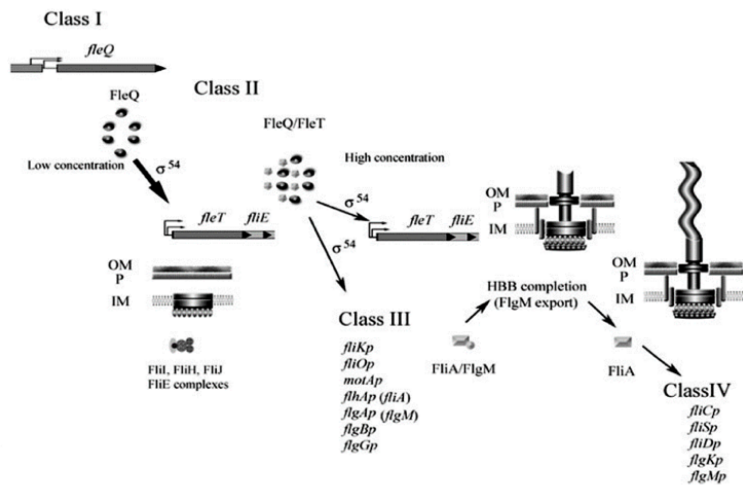
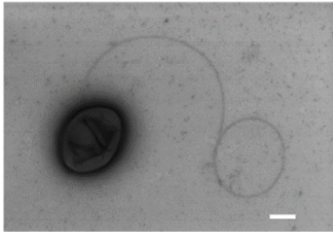
y heterótrofa; fotoautótrofa cuando utiliza el CO₂ como fuente de carbono y iones de hidrógeno como poder reductor y fotoheterótrofa cuando utiliza compuestos orgánicos como fuente de carbono y poder reductor. También puede crecer mediante quimioautotrofia y quimioheterotrofia, además de tener la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (87).

R. sphaeroides tiene la particularidad de poseer dos sistemas flagelares con diferente origen filogenético, uno heredado por transferencia vertical (Fla2), responsable de la síntesis de varios flagelos polares y el segundo, adquirido por un evento de transferencia horizontal (Fla1), que dirige el ensamblaje de un flagelo subpolar (Fig. 14) (88-90). La estructura básica de estos flagelos es fundamentalmente similar a la canónica previamente caracterizada en algunas bacterias como *E. coli*, *S. enterica* pero incluye componentes específicos en cada uno de estos flagelos (91).

Regulación genética de los genes flagelares de *R. sphaeroides*

Al igual que ocurre en *E. coli* y *Salmonella*, la biosíntesis flagelar en *R. sphaeroides* requiere de la expresión de más de 60 genes (1, 81, 92, 93). De manera general, la expresión de los genes flagelares Fla1 sigue un patrón jerárquico en el cual los genes tempranos son expresados bajo el control del RpoN1 (factor σ^{54}) y las proteínas activadoras FleQ y FleT, mientras que los genes de expresión tardía son dependientes del factor σ FliA (94) (Figura 14).

Fla1



Fla2

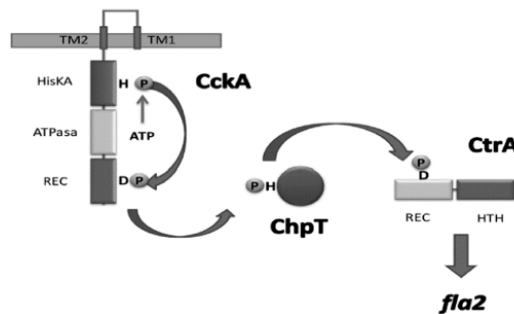
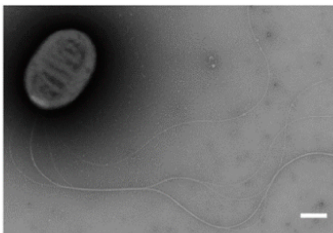


Figura 14. En la parte superior de la figura se muestra la jerarquía flagelar del sistema Fla1 de *R. sphaeroides* cuya expresión es dependiente del regulador maestro FleQ y del factor σ^{54} (RpoN1). A la izquierda se muestra una célula representativa de *R. sphaeroides* con un solo flagelo de ubicación subpolar cuya formación es dependiente de la expresión de los genes *fla1*. En la parte inferior de la figura se muestran los reguladores maestros necesarios para la expresión de los genes *fla2*, y a la izquierda se muestra una célula representativa de *R. sphaeroides* con varios flagelos polares cuya formación es dependiente de la expresión de los genes *fla2*. Tomado de (91).

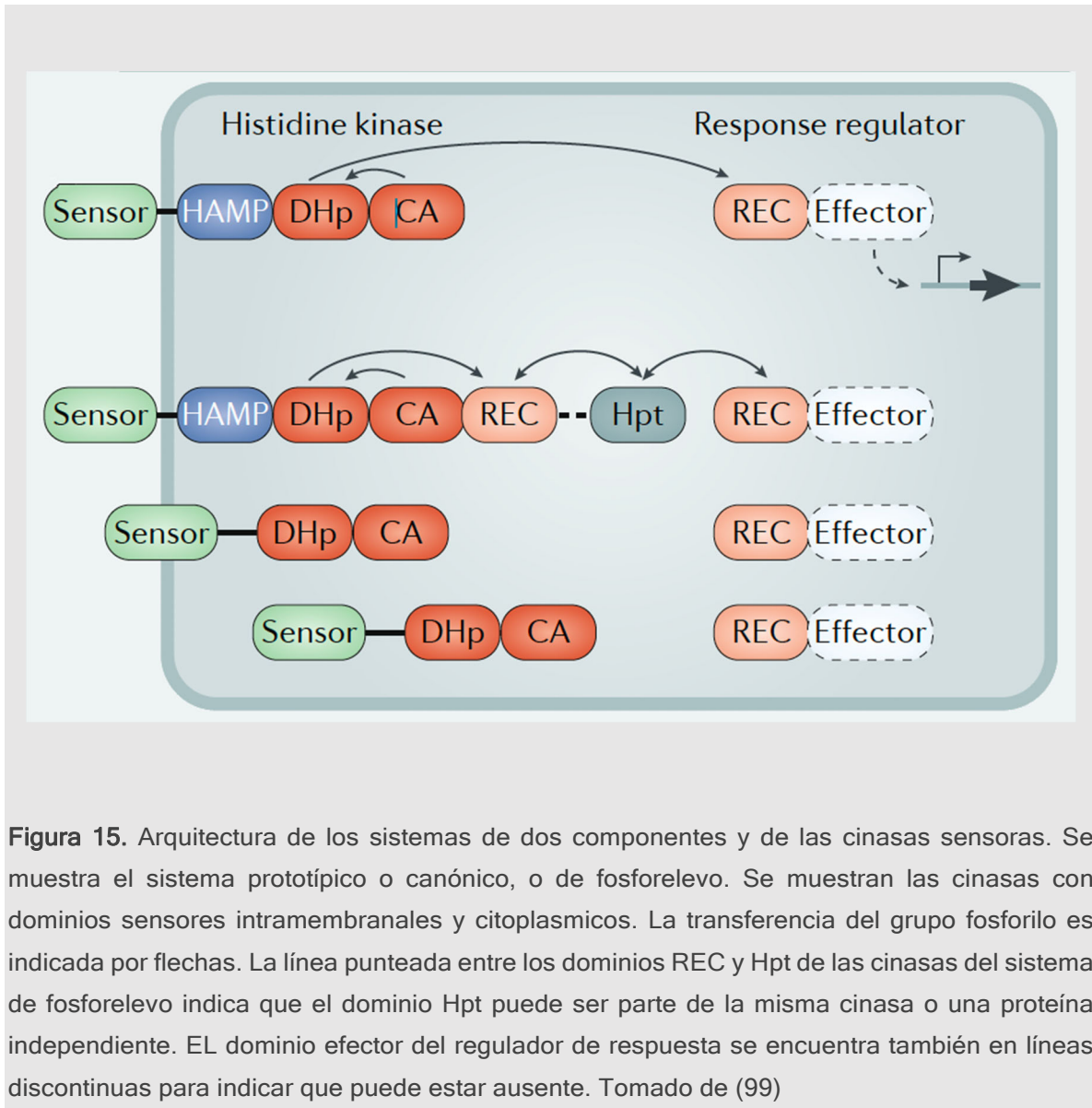
La proteína activadora FleQ junto con el factor σ^{54} (RpoN) son responsables de la expresión de los genes *fliE*, *fliF*, *fliG*, *fliH*, *fliI*, *fliJ* y de *fleT*, el producto de este último gen permite la formación del dímero FleQ-FleT que junto

con RpoN activan la expresión de los genes flagelares de clase III en donde se incluyen los genes que forman el resto del cuerpo basal, el gancho y los que codifican para las proteínas FliA, FlgM, MotA y MotB. FliA, es el factor σ alternativo denominado σ^{28} , es indispensable para la expresión de genes de clase IV y del gen *fliC* que codifica la proteína flagelina (94, 95). FleQ y FliA también participan de manera importante en la expresión de una serie de genes quimiotácticos que se encuentran en varios loci del genoma (96).

Por otra parte, la expresión genética del sistema flagelar Fla2 requiere de la activación de un sistema de dos componentes formado por la histidin-cinasa híbrida CckA, la fosfotransferasa de histidina ChpT y el regulador de respuesta CtrA (90) (Figura 14).

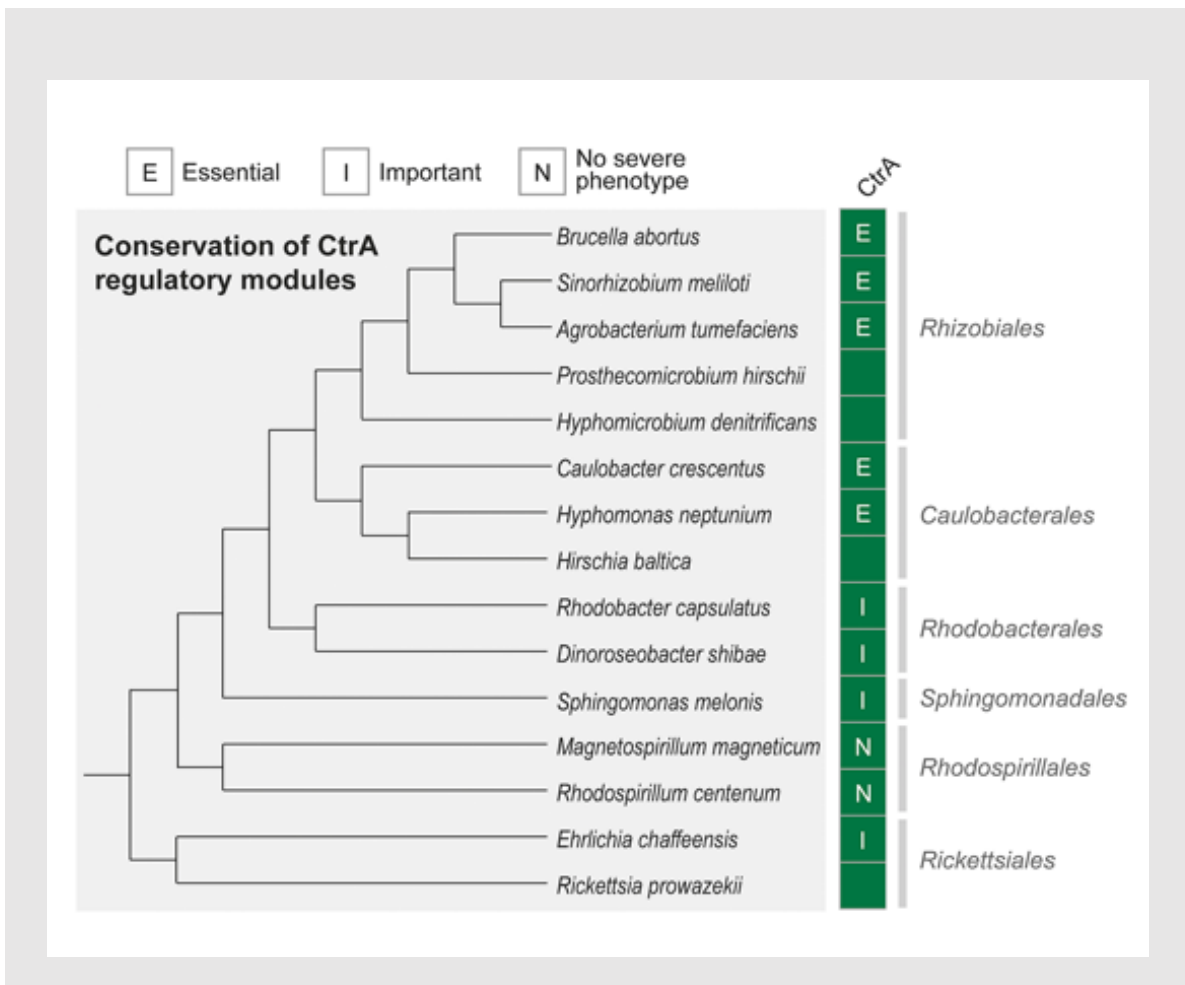
Los sistemas de dos componentes son, en su forma mas simple, un par de proteínas que le permiten a las bacterias sensorar un estímulo y generar una respuesta adaptativa ante este estímulo. Una de las proteínas es una cinasa sensora que en presencia del estímulo se fosforila en un residuo conservado de histidina, y la otra proteína se denomina regulador de respuesta que es fosforilado por la cinasa, en un residuo de ácido aspártico conservado presente en el dominio REC (receptor) de la proteína (Figura 15). Existen sistemas de dos componentes que están formados por cinasas híbridas, estas proteínas poseen un dominio REC adicional y por lo tanto, una vez fosforilada la cinasa en el residuo de His, el grupo fosforilo es transferido al aspártico conservado del dominio REC de la misma proteína, en este caso para lograr la fosforilación del regulador de respuesta es indispensable la presencia de una proteína

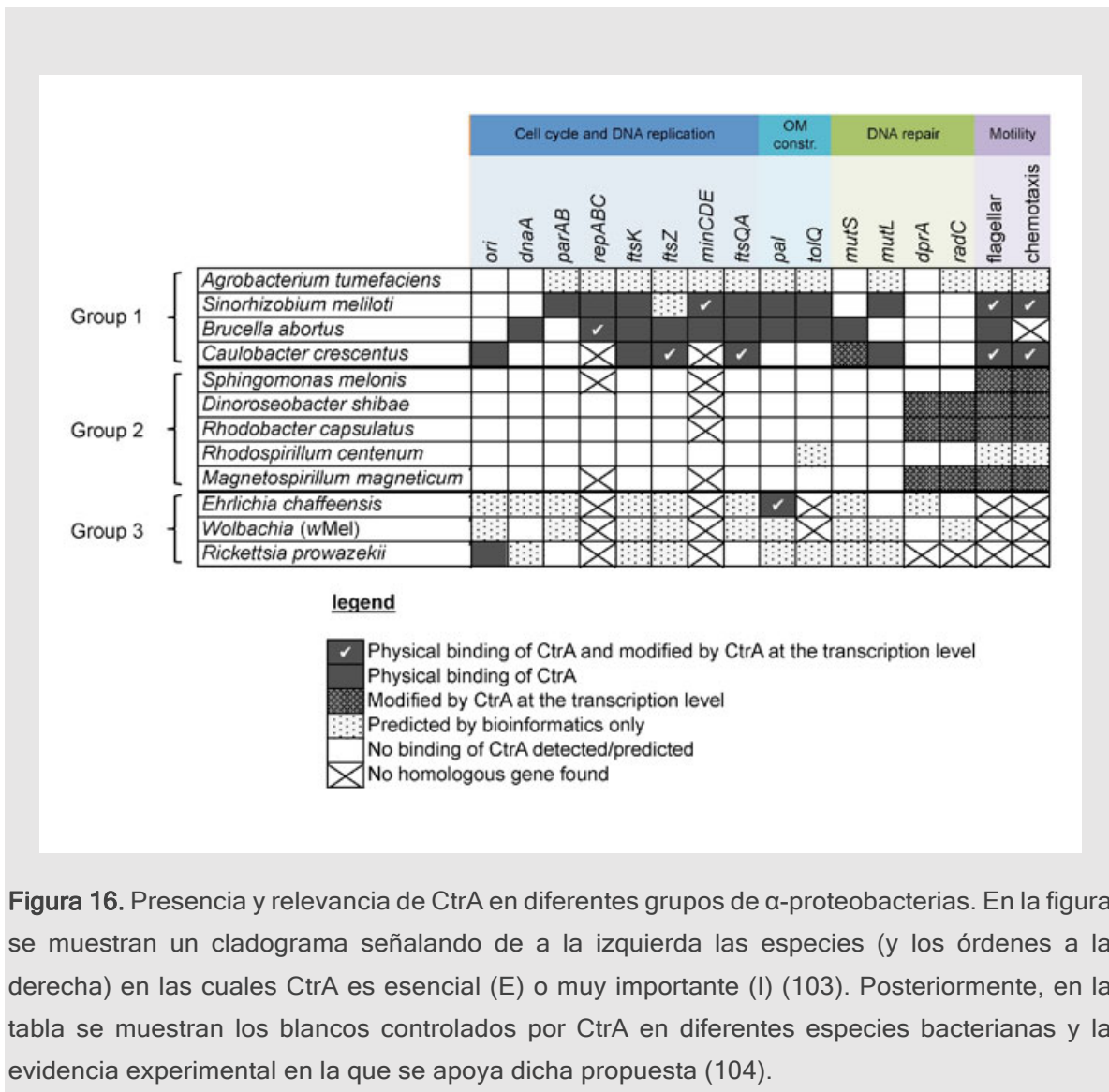
denominada de fosfotransferencia que tiene un residuo de His, que funciona como un intermediario en la reacción. Es importante mencionar que dicha proteína de fosfotransferencia puede ser un polipéptido independiente o un dominio de la misma cinasa híbrida (97, 98) (Figura 15).



Regulación genética de los genes dependientes de CtrA

El sistema de dos componentes CckA/ChpT/CtrA se encuentra ampliamente distribuido entre las α -proteobacterias. En algunas especies como *Sinorhizobium meliloti*, *Brucella abortus* y *C. crescentus* este sistema es esencial debido a que CtrA no solo tiene un papel importante en la movilidad, sino que también participa en procesos de regulación del ciclo celular, transducción de señales y biogénesis de la pared/membrana celular (86, 100-102) (Figura 16).





Recientemente, se han realizado múltiples investigaciones en α -proteobacterias donde se reporta el perfil transcripcional global de genes regulados positiva o negativamente por CtrA. En *S. meliloti*, se demostró que la depleción de CtrA afecta negativamente la expresión de los genes *flaA*, *flaB*, *flaC* y *pilA* (85). De manera similar, en *Sphingomonas melonis*, la caracterización de la mutante *ctrA* ha permitido determinar la participación de

este factor transcripcional en la expresión de los genes flagelares, de genes involucrados en la síntesis de exopolisacáridos, y del segundo mensajero c-di-GMP (105) (Figura 16).

En algunas especies del orden de las *Rhodobacterales* y *Rhodospirillales* en las que se ha estudiado este sistema de dos componentes se ha reportado que este no es esencial y se ha descrito que participa en el control de la síntesis de flagelo, y en algunos casos en aspectos específicos de la fisiología de cada especie; por ejemplo, en *Rhodospirillum centenum* que es capaz de formar quistes ante condiciones adversas, CtrA inhibe el enquistamiento. En *Magnetospirillum magneticum* se observó que algunos genes ubicados dentro de la isla que codifica para las proteínas del magnetosoma son activados por CtrA, mientras que en *Dinoroseobacter shibae* CtrA inhibe la morfología heterogénea de la población celular, aunque se desconoce el mecanismo que subyace en este fenómeno (106-109).

Por otro lado, la arquitectura de los promotores de CtrA ha sido recientemente estudiada a nivel genómico en *C. crescentus* a través del análisis de las regiones regulatorias de los genes directamente controlados por CtrA, identificados mediante experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina y 5' RACE. De estos análisis se describieron dos clases de sitios de unión a CtrA: un sitio completo representado por la secuencia TTAA(N7)TTAA y un sitio corto con la secuencia TTAA (Figura 17) (110). En estudios previos ya habían sido

identificados este tipo de sitios de unión a CtrA además del motivo TTAACCAT (111).

Los sitios mencionados se encontraron ubicados en las regiones del promotor correspondientes a la caja -35 cuando CtrA actúa como un activador transcripcional; mientras que en los promotores donde CtrA actúa como represor, el motivo corto de CtrA se traslapa con la caja -10 del promotor (Figura 17) (110). Asimismo, la relevancia del motivo TTAA(N7)TTAA para la activación transcripcional en esta especie ha sido probada por experimentos de mutagénesis dirigida (112).

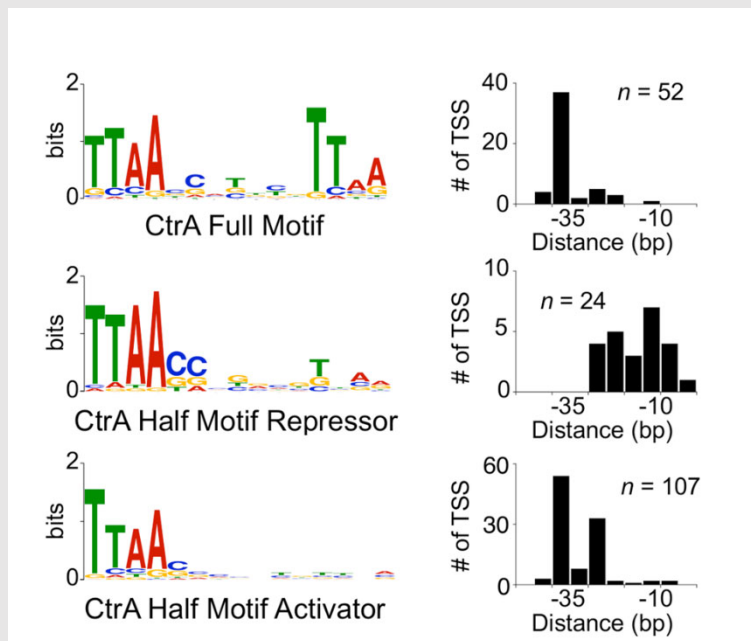


Figura 17. Motivos reconocidos por CtrA y arquitectura de las regiones promotoras en *C. crescentus*. El estudio genómico reveló los sitios de unión de CtrA mediante predicción in silico y los sitios de iniciación de la transcripción. Los sitios de unión están representados por los tres diferentes motivos representados a la derecha como una secuencia LOGO. A la derecha se muestra la posición del sitio de unión con respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS) y el número de promotores que muestran esta arquitectura (n). Tomado de (110).

Para otras bacterias se ha sugerido que CtrA podría tener sitios de reconocimiento similares a los reportados en *C. crescentus*, ya que secuencias parecidas han sido observadas en las regiones de control de los genes regulados por CtrA en diversas α -proteobacterias (101, 105, 107, 113, 114) (Figura 16). Además, se ha observado que puede ocurrir complementación heteróloga ya que *ctrA* de *C. crescentus* complementa una mutante de *S. meliloti* y el gen de *Rickettsia prowazekii* es parcialmente funcional en *C. crescentus* (100, 115). Específicamente, para *R. sphaeroides* se ha sugerido que los genes dependientes de CtrA podrían tener una región similar de reconocimiento en sus promotores (116) (Figura 18).

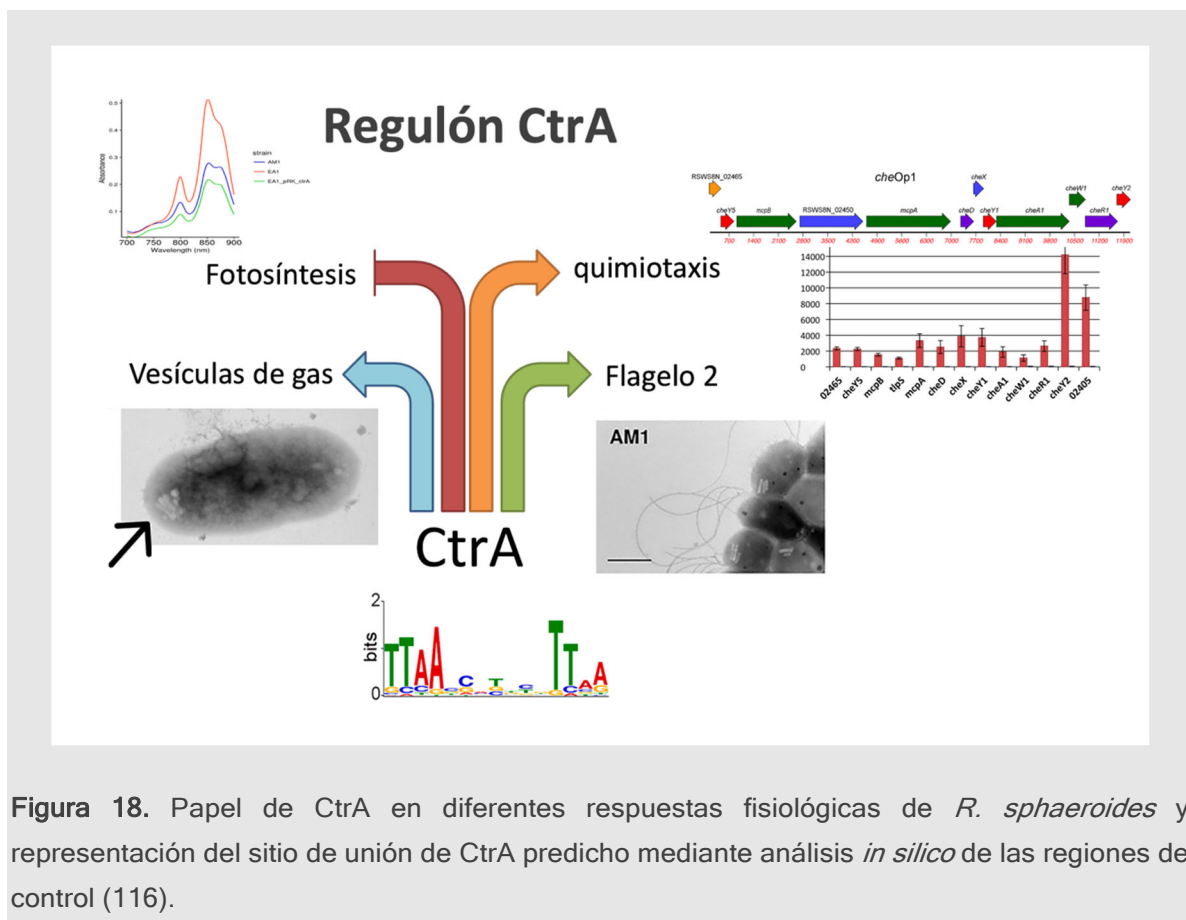


Figura 18. Papel de CtrA en diferentes respuestas fisiológicas de *R. sphaeroides* y representación del sitio de unión de CtrA predicho mediante análisis *in silico* de las regiones de control (116).

A pesar de que se ha descrito la posición de los sitios de unión de CtrA en las regiones promotoras de muchos genes, muy poca atención se ha brindado al hecho de que muchas de las unidades transcripcionales controladas por CtrA son dependientes de promotores divergentes que se encuentran separados por 100, o menos, pares de bases (bp) (117-119).

En este trabajo analizamos dos regiones promotoras divergentes dentro del operon de los genes flagelares *fla2* que contienen a los promotores flagelares *flgB2p-flil2p* y *fliF2p-flilL2p*, las cuales se sugieren están bajo el control de CtrA. La arquitectura de estas regiones regulatorias fue caracterizada utilizando experimentos de 5' RACE (*5' rapid amplification of cDNA ends*), mutagénesis dirigida y ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina. De los resultados obtenidos concluimos que CtrA activa directamente a los promotores *fla2* utilizando más de una sola arquitectura.

OBJETIVO GENERAL

- Describir la arquitectura de los promotores flagelares divergentes dependientes de CtrA en *Rhodobacter sphaeroides*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Construir plásmidos reporteros con los promotores *fla2*
- Determinar los sitios de inicio de la transcripción de los promotores *fliL2p*, *fliF2p*, *flgB2p*, *fliI2p* y *flgE2p*
- Realizar ensayos de mutagénesis dirigida para los promotores *fla2* seleccionados.
- Evaluar los sitios de unión de CtrA en la región de control de los promotores *flgB2p* y *fliI2p*.
- Analizar *in silico* la región intercistrónica de *flgB-fliI* en otras α -proteobacterias

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas y plásmidos

Las cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados se encuentran enlistados a continuación (Tabla 1):

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Cepas	Descripción	Referencia
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>		
WS8N	Cepa silvestre, NaIR	(120)
AM1	derivada de WS8N, DfleQ::kan cckAL391F	(121)
EA1	derivada de AM1, DctrA::aadA	(90)
AR1	derivada de AM1 DflgB2-flil2::WSpC	este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10	cepa para transformación	Invitrogen
S17-1	recA endA thi hsdR RP4-2-Tc::Mu::Tn7	(122)
Rosetta	cepa para expresión, CmR	
Plásmidos		
pTZ19R	vector de clonación ApR	Fermentas
pJQ200 mp18	vector suicida mobilizable; GmR	(123)
pRK415	vector de expresión en <i>R. sphaeroides</i>	(124)
pRK415/uidA	pRK415 con el casete uidA-aadA	este trabajo
pWM5	plásmido fuente del casete uidA-aadA	(125)
pRK_flgB2p::uidA-aadA	pRK415/uidA llevando flgB2p	este trabajo
pRK_flgE2p::uidA-aadA	pRK415/uidA llevando flgE2p	este trabajo
pRK_fliF2p::uidA-aadA	pRK415/uidA llevando fliF2p	este trabajo
pRK_fliI2p::uidA-aadA	pRK415/uidA llevando fliI2p	este trabajo
pRK_fliL2p::uidA-aadA	pRK415/uidA llevando fliL2p	este trabajo

Tabla 2. Oligonucleótidos usados en este trabajo

Para obtener la cepa AR1	
DinterB2for	TCTAGATGGA ACTCCTTTCAACGAC
DinterI2rev	TCTAGAACGGT CGTCTGTCTACGA
Para obtener el plásmido pBAD_ctrA	
CtrABADFwSac	GAGCTCATGAGA ATACTGCTGGTGGGA
CtrABADRvEco	GAATTCTCCAG CCCACCCTTCCCCG
Para clonar los promotores silvestres	
	<i>flgB2p</i> (336 bp)
FlgBI5	GAGTCTGATATCCGGGCGTGTCTGGCATTG
FlgBI2	GAATTCACCCGGT CGCCCAGCGCGG
	<i>flgE2p</i> (303 bp)
pflgE2for	GAATTCGGT GCGAAACAACAGACT
pflgE2rev	GAGCTCATTG GCCGACTGCGTGAT
	<i>fliF2p</i> (331 bp)
FliFL5	GAATTCGATATCCGGGCGTGTCTGGCATTG
FliFL2	GAATTCAGGCCCG ACCAGGTGGCGTAG
	<i>fliI2p</i> (producto de 336 bp)
FliBI3	GAATTCGATATCCGGGCGTGTCTGGCATTG
FliBI6	GAGCTCCACCCGGT CGCCCAGCGCGG
	<i>fliL2p</i> (331 bp)
FliFL3	GAATTCAGACCGAGCACGGCCAGGAAC
FliFL6	GAGCTCAGGCCCG ACCAGGTGGCGTAG
Para los experimentos de 5'RACE	
flgB2 RACE	CGCACCATCTCATCCTCGAGCGAG
N3' flgB2 RACE	GACCGTGTGCGGTTGGGCGAAG
flgE2 RACE	GATATCCAGGGCGCTCGCGGTGCGAGA
N3' flgE2 RACE	CATTCTCCACCCGCCGATGGTGT
fliF2 RACE	CACCTCGTAGGCCGCGCCCTGCGCC
fliI2 RACE	GGGCAGGATCGCCACCTCGTGCACGAA
N3' fliI2 RACE	GCCGCAGAACCTCGCCGCCGAGGATG
fliL2 RACE	CCAAGGCTGATCACGATCGGGTCTGA
Para los experimentos de mutagénesis dirigida	
flgB2p -10	GTTTCACCAAGGCG CAAGGGCGATT CCTTTAG
flgB2p -13/-14	CACCAAGGCTT CGGGGCGATT C
flgB2p -17/-18	CAAGGCTTAAGG CGGATT CCTTTAGAAAG
flgB2p -23/-24	CTTAAGGGCGATT G GTTTAGAAAGGGTAAG
flgB2p -27/-28	GGGCGATTCTT CGGAAAGGGTAAGGCGC
flgB2p -35	TAGAAAGGGT G GGGCGCGAAC
flgB2p -42/-43	GAAAGGGTAAGGCG GCAACAAAGAGG ATTG
fliF2p -10	CCACATCCGT CCGGAT GGTCTGGGC
fliF2p -35	GATTGTT G GCCACATCCGTCA
fliI2p -10	TTGTTGCGCGCT CCCCCTTTCT
fliI2p -26/-27	TTAAGGGCGAGGC TTTAGAAAAG
fliI2p -35	CACCAAGGCTT CGGGGCGATT C
fliI2p -47/-48	CTCCCTCGATCGGT GCCACCAAGGCT TAAGGGC
fliL2p -10	GTCGATCTAG GGCCG GATCCC
fliL2p -35	GATTGTT G GCCACATCCGTCA

Medios y condiciones de crecimiento

Las cepas de *R. sphaeroides* se cultivaron en medio mínimo de Sistro (126) suplementado con ácido succínico a una concentración de 80 μ M (condiciones reducidas de la concentración normal de 30 mM), o bien, cuando se indica, sustituyendo el ácido succínico con casaminoácidos al 0.2%.

Para las condiciones de cultivo heterotróficas, las cepas se crecieron a 30°C, en oscuridad y con agitación constante a 180 rpm en una incubadora con agitador orbital. Para el crecimiento fotoheterotrófico en caja, las bacterias se crecieron en una jarra anaerobiosis con una bolsa de generación de gas (Beckton Dickinson and Company Gas Pack EZ anaerobe pouch system 8) y en condiciones de iluminación constante con dos focos incandescentes de 75 W. Los cultivos fotoheterotróficos líquidos fueron crecidos en tubos con tapón de rosca completamente llenos, igualmente en condiciones de iluminación continua.

Las cepas de *E. coli* fueron crecidas en medio LB en condiciones estándar (127). Todas las cepas fueron crecidas utilizando el siguiente esquema de antibióticos:

Tabla 3. Esquema de antibióticos y concentraciones

	Antibiótico	Concentración
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Kanamicina	25 µg/ml
	Tetraciclina	1 µg/ml
	Espectinomicina	50 µg/ml
<i>Escherichia coli</i>	Kanamicina	50 µg/ml
	Tetraciclina	12 µg/ml
	Espectinomicina	50 µg/ml
	Ampicilina	100 µg/ml
	Cloranfenicol	20 µg/ml
	Gentamicina	30 µg/ml

Reactivos

Todas las enzimas de restricción fueron adquiridas de Thermo Fisher Scientific. La Taq polimerasa PrimeSTAR HS utilizada para la amplificación del DNA se obtuvo de Takara Bio Inc. Diversos reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

Identificación de los sitios de unión de CtrA

La secuencia de DNA que contiene los genes *fla2* se analizó utilizando una matriz de peso de posición (PWM) construida a partir de la secuencia de la región promotora de 54 genes controlados por CtrA en *C. crescentus* (133). La búsqueda de posibles sitios de unión se llevó a cabo con las herramientas de análisis de secuencias de RSAT (Regulatory Sequence Analysis Tools) (<http://embnet.ccg.unam.mx/rsat>). Las alineaciones de secuencias se llevaron a cabo utilizando MUSCLE (134).

Técnicas de biología molecular:

Aislamiento de la cepa mutante AR1

Para obtener la cepa mutante AR1 en la cual la región intercistronica entre *flgB2* y *fliI2* incluyendo la región 5' de cada gen, fue sustituida con el cartucho omega-Spc^R, se procedió inicialmente a amplificar una región cromosómica de 2250 pb utilizando los oligonucleótidos DinterB2For y DinterI2Rev. El producto de PCR obtenido fue clonado en el vector pCR2.1-TOPO y posteriormente digerido con *Stu*I. La digestión con *Stu*I permitió la eliminación de dos fragmentos internos, uno de 392 y el otro de 126 pb. El plásmido lineal resultante se auto-ligó, dando por resultado la unión de la porción terminal de *flgB2* con el extremo terminal del gen *fliI2*. Este plásmido fue purificado, digerido nuevamente con *Stu*I y ligado con el cartucho W^{Spc}, obtenido del plásmido pBOR. El plásmido resultante fue digerido con la enzima *Xba*I cuyo sitio de reconocimiento fue diseñado en los oligos DinterB2For y DinterI2Rev, y el fragmento obtenido se subclonó en el plásmido suicida pJQ200mp18 (123). La cepa *E. coli* S17-1 con el plásmido resultante fue conjugada con *R. sphaeroides* siguiendo el protocolo previamente reportado (128). Dado que el plásmido pJQ200mp18 no se puede replicar en *R. sphaeroides*, las transconjugantes Spc^R y Gm^S representan los eventos de doble recombinación entre el plásmido y el cromosoma. La cepa mutante se verificó mediante PCR.

Fusión de los promotores flagelares al gen reportero *uidA*

La región reguladora de los promotores *fla2* para los genes *flgB2*, *fliI2*, *fliF2*, *fliL2* y *flgE2* se amplificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos indicados en la Tabla 2. Cada uno de los productos fue purificado y clonado en pTZ19R para su posterior secuenciación. Los fragmentos obtenidos a partir de estos plásmidos fueron subclonados en el plásmido pRK415/*uidA*. Este plásmido permite crear una fusión transcripcional con el gen reportero *uidA* que codifica la β -glucuronidasa. En el plásmido pRK415/*uidA* se clonó el casete *uidA-aadA* en el sitio BamHI, la orientación del casete permitirá la expresión del reportero *uidA*, al clonar un promotor cuya dirección de la transcripción sea del sitio EcoRI hacia el sitio SstI.

Ensayo de β -glucuronidasa

El ensayo para determinar la actividad de la β -glucuronidasa se realizó con extractos celulares derivados de cultivos en fase exponencial crecidos en condiciones fotoheterótrofas siguiendo el protocolo descrito previamente (96, 129). Como estándar, se utilizó una curva con diferentes concentraciones de 4-metilumbeliferona (Sigma-Aldrich). La concentración de proteínas en el extracto se determinó utilizando método de Bradford con reactivos de la marca Bio-Rad, utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

Mutagénesis sitio dirigida

La mutagénesis fue realizada siguiendo el método de Kunkel (1985) (130), utilizando DNA de cadena sencilla y los oligonucleótidos apropiados (Tabla 2). Los plásmidos pTZ19R que llevan clonados los fragmentos correspondientes a las regiones promotoras *flgB2p*, *fliI2p*, *fliL2p* y *fliI2p* se utilizaron como la cadena molde. La presencia de las mutaciones fue verificada mediante secuenciación.

Búsqueda de los sitios de inicio de la transcripción mediante 5'-RACE (*5'rapid amplification of cDNA ends*)

El RNA total de las células bacterianas fue extraído a partir de cultivos líquidos en condiciones fotoheterotrófas en fase logarítmica crecidos en medio sistrom suplementado con cas aminoácidos utilizando el kit RiboPure-Bacteria (ThermoFisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA residual de las muestras fue eliminado utilizando DNAsa I (Roche). Para determinar el sitio 5' del RNAm de *flgB2*, *fliI2*, *fliF2*, *fliL2* y *flgE2*, se utilizaron los oligonucleótidos previamente enlistados en la Tabla 2. Los productos de PCR obtenidos a partir de estos experimentos se clonaron en el plásmido pCR2.1-TOPO y fueron secuenciados.

Purificación de la proteína His6X-CtrA y producción de anticuerpos

El gen *ctrA* se amplificó utilizando los oligonucleótidos ctrABADFwSac y ctrABADRvEco. El amplicón resultante se clonó en el vector comercial pBAD/HisA (Invitrogen) y se introdujo en la cepa Rosetta de *E. coli*, la cual fue crecida en medio LB suplementado con L-arabinosa al 0.2% durante 4 horas a 37°C. Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 1/100 del volumen original en buffer de fosfatos (PBS): Na₂HPO₄ 0.058 M, NaH₂PO₄ 0.017 M y NaCl 0.068 M, pH 7.4. La suspensión celular se sonicó en un baño de hielo con cinco pulsos de 10 segundos. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se mezcló con una alícuota de la suspensión de Ni-NTA-agarosa (Qiagen) y la mezcla fue incubada durante 1 hora en hielo en presencia de 20 mM imidazol. La mezcla se cargó en una columna de polipropileno (1 ml de capacidad) y se lavó la resina con PBS / imidazol 30 mM / NaCl 200 mM. La proteína se eluyó utilizando PBS con 250 mM imidazol.

Seis ratones hembra BALB/c de tres semanas de edad se inmunizaron intraperitonealmente con 2 dosis de 20 µg de proteína His6X-CtrA (para cada ratón) en adyuvante incompleto de Freund con un intervalo de 21 días. Dos semanas más tarde se extrajo sangre de los ratones y se obtuvieron antisueros mediante centrifugación a baja velocidad. La especificidad de los anticuerpos anti-CtrA se evaluó mediante Western blot siguiendo protocolos previamente descritos (131). En este ensayo, los extractos de células totales de las cepas AM1 y EA1 se utilizaron como controles positivos y negativos, respectivamente.

Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

El ChIP se llevó a cabo siguiendo el protocolo previamente descrito (128) con las siguientes modificaciones: se utilizaron cepas de *R. sphaeroides* crecidas en condiciones fotoheterotróficas cultivadas en 15 ml de medio de Sistrom con cas aminoácidos como fuente de carbono. A una DO_{600} de 0.5, el cultivo fue transferido a un matraz Erlenmeyer de 125 ml, se agregaron 0.41 ml de formaldehído recién preparado al 37% y se incubó durante 10 min a 30°C con agitación lenta. Pasado este tiempo los matraces se incubaron en hielo durante 30 min. Las células se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en 250 μ l de PBS con inhibidores de proteasa (tabletas de cóctel inhibidor de proteasa sin EDTA, completas, Roche).

A continuación, las muestras se incubaron a temperatura ambiente con lisozima (80 μ g/ml) durante 15 min; después de este tiempo, se añadieron 2.5 μ l de Triton X-100 y 5 μ l de EDTA 50 mM. Después de 10 min, se sonicó 10 veces durante 8 segundos (ciclo de trabajo de 30%) en hielo. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 10,000 x g durante 5 min. Los sobrenadantes se transfirieron a un tubo limpio con 100 μ l de una mezcla de Proteína A-Sefarosa/DNA/BSA.

Las muestras se incubaron a 4°C en un agitador de plataforma oscilante durante 2 horas y se centrifugaron durante 3 min a 550 x g. Los sobrenadantes se transfirieron a un tubo limpio, de aquí se extrajo una alícuota de 20 μ l para usarla como control (input). La muestra restante se mezcló con 4 μ l de anticuerpo anti-CtrA y se incubó durante la noche a 4°C en un agitador de plataforma oscilante. Los

complejos se capturaron añadiendo 100 µl de Proteína A-Sefarosa/DNA/BSA, e incubando la mezcla durante 2 horas.

El material inmunoprecipitado se lavó dos veces en buffers de baja y alta concentración de NaCl (baja concentración: SDS al 0.1%, Tritón X-100 al 1%, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, Tris 20 mM, pH 8; alta concentración: SDS al 0.1%, Tritón X-100 al 1%, EDTA 2 mM, NaCl 500 mM, Tris 20 mM, pH 8). Posteriormente se lavó dos veces en buffer LiCl (LiCl 0.25 M, Tritón X-100 al 1%, desoxicolato al 1%, EDTA 1 mM, Tris 10 mM, pH 8) y dos veces en buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Las muestras se resuspendieron en 500 µl de buffer de elución (SDS al 1%, NaHCO₃ 0.1 M, NaCl 300 mM) y se incubaron durante la noche a 65°C.

Las muestras se trataron durante 30 min con 50 µg de RNasa durante 30 min a 37°C y posteriormente con 120 µg de proteinasa K durante 30 min. El DNA se purificó usando el kit de purificación QIAquick PCR. Se realizaron tres ensayos independientes para las cepas AR1 y EA1 que portaban el plásmido pRK_ *flgB2p::uidA-aadA*; y dos veces para AR1 con pRK_ *flgB2p -10::uidA-aadA* ó pRK_ *flgB2p -35::uidA-aadA*.

PCR semicuantitativa

Para evaluar la presencia de la región *flgB2-fli2* en las muestras de CHIP, se realizó una reacción de PCR y se evaluó la cantidad de producto en diferentes ciclos de la reacción. Los productos de DNA se analizaron mediante electroforesis en gel de acrilamida al y se cuantificaron utilizando el software Image J (132).

RESULTADOS

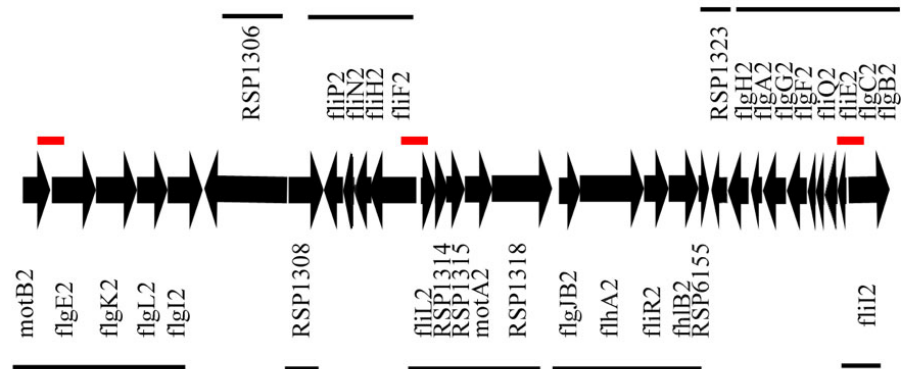
Construcción de plásmidos reporteros que contienen seleccionados promotores *fla2*

Se analizó la región cromosómica *fla2* en búsqueda de sitios de unión para CtrA. Usando un umbral de 5, la búsqueda identificó 57 posibles sitios de unión, muchos de los cuales estaban dentro de regiones codificantes. Con un umbral de 5.5 se identificaron 34 sitios, entre estos se encontraron las regiones reguladoras de los genes *motB2*, *flgE2*, *motA2*, así como tres regiones intercistónicas que contienen promotores divergentes correspondientes a *fliF2-fliL2*, *flgB2-fliI2* y *flgJ2-fliK2* (Tabla Anexo 1). Dada la naturaleza palindrómica del sitio de unión a CtrA, con frecuencia se registraban dos sitios para cada promotor; también notamos que en una misma región reguladora se encontraban ocasionalmente varios posibles sitios (por ejemplo, para el gen *motA2*). Además, se identificaron once sitios posibles de unión a CtrA dentro de las regiones codificantes, que podrían representar falsos negativos (Tabla Anexo 1).

Para evaluar la relevancia funcional de los sitios identificados, se clonaron las regiones intercistónicas localizadas entre *fliL2-fliF2* y *flgB2-fliI2* (Figura 19) en un plásmido con el gen reportero *uidA* (pRK415/*uidA*) con el objetivo de crear una fusión transcripcional entre estos promotores y el gen *uidA*, que codifica para la enzima β -glucuronidasa. Para probar la actividad de los cuatro promotores (i.e. *fliL2p*, *fliF2p*, *flgB2p* y *fliI2p*), se clonaron las regiones promotoras en ambas

orientaciones con respecto a *uidA*. Estas construcciones se introdujeron en la cepa AM1 (para simplificar, esta cepa será llamada a partir de ahora como wild type o WT) y su derivada $\Delta ctrA$ (cepa EA1).

Se observó que todos los plásmidos presentaron una síntesis elevada de β -glucuronidasa en la cepa AM1 (WT), pero no en la cepa EA1 ($\Delta ctrA$) (Figura 19). Estos resultados indican que cada una de estas regiones contiene un promotor funcional dependiente de CtrA. Para probar una región que no correspondiera a un promotor divergente, se clonó la región regulatoria de *flgE2* en el plásmido pRK415/*uidA*, dicho promotor también promovió la expresión del gen reportero en la cepa AM1, pero no en la cepa $\Delta ctrA$ (Figura 19).



	WT	$\Delta ctrA$
<i>fliL2p</i>	204	0.28
<i>fliF2p</i>	166	1
<i>flgB2p</i>	125	0.52
<i>fliI2p</i>	99	0.37
<i>flgE2p</i>	148	1.4

Figura 19. Esquema de la región cromosomal que contiene los genes flagelares *fla2* en *R. sphaeroides* y arreglo de las unidades transcripcionales. Las flechas indican el sentido de la transcripción. El nombre de los genes que son transcritos de izquierda a derecha está indicado bajo las flechas y el nombre de los genes transcritos en el sentido opuesto se indica arriba de las flechas. La línea negra arriba y debajo de los nombres, indica el arreglo de las unidades transcripcionales. Las líneas rojas indican las regiones regulatorias analizadas en este trabajo. Para una sencilla identificación, las flechas que representan a *flgB2* y *flgI2* están coloreadas en violeta y naranja, respectivamente. En la parte inferior de la Figura se muestran las actividades de la b-glucuronidasa expresada por los promotores *fliL2p*, *fliF2p*, *flgB2p*, *flgI2p* y *flgE2p* en las cepas AM1 y su derivada EA1 ($\Delta ctrA$).

Adicionalmente, para validar nuestro sistema de plásmidos, se clonó el promotor del gen *fliQ* de *C. crescentus* (conocido por ser activado por CtrA) en el plásmido pRK415/uidA y se introdujo a las cepas AM1 y EA1. Conforme a lo esperado, se detectó actividad de β -glucuronidasa en la cepa AM1, pero no en EA1 (datos no mostrados).

Determinación del sitio de inicio de la transcripción de los promotores *fliL2p*, *fliF2p*, *flgB2p*, *fliI2p* y *flgE2p*

Para caracterizar con más detalle los promotores de los genes *fliL2p*, *fliF2p*, *flgB2p*, *fliI2p* y *flgE2p*, se determinó el sitio de inicio de la transcripción (TSS) mediante 5'-RACE. El TSS fue establecido secuenciando cinco clonas independientes de cada muestra, para estos promotores, el nucleótido de inicio fue siempre una purina (Figura 20, sombreado rosa). Las regiones río arriba del TSS se alinearon usando MUSCLE y también por criterio visual; de esta alineación fue posible detectar una secuencia similar al sitio de unión de CtrA (Fig 20, sombreado amarillo).

reconocimiento a CtrA está separada por 6 nt en lugar de 7 nt, que corresponde al consenso reportado (Figura 20). Para *flgB2p*, el algoritmo detectó dos sitios de unión diferentes (Tabla Anexo 1, resaltado en verde). El primero con un valor de 8.3 que se superpone con el TSS, y por lo tanto no podría ser funcional para el sitio de inicio de transcripción identificado; el otro sitio mostró un valor de probabilidad muy bajo (5.9), que contrasta con el valor observado para los sitios de unión predichos para los genes *fliF2p*, *fliL2p* y *flgE2p* (9.7, 9.3 y 10.3, respectivamente), y además se encuentra río arriba de la secuencia representada en la figura 20, y por lo tanto demasiado alejado de la posible caja -10. Para *fliI2p*, el algoritmo predijo dos sitios de unión, uno de ellos prácticamente traslapado al -10, y por ende demasiado cerca del TSS (Tabla Anexo 1, línea 30), y para el otro sitio predicho, el elemento izquierdo del palíndromo (TTAA) se ubica río arriba de la secuencia mostrada en la figura 20, pero cuyo elemento derecho (TTAA) corresponde al elemento izquierdo propuesto, y resaltado en amarillo, en la figura 20.

Para confirmar la relevancia funcional de cualquiera de estos sitios nos planteamos el llevar a cabo experimentos de mutagénesis dirigida.

Mutagénesis dirigida de los promotores *fla2*

Para determinar si las secuencias identificadas a partir de los alineamientos de las regiones promotoras de los genes *flgB2p*, *fliI2p*, *fliF2p* y *fliL2p* eran importantes para promover la transcripción, se realizó mutagénesis dirigida de algunos nucleótidos. Para cada promotor se cambiaron dos bases de la región

donde se propone se encuentra el sitio de unión de CtrA, y dos bases de la supuesta región promotora -10 (Figura 21, cambios resaltados en rojo). Las regiones que llevan estas mutaciones, denominadas -10 y -35 para cada promotor, fueron clonadas en el plásmido pRK415/uidA e introducidas en la cepa AM1 para determinar la cantidad de β -glucuronidasa presente en los extractos celulares totales.

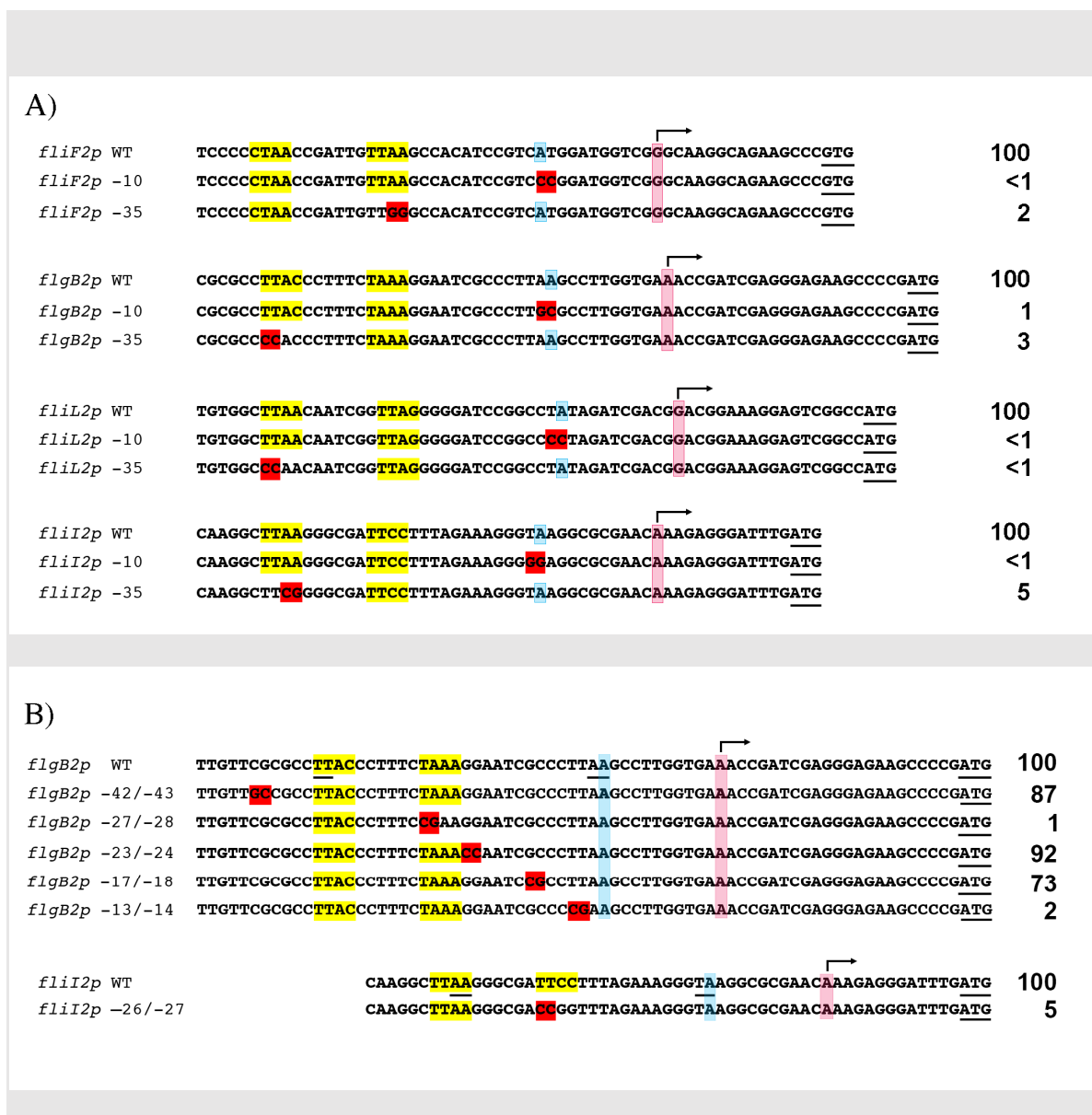


Figura 21. Actividad de β -glucuronidasa en la cepa AM1 de los promotores silvestres y mutantes. La actividad de la β -glucuronidasa se muestra del lado derecho como porcentaje con respecto al promotor silvestre (WT). El sitio de iniciación de la transcripción está indicado en color rosa. El nucleótido conservado en la posición -11 está indicado en color azul. Las regiones que coinciden con la secuencia consenso de CtrA están resaltadas en color amarillo. Los codones de iniciación de la traducción se encuentran subrayados. Las regiones que fueron mutagenizadas se muestran en color rojo. **A)** Mutagénesis dirigida en las bases que afectan el sitio de la secuencia consenso de unión a CtrA (-35) y en la posición -11 (-10) y **B)** Mutagénesis dirigida en varias posiciones de la región que contiene el promotor *flgB2p* y *fliI2p*. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

Para los cuatro promotores se observó una fuerte reducción en la actividad de la β -glucuronidasa cuando las mutaciones afectaron cualquiera de las dos regiones (Figura 21A), lo que sugiere que estos cambios podrían afectar el sitio de unión a CtrA, en el caso de los cambios en la región -35, y el reconocimiento de la RNA polimerasa, en el caso de los cambios en -10.

Para analizar en detalle una de estas regiones de control, se generaron mutaciones a lo largo de la región de control que contiene al promotor *flgB2p* (Figura 21B). Al introducir estos plásmidos en la cepa AM1 se observó una clara reducción en la producción de la β -glucuronidasa cuando se mutaron las posiciones que se encuentran río arriba de la posición -11 (-13/-14), y cuando se alteró el elemento derecho del posible sitio de unión de CtrA (-27/-28) (Figura 21B). Las mutaciones en las posiciones -17/-18, -23/-24 y -42/-43 no afectaron la expresión del gen reportero.

Estos resultados apoyan la idea de que existen posiciones específicas en este promotor que son indispensable para el inicio de la transcripción; siendo estas aquellas que se encuentran alrededor de la posición -11 que representarían la caja -10 para el reconocimiento de la RNA polimerasa, y el sitio de unión de CtrA, que incluye ambas regiones (derecha e izquierda) del palíndrome imperfecto TTAA.

Para el promotor *fli2p*, el elemento derecho del posible sitio de unión para CtrA también fue modificado (Fig. 21B, posiciones -26/-27), estos cambios redujeron significativamente la cantidad de β -glucuronidasa producida en comparación con el promotor WT (Fig. 21B), lo que indica que esta región puede representar el sitio de unión de CtrA. Como se mencionó anteriormente, se predijo un sitio de unión a CtrA por medio de análisis bioinformático cuyo elemento izquierdo del palíndrome se ubica río arriba de la secuencia representada en la figura 21, por lo tanto, para determinar si esta región es relevante para la actividad promotora de *flg2p*, se realizaron mutaciones en las posiciones -47/-48 del gen *fli2p*, sin embargo no se observó una reducción en la cantidad de β -glucuronidasa (datos no mostrados), lo que sugiere que el sitio de unión de CtrA debe corresponder a la secuencia resaltada en amarillo en la figura 21.

Como se mencionó, *flgB2* y *fli2* son promotores divergentes, así como sucede con *fliF2* y *fliL2*. Los resultados obtenidos a partir de los experimentos de mutagénesis indican que la arquitectura de estas regiones promotoras es diferente. La figura 22 muestra el arreglo de las secuencias relevantes en estas regiones y muestra cómo un solo sitio de unión de CtrA promueve la activación de *flgF2p* y

fliL2p, mientras que *flgB2p* y *fliI2p* son activados utilizando sitios independientes de unión a CtrA.

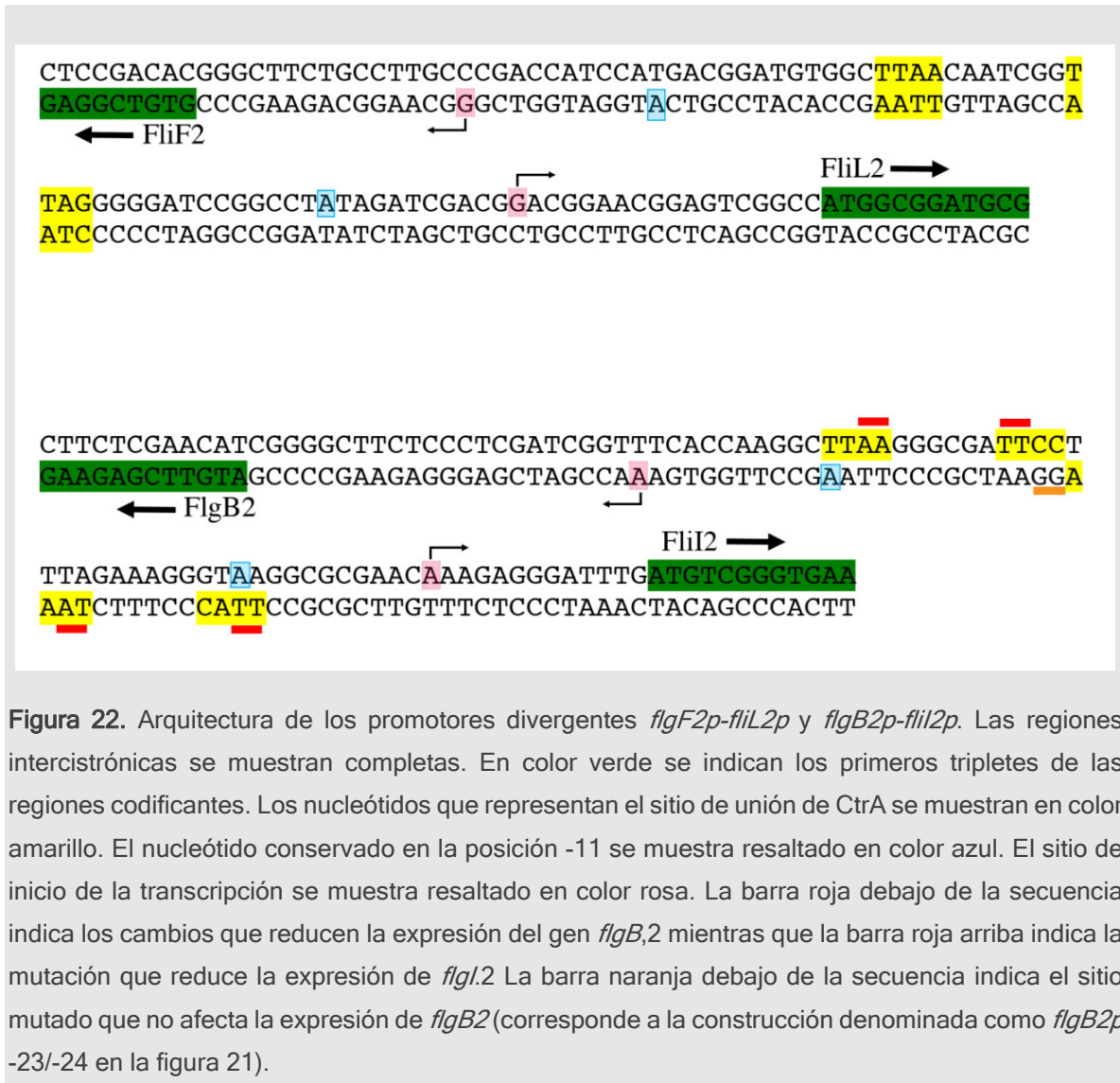


Figura 22. Arquitectura de los promotores divergentes *flgF2p-fliL2p* y *flgB2p-fliI2p*. Las regiones intercistónicas se muestran completas. En color verde se indican los primeros tripletes de las regiones codificantes. Los nucleótidos que representan el sitio de unión de CtrA se muestran en color amarillo. El nucleótido conservado en la posición -11 se muestra resaltado en color azul. El sitio de inicio de la transcripción se muestra resaltado en color rosa. La barra roja debajo de la secuencia indica los cambios que reducen la expresión del gen *flgB2* mientras que la barra roja arriba indica la mutación que reduce la expresión de *flgI2*. La barra naranja debajo de la secuencia indica el sitio mutado que no afecta la expresión de *flgB2* (corresponde a la construcción denominada como *flgB2p*-23/-24 en la figura 21).

Unión de CtrA a los promotores *flgB2p* y *fliI2p*

Los intentos por detectar la unión de His6X-CtrA a los diferentes promotores *fla2* utilizando el ensayo de cambio de la movilidad electroforética en gel (EMSA),

así como el ensayo de protección a DNasa no tuvieron éxito quizá porque CtrA no se encontraba en estado fosforilado; por lo tanto, decidimos emprender un enfoque in vivo utilizando ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Para estos experimentos usamos el plásmido pRK415/uidA que lleva la región de los promotores *flgB2p-flil2p* en la cepa AR1, en la cual la región cromosómica correspondiente a *flgB2p* y *flil2p* fue eliminada.

La cantidad de *flgB2p* inmunoprecipitada por los anticuerpos α -CtrA se detectó mediante PCR semicuantitativa. Se observó una cantidad importante del producto de PCR de *flgB2p-flil2p* en las muestras obtenidas de AR1, en donde CtrA se une a esta región, en comparación con lo observado para las muestras provenientes de EA1 ($\Delta ctrA$) en donde la ausencia de CtrA provoca la detección de la región regulatoria a niveles basales (Figura 23).

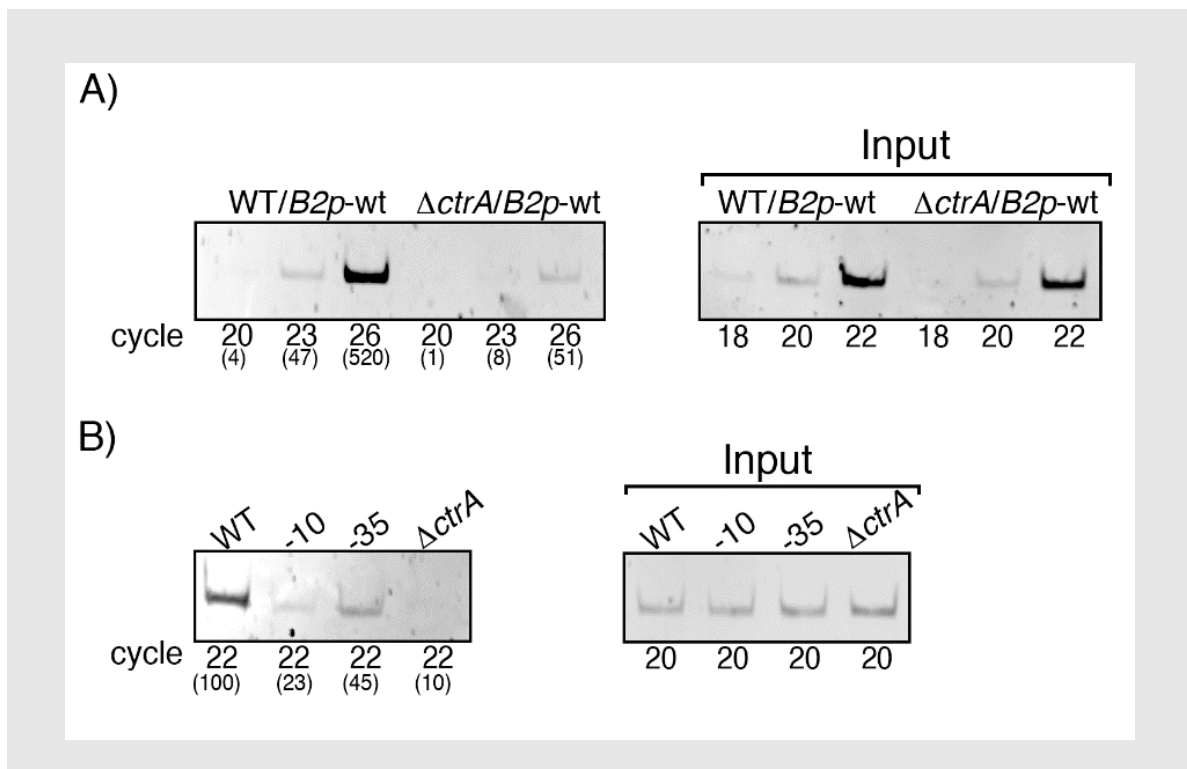
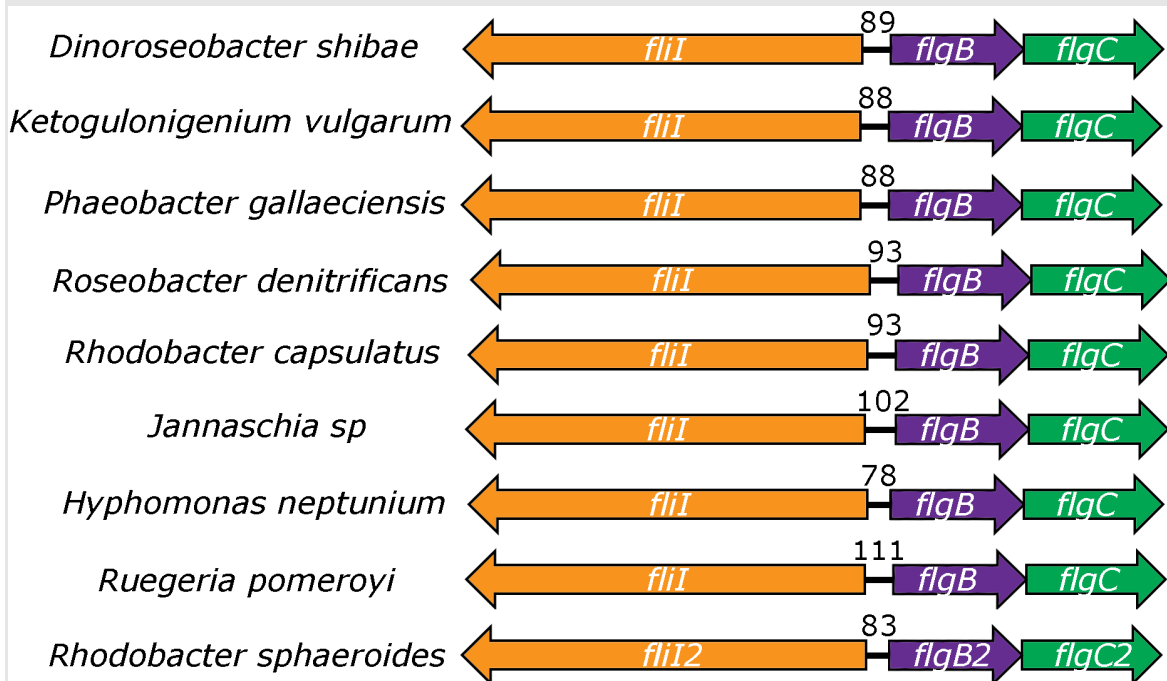


Figura 23. Unión de CtrA a la región reguladora *flgB2p-flil2p*. El DNA inmunoprecipitado con los anticuerpos anti-CtrA fue amplificado con los oligonucleótidos flgB12 and flgB15. Las muestras fueron tomadas a diferentes ciclos de amplificación y analizadas por electroforesis. Se muestran fotografías representativas de 3 experimentos independientes. En **A**, los números entre paréntesis representan al valor obtenido por análisis de densidad. En **B**, los números entre paréntesis representan el porcentaje de cambio con respecto al control WT (promotor silvestre).

Se procedió entonces a determinar la cantidad de *flgB2p-flgIp2* precipitada por los anticuerpos α -CtrA utilizando la cepa AR1 transformada con los plásmidos que llevan *flgB2p-10* y *flgB2p-35*. Dada la arquitectura de *flgB2p* y *flil2p*, cabe destacar que el cambio en la región -10 de *flgB2p* afecta también el sitio de unión de CtrA de *flil2p* (ver Figura 22), por lo que en ambas muestras existe un sitio de unión a CtrA mutagenizado. De acuerdo con esto, se observó una reducción significativa en la cantidad de DNA inmunoprecipitado al utilizar los promotores mutantes. Lo anterior apoya la propuesta de que estas secuencias representan el sitio de unión de CtrA.

Análisis de la región intercistrónica de *flgB-flil* en otras α -proteobacterias

Los genes *flgB2* y *flil2* son sinténicos en varias α -proteobacterias. Se analizó la región intercistrónica de estos genes en *R. sphaeroides* y en otras siete especies de la familia *Rhodobacteraceae* y en una especie de la familia *Hyphomonadaceae* que pertenece al orden de las *Rhodobacterales*. Estas regiones reguladoras se muestran en la figura 24, es evidente que en la mayoría de los casos hay limitaciones de espacio para la presencia de los promotores y de los sitios de unión a CtrA.



D. shibae

GGTCATCGTCGGCCTTCTGGTCCGTTGGATGTTCACTTACTGTTTCTAAAGGAA
TCGGGGTTAA GCCTTGGTTGAAACCATCGTGGGAGAAGCCCCGATATGAAA

K. vulgare

GCGCATGTAAAAATCCCTCGTGATCAGCCCGGCACAACCTCTCTTTAAGGAATCAG
CCTTAAATCTTGGTTGAAACCACAAAGGAAAGCGCCCGATGCAT

P. gallaeciensis

GATCATGTTCTGGTGTCTCCAACCTGTTCCCTGAAAACAATTTCTAAAGGAATCGGGG
TTAAGCCTTGA TTGAAATTGATCGAGGGAGAAGCCCCGGTGT

R. denitrificans

GGGAATCGGCTGGTTCATGTCATTCCTTTGCTTTCTGCACACTCTTTCTAAAGGAA
TCAGAGTTAAGCCTTGA TGAAATCACACGAGGGAGAAGCCCGGATGTTT

R. capsulatus

CGCCATTCTGGCCCCCGTGTCTTCGGTTCGGTGTTCCTTGAACGCTTTTTTAAACGA
TTCTCTCTTAA GCCTTGGTTGATAGCTCGGAGGAGAAACCCCGATGTTT

Jannaschia sp.

AGACATGGCGGATTCTCCAAACCAATCGGCGCGGGATGTGCGCCTTCATTACGGAA
TGTAAGGAATCAGTCTTAA GCCTTTCGTAGCCGAGATGGGAGAAGCCCAGATGTTT

H. neptunium

TGCCATGGATGCCTGCAAGTAAACAACTCCGCATTTCTGT TAA CCTGTTC TTTAG
TTAATGCGAACATTTTCCCAAAGGGTTAACCTTGGTGAAT

R. pomeroyi

TTTCAGGGCGAGGGGGTCTGGGGCCGTCATCGGGATATCTCCAACAATTTCTGAA
AACGGTTTCTAAACGAATCGGGGTTAAGCCTTGA TTGAAATTGATCGAGGGAGAAGCCCCG
ATGTTT

R. sphaeroides

GAACATCGGGGCTTCTCCCTCGATCGGTTTACCAAGGCTTAAGGGCGATTCC TTTAGAAA
GGTAA GCGCGAACAAGAGGGATTTGATGTCC

Figura 24. Sitios de unión de CtrA en los promotores divergentes *flgB-flgI* en varias especies bacterianas. Regiones intercistrónicas entre *flgB-flgI* presentes en *R. shphaeroides* y en otras siete especies de la familia de las *Rhodobacteraceae* y en *Hyphomonas neptuni* perteneciente al orden de las *Rhodobacterales*, que muestran un arreglo similar al observado en la región homóloga en *R. sphaeroides*. La región codificadora de *flgI* está resaltada en naranja y la de *flgB* en violeta. En la parte baja de la figura se muestra la secuencia presente en la región intercistrónica y las secuencias predichas como los posibles sitios de unión a CtrA se encuentran resaltadas en amarillo, en el caso de activar la expresión de *flgB*, o subrayadas cuando están orientadas para activar la expresión de *flgI*.

Para *Rhodobacter capsulatus*, *Dinoreoseobacter shibae* y *Ruegeria pomeroyi*, se ha establecido que la expresión de los genes flagelares es dependiente de CtrA (109, 117, 135) y dado que en las otras especies es posible encontrar los genes que codifican para la cinasa de histidina, CckA, la fosfotransferasa ChpT y CtrA, es factible suponer que en estos organismos los genes flagelares también podrían estar controlados por CtrA. Utilizando la PWM publicada anteriormente para *C. crescentus*, se buscaron los sitios de unión de CtrA en estas regiones intercistrónicas usando un umbral de 3. A partir de estos análisis encontramos que para algunas especies no fue posible encontrar sitios putativos CtrA con puntuaciones superiores a 3.5, lo que podría indicar que la secuencia de reconocimiento de CtrA puede apartarse del consenso publicado; en otros casos, el análisis de la secuencia reveló la presencia de un solo sitio con una alta puntuación, lo que podría indicar que en estos casos un solo sitio de unión a CtrA podría usarse para activar estos promotores como ocurre en *Dinoreoseobacter shibae* y *Jannaschia sp*, mientras que dos sitios de unión de CtrA parecen ser necesarios para la activación en *Ketogulonigenium vulgare* (Figura 24). Lo anterior, sugiere que la

activación mediada por CtrA puede ocurrir utilizando más de un tipo de arquitectura en el promotor, de forma similar a lo observado en *R. sphaeroides*.

DISCUSIÓN

Los estudios realizados en el laboratorio demostraron que en *R. sphaeroides*, la expresión de los genes flagelares *fla2* se encuentra bajo el control del sistema de dos componentes CckA/ChpT/CtrA (90); sin embargo, no se contaba con evidencia que demostrara que dicha activación ocurría de forma directa. En este trabajo se demuestra que *in vivo* CtrA se une a la región reguladora de los promotores *flgB2-flgI2* y que dicha unión depende de la integridad de las secuencias que son similares al sitio consenso de unión de CtrA. La idea de que la proteína CtrA de *R. sphaeroides* podría reconocer una secuencia similar a la secuencia consenso previamente reportada en *C. crescentus*, fue apoyada por los experimentos que demostraron que el promotor *fliQ* de este microorganismo promueve la transcripción de un gen reportero en *R. sphaeroides* de una forma dependiente de CtrA.

Por lo anterior, se realizó una búsqueda bioinformática que nos permitió identificar los posibles sitios de unión a CtrA en el locus que contiene los genes *fla2*, encontrándose que existe un sitio de unión a CtrA prácticamente para cada unidad transcripcional.

La identificación de los sitios de inicio de la transcripción para cinco diferentes promotores nos permitió caracterizar en detalle estas regiones de control. En particular, observamos que todos ellos inician con una purina, contienen una adenina invariante en la posición -11, una guanina en la posición -4, y una secuencia de unión a CtrA cerca del -35. La iniciación de la transcripción con una purina ha

sido reportada como una característica común en varios promotores bacterianos (136-138). Además, la A-11 podría representar un contacto relevante para la RNA polimerasa asociada con el factor $\sigma 70$, ya que ha sido reportado que justamente esta posición se extruye de la doble hélice durante la formación del complejo abierto, y la identidad de dicho nucleótido es esencial para interactuar con la RNA polimerasa (139). Por lo tanto, estas dos características son comunes a otros promotores y podrían ser relevantes para el proceso de iniciación. La posición conservada G-4, se ubica en la región conocida como elemento discriminador, la cual en *E. coli* se sabe que interactúa con el dominio 1.2 de la RNA polimerasa y en el caso de contener un alto contenido de G o C, la vida media del complejo abierto es más larga. No obstante, no se observa en la región una corrida de guaninas o citosinas y por lo tanto la relevancia de esta posición queda por ser investigada.

Nuestro análisis concerniente a los sitios de unión de CtrA se centró en los promotores divergentes *fliL2p-fliF2p* y *flgB2p-fliI2p*. Ensayos de mutagénesis dirigida y ChIP nos permitieron proponer cuales son las secuencias que representan los sitios de unión a este factor de transcripción.

Se sabe que promotores divergentes no solo presentan un espacio reducido para albergar a la RNA polimerasa y otros factores de transcripción, sino que también pueden verse afectados por cambios en el superenrollamiento generado por transcripción adyacente (140-142). Observamos que, independientemente de que la región intercistronica de *flgB2* y *fliI2* es de sólo 47 pb contando desde el sitio de inicio de la transcripción, hay dos sitios independientes de unión de CtrA en esta

región. Los experimentos de mutagénesis claramente indican que al afectar el sitio de unión de CtrA para uno de los promotores, la expresión del promotor divergente no se altera como lo ilustra la construcción *flgB2p*-23/-24 (que no afecta el sitio de CtrA para activar *flgB2*, pero sí afecta el sitio de CtrA para *flgI2p*, y pese a ello el nivel de transcripción de *flgB2* no se altera).

Cabe destacar que el sitio de unión de CtrA propuesto para estos promotores (es decir, *flgB2p* y *fliI2p*) no se ajusta a la secuencia consenso previamente reportada, ya que para *flgB2p* y *fliI2p*, los elementos izquierdo y derecho del sitio de unión de CtrA están localizados a solo 6 pb de distancia. Dado que la evidencia experimental apoya la idea de que estas secuencias representan el sitio de unión a CtrA funcional, nuestros resultados nos llevan a sugerir que en ciertos casos CtrA es capaz de activar la transcripción utilizando sitios de unión atípicos. Una posible explicación podría ser que una región intercistrónica muy corta entre promotores divergentes podría verse particularmente afectada por el superenrollamiento negativo del DNA (*undertwisting*) que ocurre río arriba. Esta conformación sería provocada por la actividad transcripcional divergente de estos promotores, permitiendo un mejor reconocimiento del sitio de unión de CtrA, independientemente del hecho de que los elementos de reconocimiento izquierdo y derecho se encuentran a solo 6 pb. En este contexto, es importante hacer notar que un espaciado similar de solo 6 nt, entre los elementos TTAA izquierdo y derecho del sitio de unión de CtrA ha sido descrito para *Magnetospirillum magneticum* (107), aunque su funcionalidad no ha sido probada. También, en *C. crescentus* se observó

un espaciado atípico para los elementos derecho e izquierdo del sitio de unión de CtrA en el promotor P2 que promueve la transcripción de *ctrA* (143).

Por otro lado, se observó una situación diferente para la activación de *fliF2p* y *fliL2p*, dado que solo se requiere un sitio de unión de CtrA para activar ambos promotores divergentes. Estos resultados sugieren que el sitio de unión de CtrA con ambos promotores debe estar correctamente orientado en la misma cara de la hélice del DNA. En este sentido, identificamos solo una secuencia consenso para CtrA entre los promotores divergentes *fliI* y *flgB* en otras especies de α -proteobacterias, como en *D. shibae* y *Jannaschia* sp., lo que sugiere que podría ser una característica común. Alternativamente, es posible que la matriz de peso utilizada no represente los sitios de unión de CtrA en las regiones reguladoras de otras bacterias, en cuyo caso otros sitios de unión de CtrA quedarían por ser identificados.

CONCLUSIONES

En este trabajo encontramos que CtrA activa directamente la expresión de los genes flagelares *fla2* de *R. sphaeroides*. La identificación del sitio de inicio de la transcripción para varios promotores *fla2* nos permitieron identificar varias de las características conservadas, como una adenina en la posición -11 y una purina en el sitio de inicio de la transcripción. Los sitios de unión de CtrA fueron probados por mutagénesis dirigida y encontramos que CtrA activa la expresión de los promotores divergentes *fliL2p-fliFp2* utilizando un solo sitio de unión, mientras que para los promotores divergentes *flgB2p-fliI2p* CtrA activa la transcripción usando dos sitios independientes. Además, encontramos que el sitio de unión de CtrA también podría ser funcional cuando el elemento izquierdo y derecho del motivo completo son 6 pb, esto correspondería a TTAA N6 TTAA.

ANEXO 1. En amarillo se resaltan los sitios orientados en la dirección de transcripción del gen. En verde los sitios predichos en la región intercistrica *flgB2-flgI2*.

Tabla Anexo 1			
Dirección	secuencia	PWM score	Nombre gen
R	TGAAGGGAGCCTTAAT	6.4	río arriba de motB2
D	TTAAGGCTCCCTTCAC	7.9	río arriba de motB2
R	TTAACACCCGCCTAAC	9.7	río arriba de flgE2
D	TTAGGCGGGTGTAAAG	10.3	río arriba de flgE2
R	CCAAAAGGTCGTTACC	8.4	región codificante flgI2
R	TCAGCAAGCCCTATAC	6	región codificante RSP1306
D	GTAGCCCGAGGTGAAG	5.7	región codificante RSP1306
R	CTACGGTTCGTCAAA	6	región codificante RSP1306
D	ATACCAGGTCAGGAAC	6	región codificante fliP2
R	TTACGAAGAGGGCTAC	5.8	región codificante fliH2
R	CTAACCGATTGTAAAG	9.7	río arriba de fliF2
D	TTAACAATCGGTTAGG	9.3	río arriba de fliL2
R	TTAAGATAACTTCACT	7	río arriba de motA2
D	GTGAAGTTATCTTAAC	8.2	río arriba de motA2
R	GTTAAGATAACTTCAC	6.7	río arriba de motA2
D	TGAAGTTATCTTAACC	6.9	río arriba de motA2
R	GCGGGGTTAAGATAAC	5.7	río arriba de motA2
R	GCAAGGCGGGGTTAAG	7.2	río arriba de motA2
R	ATCGAAGGCGGGTTAAC	7	río arriba de sltF2
D	CCAAGGCACCGCTAAC	6.9	río arriba de sltF2
R	TTGGGAAACGGTTAGC	6.9	río arriba de sltF2
R	TGACAACGAAGTTCAC	5.9	región codificante flhA2
R	TGAACGCCAAGGTAAT	6	región codificante flgG2
D	TTACCTTGCGTTCAG	7.2	región codificante flgG2
R	TTAAGCCTTGGTGAAA	8.3	río arriba de flgB2
D	TTCACCAAGGCTTAAG	7.1	río arriba de flgI2
R	CTTACCCTTTCTAAAG	5.9	río arriba de flgB2
D	TTTAGAAAGGGTAAGG	7.1	río arriba de flgI2
D	GTCAGAGACCGGTAAC	6.1	región codificante flgJ2
R	TTACGGAACATTTACG	6.6	río arriba de flgJ2
D	GTAAATGTTCCGTAAT	7.6	río arriba de fliK2
R	ATTACGGAACATTTAC	7.8	río arriba de fliK2
D	TAAATGTTCCGTAATC	7.6	río arriba de fliK2
R	GTAGTCGGACGTGACC	5.8	región codificante flgD

REFERENCIAS

1. Berg HC. 2003. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem* 72:19-54.
2. Nakamura S, Minamino T. 2019. Flagella-Driven motility of bacteria. *Biomolecules* 9.
3. Aschtgen MS, Brennan CA, Nikolakakis K, Cohen S, McFall-Ngai M, Ruby EG. 2019. Insights into flagellar function and mechanism from the squid-vibrio symbiosis. *NPJ Biofilms Microbiomes* 5:32.
4. Aroney STN, Poole PS, Sanchez-Canizares C. 2021. Rhizobial Chemotaxis and Motility Systems at Work in the Soil. *Front Plant Sci* 12:725338.
5. Blair DF. 2003. Flagellar movement driven by proton translocation. *FEBS Lett* 545:86-95.
6. Blair DF, Berg HC. 1990. The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor. *Cell* 60:439-49.
7. Kojima S, Blair DF. 2004. The bacterial flagellar motor: structure and function of a complex molecular machine. *Int Rev Cytol* 233:93-134.
8. Schuhmacher JS, Thormann KM, Bange G. 2015. How bacteria maintain location and number of flagella? *FEMS Microbiol Rev* 39:812-22.
9. Terashima H, Kojima S, Homma M. 2008. Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Int Rev Cell Mol Biol* 270:39-85.
10. Morimoto YV, Minamino T. 2014. Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor. *Biomolecules* 4:217-34.
11. Ueno T, Oosawa K, 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* 227:672-7.

12. Kawamoto A, Miyata T, Makino F, Kinoshita M, Minamino T, Imada K, Kato T, Namba K. 2021. Native flagellar MS ring is formed by 34 subunits with 23-fold and 11-fold subsymmetries. *Nat Commun* 12:4223.
13. Takekawa N, Kawamoto A, Sakuma M, Kato T, Kojima S, Kinoshita M, Minamino T, Namba K, Homma M, Imada K. 2021. Two Distinct Conformations in 34 FliF Subunits Generate Three Different Symmetries within the Flagellar MS-Ring. *mBio* 12.
14. Johnson S, Fong YH, Deme JC, Furlong EJ, Kuhlen L, Lea SM. 2020. Symmetry mismatch in the MS-ring of the bacterial flagellar rotor explains the structural coordination of secretion and rotation. *Nat Microbiol* 5:966-975.
15. Francis NR, Irikura VM, Yamaguchi S, DeRosier DJ, Macnab RM. 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* 89:6304-8.
16. Thomas D, Morgan DG, DeRosier DJ. 2001. Structures of bacterial flagellar motors from two FliF-FliG gene fusion mutants. *J Bacteriol* 183:6404-12.
17. Minamino T, Imada K, Namba K. 2008. Molecular motors of the bacterial flagella. *Curr Opin Struct Biol* 18:693-701.
18. Kubori T, Shimamoto N, Yamaguchi S, Namba K, Aizawa S. 1992. Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* 226:433-46.
19. Minamino T, Yamaguchi S, Macnab RM. 2000. Interaction between FliE and FlgB, a proximal rod component of the flagellar basal body of *Salmonella*. *J Bacteriol* 182:3029-36.
20. Homma M, Kutsukake K, Hasebe M, Iino T, Macnab RM. 1990. FlgB, FlgC, FlgF and FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* 211:465-77.
21. Jones CJ, Macnab RM. 1990. Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*: analysis with temperature-sensitive mutants. *J Bacteriol* 172:1327-39.

22. Jones CJ, Macnab RM, Okino H, Aizawa S. 1990. Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* 212:377-87.
23. Tan J, Zhang X, Wang X, Xu C, Chang S, Wu H, Wang T, Liang H, Gao H, Zhou Y, Zhu Y. 2021. Structural basis of assembly and torque transmission of the bacterial flagellar motor. *Cell* 184:2665-2679 e19.
24. Chevance FF, Takahashi N, Karlinsey JE, Gnerer J, Hirano T, Samudrala R, Aizawa S, Hughes KT. 2007. The mechanism of outer membrane penetration by the eubacterial flagellum and implications for spirochete evolution. *Genes Dev* 21:2326-35.
25. Jones CJ, Homma M, Macnab RM. 1987. Identification of proteins of the outer (L and P) rings of the flagellar basal body of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169:1489-92.
26. Homma M, Komeda Y, Iino T, Macnab RM. 1987. The flaFIX gene product of *Salmonella typhimurium* is a flagellar basal body component with a signal peptide for export. *J Bacteriol* 169:1493-8.
27. Jones CJ, Homma M, Macnab RM. 1989. L-, P-, and M-ring proteins of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*: gene sequences and deduced protein sequences. *J Bacteriol* 171:3890-900.
28. Schoenhals GJ, Macnab RM. 1996. Physiological and biochemical analyses of FlgH, a lipoprotein forming the outer membrane L ring of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 178:4200-7.
29. Yamaguchi T, Makino F, Miyata T, Minamino T, Kato T, Namba K. 2021. Structure of the molecular bushing of the bacterial flagellar motor. *Nat Commun* 12:4469.
30. Hirano T, Minamino T, Macnab RM. 2001. The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase. *J Mol Biol* 312:359-69.

31. Nambu T, Minamino T, Macnab RM, Kutsukake K. 1999. Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol 181:1555-61.
32. Nambu T, Inagaki Y, Kutsukake K. 2006. Plasticity of the domain structure in FlgJ, a bacterial protein involved in flagellar rod formation. Genes Genet Syst 81:381-9.
33. Wagenknecht T, DeRosier DJ, Aizawa S, Macnab RM. 1982. Flagellar hook structures of Caulobacter and Salmonella and their relationship to filament structure. J Mol Biol 162:69-87.
34. Samatey FA, Matsunami H, Imada K, Nagashima S, Shaikh TR, Thomas DR, Chen JZ, Derosier DJ, Kitao A, Namba K. 2004. Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. Nature 431:1062-8.
35. Morgan DG, Macnab RM, Francis NR, DeRosier DJ. 1993. Domain organization of the subunit of the Salmonella typhimurium flagellar hook. J Mol Biol 229:79-84.
36. Kato T, Makino F, Miyata T, Horvath P, Namba K. 2019. Structure of the native supercoiled flagellar hook as a universal joint. Nat Commun 10:5295.
37. Fujii T, Kato T, 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 17:1485-93.
38. Wadhwa N, Berg HC. 2021. Bacterial motility: machinery and mechanisms. Nat Rev Microbiol doi:10.1038/s41579-021-00626-4.
39. Turner L, Ryu WS, Berg HC. 2000. Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments. J Bacteriol 182:2793-801.
40. O'Brien EJ, Bennett PM. 1972. Structure of straight flagella from a mutant Salmonella. J Mol Biol 70:133-52.

41. Hayashi F, Tomaru H, Furukawa E, Ikeda K, Fukano H, Oosawa K. 2013. Key amino acid residues involved in the transitions of L- to R-type protofilaments of the Salmonella flagellar filament. *J Bacteriol* 195:3503-13.
42. Calladine C. 1978. Change of waveform in bacterial flagella: The role of mechanics at the molecular level. *J Mol Evol* 118:457-479.
43. Samatey FA, Imada K, Nagashima S, Vonderviszt F, Kumasaka T, Yamamoto M, Namba K. 2001. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature* 410:331-7.
44. Kamiya R, Asakura S, Wakabayashi K, Namba K. 1979. Transition of bacterial flagella from helical to straight forms with different subunit arrangements. *J Mol Biol* 131:725-42.
45. Kamiya R, Asakura S. 1976. Helical transformations of Salmonella flagella in vitro. *J Mol Biol* 106:167-86.
46. Nedeljkovic M, Sastre DE, Sundberg EJ. 2021. Bacterial Flagellar Filament: A Supramolecular Multifunctional Nanostructure. *Int J Mol Sci* 22.
47. Wang F, Burrage AM, Postel S, Clark RE, Orlova A, Sundberg EJ, Kearns DB, Egelman EH. 2017. A structural model of flagellar filament switching across multiple bacterial species. *Nat Commun* 8:960.
48. Imada K. 2018. Bacterial flagellar axial structure and its construction. *Biophys Rev* 10:559-570.
49. Darnton NC, Berg HC. 2007. Force-extension measurements on bacterial flagella: triggering polymorphic transformations. *Biophys J* 92:2230-6.
50. Macnab RM, Ornston MK. 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.

51. Macnab RM. 1977. Bacterial flagella rotating in bundles: a study in helical geometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:221-5.
52. Larsen SH, Reader RW, Kort EN, Tso WW, Adler J. 1974. Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in *Escherichia coli*. *Nature* 249:74-7.
53. Mears PJ, Koirala S, Rao CV, Golding I, Chemla YR. 2014. *Escherichia coli* swimming is robust against variations in flagellar number. *Elife* 3:e01916.
54. Darnton NC, Turner L, Rojevsky S, Berg HC. 2007. On torque and tumbling in swimming *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189:1756-64.
55. Minamino T, Kawamoto A, Kinoshita M, Namba K. 2020. Molecular Organization and Assembly of the Export Apparatus of Flagellar Type III Secretion Systems. *Curr Top Microbiol Immunol* 427:91-107.
56. Halte M, Erhardt M. 2021. Protein Export via the Type III Secretion System of the Bacterial Flagellum. *Biomolecules* 11.
57. Morimoto YV, Ito M, Hiraoka KD, Che YS, Bai F, Kami-Ike N, Namba K, Minamino T. 2014. Assembly and stoichiometry of FliF and FliA in *Salmonella* flagellar basal body. *Mol Microbiol* 91:1214-26.
58. Fukumura T, Makino F, Dietsche T, Kinoshita M, Kato T, Wagner S, Namba K, Imada K, Minamino T. 2017. Assembly and stoichiometry of the core structure of the bacterial flagellar type III export gate complex. *PLoS Biol* 15:e2002281.
59. Ward E, Renault TT, Kim EA, Erhardt M, Hughes KT, Blair DF. 2018. Type-III secretion pore formed by flagellar protein FliP. *Mol Microbiol* 107:94-103.
60. Ohnishi K, Fan F, Schoenhals GJ, Kihara M, Macnab RM. 1997. The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*: putative components for flagellar assembly. *J Bacteriol* 179:6092-9.

61. Kuhlen L, Abrusci P, Johnson S, Gault J, Deme J, Caesar J, Dietsche T, Mebrhatu MT, Ganief T, Macek B, Wagner S, Robinson CV, Lea SM. 2018. Structure of the core of the type III secretion system export apparatus. *Nat Struct Mol Biol* 25:583-590.
62. Minamino T, Morimoto YV, Kinoshita M, Namba K. 2021. Membrane voltage-dependent activation mechanism of the bacterial flagellar protein export apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118.
63. Bryant OJ, Fraser GM. 2021. Regulation of bacterial Type III Secretion System export gate opening by substrates and the FliJ stalk of the flagellar ATPase. *FEBS J* doi:10.1111/febs.16294.
64. Paul K, Harmon JG, Blair DF. 2006. Mutational analysis of the flagellar rotor protein FliN: identification of surfaces important for flagellar assembly and switching. *J Bacteriol* 188:5240-8.
65. McMurry JL, Murphy JW, Gonzalez-Pedrajo B. 2006. The FliN-FliH interaction mediates localization of flagellar export ATPase FliI to the C ring complex. *Biochemistry* 45:11790-8.
66. Kinoshita M, Namba K, Minamino T. 2021. A positive charge region of Salmonella FliI is required for ATPase formation and efficient flagellar protein export. *Commun Biol* 4:464.
67. Reid SW, Leake MC, Chandler JH, Lo CJ, Armitage JP, Berry RM. 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* 103:8066-71.
68. Deme JC, Johnson S, Vickery O, Aron A, Monkhouse H, Griffiths T, James RH, Berks BC, Coulton JW, Stansfeld PJ, Lea SM. 2020. Structures of the stator complex that drives rotation of the bacterial flagellum. *Nat Microbiol* 5:1553-1564.

69. Santiveri M, Roa-Eguiara A, Kuhne C, Wadhwa N, Hu H, Berg HC, Erhardt M, Taylor NMI. 2020. Structure and Function of Stator Units of the Bacterial Flagellar Motor. *Cell* 183:244-257 e16.
70. Chun SY, Parkinson JS. 1988. Bacterial motility: membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein. *Science* 239:276-8.
71. Che YS, Nakamura S, Kojima S, Kami-ike N, Namba K, Minamino T. 2008. Suppressor analysis of the MotB(D33E) mutation to probe bacterial flagellar motor dynamics coupled with proton translocation. *J Bacteriol* 190:6660-7.
72. Zhou J, Blair DF. 1997. Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for torque generation in the bacterial flagellar motor. *J Mol Biol* 273:428-39.
73. Roujeinikova A. 2008. Crystal structure of the cell wall anchor domain of MotB, a stator component of the bacterial flagellar motor: implications for peptidoglycan recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10348-53.
74. Reboul CF, Andrews DA, Nahar MF, Buckle AM, Roujeinikova A. 2011. Crystallographic and molecular dynamics analysis of loop motions unmasking the peptidoglycan-binding site in stator protein MotB of flagellar motor. *PLoS One* 6:e18981.
75. Zhou J, Lloyd SA, Blair DF. 1998. Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6436-41.
76. Morimoto YV, Nakamura S, Hiraoka KD, Namba K, Minamino T. 2013. Distinct roles of highly conserved charged residues at the MotA-FliG interface in bacterial flagellar motor rotation. *J Bacteriol* 195:474-81.
77. Nishihara Y, Kitao A. 2015. Gate-controlled proton diffusion and protonation-induced ratchet motion in the stator of the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:7737-42.

78. Thormann KM, Paulick A. 2010. Tuning the flagellar motor. *Microbiology* 156:1275-83.
79. Lai YW, Ridone P, Peralta G, Tanaka MM, Baker MAB. 2020. Evolution of the Stator Elements of Rotary Prokaryote Motors. *J Bacteriol* 202.
80. Homma M, Nishikino T, Kojima S. 2021. Achievements in bacterial flagellar research with focus on *Vibrio* species. *Microbiol Immunol* doi:10.1111/1348-0421.12954.
81. Chevance FF, Hughes KT. 2008. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol* 6:455-65.
82. Minamino T, Morimoto YV, Kinoshita M, Namba K. 2021. Multiple Roles of Flagellar Export Chaperones for Efficient and Robust Flagellar Filament Formation in *Salmonella*. *Front Microbiol* 12:756044.
83. Tsang J, Hoover TR. 2014. Themes and Variations: Regulation of RpoN-Dependent Flagellar Genes across Diverse Bacterial Species. *Scientifica (Cairo)* 2014:681754.
84. Rotter C, Muhlbacher S, Salamon D, Schmitt R, Scharf B. 2006. Rem, a new transcriptional activator of motility and chemotaxis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 188:6932-42.
85. Pini F, De Nisco NJ, Ferri L, Penterman J, Fioravanti A, Brillì M, Mengoni A, Bazzicalupo M, Viollier PH, Walker GC, Biondi EG. 2015. Cell Cycle Control by the Master Regulator CtrA in *Sinorhizobium meliloti*. *PLoS Genet* 11:e1005232.
86. Curtis PD, Brun YV. 2010. Getting in the loop: regulation of development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:13-41.
87. Imam S, Noguera DR, Donohue TJ. 2013. Global insights into energetic and metabolic networks in *Rhodobacter sphaeroides*. *BMC Syst Biol* 7:89.
88. Poggio S, Abreu-Goodger C, Fabela S, Osorio A, Dreyfus G, Vinuesa P, Camarena L. 2007. A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists

- with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. J Bacteriol 189:3208-16.
89. Armitage JP, Macnab RM. 1987. Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. J Bacteriol 169:514-8.
 90. Vega-Baray B, Domenzain C, Rivera A, Alfaro-Lopez R, Gomez-Cesar E, Poggio S, Dreyfus G, Camarena L. 2015. The flagellar set Fla2 in *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the CckA pathway and is repressed by organic acids and the expression of Fla1. J Bacteriol 197:833-47.
 91. Camarena L, Dreyfus G. 2020. Living in a Foster Home: The Single Subpolar Flagellum Fla1 of *Rhodobacter sphaeroides*. Biomolecules 10.
 92. Macnab RM. 2004. Type III flagellar protein export and flagellar assembly. Biochim Biophys Acta 1694:207-17.
 93. Smith TG, Hoover TR. 2009. Deciphering bacterial flagellar gene regulatory networks in the genomic era. Adv Appl Microbiol 67:257-95.
 94. Poggio S, Osorio A, Dreyfus G, Camarena L. 2005. The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins. Mol Microbiol 58:969-83.
 95. Pena-Sanchez J, Poggio S, Flores-Perez U, Osorio A, Domenzain C, Dreyfus G, Camarena L. 2009. Identification of the binding site of the sigma54 hetero-oligomeric FleQ/FleT activator in the flagellar promoters of *Rhodobacter sphaeroides*. Microbiology 155:1669-79.
 96. Hernandez-Valle J, Domenzain C, de la Mora J, Poggio S, Dreyfus G, Camarena L. 2017. The master regulators of the Fla1 and Fla2 flagella of *Rhodobacter sphaeroides* control the expression of their cognate CheY proteins. J Bacteriol 199.
 97. Laub MT, Goulian M. 2007. Specificity in two-component signal transduction pathways. Annu Rev Genet 41:121-45.

98. Groisman EA. 2016. Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. *Annu Rev Microbiol* 70:103-24.
99. Jacob-Dubuisson F, Mechaly A, Betton JM, Antoine R. 2018. Structural insights into the signalling mechanisms of two-component systems. *Nat Rev Microbiol* 16:585-593.
100. Barnett MJ, Hung DY, Reisenauer A, Shapiro L, Long SR. 2001. A homolog of the CtrA cell cycle regulator is present and essential in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 183:3204-10.
101. Brilli M, Fondi M, Fani R, Mengoni A, Ferri L, Bazzicalupo M, Biondi EG. 2010. The diversity and evolution of cell cycle regulation in alpha-proteobacteria: a comparative genomic analysis. *BMC Syst Biol* 4:52.
102. Bellefontaine AF, Pierreux CE, Mertens P, Vandenhoute J, Letesson JJ, De Bolle X. 2002. Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*. *Mol Microbiol* 43:945-60.
103. van Teeseling MCF, Thanbichler M. 2020. Generating asymmetry in a changing environment: cell cycle regulation in dimorphic alphaproteobacteria. *Biol Chem* 401:1349-1363.
104. Poncin K, Gillet S, De Bolle X. 2018. Learning from the master: targets and functions of the CtrA response regulator in *Brucella abortus* and other alpha-proteobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 42:500-513.
105. Francez-Charlot A, Kaczmarczyk A, Vorholt JA. 2015. The branched CcsA/CckA-ChpT-CtrA phosphorelay of *Sphingomonas melonis* controls motility and biofilm formation. *Mol Microbiol* 97:47-63.
106. Bird TH, MacKrell A. 2011. A CtrA homolog affects swarming motility and encystment in *Rhodospirillum centenum*. *Arch Microbiol* 193:451-9.

107. Greene SE, Brill M, Biondi EG, Komeili A. 2012. Analysis of the CtrA pathway in *Magnetospirillum* reveals an ancestral role in motility in alphaproteobacteria. *J Bacteriol* 194:2973-86.
108. Zan J, Heindl JE, Liu Y, Fuqua C, Hill RT. 2013. The CckA-ChpT-CtrA phosphorelay system is regulated by quorum sensing and controls flagellar motility in the marine sponge symbiont *Ruegeria* sp. KLH11. *PLoS One* 8:e66346.
109. Wang H, Ziesche L, Frank O, Michael V, Martin M, Petersen J, Schulz S, Wagner-Dobler I, Tomasch J. 2014. The CtrA phosphorelay integrates differentiation and communication in the marine alphaproteobacterium *Dinoroseobacter shibae*. *BMC Genomics* 15:130.
110. Zhou B, Schrader JM, Kalogeraki VS, Abeliuk E, Dinh CB, Pham JQ, Cui ZZ, Dill DL, McAdams HH, Shapiro L. 2015. The global regulatory architecture of transcription during the *Caulobacter* cell cycle. *PLoS Genet* 11:e1004831.
111. Laub MT, Chen SL, Shapiro L, McAdams HH. 2002. Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4632-7.
112. Ouimet MC, Marczyński GT. 2000. Analysis of a cell-cycle promoter bound by a response regulator. *J Mol Biol* 302:761-75.
113. De Nisco NJ, Abo RP, Wu CM, Penterman J, Walker GC. 2014. Global analysis of cell cycle gene expression of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:3217-24.
114. Mercer RG, Callister SJ, Lipton MS, Pasa-Tolic L, Strnad H, Paces V, Beatty JT, Lang AS. 2010. Loss of the response regulator CtrA causes pleiotropic effects on gene expression but does not affect growth phase regulation in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* 192:2701-10.

115. Brassinga AK, Siam R, McSween W, Winkler H, Wood D, Marczynski GT. 2002. Conserved response regulator CtrA and IHF binding sites in the alpha-proteobacteria *Caulobacter crescentus* and *Rickettsia prowazekii* chromosomal replication origins. *J Bacteriol* 184:5789-99.
116. Hernandez-Valle J, Sanchez-Flores A, Poggio S, Dreyfus G, Camarena L. 2020. The CtrA regulon of *Rhodobacter sphaeroides* favors adaptation to a particular life style. *J Bacteriol* doi:10.1128/JB.00678-19.
117. Belas R, Horikawa E, Aizawa S, Suvanasuthi R. 2009. Genetic determinants of *Silicibacter* sp. TM1040 motility. *J Bacteriol* 191:4502-12.
118. Boyd CH, Gober JW. 2001. Temporal regulation of genes encoding the flagellar proximal rod in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 183:725-35.
119. Jones SE, Ferguson NL, Alley MR. 2001. New members of the ctrA regulon: the major chemotaxis operon in *Caulobacter* is CtrA dependent. *Microbiology* 147:949-58.
120. Sockett RE, Foster, J.C.A., Armitage J. P. 1990. Molecular biology of the *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. *FEMS Symp* 53:473-479.
121. del Campo AM, Ballado T, de la Mora J, Poggio S, Camarena L, Dreyfus G. 2007. Chemotactic control of the two flagellar systems of *Rhodobacter sphaeroides* is mediated by different sets of CheY and FliM proteins. *J Bacteriol* 189:8397-401.
122. Simon R, Prierer U, Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1:37-45.
123. Quandt J, Hynes MF. 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene* 127:15-21.
124. Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Trollinger D. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* 70:191-7.

125. Metcalf WW, Wanner BL. 1993. Construction of new b-glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement. *Gene* 129:17-25.
126. Siström WR. 1962. The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J Gen Microbiol* 28:607-16.
127. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley, New York.
128. Davis J, Donohue TJ, Kaplan S. 1988. Construction, characterization, and complementation of a Puf- mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 170:320-9.
129. Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D. 1986. b-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:8447-51.
130. Kunkel TA. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:488-92.
131. Harlow E, Lane D. 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbor, New York.
132. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671-5.
133. Sourjik V, Muschler P, Scharf B, Schmitt R. 2000. VisN and VisR are global regulators of chemotaxis, flagellar, and motility genes in *Sinorhizobium* (*Rhizobium*) *meliloti*. *J Bacteriol* 182:782-8.
134. Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792-7.
135. Lang AS, Beatty JT. 2002. A bacterial signal transduction system controls genetic exchange and motility. *J Bacteriol* 184:913-8.

136. Prados J, Linder P, Redder P. 2016. TSS-EMOTE, a refined protocol for a more complete and less biased global mapping of transcription start sites in bacterial pathogens. *BMC Genomics* 17:849.
137. Vvedenskaya IO, Zhang Y, Goldman SR, Valenti A, Visone V, Taylor DM, Ebright RH, Nickels BE. 2015. Massively Systematic Transcript End Readout, "MASTER": Transcription Start Site Selection, Transcriptional Slippage, and Transcript Yields. *Mol Cell* 60:953-65.
138. Hawley DK, McClure WR. 1983. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 11:2237-55.
139. Feklistov A, Darst SA. 2011. Structural basis for promoter-10 element recognition by the bacterial RNA polymerase sigma subunit. *Cell* 147:1257-69.
140. Zhi X, Dages S, Dages K, Liu Y, Hua ZC, Makemson J, Leng F. 2017. Transient and dynamic DNA supercoiling potently stimulates the leu-500 promoter in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 292:14566-14575.
141. Opel ML, Hatfield GW. 2001. DNA supercoiling-dependent transcriptional coupling between the divergently transcribed promoters of the *ilvYC* operon of *Escherichia coli* is proportional to promoter strengths and transcript lengths. *Mol Microbiol* 39:191-8.
142. Liu LF, Wang JC. 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7024-7.
143. Spencer W, Siam R, Ouimet MC, Bastedo DP, Marczyński GT. 2009. CtrA, a global response regulator, uses a distinct second category of weak DNA binding sites for cell cycle transcription control in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 191:5458-70.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Architecture of divergent flagellar promoters controlled by CtrA in *Rhodobacter sphaeroides*

Anet Rivera-Osorio¹, Aurora Osorio¹, Sebastian Poggio¹, Georges Dreyfus^{2*} and Laura Camarena^{1*} 

Abstract

Background: *Rhodobacter sphaeroides* has two sets of flagellar genes, *fla1* and *fla2*, that are responsible for the synthesis of two different flagellar structures. The expression of the *fla2* genes is under control of CtrA. In several α -proteobacteria CtrA is also required for the expression of the flagellar genes, but the architecture of CtrA-dependent promoters has only been studied in detail in *Caulobacter crescentus*. In many cases the expression of *fla* genes originates from divergent promoters located a few base pairs apart, suggesting a particular arrangement of the *cis*-acting sites.

Results: Here we characterized several control regions of the *R. sphaeroides fla2* genes and analyzed in detail two regions containing the divergent promoters *flgB2p-flil2p*, and *fliL2p-fliF2p*. Binding sites for CtrA of these promoters were identified in silico and tested by site directed mutagenesis. We conclude that each one of these promoter regions has a particular arrangement, either a single CtrA binding site for activation of *fliL2p* and *fliF2p*, or two independent sites for activation of *flgB2p* and *fliI2p*. ChIP experiments confirmed that CtrA binds to the control region containing the *flgB2* and *fliI2* promoters, supporting the notion that CtrA directly controls the expression of the *fla2* genes. The *flgB* and *fliI* genes are syntenic and show a short intercistronic region in closely related bacterial species. We analyzed these regions and found that the arrangement of the CtrA binding sites varies considerably.

Conclusions: The results in this work reveal the arrangement of the *fla2* divergent promoters showing that CtrA promotes transcriptional activation using more than a single architecture.

Keywords: *Rhodobacter sphaeroides*, CtrA, Bacterial flagellum, Divergent promoters

Background

Many bacteria use rotating flagella for locomotion, the motor is embedded in the membrane and couples the influx of specific ions to the generation of rotational force. The bacterial flagellum can be divided in a basal body that includes the motor, a filament that acts as a propeller, and a universal joint also known as the hook which links the basal body and the filament. The basal body is the most complex structure that includes an axial rod and three or more rings, depending on the bacterial species. In *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*, the basal body includes

the MS-, P- and L-rings. Flagellar biogenesis requires the expression of more than 40 genes, and the assembly of this structure proceeds outwardly from proximal to distal end [1, 2]. In many bacterial species, the expression of the flagellar genes follows a hierarchical pattern with a variable number of tiers. Genes encoding the early components of the flagellar structure (basal body and export apparatus) are expressed under the control of a master activator protein placed at the top of the hierarchy. Frequently, along with the early genes, additional transcription factors are expressed that become active to transcribe the late genes in response to a signal that denotes that the early flagellar components have been assembled [3–5]. The flagellar gene expression regulatory hierarchies have been analyzed in different bacteria; in *E. coli* and *S. enterica* the transcriptional activator FlhD/FlhC is required to

* Correspondence: gdreyfus@ifc.unam.mx; rosal@unam.mx

²Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México



express the early flagellar genes (Class II) which encode the proteins required to form the basal body and the hook. The genes encoding the sigma factor FliA and its specific anti-sigma factor, FlgM also belong to this class. Once the basal body and the hook are assembled, FlgM is exported out of the cell and FliA associates with the core RNA polymerase to recognize class III promoters [5]. In other γ -proteobacteria (i.e. *Vibrio*, *Pseudomonas*), the flagellar gene expression hierarchy shows a different architecture and special features. In several species the sigma factor RpoN together with an activator protein promote the expression of the early flagellar genes, and the late genes are dependent on FliA. In these systems the expression of late flagellar genes also requires the export of FlgM [3]. Only a few examples of flagellar gene expression hierarchies have been reported for α proteobacteria; nonetheless, a substantial variation in the control networks is evident. For instance, in *Sinorhizobium meliloti* two members of the LuxR family, VisN and VisR [6], bring about the expression of *rem*, which encodes an OmpR-like transcriptional activator that promotes the expression of class II flagellar genes [7]. The expression of the class III genes that include the flagellin genes *flaA*, *flaB*, and *flaC* as well as several genes encoding chemotactic receptors are directly activated by the conserved transcriptional regulator CtrA [8]. The mechanism that turns on the expression of class III genes in *S. meliloti* is still unknown. In *Caulobacter crescentus*, the flagellar expression hierarchy has been thoroughly studied. In this case, CtrA activates the expression of the class II genes that encode the proteins of the MS ring and the flagellar export apparatus as well as the regulatory proteins RpoN and FlbD. Upon completion of the export apparatus and the MS-ring, FlbD is phosphorylated by an unknown kinase and together with the sigma factor RpoN promote transcription of class III/IV genes, whose products form the axial rod, the L- and P-rings, the hook and the flagellar filament [9, 10].

Rhodobacter sphaeroides is an α -proteobacterium with two flagellar systems of different phylogenetic origin [11]. Under the growth conditions commonly used in the laboratory, the *fla1* genes are expressed and direct the assembly of a single subpolar flagellum [12]. It has been shown that the *fla1* genes of *R. sphaeroides* were acquired by horizontal transfer. In contrast, the gene products of the vertically inherited *fla2* genes enable, under particular conditions, the synthesis of several polar flagella [11, 13]. The expression of the *fla1* genes follows a hierarchical expression pattern in which the early genes are expressed under the control of RpoN1 and the activator proteins FleQ and FleT whereas the late genes are dependent on FliA [14]. In contrast, expression of the *fla2* genes is dependent on the two-component system (TCS) formed by the hybrid histidine kinase, CckA, the histidine phosphotransferase, ChpT, and the response regulator CtrA

[15]. The signal that fully activates CckA as a kinase has not been elucidated yet in this bacterium; therefore, the Fla2 system has been studied in strains that carry two mutations: one that inactivates the master regulator of the Fla1 system, and the other, a constitutive mutation in CckA. These strains, in consequence, have a Fla1⁻/Fla2⁺ phenotype [11, 15, 16].

The CckA/ChpT/CtrA TCS, is broadly distributed among α -proteobacteria. In some bacterial species this system is essential given that CtrA regulates the expression of genes that control the cell cycle; in contrast in many other bacteria, CtrA is not essential. In general, genes controlled by CtrA are enriched in certain functional categories, i.e. cell motility, signal transduction, and cell wall/membrane envelope biogenesis [17].

In *C. crescentus* the architecture of the CtrA promoters has been recently analyzed at genomic level by means of a global 5' RACE protocol combined with a search for CtrA binding sites using a weight position matrix generated from ChIP experiments. From these studies it was observed that there are two classes of CtrA binding motifs, a full site represented by the sequence TTAA (N7) TTAA, and a half site (TTAA) [18]. Previously, a global analysis of the control regions of the CtrA-dependent genes, using MEME and BIOPROSPECTOR, also identified the sequence for the full site, the ungapped variant TTAA CCAT, and the short motif TTAA [19]. In addition, it was reported that the CtrA binding sites involved in transcriptional activation are located near the -35 promoter region. In contrast, in those promoters where CtrA acts as a repressor, the CtrA half binding motif overlaps with the -10 promoter region [18]. The relevance of the TTAA (N7) TTAA motif for transcriptional activation has been proved by site directed mutagenesis [20].

For other bacteria, it was suggested that CtrA could have similar recognition sites based on the fact that related motifs have been identified upstream of genes controlled by CtrA [17, 21–24]. Supporting this idea, it has been observed that *ctrA* from *Rickettsia prowazekii* is partially functional in *C. crescentus*, and that *ctrA* from *C. crescentus* is functional in *Sinorhizobium meliloti* [25, 26].

In many species, the flagellar genes presumably controlled by CtrA are expressed as divergent transcriptional units, and in many cases, the control region encompasses less than 100 bp [27–29].

In this work we analyzed two divergent promoter regions carrying the *fla2* promoters *flgB2p-flil2p* and *fliF2p-flil2p*. The architecture of these regulatory regions was characterized using 5'-RACE, site directed mutagenesis and chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay. From these analyses we conclude that CtrA directly activates the *fla2* promoters using more than a single architecture.

Methods

Strains, plasmids and oligonucleotides

All plasmids and bacterial strains used in this work are listed in Table 1. The oligonucleotides used in this work are listed in Table 2.

Media and growth conditions

R. sphaeroides was grown in Siström's minimal medium [30]. When indicated the strains were grown in Siström minimal medium in which succinic acid was reduced to 80 μ M or replaced by 0.2% casamino acids. Heterotrophic growth was carried out at 30 °C in the dark with orbital shaking at 180 rpm. Photoheterotrophic growth on plates was achieved by incubation in a polycarbonate anaerobic jar containing a BD Gas Pack EZ anaerobe pouch system 8 (Becton, Dickinson and Company) and illuminated with two 75 W incandescent bulbs. Photoheterotrophic liquid cultures were grown in completely filled screw-cap tubes under continuous illumination. *Escherichia coli* was grown in LB medium [31] at 37 °C. When required, antibiotics were used at the following concentrations: for *R. sphaeroides*, kanamycin (25 μ g/ml), tetracycline (1 μ g/ml), spectinomycin (50 μ g/ml). For *E. coli*, kanamycin (50 μ g/ml), tetracycline (12 μ g/ml) ampicillin (100 μ g/ml), spectinomycin

(50 μ g/ml), chloramphenicol (20 μ g/ml), gentamycin (30 μ g/ml).

Standard techniques of molecular biology

Routine genetic manipulations were performed as described elsewhere [31]. Restriction and modification enzymes were purchased from Thermo Fisher Scientific. PrimeSTAR HS from Takara Bio Inc. was used for DNA amplification.

Isolation of the AR1 mutant strain

The intergenic region between *flgB2* and *fliI2* as well as the 5' region of each gene was replaced with the omega-Spc^R cartridge. For this a chromosomal region of 2250 bp was amplified using the oligonucleotides DinterB2For and DinterI2Rev. The PCR product encompassing from the end of *flgC2* to the end of *fliI2*, was cloned in pCR2.1-TOPO, digested with StuI and religated. The StuI digestion allowed the removal of two internal fragments, one of 392 and the other of 126 bp. The resulting linearized plasmid was self-joined to bring together the C-terminal half of *flgB2* with the C-terminal half of *fliI2*. This plasmid was purified, digested with StuI and ligated with the omega-Spc^R cartridge obtained from the pBOR plasmid. The complete fragment was then

Table 1 Strains and plasmids used in this work

	Description	Reference
Strains		
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>		
WS8N	wild-type; spontaneous Nal ^R	[52]
AM1	WS8N derivative, Fla2 ⁺ , Δ fleQ::kan cckA _{L391}	[16]
EA1	AM1 derivative, Δ ctrA::aadA	[15]
AR1	AM1 derivative Δ flgB2-fliI2:: Ω ^{Spc}	This work
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10	Cloning strain	Invitrogen
S17-1	<i>recA endA thi hsdR RP4-2-Tc::Mu::Tn7</i>	[53]
Rosetta	Protein expression strain, Cm ^R	Novagen
Plasmids		
pTZ19R	Cloning vector Ap ^R	Fermentas
pCR2.1-TOPO	Cloning vector, Ap ^R	Invitrogen
pJQ200mp18	Mobilizable suicide vector; Gm ^R	[32]
pRK415	Expression vector for <i>R. sphaeroides</i>	[54]
pRK415/uidA	pRK415 carrying the <i>uidA-aadA</i> cassette	This work
pWM5	Vector source of the <i>uidA-aadA</i> cassette	[55]
pRK_flgB2p::uidA-aadA	pRK415/uidA carrying <i>flgB2p</i>	This work
pRK_flgE2p::uidA-aadA	pRK415/uidA carrying <i>flgE2p</i>	This work
pRK_fliF2p::uidA-aadA	pRK415/uidA carrying <i>fliF2p</i>	This work
pRK_fliI2p::uidA-aadA	pRK415/uidA carrying <i>fliI2p</i>	This work
pRK_fliL2p::uidA-aadA	pRK415/uidA carrying <i>fliL2p</i>	This work

Table 2 Oligonucleotides used in this work^a

To obtain the strain AR1	
DinterB2for	TCTAGATGGAACCTCTTCAACGAC
DinterI2rev	TCTAGAACGGTCGTCGCTACGA
To obtain pBAD_ctrA	
CtrABADfwSac	GAGCTCATGAGAATACTGCTGGTGGA
CtrABADrvEco	GAATTCTCCAGCCCACCTTCCCG
To clone the wild-type promoters	
<i>flgB2p</i> (336 bp)	
FlgB15	GAGTCTGATATCCGGGCGTGTCGGCATTG
FlgB12	GAATTCACCCCGGTCGCCAGCGCGG
<i>flgE2p</i> (303 bp)	
pflgE2for	GAATTCGGTGCGAAACAACAGACT
pflgE2rev	GAGCTCATTGGCCGACTGCGTGAT
<i>fliF2p</i> (331 bp)	
FliFL5	GAGCTCAGACCGAGCACGGCCAGGAA
FliFL2	GAATTCAGGCCGACCCAGGTGGCGTAG
<i>fliI2p</i> (product of 336 bp)	
FliBI3	GAATTCGATATCCGGGCGTGTCGGCATTG
FliBI6	GAGCTCCACCCGGTCGCCAGCGCGG
<i>fliL2p</i> (331 bp)	
FliFL3	GAATTCAGACCGAGCACGGCCAGGAA
FliFL6	GAGCTCAGGCCGACCCAGGTGGCGTAG
For the 5' RACE experiments	
flgB2 RACE	CGCACCATCTCATCTCGAGCGAG
N3' flgB2 RACE	GACCGTGTGCCGTGGGCGAAG
flgE2 RACE	GATATCCAGGGCGCTCGCGGTCGAGA
N3' flgE2 RACE	CATTCTCCACCCGCCGTATGGTGT
fliF2 RACE	CACCTCGTAGCCCGCCCTGCGCC
fliI2 RACE	GGGCGAGTATCGCCACCTCGTGCAGCA
N3' fliI2 RACE	GCCGCAGAACCTCGCCGCCGAGGATG
fliL2 RACE	CCAAGGCTGATCACGATCGGGTCGA
N3' fliL2 RACE	CGATCGGCACGAAGGCGATGTCGGGA
For site directed mutagenesis	
flgB2p -10	GTTTACCAAGGCGCAAGGGCGATTCTTTAG
flgB2p -13/-14	CACCAAGGCTTCGGGGCGATTCT
flgB2p -17/-18	CAAGGCTTAAGGCGGATTCTTTAGAAAG
flgB2p -23/-24	CTTAAGGGCGATTGGTTTAGAAAGGGTAAG
flgB2p -27/-28	GGGCGATTCTTCGGAAAGGGTAAGGCGC
flgB2p -35	TAGAAAGGGTGGGGCGCGAAC
flgB2p -42/-43	GAAAGGGTAAGGCGGCAACAAGAGGGATTG
fliF2p -10	CCACATCCGTCCGGATGGTCGGGG
fliF2p -35	GATTGTGGGCCACATCCGTCA
fliI2p -10	TTGTTCCGCGCTCCCTTTCT
fliI2p -26/-27	TTAAGGGCGAGGCTTTAGAAAG
fliI2p -35	CACCAAGGCTTCGGGGCGATTCT

Table 2 Oligonucleotides used in this work^a (Continued)

fliI2p -47/-48	CTCCCTCGATCGGTGCCACCAAGGCTTAAGGGC
fliL2p -10	GTCGATCTAGGGGCCGGATCCC
fliL2p -35	GATTGTGGGCCACATCCGTCA

^aThe underlines bases correspond to the changes introduced in the wild type sequence

subcloned into pJQ200mp18 [32]. This plasmid was introduced to *E. coli* S17-1 and subsequently transferred to *R. sphaeroides* by conjugation [33]. Since pJQ200mp18 cannot replicate in *R. sphaeroides*, the double-recombination event was selected on LB agar plates in the presence of spectinomycin and 5% sucrose. The mutant was verified by PCR.

Fusion of the flagellar promoters to the reporter gene *uidA*

The regulatory region of the *fla2* promoters for the genes *flgB2*, *fliI2*, *fliF2*, *fliL2* and *flgE2* was amplified by PCR using the oligonucleotides indicated in Table 2. The product was gel purified and cloned in pTZ19R for sequencing. Subsequently, each fragment was subcloned in pRK415/*uidA*. This plasmid enables to create a transcriptional fusion with the *uidA* gene that encodes for the β -glucuronidase. In pRK415/*uidA*, the *uidA-aadA* cassette was cloned in the BamHI site, the orientation of the fragment was selected in such a manner that the *uidA* gene can be transcribed from a promoter cloned as an EcoRI-SstI fragment.

β -Glucuronidase assay

Cell-free extracts from exponential phase cultures grown photoheterotrophically were tested for β -glucuronidase activity following the previously reported protocol [34, 35]. As standard, a curve of different concentrations of 4-methyl-umbelliferone (Sigma-Aldrich) was used. Specific activities are expressed as $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of 4-methyl-umbelliferone formed. Protein content was determined with a Bio-Rad protein assay kit, using bovine serum albumin as standard.

Site directed mutagenesis

Mutagenesis was performed essentially following the method of Kunkel [36] with an uracil-containing single-stranded DNA as template and the appropriate oligonucleotides (Table 2). pTZ19R plasmids carrying *flgB2p*, *fliI2p*, *fliL2p*, and *fliI2p* were used as templates. The presence of the mutation was verified by sequencing.

5'-rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) analysis

Bacterial cells from cultures grown to mid-log phase in 0.2% casamino acids, were collected at 4 °C and immediately used to extract the complete pool of RNA using the RiboPure-Bacteria kit (ThermoFisher Scientific) according

to the manufacturer's instructions. Residual DNA in the samples was removed using DNaseI (Roche). To determine the 5' end of the mRNA transcripts of *flgB2*, *fliI2*, *fliF2*, *fliL2*, and *flgE2*, the primers shown in Table 2 were used. The PCR products obtained from these reactions were cloned in pCR2.1-TOPO and sequenced.

His6X-CtrA purification and antibody production

ctrA was amplified using the oligonucleotides ctrABADFW-Sac and ctrABADRvEco. The amplification product was cloned into pBAD/HisA (Invitrogen). This construction was introduced into Rosetta and a culture of this strain grown at mid-log phase was induced with 0.2% L-arabinose for 4 h at 37 °C. Cells were collected by centrifugation and resuspended in 1/100 of the original volume in phosphate buffered saline (PBS) 0.058 M Na₂HPO₄, 0.017 M NaH₂PO₄, 0.068 M NaCl, pH 7.4. The cell suspension was sonicated in an ice bath for five bursts of 10 s. Cell debris were removed by centrifugation and the supernatant was mixed with Ni-NTA-agarose beads (Quiagen) and incubated for 1 h on ice in the presence of 20 mM imidazole. The beads were loaded into a polypropylene column (1 ml of capacity) and washed with PBS/30 mM imidazole/200 mM NaCl. The protein was eluted using PBS containing 250 mM imidazole.

Six three weeks old BALB/C female mice, were immunized intraperitoneally with 20 µg of His6X-CtrA protein (for each mice) in incomplete Freund's adjuvant, and 3 weeks later reimmunized. Two weeks later the mice were bled and antisera were obtained by low-speed centrifugation. The specificity of the anti-CtrA antibodies was tested by immunoblotting following standard protocols [37]; in this experiment, total cell extracts from AM1 and EA1 strains were used respectively as positive and negative controls.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

ChIP was carried out according to the protocol previously reported [33] with minor modifications as follows: 15 ml of a photoheterotrophic culture of *R. sphaeroides*, grown in Siström's medium with 0.2% casamino acids, were transferred to a 125 ml Erlenmeyer flask when the OD₆₀₀ reached 0.5. Immediately, 0.41 ml of 37% of freshly prepared formaldehyde was added and incubated for 10 min at 30 °C with slow shaking. After this time, the flasks were incubated on ice for 30 min. The cells were washed three times with PBS buffer and then resuspended in 250 µl of PBS with protease inhibitors (complete, EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets from Roche). The sample was incubated at room temperature with lysozyme (80 µg/ml) for 15 min; after this time, 2.5 µl of Triton X-100

and 5 µl of EDTA 50 mM were added, and carefully mixed. After 10 min, the sample was sonicated 10 times for 8 s (30% duty cycle) on ice. Cell debris were removed by centrifugation at 10,000 x g for 5 min. The supernatant was transferred to a clean tube containing 100 µl of a mixture of Protein A Sepharose/DNA/BSA (100 µg of sonified herring sperm DNA/100 µg of BSA). The sample was incubated at 4 °C on a rocking platform shaker, for 2 h, and centrifuged for 3 min at 550 x g. The supernatant was transferred to a clean tube, and an aliquot of 20 µl was withdrawn and labeled as input. The remaining sample was mixed with 4 µl of anti-CtrA antibody and incubated overnight at 4 °C on a rocking platform shaker. The complexes were captured by adding 100 µl of Protein A-Sepharose/DNA/BSA and continuing incubation for 2 h. The immunoprecipitated material was washed twice in low, and high salt buffers (Low: 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8. High: 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 500 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8), twice in LiCl buffer (0.25 M LiCl, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8) and twice in TE buffer (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA). The sample was resuspended in 500 µl of elution buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃, 300 mM NaCl) and incubated overnight at 65 °C to reverse the cross-linking. Input samples were also incubated overnight at 65 °C in elution buffer. The samples were treated for 30 min with 50 µg of RNase for 30 min at 37 °C, and subsequently with 120 µg of proteinase K for 30 min. DNA was purified using the QIAquick PCR purification kit. The procedure was carried out three times for AR1 and EA1 strains carrying the plasmid pRK_ *flgB2p::uidA-aadA*; and twice for AR1 carrying pRK_ *flgB2p - 10::uidA-aadA* or pRK_ *flgB2p - 35::uidA-aadA*.

Semiquantitative PCR

To assess the presence of the *flgB2-fliI2* region in the ChIP samples, we carried out a PCR reaction and evaluated the amount of product at different cycles of the reaction. The DNA products were analyzed by acrylamide gel electrophoresis and quantified using Image J software [38]. The data represent the average of three independent experiments.

Identification of the CtrA binding sites

The DNA sequence containing the *fla2* genes was analyzed using a position weight matrix (PWM) built from the regulatory region of 54 genes identified to be controlled by CtrA in *C. crescentus* [6] with the tool matrix-scan included in the Regulatory Sequence Analysis Tools (RSAT) (<http://embnet.ccg.unam.mx/rsat>). Sequence alignments were carried out using MUSCLE [39].

Results

Construction of reporter plasmids containing selected *fla2* promoters

The *R. sphaeroides* WS8N genome consists of two chromosomes and two plasmids. Most of the *fla2* genes are clustered in a region of approximately 32.3 Kb localized in chromosome I (Fig. 1) and the gene encoding flagellin of the Fla2 flagellum is in plasmid A [11, 40].

The *fla2* chromosomal region was analyzed searching for putative CtrA binding sites as described in Materials and Methods. Using a threshold of 5, the search identified 57 hits, many of which were within coding regions. A threshold of 5.5 identified 34 hits, and the best hits included the regulatory regions of *motB2*, *flgE2*, *motA2*, as well as the intergenic regions containing the divergent promoters of *fliF2-fliL2*, *flgB2-fliI2* and *flgJ2-fliK2* (Additional file 1). Given the palindromic nature of the CtrA binding site, frequently two hits were computed for each promoter; we also noted that in a single regulatory region several hits were occasionally found (for instance upstream of *motA2*). Eleven hits mapped within coding regions, suggesting a high rate of false negatives.

To evaluate the functional relevance of some of the identified sites, we cloned the intergenic regions located between *fliL2-fliF2*, and *flgB2-fliI2* in a plasmid that carries the reporter gene *uidA* (pRK415/*uidA*), in order to create a transcriptional fusion between these promoters and the *uidA* gene, which encodes for the enzyme β -glucuronidase. To test the activity of the

promoters *fliL2p*, *fliF2p*, *flgB2p* and *fliI2p*, these regions were cloned in both orientations regarding *uidA*. These constructions were introduced to the AM1 mutant strain (for simplicity this strain will be named as wild type from now on) and its Δ *ctrA* derivative (EA1 strain). The amount of β -glucuronidase produced by each strain was determined.

It was observed that all these plasmids promoted an elevated synthesis of β -glucuronidase in the AM1 (WT) strain, but not in the EA1 (Δ *ctrA*) strain (Table 3). This suggests that each one of these regions contain a functional CtrA-dependent promoter. The region upstream of *flgE2* was also cloned into pRK415/*uidA*, in order to test a region that does not contain a divergent promoter. β -glucuronidase activity promoted by *flgE2p* was also dependent on the presence of CtrA (Table 3).

To validate our plasmid system, we cloned the *fliQ* promoter from *C. crescentus*, previously known to be activated by CtrA, into pRK415/*uidA* and it was introduced to the wild-type (AM1) and EA1 strains. A high level of β -glucuronidase was detected in AM1 but not in EA1 (data not shown).

Determination of the transcriptional start site of *fliL2p*, *fliF2p*, *flgB2p*, *fliI2p* and *flgE2p*

To further characterize *fliL2p*, *fliF2p*, *flgB2p*, *fliI2p* and *flgE2p*, we proceeded to determine the transcriptional start site (TSS) by 5'-RACE. The TSS was established by sequencing five independent clones from each sample. For these promoters, the initiation nucleotide was always

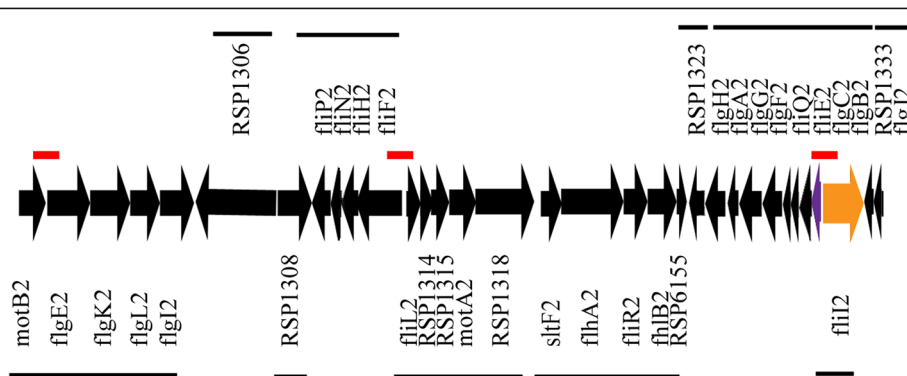


Fig. 1 Cluster and operon arrangement of the *fla2* genes between *motB2* and *fliI2*. Arrows indicate the direction of transcription. The name of the genes that are transcribed from left to right are indicated under the arrows, and the genes transcribed in the opposite direction are indicated above the arrows. The red lines indicate the regulatory regions analyzed in this work. For an easy identification, the arrows representing *flgB2* and *fliI2* are colored in violet and orange, respectively. In the cluster, *motB2* encodes the motor protein B; *flgE2*, the hook protein; *flgK2* and *flgL2*, the hook associated proteins 1 and 3, respectively; *flgI2*, the P-ring protein; RSP_1316 a putative histidine kinase; RSP_1318 a putative response regulator; *fliP2* membrane component of the secretion apparatus; *fliN2*, a switch complex/secretion protein; *fliH2*, a soluble component of the secretion system; *fliF2*, the MS-ring protein; *fliL2*, a motor control protein; RSP_1414, RSP_1315, conserved hypothetical proteins; *motA2*, the stator protein A; RSP_1318, a conserved hypothetical protein; StfF, the flagellar soluble lytic transglycosylase (named before *flgJ2*); *flhA2*, *fliR2*, *flhB2*, membrane components of the secretion apparatus; RSP_6155, conserved hypothetical protein; RSP_1323 similar to FliI; *flgH2*, L-ring protein; *flgA2*, chaperone for P-ring formation; *flgG2*, distal rod protein; *flgF2*, rod protein; *fliQ*, membrane component of the secretion apparatus; *fliE*, periplasmic protein related with the secretion apparatus; *flgC2*, *flgB2*, proximal rod proteins; *fliI2* cytoplasmic component of the secretion system, ATPase component; RSP_1333 putative secretion chaperone; *flgJ2*, cap rod protein

Table 3 β -glucuronidase activity promoted by the regulatory regions of *flgE2p*, *fliF2p*, *flgB2p*, *fliL2p*, and *fliI2p*^a

	WT	Δ ctrA
<i>flgE2p</i>	148 ± 32	1.4 ± 0.36
<i>fliF2p</i>	166 ± 27	1.0 ± 0.24
<i>flgB2p</i>	125 ± 24	0.52 ± 0.12
<i>flgL2p</i>	204 ± 36	0.28 ± 0.06
<i>fliI2p</i>	99 ± 19	0.37 ± 0.09

^aThe plasmids pRK415/uidA carrying the indicated regulatory regions were introduced to AM1 (WT) and EA1 (Δ ctrA) and the amount of β -glucuronidase was determined. Activity is expressed as μ mol of 4-methyl-umbelliferone/min/mg of protein. The values represent an average of three independent experiments

a purine (Fig. 2). The regions upstream of the TSS were aligned using MUSCLE and also by visual inspection; from this alignment it was possible to detect a sequence similar to the CtrA-binding site (yellow shaded in Fig. 2). The distance between the TSS and the final boundary of the putative CtrA-binding site is 23 or 24 nt, which is in agreement with the findings made in *C. crescentus*. In this bacterium it was observed that the CtrA-binding site is located near the -35 promoter region in CtrA-activated promoters [18, 20]. It should be stressed that the putative CtrA-binding sites identified from this sequence alignment, concur with those identified bioinformatically using a threshold of 5.5, except for the divergent promoters *flgB2p* and *fliI2p*.

From the alignment (Fig. 2), we also observed an invariant A at the -11 position, a G at -4 and, a variable distance between the TSS and the start codon, ranging from 33 to 12 bp. Under the idea that the -11 position could be a part of the -10 promoter region, we presume that the identity of the -11 position could be important for transcription.

As can be observed in Fig. 2, a gap was introduced between the left and right conserved elements of the CtrA-binding site for *flgB2p* and *fliI2p*. Therefore, these sites do not conform to the consensus CtrA-binding site, and in consequence they were not found by the algorithm in the initial analysis. For *flgB2p*, the algorithm

predicted two different sites. The first has a score of 8.3 and overlaps the TSS. The other starts one nucleotide upstream of the highlighted sequence in Fig. 2 but has several differences from the consensus and a score just above the threshold (5.9), which contrasts with the high score observed for the predicted sites upstream of *fliF2p*, *fliL2p* or *flgE2p* (i.e., 9.7, 9.3 and 10.3, respectively). For *fliI2p*, the algorithm predicted one CtrA-binding site (score 7.1), which starts upstream of the sequence shown in Fig. 2, and overlaps with the highlighted sequence in Fig. 2, in such a manner that the right element of this site is the left element highlighted in Fig. 2. To clarify the relevance of these putative CtrA binding sites, additional experiments were carried out.

Site directed mutagenesis of the *fla2* promoters

To gain insight on the role of the sequences identified from the alignments of *flgB2p*, *fliI2p*, *fliF2p* and *fliL2p* such as the putative CtrA binding site or the putative -10 promoter region, we proceeded to mutagenize the nucleotides shown in Fig. 3a. For each promoter we changed two bases of the proposed CtrA-binding site and two bases of the putative -10 promoter region.

The promoter regions carrying these changes were cloned in pRK415/uidA and introduced to AM1. The amount of β -glucuronidase present in total cell extracts was determined. We noticed a strong reduction in the enzymatic activity when these changes were introduced (Fig. 3a), suggesting that these regions could indeed represent the functional CtrA binding site and the -10 promoter region. To support this notion, we decided to further analyze *flgB2p* introducing additional changes along the regulatory region (Fig. 3b). The plasmids carrying these changes were introduced to AM1 and the amount of β -glucuronidase was determined. We noticed a reduction in the amount of β -glucuronidase when the positions immediately upstream of the -11 position (-13/-14), and the right element of the CtrA-binding site (-27/-28) were changed (Fig. 3b). Mutations at positions -17/-18, -23/-24, and -42/-43 did not severely affect the expression of the reporter gene. These results

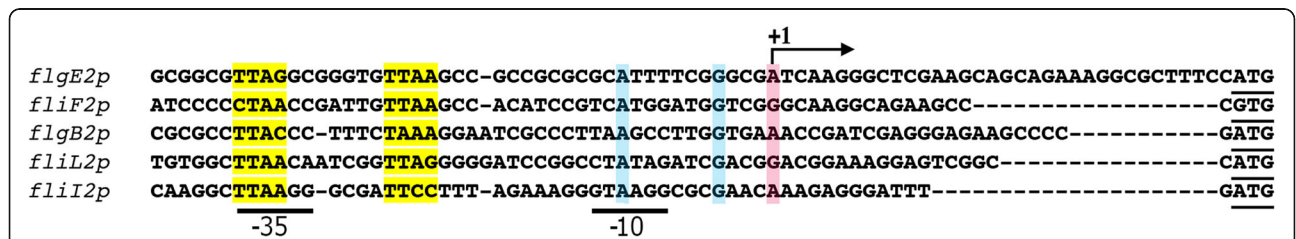
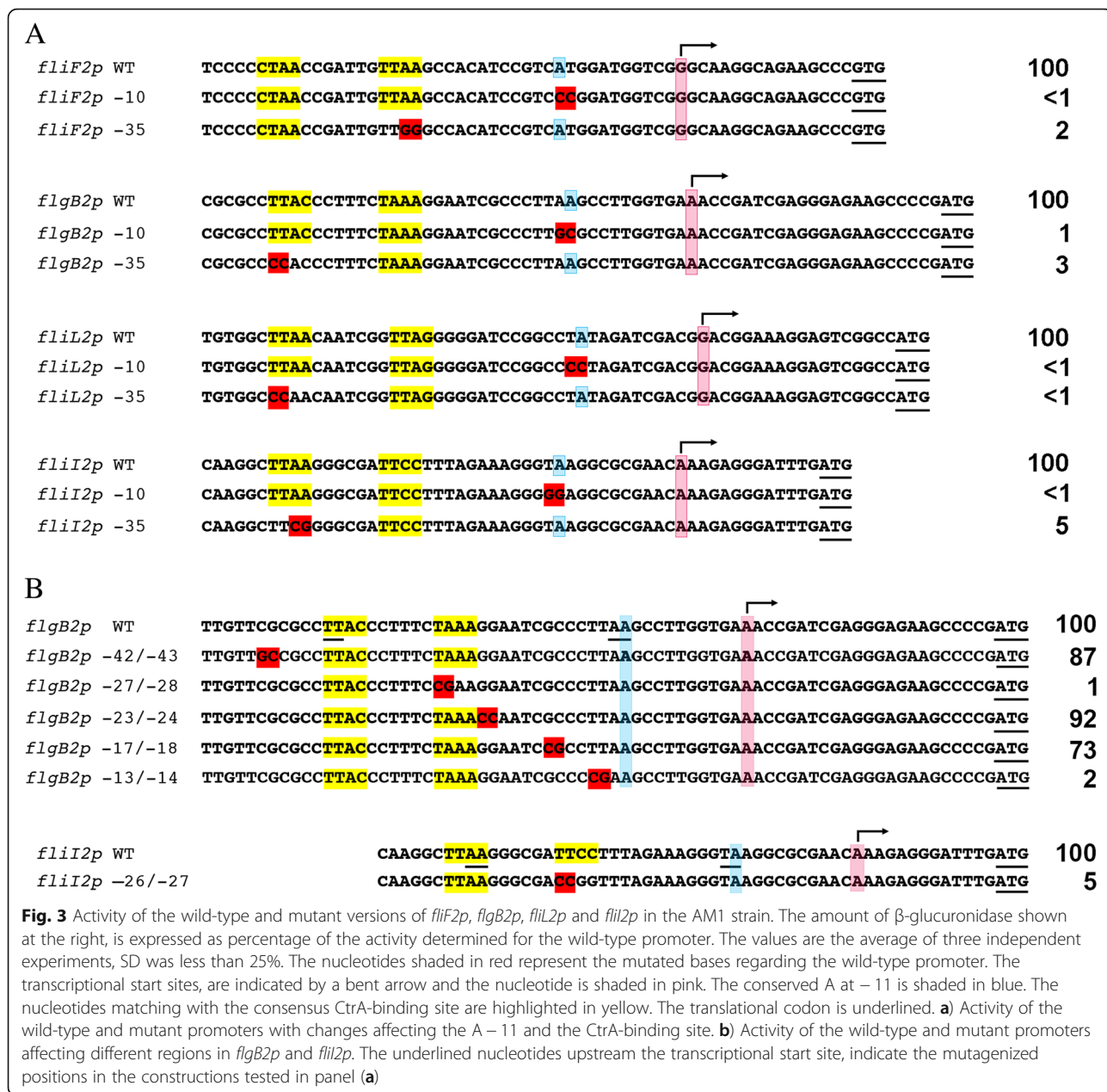


Fig. 2 Transcriptional start sites of the *flgE2*, *fliF2*, *flgB2*, *fliL2* and *fliI2* promoters The transcriptional start site (+1), is indicated by a bent arrow and the nucleotide is shaded in pink. The conserved nucleotides A and G at -11 and -4 positions, respectively are shaded in blue. The nucleotides matching with the consensus CtrA-binding site are highlighted in yellow. The translation codons for FlgE2, FliF2, FlgB2, FliL2 and FliI2, are underlined



support the notion that specific positions at this promoter region are indeed relevant to achieve transcription whereas others do not make a significant contribution. Therefore, the region around the -11 position and the proposed CtrA binding site, including the left and right elements, are key for the expression of *flgB2p*.

For *fliI2p*, the right element of the proposed CtrA binding site, was also mutagenized, and this change strongly reduced the amount of β -glucuronidase as compared with the wild type promoter (Fig. 3b), indicating that the proposed sequence could represent the actual CtrA-binding site. As mentioned in the previous section, a different site was predicted bioinformatically for this

promoter. The right element of this putative site is in fact the left element highlighted in the alignment shown in Figs. 2 and 3. To obtain evidence of the contribution of this putative site, we mutagenized the -47/-48 positions of *fliI2p*, which must represent the left element, but did not detect a reduction in the amount of β -glucuronidase when this mutant promoter was tested in pRK415/uidA (data not shown). These results lead us to the conclusion that the functional site for CtrA binding must be the sequences highlighted in yellow in Fig. 2.

As mentioned before, *flgB2* and *fliI2* are transcribed from divergent promoters as well as *fliF2* and *fliL2*;

nonetheless, from the above results we realized that the architecture of these promoter regions is different. Figure 4 illustrates how a single CtrA binding site is sufficient for activation of *flgF2p* and *fliL2p*, whereas *flgB2p* and *fliI2p* are activated from independent CtrA binding sites.

Binding of CtrA to *flgB2p* and *fliI2p* promoters

Attempts to detect binding of His6X-CtrA to different *fla2* promoters by gel electrophoresis mobility shift assay (EMSA) and DNase I footprinting were unsuccessful; therefore, we decided to undertake an in vivo approach using chromatin immunoprecipitation (ChIP) in order to reveal the binding of CtrA to the *fla2* promoters. For these experiments we used the plasmid pRK415/*uidA* carrying *flgB2p* in the AR1 strain, in which the chromosomal region corresponding to *flgB2p* and *fliI2p* was deleted.

The amount of *flgB2p* immunoprecipitated by α -CtrA antibodies was detected by semi-quantitative PCR. A strong increase of the PCR product was observed in the sample obtained from AR1 as compared with that obtained from EA1 (Δ *ctrA*), indicating that CtrA binds to this region (Fig. 5a).

We also analyzed the amount of *flgB2p* precipitated by α -CtrA antibodies using the AR1 strain transformed with the plasmids carrying *flgB2p* - 10 and *flgB2p* - 35 (constructions shown in Fig. 3a). Given the architecture of *flgB2p* and *fliI2p* it should be stressed that the change

at the - 10 region of *flgB2p* affects the CtrA-binding site of *fliI2p* (Fig. 4), so a reduction in the amount of product can be expected. From these experiments we observed a perceptible reduction in the amount of DNA that was immunoprecipitated by α -CtrA antibodies when the putative CtrA-binding sites were mutagenized, supporting the idea that these sites are involved in the binding of CtrA (Fig. 5b).

Analysis of the intergenic region *flgB-fliI* in other α -proteobacteria

The *flgB2* and *fliI2* genes are syntenic in several α -proteobacteria. We analyzed the intergenic region between these genes for seven species of *Rhodobacteraceae* and one from the *Hyphomonadaceae* family, order *Rhodobacterales*. These regulatory regions are shown in Fig. 6, and it is evident that there is a limited space for the promoters and the CtrA-binding sites. For *Rhodobacter capsulatus*, *Dinoreoseobacter shibae* and *Ruegeria pomeroyi*, it has been established that the expression of the flagellar genes is dependent on CtrA [29, 41, 42] and given that in the other species it is possible to find the presence of the gene encoding the histidine kinase *cckA*, the phosphotransferase *chpT* along with *ctrA*, an educated guess allows us to presume that in these bacteria the flagellar genes are also controlled by CtrA. Using the PWM previously published for *C. crescentus* [17], we searched for the CtrA-binding sites in these sequences using a threshold of 3. From this analysis we noticed



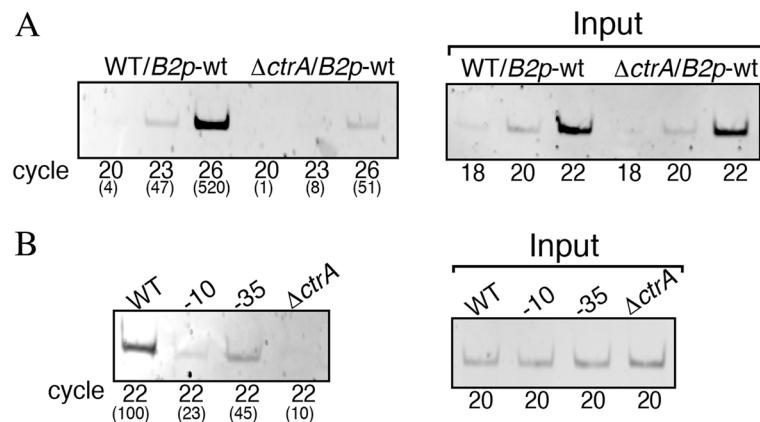


Fig. 5 Binding of CtrA to the *flgB2-flil2* regulatory region. DNA material immunoprecipitated with α -CtrA antibodies, was amplified using the *flgB2* and *flgB5* oligonucleotides. Samples were taken at different cycles and analyzed by agarose gel electrophoresis. Panel **a** and **b** show one representative experiment out of three independent assays. **a**) Samples of AM1 (WT) and EA1 ($\Delta ctrA$) carrying pRK_ *flgB2p::uidA-aadA* (*B2p-wt*) were amplified during the number of cycles indicated below. The numbers in parenthesis represent the value obtained from the densitometric analysis. Input, shows the amplification products from an aliquot taken from each sample before ChIP (total chromatin input DNA). **b**) Samples of AR1 carrying pRK_ *flgB2p::uidA-aadA* (WT) or the mutant versions pRK_ *flgB2p* - 10: *uidA-aadA* (-10) and pRK_ *flgB2p* - 35: *uidA-aadA* (-35), and EA1 carrying pRK_ *flgB2p::uidA-aadA* ($\Delta ctrA$). The values in parenthesis represent the percentage of product relative to the amount detected for the wild type. Input shows the amplification products from an aliquot taken from each sample before ChIP

that for some species it was not possible to find putative CtrA binding sites with scores above 3.5, and in other cases only one site with a high score was found (Fig. 6). From this, it seems possible that a single CtrA binding site could be used to activate these promoters in *Dinoroseobacter shibae* and *Jannaschia sp*, whereas two CtrA-binding sites seem to be required for activation in *Ketogulonigenium vulgare*. Nonetheless, from this analysis it emerges that more than one type of architecture is possible.

Discussion

We have previously shown that in *R. sphaeroides* the expression of the *fla2* genes is controlled by CtrA [15]. In this work we present evidence indicating that CtrA binding directly activates transcription of these genes. From our results we inferred that the binding site for this transcription factor should be similar to the one already reported for *C. crescentus*, given that the *fliQ* promoter from this microorganism was able to transcribe the reporter gene *uidA* in a CtrA-dependent fashion in *R. sphaeroides*. Therefore, we analyzed bioinformatically the *fla2* region for CtrA binding sites using the PWM obtained from studies in *C. crescentus* [17]; several sites were identified and its functionality was tested by site directed mutagenesis. This analysis together with the identification of the TSS of several *fla2* promoters allows us to define the control region of these genes. We observed that they contain an invariant A at the -11 position, and a putative CtrA binding site near the -35. Adenine at the -11 position could represent a relevant contact for the RNA polymerase associated with the σ^{70} factor.

In line with this idea, it has been proposed that this nucleotide is flipped out during the open complex formation and is specifically recognized by several amino acids in the sigma-2 domain of σ^{70} [43]. In addition, we determined that a purine is located at the initiation transcription site in these four promoters, which is in agreement with previous observations in other bacterial promoters [44–46]. Therefore, several common features previously known to be relevant for transcription initiation are present in these promoters.

We centered our analysis in the divergent promoters *fliL2p-fliF2p*, and *flgB2p-fliI2p* given that transcription from divergent promoters that are dependent on positive control could reveal additional features to those already known for non-divergent promoters. It is known that divergent promoters not only show a reduced space for housing the RNA polymerase and other transcription factors, but may also be affected by changes in the local superhelical density generated by the adjacent transcribing RNA complexes [47–49].

We observed that, regardless that the intergenic region of *flgB2* and *fliI2* is only 47 bp counting from the transcription start sites (TSS), there are two independent CtrA-binding sites in this region. This is supported by the fact that site-directed mutagenesis of the CtrA binding site of *flgB2p* (in the left or right element corresponding to *flgB2*-35 and -27/-28 constructions, see Figs. 3 and 4) provoked a decrease of the activity of the reporter gene; however, mutagenesis of the -23/-24 positions of *flgB2p* did not affect the expression of the reporter gene, but did affect the functional CtrA binding site of *fliI2p* (see Fig. 4). This suggests that binding of

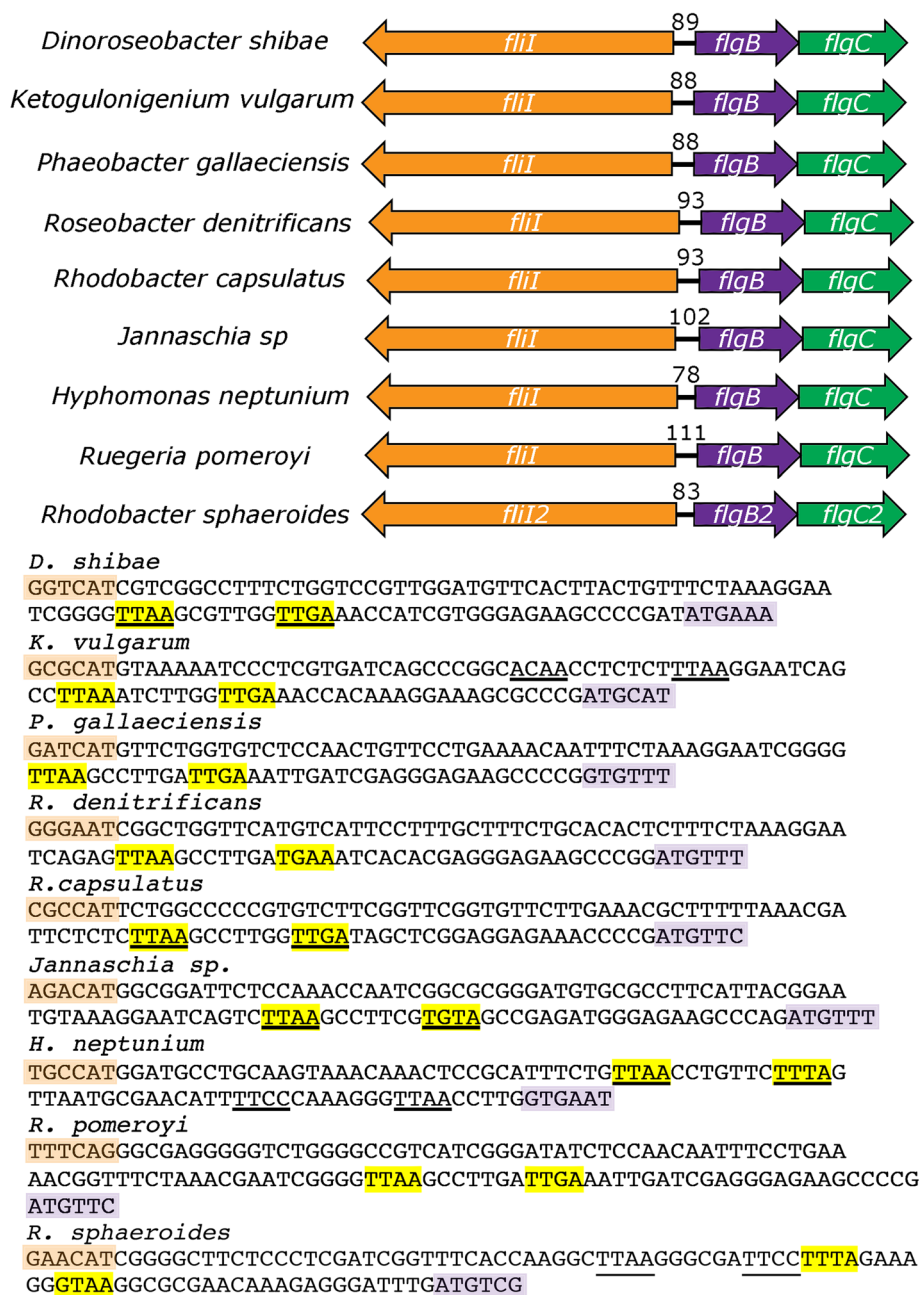


Fig. 6 CtrA binding sites for the *fliI*-*flgB* divergent promoters from different species. Intercistronic regions between *flgB* and *fliI* of six different species of *Rhodobacteraceae* and one species of the *Hyphomonadaceae* family. These genes show a similar arrangement as that observed for *flgB2* and *fliI2* of *R. sphaeroides*. The *fliI* gene is represented in orange and *flgB* in violet. Below, the complete intercistronic region is shown and the sequences predicted as possible CtrA binding sites are indicated as follows: highlighted in yellow for the reverse strand, and underlined for the direct strand. For *Hyphomonas neptunium* two different sites are underlined given that the highest score (4) corresponds to a predicted site that is five nucleotides upstream the initiation codon of *FlgB*; the other possible site has a lower score (3,8) but from this localization it is likely that CtrA could activate the RNA polymerase

CtrA to activate *fliI2p* did not affect activation of *flgB2p*, at least when these promoters are measured from a plasmid.

It should be stressed that the proposed CtrA-binding sites for these promoters (i.e. *flgB2p* and *fliI2p*) do not

conform to the consensus that has been previously reported for other bacteria, given that for *flgB2p* and *fliI2p*, the left and right elements of the CtrA binding site are located only 6 bp apart. As explained in the results section, for *flgB2p*, the other possible sites for CtrA binding

were unlikely to be functional, given that one overlapped with the TSS, and the other showed a very low score. For *fliL2p* the best CtrA binding site that was identified bioinformatically was not supported by the experiments reported in this work. Therefore, we presume that for these promoters CtrA is able to activate transcription from atypical binding sites. A possible scenario could be that a very short intercistronic region with divergent promoters could be particularly affected by negative supercoiling (undertwisting) of the DNA. This conformation would be due to the activity of the divergent transcription from these promoters, enabling a better recognition of the CtrA binding site regardless of the fact that the left and right elements are positioned only 6 bp apart. A similar spacing between the left and right TTAA elements of the CtrA binding site has been described for *Magnetospirillum magneticum* [21]. An atypical spacing between these elements was also noted for the *ctrA* binding sites of the *ctrA* P1 and P2 promoters of *C. crescentus*. In this case the P1 promoter that is negatively controlled by CtrA, could have the ungapped variant for CtrA binding; however, for the CtrA-activated P2 promoter, the contribution of the left and right elements spaced by 6 bp was verified by an electrophoretic mobility shift assays [50].

A different situation was observed for activation of *fliF2p* and *fliL2p*, given that it appears that only one CtrA binding site is required for activation of these other divergent promoters. These results suggest that the CtrA binding site and both promoters must be properly placed on the same face of the DNA helix. In this regard, we identified a single CtrA binding site between the divergent promoters *fliI* and *flgB* in several species of α -proteobacteria, suggesting that the presence of a single CtrA binding site to active divergent promoters could be a common feature. Alternatively, it is possible that the PWM does not represent the actual CtrA binding site in the regulatory regions of these bacteria, in which case other CtrA binding sites would remain to be identified.

In *C. crescentus* it has been reported that the divergent promoters *flgBp* and *fliOp*, which are located 144 bp apart, share a CtrA-binding site. In this case, *flgBp* is repressed by CtrA and *fliOp* is activated when CtrA binds to this site [27]. This difference could be the result of a different evolution of the flagellar transcriptional hierarchies. For instance, in *C. crescentus* the periplasmic components of the flagellum (most of the genes encoding the rod proteins, and FlgI and FlgH that form the L and P rings, respectively) are encoded by genes that are dependent on RpoN and the activator protein FlbD [9]. In *R. sphaeroides* none of its four different RpoN proteins [51] is involved in the expression of the *fla2* genes (unpublished results). Moreover, the gene encoding FlbD is absent in the species of *Rhodobacteraceae* shown in

Fig. 6; nevertheless, other proteins of this family of activators can be identified. This information suggests that in *R. sphaeroides* and other species of this genus, the early constituents of the flagellar structure including the periplasmic components are encoded by genes that could be directly activated by CtrA.

Conclusions

In this work we show that CtrA directly activates the expression of the *fla2* genes of *R. sphaeroides*. The identification of the transcriptional start site for several *fla2* promoters allowed us to identify several conserved features such as a conserved A at the -11 position and a purine at the initiation start site. The CtrA binding sites were tested by site directed mutagenesis and it was found that CtrA activates the expression of the divergent promoters *fliL2p-fliFp2* using a single binding site, whereas for the divergent promoters *flgB2p-fliI2p* CtrA activates transcription from two independent sites. In addition, we found that the CtrA binding site could also be functional when the left and right elements of the full motif are 6 bp apart.

Additional file

Additional file 1: CtrA-binding sites predicted in the *fla2* cluster of *Rhodobacter sphaeroides* using the PWM reported for *Caulobacter crescentus*. Hits found by RSAT in the *fla2* cluster of *R. sphaeroides*. (XLSX 40 kb)

Abbreviations

5'-RACE: 5'-Rapid amplification of cDNA ends; Ap: Ampicillin; BSA: Bovine serum albumin; ChIP: Chromatin immunoprecipitation; Cm: Chloramphenicol; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; EMSA: Gel electrophoresis mobility shift assay; Gm: Gentamycin; LB: Luria broth; MEME: Multiple EM (expectation-maximization algorithm) for Motif Elicitation; min: Minutes; MUSCLE: Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation; NaI: Nalidixic acid; Ni-NTA: Nickel-nitrilotriacetic acid; OD600: Optical density measured at 600 nm; PBS: Phosphate buffered saline; PCR: Polymerase chain reaction; PWM: Position weight matrix; rpm: revolutions per minute; RSAT: Regulatory Sequence Analysis Tools; SD: Standard deviation; SDS: Sodium dodecyl sulfate; Spc: Spectinomycin; TCS: Two component system(s); Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethane; TSS: Transcriptional start site

Acknowledgments

We thank Teresa Ballado and Javier de la Mora (IFC) for technical support, Georgina Hernandez (IIB) for valuable help with antibody production, and the Molecular Biology Unit IFC-UNAM for sequencing facilities.

Funding

This study is part of the requisites to obtain a doctoral degree by A.O. (Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México), who was supported during her studies by a fellowship from CONACYT. This work was partially supported by DGAPA-UNAM (PAPIIT-IN204317) and CONACYT (CB2014-235996).

The funding source had no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

LC, GD and SP discussed, planned and designed the experiments, AR-O performed them. LC supervised AR-O. LC and GD wrote the manuscript. Many constructions and enzymatic activities were obtained by AO. All the authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval

Maintenance and use of the animals was in accordance with the Guidelines of the Mexican Law of Animal Protection (NOM-062-ZOO-1999). All experiments were approved by the local Institutional Animal Care and Research Advisory Committee (CICUAL, Protocol ID 146), from Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and under International Laws of ethical care and use of animals (National Research Council (U.S.) et al., 2011). The mice were allowed to adapt to the new conditions for two weeks at the Animal Care Facility Unit of Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. They were housed in an individually ventilated caging system under standard conditions (mean temperature 22 ± 2 °C, $40 \pm 10\%$ relative humidity, 12:12 h light-dark cycle (lights on 7:00–19:00 h)) on sterilized wood shavings bedding (ENVIGO). They received a commercial pelletized diet (TG rodent diet T2018S.15, ENVIGO) and water ad libitum from an automated watering system. Mice were sacrificed by CO₂ (according to the AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals 2013).

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 5 December 2017 Accepted: 26 September 2018

Published online: 10 October 2018

References

- Macnab RM. How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol.* 2003; 57:77–100.
- Berg HC. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:19–54.
- Smith TG, Hoover TR. Deciphering bacterial flagellar gene regulatory networks in the genomic era. *Adv Appl Microbiol.* 2009;67:257–95.
- Macnab RM. Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu Rev Genet.* 1992;26:131–58.
- Chevance FF, Hughes KT. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(6):455–65.
- Sourjik V, Muschler P, Scharf B, Schmitt R. VisN and VisR are global regulators of chemotaxis, flagellar, and motility genes in *Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti*. *J Bacteriol.* 2000;182(3):782–8.
- Rotter C, Muhlbacher S, Salamon D, Schmitt R, Scharf B. Rem, a new transcriptional activator of motility and chemotaxis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* 2006;188(19):6932–42.
- Pini F, De Nisco NJ, Ferri L, Penterman J, Fioravanti A, Brillì M, Mengoni A, Bazzicalupo M, Viollier PH, Walker GC et al: Cell cycle control by the master regulator CtrA in *Sinorhizobium meliloti*. *PLoS Genet* 2015, 11(5):e1005232.
- Curtis PD, Brun YV. Getting in the loop: regulation of development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(1):13–41.
- Tsang J, Hoover TR. Themes and variations: regulation of RpoN-dependent flagellar genes across diverse bacterial species. *Scientifica (Cairo).* 2014;2014:681754.
- Poggio S, Abreu-Goodger C, Fabela S, Osorio A, Dreyfus G, Vinuesa P, Camarena L. A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* 2007;189(8):3208–16.
- Amitage JP, Macnab RM. Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* 1987;169(2):514–8.
- de la Mora J, Uchida K, del Campo AM, Camarena L, Aizawa S, Dreyfus G. Structural characterization of the Fla2 flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* 2015;197(17):2859–66.
- Poggio S, Osorio A, Dreyfus G, Camarena L. The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins. *Mol Microbiol.* 2005;58(4):969–83.
- Vega-Baray B, Domenzain C, Rivera A, Alfaro-Lopez R, Gomez-Cesar E, Poggio S, Dreyfus G, Camarena L. The flagellar set Fla2 in *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the CckA pathway and is repressed by organic acids and the expression of Fla1. *J Bacteriol.* 2015;197(5):833–47.
- del Campo AM, Ballado T, de la Mora J, Poggio S, Camarena L, Dreyfus G: Chemotactic control of the two flagellar systems of *Rhodobacter sphaeroides* is mediated by different sets of CheY and FlIM proteins. *J Bacteriol* 2007, 189(22):8397–8401.
- Brillì M, Fondi M, Fani R, Mengoni A, Ferri L, Bazzicalupo M, Biondi EG. The diversity and evolution of cell cycle regulation in alpha-proteobacteria: a comparative genomic analysis. *BMC Syst Biol.* 2010;4:52.
- Zhou B, Schrader JM, Kalogeraki VS, Abeliuk E, Dinh CB, Pham JQ, Cui ZZ, Dill DL, McAdams HH, Shapiro L: The global regulatory architecture of transcription during the *Caulobacter* cell cycle. *PLoS Genet* 2015, 11(1):e1004831.
- Laub MT, Chen SL, Shapiro L, McAdams HH. Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(7):4632–7.
- Quimet MC, Marczyński GT. Analysis of a cell-cycle promoter bound by a response regulator. *J Mol Biol.* 2000;302(4):761–75.
- Greene SE, Brillì M, Biondi EG, Komeili A. Analysis of the CtrA pathway in *Magnetospirillum* reveals an ancestral role in motility in alphaproteobacteria. *J Bacteriol.* 2012;194(11):2973–86.
- Mercer RG, Callister SJ, Lipton MS, Pasa-Tolic L, Strnad H, Paces V, Beatty JT, Lang AS. Loss of the response regulator CtrA causes pleiotropic effects on gene expression but does not affect growth phase regulation in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol.* 2010;192(11):2701–10.
- Francez-Charlot A, Kaczmarczyk A, Vorholt JA. The branched CcsA/CckA-ChpT-CtrA phosphorelay of *Sphingomonas melonis* controls motility and biofilm formation. *Mol Microbiol.* 2015;97(1):47–63.
- De Nisco NJ, Abo RP, Wu CM, Penterman J, Walker GC: Global analysis of cell cycle gene expression of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, 111(9):3217–3224.
- Barnett MJ, Hung DY, Reisenauer A, Shapiro L, Long SR. A homolog of the CtrA cell cycle regulator is present and essential in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* 2001;183(10):3204–10.
- Brassinga AK, Siam R, McSween W, Winkler H, Wood D, Marczyński GT. Conserved response regulator CtrA and IHF binding sites in the alpha-proteobacteria *Caulobacter crescentus* and *Rickettsia prowazekii* chromosomal replication origins. *J Bacteriol.* 2002;184(20):5789–99.
- Boyd CH, Guber JW. Temporal regulation of genes encoding the flagellar proximal rod in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol.* 2001;183(2):725–35.
- Jones SE, Ferguson NL, Alley MR. New members of the ctrA regulon: the major chemotaxis operon in *Caulobacter* is CtrA dependent. *Microbiology.* 2001;147(Pt 4):949–58.
- Belas R, Horikawa E, Aizawa S, Suvanasuthi R. Genetic determinants of *Silicibacter* sp. TM1040 motility. *J Bacteriol.* 2009;191(14):4502–12.
- Sistrom WR. The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J Gen Microbiol.* 1962;28:607–16.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley; 1987.
- Quandt J, Hynes MF. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene.* 1993;127(1):15–21.
- Davis J, Donohue TJ, Kaplan S. Construction, characterization, and complementation of a Puf- mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* 1988;170(1):320–9.
- Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D. β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(22):8447–51.
- Hernandez-Valle J, Domenzain C, de la Mora J, Poggio S, Dreyfus G, Camarena L. The Master Regulators of the Fla1 and Fla2 Flagella of *Rhodobacter sphaeroides* Control the Expression of Their Cognate CheY Proteins. *J Bacteriol.* 2017;199(5).
- Kunkel TA. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(2):488–92.
- Harlow E, Lane D: Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1988.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671–5.

39. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(5):1792–7.
40. Porter SL, Wilkinson DA, Byles ED, Wadhams GH, Taylor S, Saunders NJ, Armitage JP. Genome sequence of *Rhodobacter sphaeroides* strain WS8N. *J Bacteriol.* 2011;193(15):4027–8.
41. Lang AS, Beatty JT. A bacterial signal transduction system controls genetic exchange and motility. *J Bacteriol.* 2002;184(4):913–8.
42. Wang H, Ziesche L, Frank O, Michael V, Martin M, Petersen J, Schulz S, Wagner-Dobler I, Tomasch J. The CtrA phosphorelay integrates differentiation and communication in the marine alphaproteobacterium *Dinoroseobacter shibae*. *BMC Genomics.* 2014;15:130.
43. Feklistov A, Darst SA. Structural basis for promoter-10 element recognition by the bacterial RNA polymerase sigma subunit. *Cell.* 2011;147(6):1257–69.
44. Hawley DK, McClure WR. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 1983;11(8):2237–55.
45. Vvedenskaya IO, Zhang Y, Goldman SR, Valenti A, Visone V, Taylor DM, Ebright RH, Nickels BE. Massively systematic transcript end readout, "MASTER": transcription start site selection, transcriptional slippage, and transcript yields. *Mol Cell.* 2015;60(6):953–65.
46. Prados J, Linder P, Redder P. TSS-EMOTE, a refined protocol for a more complete and less biased global mapping of transcription start sites in bacterial pathogens. *BMC Genomics.* 2016;17(1):849.
47. Liu LF, Wang JC. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(20):7024–7.
48. Opel ML, Hatfield GW. DNA supercoiling-dependent transcriptional coupling between the divergently transcribed promoters of the *ilvYC* operon of *Escherichia coli* is proportional to promoter strengths and transcript lengths. *Mol Microbiol.* 2001;39(1):191–8.
49. Zhi X, Dages S, Dages K, Liu Y, Hua ZC, Makemson J, Leng F. Transient and dynamic DNA supercoiling potently stimulates the *leu-500* promoter in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2017;292(35):14566–75.
50. Spencer W, Siam R, Ouimet MC, Bastedo DP, Marczynski GT. CtrA, a global response regulator, uses a distinct second category of weak DNA binding sites for cell cycle transcription control in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol.* 2009;191(17):5458–70.
51. Poggio S, Osorio A, Dreyfus G, Camarena L. The four different σ^{54} factors of *Rhodobacter sphaeroides* are not functionally interchangeable. *Mol Microbiol.* 2002;46(1):75–85.
52. Sockett RE, Foster JCA, Armitage JP. Molecular biology of the *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. *FEMS Symp.* 1990;53:473–9.
53. Simon R, Priefer U, Pühler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology.* 1983;1:37–45.
54. Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Trollinger D. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene.* 1988;70(1):191–7.
55. Metcalf WW, Wanner BL. Construction of new β -glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement. *Gene.* 1993;129(1):17–25.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

