

03062



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**ESTUDIO MORFOGENÉTICO DE UNA MUTANTE
FLAGELAR EN *Rhodobacter sphaeroides***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN INVESTIGACION

BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A :

BIOL. BERTHA MARÍA JOSEFINA GONZÁLEZ PEDRAJO

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

"El respeto al trabajo ajeno es la paz"

It doesn't matter if you fall down, as long as you pick up something from the floor while you stand up.

E. Racker

El presente trabajo se realizó en el laboratorio y bajo la dirección del Dr. Georges Dreyfus Cortés, en el Departamento de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, con apoyo de CONACYT (0617-N9110) y DGAPA (1N-204595).

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Georges Dreyfus Cortés
Dra. Alicia González Manjarrez
Dra. Carmen Gómez Eichelmann
Dr. Diego González Halphen
Dr. Heliodoro Celis Sandoval

A Nayar, con todo mi amor

AGRADECIMIENTOS

Agradezco muy especialmente al Dr. Georges Dreyfus por la dirección de este trabajo, por permitirme seguir aprendiendo en su laboratorio, por todo su apoyo y enseñanzas, así como por la confianza para iniciar una nueva línea de investigación.

A los miembros del jurado Dr. Diego González, Dr. Heliodoro Celis, Dra. Alicia González y Dra. Carmen Gómez por la cuidadosa revisión, comentarios y sugerencias que hicieron al trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial los Dres. Alicia González y Ruy Pérez Montfort, por escuchar tantas veces el proyecto, por todas sus aportaciones que me fueron de gran utilidad, y por el interés que mostraron.

A los Dres. Robert Macnab, Chi Aizawa y Liz Sockett, por facilitarnos diversos plásmidos y cósmidos, y por ayudarnos en el inicio del estudio del flagelo.

A la excelente ayuda técnica de la QFB Teresa Ballado Nava y la Biol. Marcela Sosa Garrocho para la elaboración del presente trabajo.

A la excelente ayuda técnica de Jorge Sepúlveda a quien se deben todas las fotografías de microscopio electrónico de este trabajo, por el interés que mostró en la elaboración de nuevas tinciones para obtener mejor contraste, por su amabilidad y disposición de colaborar.

A Andrés Campos por su ayuda con diversas técnicas de Biología Molecular, por enseñarme a secuenciar.

Al Sr. Hilario Zamudio por su apoyo en el lavado y conservación del material y de otras muchas ayudas importantes en el laboratorio.

A Rodolfo Paredes por su ayuda con las fotos de las placas de nado.

A Laura Ongay por la realización de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Al eficiente apoyo secretarial de Domi, Lupita, Maru y Jenny, que siempre me ayudan con lo que sea.

A la unidad de cómputo, especialmente a Juan por su ayuda.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por la beca otorgada para la realización de la presente tesis.

Al Instituto de Fisiología Celular y su personal, por las facilidades que brinda para el desarrollo de la investigación.

Agradezco :

A todos los integrantes actuales y pasados del lab. 322 por su ayuda en este trabajo, por su apoyo y sobretodo por aquantarme diario.

Especialmente a Hilario porque su ayuda ha sido muy importante, por el delicioso café que prepara diario, etc.

A Edgar por ser un gran amigo

A Ernie por su ayuda incondicional, su amistad y por haber luchado para que el 322 siguiera siendo el de antaño

A Terechú por ayudarme siempre con la mejor disposición, por su amistad y apoyo

A Uge por su compañerismo y toda su ayuda con el flagelo, por echarle tantas ganas al lab. y a nuestros seminarios

A Mariana por ser una excelente compañera de viaje y de laboratorio, por su ayuda con las figuras, por participar en el curso... por ser buena onda

A Marce por darle un toque de fiesta al lab. alegrando el ambiente

A Gerardo por haberse integrado en el equipo y por sus porras.

A mis cuates del Instituto por hacer agradable la estancia diaria en el IFC: Lety Z., Iirma, Silvia, Mayra, a las Diegas (Miriam, Anaíd, Sole), Erika, Jorge Pérez, Jorge Ramírez, Gonzálo, Agustín, y muy especialmente a Miss Ember y a José por su amistad.

A quienes quiero tanto: mis papas, hermanas y sobrino (a), por todo su apoyo. Al "Gabo".

A mi familia (Padrajo y Goya) por ayudarme cuando la beca se acaba

A los amigos de siempre que aunque no participen directamente en el trabajo, son pieza fundamental: Guero (of course) y Clau, Cucho y Maqui, Maru, mi casi hermano Pedris y la coleguita Funes, y a Luchi (por el super viaje).

A mis alumnos de Medicina por enseñarme a dar clases.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, máxima casa de estudios.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	
Movilidad Bacteriana: El Flagelo	2
Quimiotaxis	5
Estructura y Función Flagelar	8
Biogénesis Flagelar	15
Organización Genética Flagelar	17
Regulación Genética: Regulón	19
FliK y FlhB: Control del Tamaño del Gancho	23
El flagelo de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	26
OBJETIVOS	31
MATERIALES Y METODOS	33
RESULTADOS	46
DISCUSION	67
REFERENCIAS	76

RESUMEN

La movilidad bacteriana se debe a la rotación de organelos especializados denominados flagelos.

El flagelo bacteriano ha sido extensamente estudiado en bacterias entéricas, principalmente *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, sin embargo, en la mayoría de las familias bacterianas existen representantes flagelados. En este sentido, el presente trabajo tiene como objetivo general el estudio del flagelo de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*, el cual presenta características particulares que lo hacen un modelo interesante de flagelo procarionte.

El enfoque experimental utilizado para el estudio del movimiento en esta especie bacteriana, consistió en generar mutantes a través de mutagénesis por transposición, que fueran incapaces de nadar.

En el presente trabajo, se describe el aislamiento de una mutante no móvil, que presenta un fenotipo denominado poliganchos.

Se realizó la caracterización morfogenética de dicha mutante a través del uso de técnicas de microscopía electrónica, bioquímicas y de biología molecular. El trabajo incluye la caracterización microscópica de la mutante; la purificación de la proteína flagelar FlgE (proteína del gancho), incluyendo la secuenciación del extremo amino terminal.

Se realizaron a su vez estudios de restablecimiento de la movilidad con experimentos de complementación en trans, con lo que se logró la posterior identificación y clonación del gen mutado.

Por último, se incluye la secuencia preliminar de dicho gen.

El estudio y la generación de diferentes mutantes incapaces de nadar, abre la posibilidad de conocer la organización genética de los genes flagelares en *R. sphaeroides*, así como los mecanismos de regulación de los diferentes procesos de síntesis, ensamblaje, exportación y rotación flagelar, que no han sido descritos para esta bacteria.

INTRODUCCION

MOVILIDAD BACTERIANA : El Flagelo

En la búsqueda de nutrientes para la supervivencia, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos adaptativos entre los que se encuentra, la movilidad.

Muchas especies bacterianas tienen la capacidad de moverse en respuesta a diversos estímulos ambientales. Dicho movimiento puede ocurrir a partir de dos mecanismos, el nado o el deslizamiento; éste último involucra el movimiento lento sobre superficies sólidas y es característico de Myxobacterias, sin embargo, el aparato responsable de este tipo de movilidad hasta ahora no ha sido bien caracterizado (Godchaux y col., 1990).

Por otro lado, la movilidad bacteriana a través del nado, se debe a la rotación de organelos especializados denominados **flagelos**.

El flagelo es una de las estructuras más complejas de la célula bacteriana, ya que constituye parte integral de los diferentes compartimentos celulares como son la membrana celular, el espacio periplásmico, la pared celular o capa de peptidoglicano así como la membrana externa (Macnab y DeRosier, 1988).

Ya que la mayoría de las familias bacterianas se mueven activamente, existen representantes flagelados tanto en eubacterias gram positivas, gram negativas, arqueobacterias y espiroquetas (Armitage, 1992a). Existen a su vez, diferentes patrones flagelares, es decir, el número y la localización de los flagelos varía entre especies (para revisiones ver Macnab, 1987a; Jones y Aizawa, 1991; Silva-Herzog y Dreyfus, 1995; Macnab, 1995a).

Los flagelos bacterianos son aparentemente parecidos a los flagelos de organismos eucariontes, sin embargo, difieren completamente de estos últimos. A diferencia del flagelo eucarionte que se mueve como látigo para impulsar al organismo, el flagelo bacteriano rota. La fuerza de rotación o torque se genera en la

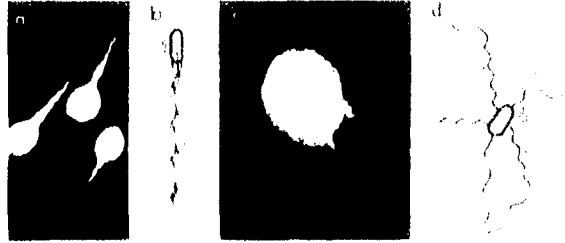
base del flagelo y se transmite hacia las estructuras extracelulares (Silverman y Simon, 1974a).

El flagelo bacteriano tiene un diámetro de 20 nm, y está constituido principalmente por múltiples subunidades de una sola proteína, la flagelina; mientras que el organelo eucarionte tiene un diámetro mayor, de 200 nm, y está constituido por más de 200 polipéptidos distintos.

Por otro lado, en organismos procariontes, la fuente de energía para la rotación flagelar no involucra la hidrólisis de ATP, sino un gradiente iónico transmembranal ya sea de protones (Larsen y col., 1974) o de iones sodio (Hirota y col., 1981). El flagelo bacteriano es por lo tanto, un transductor energético que convierte la energía del gradiente electroquímico de protones en trabajo mecánico (Blair y Dutcher, 1992).

Los sistemas flagelares más estudiados son los de las bacterias entéricas gram negativas *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, que presentan entre 5 y 10 flagelos por célula distribuidos alrededor del cuerpo celular: patrón flagelar peritrico (Macnab, 1987a).

En estas especies bacterianas, al igual que en muchas otras estudiadas, el flagelo puede rotar en dos direcciones: a favor de las manecillas del reloj (CW) "clockwise", o en contra de las manecillas del reloj (CCW) "counterclockwise". Tales bacterias con flagelación peritrica nadan cuando sus flagelos rotan en dirección CCW, lo que produce que los filamentos individuales se entrelazan formando una trenza (Macnab, 1977). Así todos los filamentos rotan de manera unitaria, lo que sirve como una propela para impulsar a la célula. Cuando existe en las células una transición hacia la rotación de los flagelos en sentido CW, la trenza se deshace, lo que permite a la bacteria reorientarse (ver figura 1). Es importante señalar que en este periodo se llevan a cabo movimientos caóticos al azar en los que no existe una velocidad lineal y por tanto no hay desplazamiento (Berg y Brown, 1972). La célula podrá comenzar a nadar en otra dirección cuando nuevamente la rotación sea CCW y se forme la trenza.



B

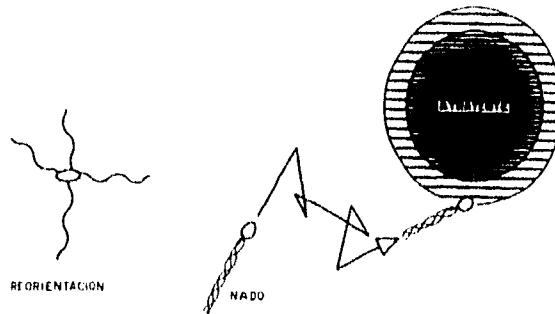


Figura 1

A) Rotación bidireccional de los flagelos de *E. coli* y *S. typhimurium*. En *a* y *b* se muestra una micrografía de campo oscuro y un diagrama de la rotación en sentido CCW; los flagelos se entrelazan en una trenza propulsiva que produce el nado. En *c* y *d* la rotación flagelar ocurre en sentido CW, la trenza se deshace y el cuerpo celular se mueve caóticamente. La flecha delgada señala la dirección de la propagación de la onda y la flecha gruesa, la dirección del movimiento del cuerpo celular (Jones y Aizawa, 1991).

B) El cambio en la dirección de la rotación flagelar (nado y reorientación), forman la base de la respuesta quimiotáctica mediante la que las células se dirigen hacia una sustancia química atrayente (tomado de Silva-Herzog y Dreyfus, 1995).

QUIMIOTAXIS

El descubrimiento del fenómeno de quimiotaxis se remonta a finales del siglo XIX, cuando Engelmann y Pfeffer descubrieron la taxis a oxígeno, minerales y nutrientes orgánicos. Demostraron microscópicamente que bacterias en suspensión se acumulaban cerca de una burbuja de aire, o de alguna sustancia química (Adler, 1966).

En la actualidad, se sabe el movimiento bacteriano no es azaroso, sino que responde a diversos estímulos ambientales como luz, oxígeno, pH, temperatura y presión, así como a la presencia de diferentes compuestos químicos. La respuesta a dichos estímulos se conoce con el nombre general de taxis, lo que constituye una ventaja adaptativa que permite a la bacteria migrar hacia ambientes más favorables (Armitage, 1992b). La **quimiotaxis** es entonces el proceso mediante el cual las células migran a través de gradientes de concentración de sustancias químicas atrayentes o repelentes.

En las bacterias entéricas, la respuesta táctica se basa fundamentalmente en el control de la dirección de la rotación flagelar. En presencia de un gradiente químico, se alteran las frecuencias de nado e intervalos de reorientación; si existe un estímulo positivo, existirá una rotación flagelar principalmente en sentido CCW, extendiéndose de esta manera los intervalos de nado, y por lo tanto siendo menos frecuentes los episodios de reorientación. En el caso de existir un repelente, habrá rotación principalmente en sentido CW (Eisenbach, 1990).

Las dimensiones de una bacteria son tan pequeñas, que no pueden sentir una diferencia de concentración a lo largo de su cuerpo celular, por lo que hacen uso de una comparación temporal, y no espacial, de los ambientes en los que se localizan (Macnab y Koshland, 1972). Es decir, integran la información temporalmente, comparando los estímulos sensoriales actuales y pasados.

El sistema de transducción en la quimiotaxis bacteriana, como el de muchos otros sistemas, se encarga de convertir un estímulo extracelular en una señal intracelular que producirá una respuesta (Stock y col., 1992; Parkinson, 1993). Los estímulos ambientales

son detectados por receptores transmembranales, que son homodímeros con un dominio sensorial extracelular, el cual se une a un dominio de señalización citoplásmico a través de dos regiones hidrofóbicas (Macnab, 1987b; Stock y col., 1992) ver figura 2.

En *E. coli* y *S. typhimurium* se han identificado cuatro receptores específicos que responden a diferentes estímulos; estos transductores se han denominado proteínas MCP (proteínas que aceptan grupos metilo), debido a que sufren procesos de metilación durante la transducción de la señal (Hazelbauer y col., 1993).

La señal que desencadena el proceso de transducción es la disminución en la ocupación del receptor (salida de quimioatrayente), información que se transmite hacia los componentes quimiotácticos del citoplasma. Existen 6 proteínas citoplásmicas denominadas Che (del inglés Chemotaxis): CheA, CheW, CheZ, CheR, CheB y CheY, encargadas de transducir la señal desde el receptor hasta el motor flagelar (Gudrun y Stock, 1993) figura 2. Las proteínas Che transducen la señal por medio de reacciones de metilación y fosforilación: CheA, CheW y CheZ funcionan regulando el nivel de fosforilación de **CheY**, quien se encarga de interactuar con el motor flagelar, modulando las frecuencias de nado y reorientación (Kuo y Koshland, Jr., 1987; Gudrun y Stock, 1993); mientras que CheR y CheB modulan el grado de metilación del receptor.

Al interactuar CheY-P con el motor flagelar, el flagelo gira en dirección CW, produciendo el nado azaroso y la reorientación de la célula. El motor flagelar gira en dirección CCW cuando CheY se encuentra desfosforilado, lo que produce el nado. Es decir, en este sistema, los atrayentes producen una señal negativa: el aumento en la concentración de atrayente disminuirá los niveles de CheY-P produciéndose el nado en una trayectoria determinada.

Las proteínas CheA y CheZ controlan el nivel de fosforilación de CheY. **CheA** es una proteína histidina cinasa capaz de autofosforilarse (Swanson y col., 1993) y es la encargada de fosforilar a CheY; **CheZ** funciona como fosfatasa desfosforilando a CheY (Huang y Stewart, 1993; Blat y Eisenbach, 1994).

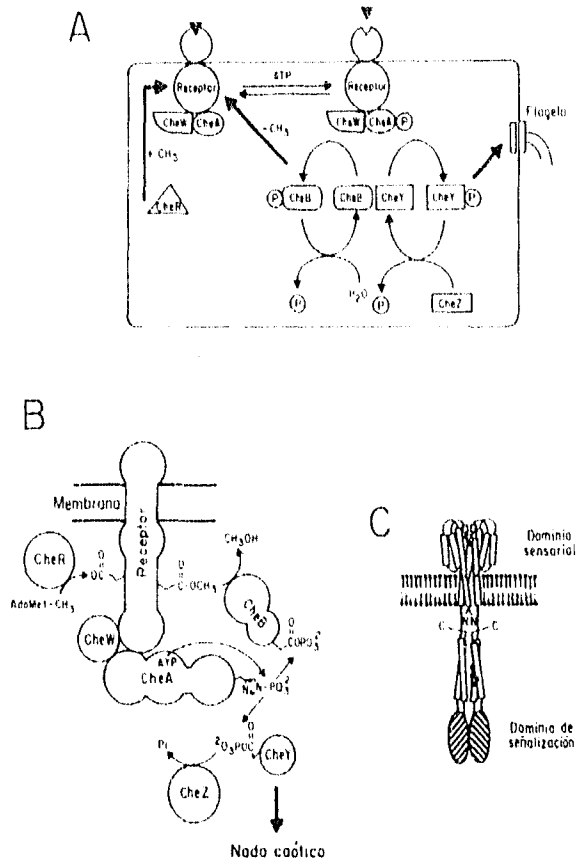


Figura 2

Cadena de transducción en la quimiotaxis de *E. coli*.
A y B) El estímulo extracelular se transduce hacia el flagelo a través de las proteínas citoplásmicas Che. La desocupación del receptor produce la fosforilación de CheY por CheA, lo que produce el nado caótico. CheR y CheB regulan los niveles de metilación del receptor (Alex y Simon, 1994).
C) Modelo estructural de un quimio-receptor. Los receptores (MCP's) son homodímeros que atraviesan la membrana plasmática (tomado de Stock y col., 1992).

Como se ha planteado, el mecanismo de transducción quimiotáctico involucra dos componentes principales, la proteína histidina autocinasa (CheA) y la proteína reguladora fosfoactivable (CheY). Este mecanismo se denomina sistema de señalización de dos componentes y es muy común en una gran variedad de procesos metabólicos bacterianos (Hazelbauer y col., 1993).

Por último, las proteínas **CheR** y **CheB** se encargan de regular los niveles de metilación del receptor: CheR es una metiltransferasa que metila al receptor cuando existe atrayente, y CheB actúa como metil-esterasa al ser fosforilada por CheA (Kleene y col., 1979). El nivel de metilación del receptor se encuentra directamente relacionado con el proceso de adaptación, en el que después de un tiempo en un ambiente estable, las células regresan a los patrones de nado no estimulado (Gudrum y Stock, 1993).

ESTRUCTURA Y FUNCION FLAGELAR

Morfológicamente, el flagelo bacteriano consiste de tres estructuras principales que se pueden distinguir al microscopio electrónico (figura 3a): el filamento extracelular encargado de la propulsión, un acoplador flexible denominado gancho y el cuerpo basal en la superficie celular, en el que se encuentra el motor rotatorio del flagelo (Macnab y Aizawa, 1984).

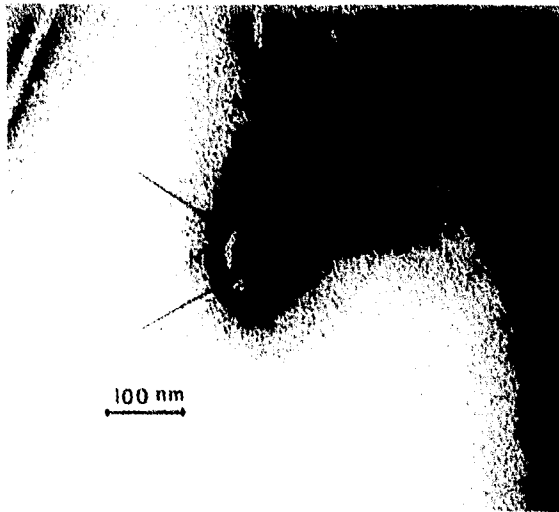
La estructura general del flagelo se representa en la figura 3b.

Filamento

El filamento de localización extracelular constituye el componente propulsor del flagelo, que genera el trabajo hidrodinámico en el medio. Esta estructura que varía entre 5 y 10 μ de longitud y 20 nm de diámetro, es un homopolímero constituido por miles de subunidades de flagelina (Jones y Aizawa, 1991).

El filamento es una estructura rígida y helicoidal, es decir, las subunidades de flagelina se organizan de manera no equivalente

a



b

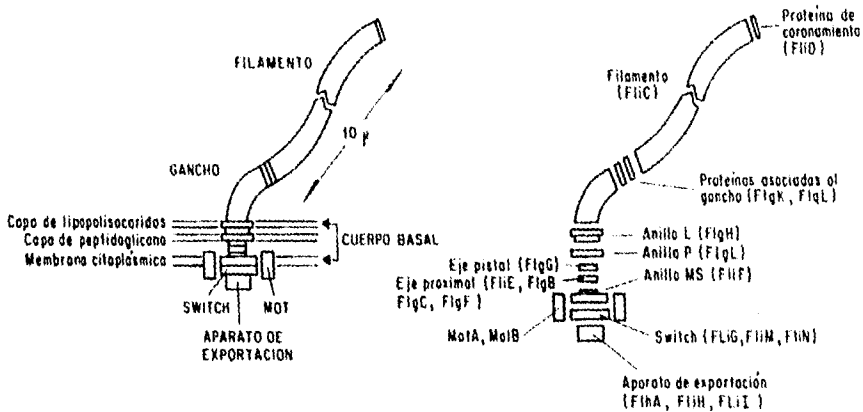


Figura 3

a) Fotografía al microscopio electrónico de un flagelo completo de *S. typhimurium*. El filamento (F) se encuentra conectado al cuerpo basal (B), a través del gancho (H) (tomado de Macnab y Aizawa, 1984).

b) Representación esquemática del flagelo de *E. coli* y *S. typhimurium*. Se señalan las proteínas que conforman al complejo filamento-gancho-cuerpo basal, así como los componentes del motor, interruptor (switch) y aparato de exportación (Macnab, 1992).

formando una hélice izquierda, lo que permite que la fuerza rotacional o torque, se convierta en una fuerza de translación que produce un "empuje mecánico" (Macnab, 1995a).

Los monómeros de flagelina se encuentran dispuestos en una simetría pseudo-hexagonal, existiendo 5.5 subunidades por vuelta de la hélice (Kondoh y Yanagida, 1975). La flagelina confiere también la antigenicidad de la bacteria.

El análisis de secuencia de esta proteína en diferentes especies muestra que existen zonas de alta similitud en los extremos amino y carboxilo terminales, y una región variable en la parte central. Se ha demostrado que los extremos conservados se requieren para la exportación y ensamblaje de los monómeros, mientras que la región central es la parte que confiere antigenicidad (Kuwajima y col., 1989).

Por otro lado, estudios de difracción de rayos-X y reconstrucción de imágenes indican que los extremos terminales se localizan en la parte central del filamento formando las paredes de un canal central a la estructura, y la parte central de la secuencia de aminoácidos se encuentra localizada hacia el exterior; lo cual concuerda con las funciones previamente mencionadas (Namba y col., 1989; Trachtenberg y DeRosier, 1987).

Gancho

El filamento se conecta a la célula a través de una estructura curvada denominada gancho, que funciona como un acoplador flexible entre el filamento y el motor celular.

El gancho es estructuralmente similar al filamento, siendo un homopolímero de entre 120-130 copias de la proteína FlgE (Jones y col., 1990). La secuencia de aminoácidos de FlgE muestra regiones de alta similitud con la flagelina, en los extremos amino y carboxilo terminales.

En contraste con el filamento, el gancho presenta un tamaño bien determinado de 55 nm \pm 6 nm (Hirano y col., 1994).

Tridimensionalmente, las subunidades de FlgE se ordenan también con simetría pseudo-hexagonal, pero en este caso formando

una hélice con giro hacia la derecha (Wageneknecht y Deiosier, 1981).

En el centro del gancho existe un canal de aproximadamente 2.5 nm de diámetro (Morgan y col., 1993), que se propone forma parte de la vía de exportación flagelo-específica.

Existen 3 proteínas adicionales asociadas al gancho. Entre el gancho y el filamento se encuentran dos proteínas accesorias de unión denominadas **HAP** (hook associated proteins): HAP1 y HAP3 (Homma y Iino, 1985; Ikeda y col., 1987). Dada la similitud estructural del gancho y el filamento en cuanto a la forma y disposición de las subunidades, resulta poco claro el porque estas proteínas representan un requerimiento estructural para la unión de dichos componentes; aparentemente se requieren para que se lleve a cabo un correcto ensamblaje del filamento. De hecho, recientemente se han estudiado mutantes en la proteína HAP3 (FlgL) en las que se afecta la resistencia del filamento a estrés mecánico, por lo que aparentemente HAP1 y HAP3 constituyen una base rígida para el filamento, permitiendo también que existe un movimiento relativo de las subunidades del gancho que es una estructura flexible (Fahrner y col., 1994).

Existe también una gran similitud en los extremos terminales de estas proteínas con la flagelina y con el monómero del gancho.

La proteína HAP2 se localiza en la parte distal del flagelo, y funciona como una tapa del filamento denominada proteína de coronamiento (Homma y col., 1990a). HAP2 se requiere para el correcto ensamblaje de los monómeros de flagelina, que en ausencia de esta proteína se exportan al medio sin poder ensamblarse.

Cuerpo Basal

El gancho se conecta a la célula a través de un complejo embebido en la superficie celular que se denomina cuerpo basal.

El cuerpo basal consiste de un eje central, montado sobre una estructura en forma de anillo (anillo MS), y rodeado de un par de anillos (L y P) localizados en la membrana externa (capa de lipopolisacáridos y capa de peptidoglicano respectivamente) como se

muestra en la figura 3b (Dopamphilis y Adler, 1971; Khan, 1993).

El anillo MS se encuentra localizado en la membrana citoplásmica, y funciona como una base que transmite la fuerza de rotación generada en el motor a través del cuerpo basal, hacia el filamento (Francis y col., 1992). Se ha propuesto que el anillo MS es el rotor del motor flagelar, donde se genera el torque.

Los anillos externos L y P forman un cilindro que genera un espacio que permite a la estructura del eje rotar libremente y penetrar la pared celular (Berg, 1974); esto se apoya en el hecho de que las bacterias gram positivas no contienen dichos anillos.

El eje atraviesa los anillos, y se encuentra constituido por 5 proteínas: FlgB, FlgC, FlgF FlgG y FliE (Homma y col., 1990b; Muller y col., 1992). Existe evidencia de que el eje rota durante el movimiento del flagelo; y ya que éste interactúa con el anillo MS, se ha inferido que este último también gira. Como se ha observado con las proteínas axiales del flagelo descritas anteriormente (filamento, gancho y HAP's), la secuencia de aminoácidos del eje tiene similitud con éstas en los extremos terminales. Esta semejanza sugiere un arreglo tridimensional similar para todas las proteínas axiales.

El flagelo bacteriano incluye también otros componentes importantes tanto citoplásmicos como membranales:

Motor Flagelar

En el motor del flagelo se lleva a cabo el acoplamiento entre el gradiente electroquímico de protones y la rotación (Larsen y col., 1974).

Para determinar cuales eran las proteínas del motor, se generaron mutantes que pudieran ensamblar el flagelo, pero que fueran incapaces de rotar. Con este fenotipo denominado Mot⁻, se identificaron los genes *motA* y *motB* (Armstrong y Adler, 1967; Silverman y Simon, 1976). La proteína MotB presenta un cruce transmembranal y se encuentra localizada en el espacio periplásmico (Chun y Parkinson, 1988). Se ha considerado la función de esta proteína como la del estator en un motor, es decir, una proteína de anclaje que conecta la estructura que genera la fuerza de rotación,

a una estructura rígida como la pared celular.

MotA es una proteína membranal con 4 cruces transmembranales (Dean y col, 1984), que forman un conjunto de α -hélices a través del que se conducen protones (Blair y Berg, 1990), por lo que se le ha propuesto como el canal de protones del motor.

Existen diferentes modelos para explicar el mecanismo de acción del motor flagelar, el cómo se acopla la conducción de protones con la producción de fuerza rotacional o torque. Entre otros, se propone que el rotor (anillo MS) presenta cargas positivas y negativas alrededor de su estructura cilíndrica, generando zonas de bajo y alto potencial eléctrico. Como se mencionó, MotA y MotB son los elementos de conducción de protones y estator. Por tanto, los protones atraviesan dicho canal (MotA), ejerciendo una fuerza electrostática en las cargas del rotor, lo que produce la rotación (Berry, 1993).

Complejo del Interruptor (Switch)

El complejo del switch se encuentra formado por tres proteínas FliG, FliM y FliN de localización citoplásmica. Recientemente se ha demostrado que dicho complejo se localiza específicamente en una estructura citoplásmica anclada al cuerpo basal denominada anillo C (Driks y Derosier, 1990).

Mutaciones en los genes que codifican para estas proteínas generan diferentes fenotipos: paralizado (Mot⁻), no flagelados (Fla⁻), y defectuosos en el proceso quimiotáctico (Che⁻). Por lo tanto, se requieren tanto en el ensamblaje flagelar, como en la rotación del motor, y de manera importante, es el complejo responsable del cambio de dirección en la rotación del flagelo (CW/CCW) (Macnab, 1995b). Como se mencionó anteriormente, el nivel de fosforilación de CheY determina la dirección de giro del flagelo, y es el complejo del switch con quien interactúa directamente CheY (Barak y Eisenbach, 1992).

Recientemente se ha tratado de asignarles funciones individuales a cada proteína. Con análisis de mutaciones supresoras se ha visto que FliM da lugar a mutaciones Che⁻, lo que indica que su papel principal es el de regular la dirección de la rotación

flagelar (Sockett y col., 1992). Por su parte, *Flig* y *Flin* contribuyen de manera importante en la generación del torque (Irikura y col., 1993).

Por otro lado, se han aislado mutantes en las que *flig* se encuentra fusionado en fase a *flif* (anillo MS), lo que indica que se localiza en el lado citoplásmico asociada con el anillo MS (Francis y col., 1992).

Aparato de Exportación

Las proteínas axiales del flagelo no se exportan a través de la vía común Sec, que constituye el mecanismo principal de exportación de proteínas bacterianas que presentan una secuencia señal líder. De las proteínas flagelares, sólo los anillos L y P contienen una secuencia señal líder en el extremo amino terminal (Homma y col., 1990b), por lo que se ha propuesto la existencia de una vía de exportación flagelo-específica. Además se ha demostrado que el filamento se forma por la adición distal de subunidades de flagelina, sin que éstas sean secretadas al medio (Iino, 1969).

Debido a esto, se propone la existencia de un canal central en el flagelo, a través del cual se exportan las proteínas flagelares, y que ha sido observado en reconstrucción de imágenes tanto en el gancho como en el filamento (Namba y col., 1989; Morgan y col., 1993; Morgan y col., 1995). El tamaño del canal es lo suficientemente grande para permitir el paso de subunidades, pero en estado desnaturalizado (Morgan y col., 1995).

Considerando esta vía de exportación flagelo-específica, se ha propuesto también la existencia de un aparato de exportación capaz de reconocer las proteínas flagelares a ser exportadas, para lo cual debe existir en dichas proteínas una señal de reconocimiento que confiera especificidad.

Como se mencionó anteriormente, existen secuencias conservadas en el extremo N-terminal de todas las proteínas axiales, como son los motivos SGL y AANLAN, así como la presencia de héptadas repetidas en las que existe un aminoácido hidrofóbico cada 7 residuos (Homma y col., 1990a). Sin embargo, se ha visto que dichas secuencias son importantes en el ensamblaje mas no en el

reconocimiento específico (Kornacker y Newton, 1994).

Para identificar las proteínas directamente involucradas en el proceso de exportación, se realizaron estudios con mutantes temperatura-sensibles, identificándose 3 componentes: FlhA, FliH y FliI (Vogler y col., 1991).

FliI es una proteína homóloga a la subunidad catalítica de la ATP sintetasa (subunidad β), y se ha demostrado que une ATP (Dreyfus y col., 1993); por lo que se le ha propuesto como el componente que hidroliza ATP dentro del aparato translocador. A su vez, tanto FliI como FlhA muestran alta similitud con proteínas involucradas en la exportación de factores de virulencia a través de un sistema diferente al Sec. Debido a esto se ha propuesto la existencia de una superfamilia de sistemas de exportación Sec-independientes (Dreyfus y col., 1993).

BIOGENESIS FLAGELAR

El camino morfogénico en la síntesis del flagelo ha sido dilucidado a través de diferentes métodos, como el análisis al microscopio electrónico de las subestructuras que se presentan al mutar diferentes genes flagelares. A partir de dichas mutantes flagelares se han obtenido varias estructuras precursoras que se analizan estructuralmente al microscopio y bioquímicamente con patrones de electroforesis (Kubori y col., 1992). A partir de estos datos se obtuvo la vía morfológica de ensamblaje flagelar que se muestra en la figura 4.

La estructura estable más temprana es el anillo MS que se puede ensamblar en ausencia de cualquier otra proteína flagelar. La siguiente estructura en formarse es el eje, que es el primer componente externo a la membrana citoplásmica. Sin embargo, existen muchos genes que deben expresarse antes de que el eje se complete.

Las proteínas del switch interactúan directamente con el anillo MS, y se ensamblan antes que el eje (Kubori y col., 1992). A su vez, se requiere la previa formación de las proteínas que han sido involucradas como parte del aparato de exportación específico

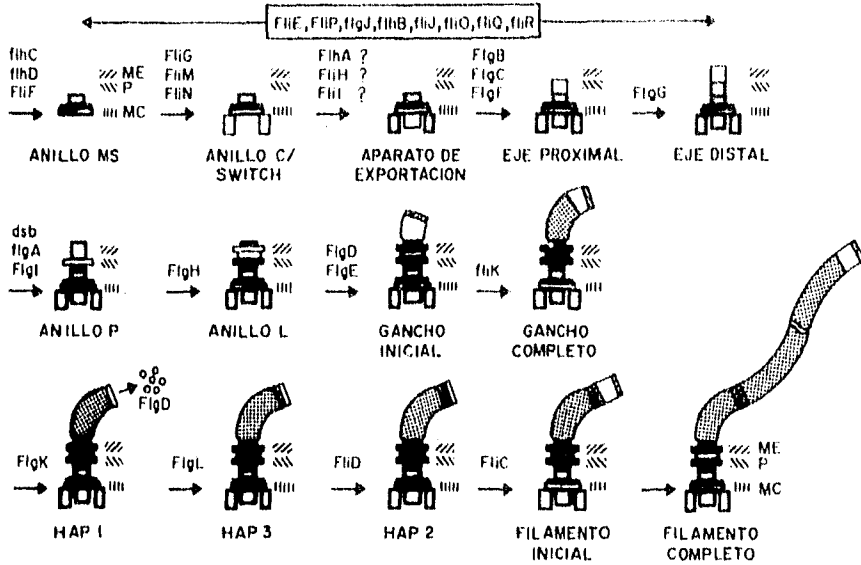


Figura 4 Vía morfogénica de ensamblaje flagelar, en la que se muestran los genes que se requieren en las diferentes etapas de la biogénesis. ME, membrana externa; P, espacio periplásmico y capa de peptidoglicano; MC, membrana citoplásmica (tomada de Macnab, 1995a).

de flagelo: FlhA, FliH y FliI; así como FlhB, FlhP, FliQ y FliR, que también presentan similitud con proteínas involucradas en la exportación de factores de virulencia.

Posteriormente se ensamblan los anillos L y P, que a diferencia de todas las demás proteínas flagelares, se sintetizan con una secuencia señal en el extremo amino terminal, por lo que se exportan a través del sistema general de exportación: Sec.

A continuación se ensambla el gancho, cuya formación requiere de la proteína FlgD. FlgD no se encuentra presente en la estructura flagelar final, es sólo una proteína transiente que se incorpora en el extremo distal del eje, acompaña el ensamblaje del gancho y es finalmente reemplazada por la proteína HAP1 (Ohnishi y col., 1994). Cabe mencionar que en este punto de la biogénesis interviene la proteína FliK encargada de regular la longitud del gancho (Silverman y Simon, 1972).

Por último, se exportan las proteínas tardías HAP3 y HAP2 permitiendo de esta manera el ensamblaje final de la flagelina.

En resumen, el proceso de ensamblaje flagelar procede en una secuencia lineal del extremo proximal al distal, con la adición de monómeros y no de estructuras preformadas. Esta secuencia de formación requiere siempre la presencia de la estructura previa (Shapiro, 1995).

ORGANIZACION GENETICA FLAGELAR

Debido a la complejidad estructural y funcional del flagelo, existen más de 40 genes involucrados en los diferentes procesos de regulación, biosíntesis, ensamblaje y rotación flagelar. Los genes flagelares se encuentran localizados en cuatro regiones en el cromosoma de *E. coli*, y una región adicional en *S. typhimurium* necesaria para la expresión alterna de diferentes genes de flagelina (figura 5a).

Existe una diferente nomenclatura para los genes dependiendo de la región en la que se encuentren: *flg* para la región I, *flh* para la región II y *fli* para las regiones IIIa y IIIb; en

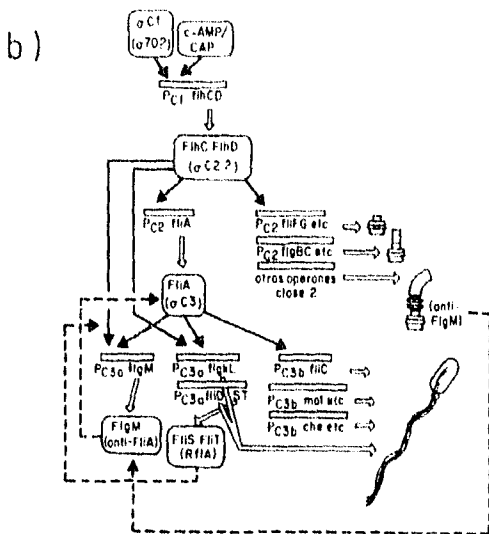
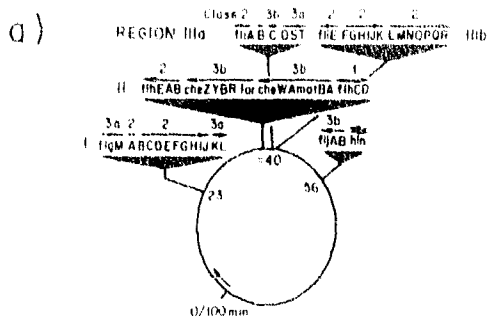


Figura 5

a) Organización cromosomal de los genes flagelares en *S. typhimurium*. En *E. coli* se presenta la misma organización excepto por la ausencia de la región *flj*. Los operones flagelares se encuentran distribuidos en cuatro regiones principales: I (genes *flg*), II (genes *flh*) y regiones IIIa y IIIb (genes *fli*).

b) Regulación del sistema genético flagelar que muestra la jerarquía de expresión de los operones flagelares. La cascada de regulación positiva se señala con flechas sólidas y los mecanismos negativos de regulación con flechas punteadas (Macnab, 1992).

S. typhimurium existe la región adicional con genes denominados *flj* (para una revisión ver Macnab, 1992).

La región I contiene principalmente genes que codifican para proteínas estructurales del gancho y cuerpo basal, así como algunos genes involucrados en la regulación de la expresión y ensamblaje de las estructuras proximales.

En la región II se localizan genes involucrados en la generación de movimiento, como los genes de las proteínas del motor, de la cadena de transducción quimiotáctica y de quimio-receptores. Existen también genes involucrados en la regulación de la expresión génica como el operón maestro *flhC* y *flhD*.

La región III se encuentra dividida en IIIa y IIIb, por una larga zona que no codifica para proteínas flagelares (Kawagishi y col., 1992). En la región IIIa se localizan proteínas involucradas en los procesos tardíos de síntesis flagelar, como el gen de la flagelina *fliC*; así como el gen *fliA* que codifica para un factor sigma que se requiere para la expresión de los genes tardíos. Los genes de la región IIIb se requieren en los estadios tempranos de ensamblaje flagelar, incluyendo los genes necesarios para la exportación de las proteínas flagelares (Macnab, 1992).

En la tabla I se enlistan por regiones todos los genes flagelares que han sido identificados y su función.

REGULACION GENETICA: Regulón

La biosíntesis del flagelo es un proceso energéticamente muy costoso para la célula, por lo que existe un estricto control de la expresión, principalmente a nivel transcripcional.

Los genes involucrados en el sistema flagelar se encuentran organizados en operones que forman un sistema coordinado de expresión o regulón (Kutsukake y col., 1990).

La jerarquía de expresión se representa en 3 clases que no necesariamente guardan relación con las regiones del cromosoma antes mencionadas (figura 5b).

Tabla I

Genes y productos génicos involucrados en la flagelación, movilidad y quimiotaxis de *E. coli* (tomada de Williams, A. W., 1995).

Gen Función o estructura que forma el producto génico

Región I

<i>flgN</i>	Desconocida
<i>flgM</i>	Factor antisigma
<i>flgA</i>	Ensamblaje de anillo P
<i>flgB</i>	Cuerpo Basal (Eje)
<i>flgC</i>	Cuerpo Basal (Eje)
<i>flgD</i>	Proteína transiente de coronamiento del gancho
<i>flgE</i>	Gancho
<i>flgF</i>	Cuerpo Basal (Eje)
<i>flgG</i>	Cuerpo Basal (Eje)
<i>flgH</i>	Cuerpo Basal (Anillo L)
<i>flgI</i>	Cuerpo Basal (Anillo P)
<i>flgJ</i>	Desconocida
<i>flgK</i>	Proteína HAP 1
<i>flgL</i>	Proteína HAP 3

Región II

<i>flhE</i>	Desconocida
<i>flhA</i>	Aparato de Exportación
<i>flhB</i>	Aparato de Exportación
<i>cheZ</i>	Fosfatasa de CheY
<i>cheY</i>	Proteína que regula el cambio de dirección al interactuar con el switch
<i>cheB</i>	Metilesterasa
<i>cheR</i>	Metiltransferasa
<i>tap</i>	Quimiorreceptor para dipéptidos
<i>tar</i>	Quimiorreceptor de aspartato
<i>cheW</i>	Regulador positivo de la fosforilación de CheA
<i>cheA</i>	Fosforila a CheY y CheB
<i>motB</i>	Rotación del motor
<i>motA</i>	Rotación del motor
<i>flhC</i>	Regulación positiva de la expresión génica
<i>flhD</i>	Regulación positiva de la expresión génica

Región IIIa

<i>fliA</i>	Factor sigma (σ^{54}) para la expresión de genes tardíos
<i>fliB</i>	N-metilación de flagelina
<i>fliC</i>	Flagelina
<i>fliD</i>	Proteína de coronamiento del filamento
<i>fliS</i>	Elongación del filamento

fliT Desconocida

Región IIb

fliE Cuerpo Basal
fliF Cuerpo Basal (Anillo MS)
fliG Switch
fliH Aparato de Exportación
fliI Aparato de Exportación
fliJ Desconocida
fliK Control del tamaño del gancho
fliL Desconocida
fliM Switch
fliN Switch
fliO Desconocida
fliP Aparato de exportación
fliQ Aparato de exportación
fliR Aparato de exportación

Clase 1. Contiene únicamente al operón maestro que es el responsable de la expresión de todos los genes flagelares, siendo regulado por represión catabólica a través del sistema AMPc/CAP (Silverman y Simon, 1974b; Komeda y col., 1975). Es decir, si los niveles de glucosa son altos, lo que indicaría un ambiente nutritivo, disminuyen los niveles de AMPc y no se expresa el operón maestro. Por tanto, la biosíntesis flagelar no se realiza cuando no se requiere la movilidad.

Clase 2. La transcripción de los genes de la clase dos se encuentra directamente regulada por el operón maestro, que posiblemente actúe como un factor sigma (Helmann y col., 1988). Los operones de esta clase presentan una secuencia promotora consenso flagelo-específica en la región -10 (Kutsukake y col., 1990). En esta clase se localiza la proteína FliA, que es un factor sigma específico para la transcripción de los genes tardíos.

Clase 3. Los operones de la clase 3 que contienen genes tardíos, regulan su expresión a través de FliA (σ^{54}). Algunos genes de esta última clase requieren de FliA totalmente para expresarse, y en otros, se observan bajos niveles de expresión en ausencia de FliA, por lo que dicha clase se ha subdividido en 3a y 3b (Macnab, 1992) ver figura 5b. La expresión FliA-independiente de la clase 3a, se encuentra regulada por el operón maestro.

FliA/FlgM

La expresión de los genes flagelares se encuentra coordinada con el ensamblaje del flagelo a través del sistema FliA/FlgM (Kutsukake y Iino, 1994) (ver figura 5b).

Como se mencionó anteriormente, la expresión de los genes de los operones tardíos de la clase 3, se encuentra regulada por el factor sigma FliA. Sin embargo, la célula controla la actividad de FliA hasta que ha terminado por completo la biogénesis del gancho, acoplado de esta manera el proceso de biosíntesis con el de regulación de la expresión génica (Kutsukake y col., 1994; Shapiro, 1995).

FlgM es un factor anti-sigma que se une a FliA disminuyendo la afinidad de este factor sigma por la RNA polimerasa. La acción de

FlgM esta a su vez regulada por el grado de ensamblaje flagelar.

Se desconoce el mecanismo mediante el cual la célula es capaz de monitorear que la síntesis de la estructura del gancho ha finalizado, sin embargo, cualquier mutación que impida la formación del gancho, resulta en la no expresión de los genes tardíos dependientes de FliA.

Recientemente se ha demostrado que FliA se activa cuando la concentración de FlgM se ve disminuida, y que esto se logra exportando a la proteína FlgM fuera de la célula, probablemente a través del canal central de la vía de exportación flagelo-específica (Hughes y col., 1993; Losick y Shapiro, 1993; Kutsukake, 1994).

Dado que existen aproximadamente 20,000 monómeros de flagelina por cada flagelo, el principal costo energético en la biosíntesis flagelar lo constituye la síntesis del filamento. Por lo tanto, el sistema de regulación descrito anteriormente se encuentra diseñado para evitar dicho gasto cuando exista alguna mutación que no permita que los monómeros se puedan ensamblar.

Al crecer el filamento, la tasa de exportación de proteínas disminuye, por lo que el nivel intracelular de FlgM aumenta; lo que produce que finalice la síntesis de monómeros de flagelina.

Existe otro tipo de regulación descrito por Kutsukake y col., en 1990, en el que mutaciones en el operón *fliDST* incrementan los niveles de expresión de los genes tardíos. Esto puede constituir otro mecanismo de regulación negativa de la expresión de los genes de la clase 3 (Kawagishi y col., 1992).

FliK y FliH: Control del Tamaño del Gancho

El control del tamaño de las estructuras del flagelo se puede dividir en tres categorías (Macnab, 1987a). La primera esta ejemplificada por los anillos, cuya estructura oligomérica se cierra sobre sí misma por lo que el tamaño se encuentra auto-determinado. En la segunda se encuentra el filamento, cuyo tamaño no se encuentra regulado, la velocidad de elongación disminuye

exponencialmente con la longitud del mismo (Iino, 1969); y depende principalmente de las tasas de síntesis de flagelina y rompimiento flagelar. Por lo tanto, se considera el tamaño del filamento como una propiedad estadística. En la tercer categoría ejemplificada por el gancho y probablemente el eje, el tamaño se encuentra bien definido. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual se determina el tamaño de estas estructuras flagelares, es aun desconocido.

Diferentes tipos de mutaciones en el gen *flgE* que codifica para la proteína del gancho, generan ganchos de tamaño normal, lo que indica que el mecanismo de regulación del tamaño no es intrínseco a la estructura. Por otro lado, la proteína monomérica del gancho puede polimerizar *in vitro* hasta una longitud indefinida (Kato y col., 1984).

El gen *fliK* ha sido identificado como el responsable de la regulación del tamaño del gancho (Silverman y Simon, 1972; Patterson-Delafield, 1973). La proteína FliK no ha sido detectada en la estructura flagelar final, sin embargo, mutaciones en dicho gen producen ganchos de tamaños anormales llamados **poliganchos**. El poligancho es un polímero de ganchos, que es incapaz de ensamblar filamento por lo que las mutantes poligancho son no móviles.

La organización de las subunidades de gancho en los poliganchos es idéntica a la de los ganchos silvestres, de hecho, los poliganchos han sido utilizados para la caracterización bioquímica de la proteína FlgE (Kagawa y col., 1976).

Como se mencionó anteriormente, la proteína FlgD acompaña la biosíntesis del gancho permitiendo el ensamblaje de las subunidades, y permanece unida a la estructura hasta que ésta alcanza su tamaño normal, momento en el que es desplazada por FlgK (HAP1) (Ohnishi y col., 1994). En las mutantes poligancho, la proteína FlgD permanece unida, no se realiza el reemplazo de FlgD por FlgK.

Se han aislado mutaciones supresoras intra e intergénicas que generan un fenotipo pseudo-revertante: "poligancho-filamento", en las que permanece el defecto en cuanto a la regulación del tamaño del gancho, pero que son ahora capaces de ensamblar filamento (Suzuky y Iino, 1981).

Las supresoras intragénicas en *fliK* indican que el proceso de control del tamaño involucra tanto la terminación de la elongación del gancho, como el inicio de la exportación o ensamblaje de flagelina, y que FliK pudiera estar cumpliendo ambas funciones.

Las supresoras intergénicas mapean en el gen *flhB* (Kutsukake y col., 1994; Hirano y col., 1994), presentan el fenotipo poligancho-filamento, por lo que FlhB puede tener un papel en el inicio de la formación de filamento. Esto indica que pueden existir otros productos génicos que se encuentren involucrados en el proceso de regulación de la longitud del gancho.

FlhB es una proteína membranal con 4 cruces transmembranales después del extremo N-terminal, y con el extremo carboxilo localizado en el citoplasma (Minamino y col., 1994). Se sabe que esta proteína se encuentra involucrada en los procesos tempranos de ensamblaje del cuerpo basal (Kubori y col., 1992), sin embargo, ya que restablece una de las funciones de FliK, pudiera estar también involucrada en el proceso de control del tamaño del gancho.

Existe evidencia de que cuando menos la exportación de una proteína flagelar: FlgM (factor antisigma), se inicia sólo después de que la estructura del gancho se encuentra completa. En las mutantes poligancho no se detecta exportación de FlgM, es decir, ésta sólo ocurre cuando se forma el gancho de manera correcta. Lo que no se conoce, es el cómo la célula es capaz de monitorear el ensamblaje correcto del gancho.

Por último, en un estudio reciente se encontró que la doble mutante *flhb flgK* (HAP1) produce un fenotipo poligancho. Esto sugiere que el mecanismo puede ser más complejo e involucrar un mayor número de productos génicos (Hirano y col., 1994).

En conclusión, el control de la longitud del gancho sigue siendo uno de los aspectos menos entendidos del proceso de biogénesis flagelar.

EL FLAGELO DE *Rhodobacter sphaeroides*

R. sphaeroides es una bacteria fotosintética perteneciente a la familia Rhodospirillaceae que tiene la capacidad de crecer en condiciones de anaerobiosis y luz fotoheterotróficamente utilizando diversos sustratos orgánicos, o bien en condiciones microaerofílicas o aeróbicas en la oscuridad como quimioheterótrofo. En esta familia se agrupan numerosas especies fotosintéticas como *Rhodospirillum rubrum* y *Rhodobacter capsulata* que son incapaces de utilizar el azufre elemental como donador de electrones por lo que se agrupan dentro de las bacterias denominadas púrpuras no sulfurosas (Pfennig y Truper, 1989).

Como se mencionó anteriormente, existen numerosos estudios sobre la estructura y funcionamiento del flagelo de bacterias como *E. coli* y *S. typhimurium*, sin embargo existen escasos reportes sobre especies fotosintéticas a pesar de la alta representatividad de los procariontes fotosintéticos flagelados en la naturaleza. Prácticamente todas las bacterias fototróficas púrpuras no sulfurosas presentan flagelo (Armitage, 1992a).

R. sphaeroides contiene un sólo flagelo localizado en la porción media del cuerpo celular (figura 6), y que rota únicamente en el sentido de las manecillas del reloj (CW). Es decir, a diferencia de las bacterias entéricas, presenta un sólo flagelo de rotación unidireccional y que sin embargo impulsa al organismo a grandes velocidades de hasta $100 \mu\text{m s}^{-1}$, lo equivalente a 50 cuerpos celulares por segundo (Armitage y Macnab, 1987); comparado con una velocidad de $25 \mu\text{m s}^{-1}$ en las entéricas (Macnab, 1995a).

Estructuralmente, el flagelo de *R. sphaeroides* presenta los mismos componentes antes descritos para las enterobacterias, sin embargo en esta especie el gancho es recto, lo cual se ha asociado con el hecho de ser una bacteria uniflagelada, que no requiere la formación de una trenza. Aparentemente el cuerpo basal se encuentra constituido por el mismo número de anillos, sin embargo esto no está bien caracterizado (Sockett y Armitage, 1991). A su vez, no se han identificado en esta bacteria los componentes del switch, siendo probable que existan productos génicos únicos que se

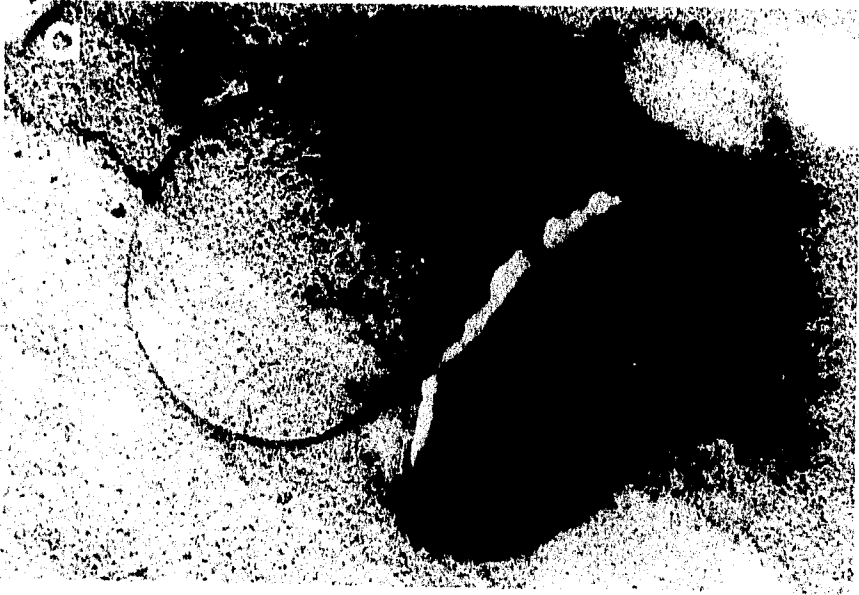


Figura 6 Fotografía al microscopio electrónico de *R. sphaeroides*, que muestra un único flagelo localizado en la porción media del cuerpo celular. La barra corresponde a 1 μm (tomado de Armitage y Macnab, 1987).

requieran para la rotación unidireccional del flagelo en este organismo fotosintético.

El movimiento de esta especie bacteriana se realiza a través de una serie de "nados y paros", cambiando de dirección por reorientación de la célula a través de movimiento Browniano que se produce cuando el flagelo deja de rotar. Es decir, el cambio de dirección no es causado por una contrarotación del flagelo como en la mayoría de las bacterias hasta ahora estudiadas (Armitage, 1988; Packer y Armitage, 1993). Durante los periodos de "paro", la estructura del filamento cambia significativamente de ser una hélice propulsiva funcional, a una forma de amplitud larga que se encuentra retraída hacia el cuerpo celular (figura 7).

Este comportamiento de "nado-paro-nado" se encuentra modulado en respuesta a estímulos tácticos como son cambios en la intensidad luminosa, tensión de oxígeno o concentraciones de determinadas sustancias.

En el caso de *R. sphaeroides*, la presencia de un quimioefector no produce un cambio en la dirección de la rotación flagelar, sino que se alteran las frecuencias de paro y nado. Los principales atrayentes incluyen ácidos orgánicos débiles como acetato, propionato, butirato y piruvato; bases débiles; iones como el potasio (Poole y col., 1990) y la luz (Armitage, 1988). No se han encontrado repelentes, ni se conoce con detalle el mecanismo que sensa los estímulos, ni el cómo se lleva a cabo la integración de la señal en el motor flagelar (Armitage, 1992a).

Estudios realizados por el grupo de Sockett y col., en 1987 demostraron la ausencia de quimio-receptores o proteínas MCP en esta bacteria; por lo que se propuso y demostró posteriormente que la respuesta quimiotáctica en estos organismos requiere el transporte y metabolismo limitado del quimioefector (Colin y Armitage, 1987; Poole y col., 1993). Sin embargo, recientemente se identificó un quimio-receptor en *R. sphaeroides* (Ward y col., 1995a); así como algunos de los componentes del sistema de transducción sensorial, como son proteínas homólogas a CheA, CheY, CheW y CheR (Ward y col., 1995b). De esta manera, *R. sphaeroides* presenta un sistema de transducción homólogo al de bacterias

a



b

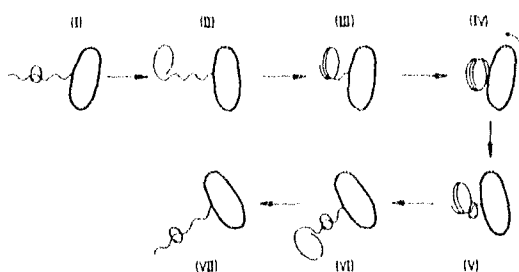


Figura 7

Comportamiento "nado-paro-nado" en *R. sphaeroides*.

a) Secuencia de imágenes de microscopía de campo oscuro de alta intensidad, en las que se muestra el cambio en la estructura del filamento, que se retrae hacia el cuerpo celular durante los periodos de "paro". La barra corresponde a 5 μm . Las imágenes corresponden a un tiempo total de 3 segundos (tomada de Armitage y Macnab, 1987)

b) Representación esquemática del comportamiento de nado en *R. sphaeroides*. Al retraerse el filamento hacia el cuerpo celular, la bacteria se reorienta y comienza el nado en una nueva dirección (Armitage y Macnab, 1987).

entéricas, pero con características particulares que han sido poco estudiadas.

En *R. sphaeroides* se presenta otro fenómeno denominado quimiocinesis en el que se observa un aumento en la velocidad de rotación del motor en respuesta a algún quimioefector, que requiere únicamente ser transportado y no metabolizado (Harrison y col., 1994; Brown y col., 1993). La quimiocinesis es un incremento en la velocidad de nado, sin cambio alguno en el gradiente electroquímico de protones (Packer y Armitage, 1994); en este sentido, es una respuesta diferente a la quimiotáctica, aunque algunos compuestos puedan inducir ambas.

En conclusión, el estudio del flagelo en *R. sphaeroides*, en comparación con las enterobacterias, se encuentra en sus fases iniciales, pero no necesariamente los modelos más estudiados y mejor caracterizados son los más representativos.

OBJETIVOS

El objetivo general del proyecto de investigación que se lleva a cabo en el laboratorio, se refiere al estudio del flagelo de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*. El interés particular se centra en los aspectos de la organización cromosomal de los genes flagelares de este organismo, así como el mecanismo de biogénesis y ensamblaje flagelar.

Debido a la incapacidad de poder aislar estructuras flagelares con la posibilidad de rastrear alguna actividad biológica, la generación y aislamiento de mutantes defectuosas en genes flagelares resulta indispensable. Es decir, la caracterización del fenotipo resultante de una mutación génica nos acerca al conocimiento de la estructura y función flagelar.

Por lo anterior, se plantearon para la elaboración del presente trabajo los siguientes objetivos particulares:

Aislamiento y selección de una mutante Fla⁻ a través de mutagénesis por transposición.

Caracterización morfológica y bioquímica de la mutante.

Identificación del gen defectuoso en el cromosoma de la cepa mutante, así como del gen intacto en el cromosoma de la cepa silvestre.

Clonación del gen responsable del fenotipo no móvil.

Restablecimiento de la movilidad a través de estudios de complementación en trans.

Secuenciación del gen

En este último punto, cabe mencionar que la secuenciación de

dicho gen así como la purificación y caracterización del producto génico, forman parte de los objetivos planteados para la futura continuación del proyecto. Sin embargo, se cuenta ya con secuencia nucleotídica preliminar con la que se pueden realizar estudios de homología con otras especies bacterianas.

De esta manera, generando un banco de mutantes flagelares e identificando los genes que afectan la movilidad, nos podremos acercar al objetivo fundamental del proyecto en cuanto a conocer las diferencias que existen en el movimiento tan peculiar de esta especie bacteriana. Es decir, el flagelo de las enterobacterias como "modelo flagelar" descrito en los libros de texto, pudiera no ser el más representativo dentro del reino procarionte.

MATERIALES Y METODOS

Las cepas, cósmidos y plásmidos utilizados en el presente trabajo se enlistan a continuación.

CEPAS

E. coli S17-1 (Pro⁻ Res⁻ Mod⁺ recA; plásmido integrado RP4-Tc::Mu-Kn::Tn7)
E. coli JM103 (cepa derivada de JM101, F' traD36 lacI' (lacZ)M15 proAB/enaA1 supE)
E. coli HB101 (hsdS recA Res⁻ Mod⁺; cepa altamente transformable, para producción de plásmidos a gran escala)
R. sphaeroides WS8-N (cepa silvestre; Nal^r)
MPG (derivado Tnp_hoA de *R. sphaeroides* WS8-N; no móvil; Kn^r, Nal^r)*
MNM1 (derivado Tnp_hoA de *R. sphaeroides* WS8-N; no móvil; Kn^r, Nal^r)*

COSMIDOS

c19 (derivado de pLA2917 que contiene ~20 kb de DNA de *R. sphaeroides* WS8; Tc^r)
c523 (derivado de pLA2917 que contiene ~25 kb de DNA de *R. sphaeroides* WS8; Tc^r)
c140 (derivado de pLA2917 que contiene ~25 kb de DNA de *R. sphaeroides* WS8; restablece la movilidad de MPG; Tc^r)

PLASMIDOS

pUC19 (vector de clonación de 2.69 kb, multicopia, expresa el N-terminal de lacZ por lo que puede llevar a cabo α complementación en una cepa adecuada, Amp^r)
pTZ19R (vector de clonación de 2.9 kb, con sitio de policlonación derivado de pUC; multicopia, Amp^r)
pRK415 (vector de 10.5 kb, derivado de pRK404 con sitio de policlonación de pUC19, Tc^r)
pU1800 (derivado de pSUP203 de 14 kb que contiene a Tnp_hoA; Cm^r, Tc^r, Kn^r)
pIK800 (fragmento de 1.3 kb de DNA de *E. coli* clonado en pUC19, contiene el gen *fliK*; Amp^r)
pTB0510 (fragmento de 5.3 kb de DNA de *R. sphaeroides* 2.4.1. clonado en pTZ18R, contiene los genes flagelares *fliH* (secuencia parcial), *fliI* y *fliJ*; Amp^r)
pTB0515 (inserto del plásmido pTB0510 clonado en pRK415; Tc^r)*
pTnM20 (fragmento de 5.7 kb clonado en pUC19 que contiene 4.6 kb de Tnp_hoA y ~1.1 kb del DNA de MPG adyacente al sitio de inserción del transposón; Kn^r, Amp^r)*
pBG0201 (fragmento *Pst*I del c140, de ~2 kb clonado en pRK415; Tc^r)*

pBG0502 (fragmento EcoRI del c140, de ~4.9 kb clonado en pRK415; Tc^r)*
pBG0503 (fragmento EcoRI del c140, de ~5.1 kb clonado en pRK415; Tc^r)*
pBG0404 (fragmento SalI del c140, de ~4.6 kb clonado en pTZ19R; Amp^r)*
pBG0405 (inserto del plásmido pBG0404 clonado en pRK415; Tc^r)*
pBG0206 (fragmento SalI-EcoRI de ~2.4 kb, de pBG0404 clonado en pTZ18R)*

* Cepas mutantes y construcciones generadas en este trabajo. La construcción pTnM20 se realizó en colaboración con la Dra. Elizabeth Sockett, Universidad de Nottingham, Reino Unido. La construcción pBG0206 se realizó en colaboración con el Dr. Andrés Campos, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Crecimiento de *Rhodobacter sphaeroides* W88

Medio de Cultivo Líquido

Se utilizó el medio de cultivo descrito originalmente por Cohen-Bazire y col., (1957), modificado por Sistrom (1960), que fue diseñado con base en los requerimientos de sodio de esta bacteria. El medio mínimo incluye succinato como principal donador de electrones, así como las vitaminas indispensables para el crecimiento de esta bacteria: ácido nicotínico, tiamina y biotina. Se añadió al medio el antibiótico ácido nalidíxico (20 µg/ml) para evitar contaminación con otras especies bacterianas.

El crecimiento se llevó a cabo en condiciones fotoheterotróficas, iluminando los cultivos con focos de 100 watts, manteniendo la temperatura constante entre 30 y 35°C, hasta alcanzar la fase de crecimiento logarítmica tardía (Clayton y Sistrom, 1978).

Medio de Cultivo Sólido

Se preparó agregando 2% de bacto-agar al medio de cultivo líquido antes descrito. Después de esterilizado, se vació en cajas de Petri, a las que se agregan las vitaminas mencionadas y se estrían las bacterias para la obtención de colonias individuales.

Las cajas se sometieron a iluminación constante dentro de una cámara de anaerobiosis en la que se genera una atmósfera de hidrógeno y bióxido de carbono que consume el oxígeno presente. Las bacterias crecidas en condiciones fotosintéticas presentan el color café característico que le proporcionan los carotenos y las bacterioclorofilas.

Crecimiento de *E. coli*

El crecimiento de las cepas de *E. coli* se llevó a cabo en el medio de Luria-Bertani (LB) que contiene por litro: 10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 10 g de bacto-triptona (Sambrook y col., 1989). Las bacterias se crecieron ya sea en cultivos líquidos en condiciones aeróbicas con agitación constante, o en medio sólido en cajas de Petri con medio LB que incluyó 2% de bacto agar, a 37°C.

La cepa JM103 se creció en medio mínimo M9 (Sambrook y col., 1989). La cepa es incapaz de utilizar lactosa como fuente de carbono y requiere prolina para crecer.

Mantenimiento de las Cepas

Para mantener las cepas bacterianas durante un tiempo largo, se realizó un cultivo aeróbico de 12 hrs con agitación constante, inoculando una colonia en 2 ml de medio líquido. Posteriormente se agregaron 500 µl del cultivo en 500 µl de glicerol previamente esterilizado (50% final), y se congeló a -70°C.

Mutagénesis de *Rhodobacter sphaeroides* W88

La mutagénesis se llevó a cabo por transposición, introduciendo en *R. sphaeroides* el elemento transponible TnphoA a través de conjugación diparental (Moore y Kaplan, 1989).

El plásmido suicida pU1800 que contiene al transposón Tn5

fusionado al gen de la fosfatasa alcalina, se introdujo en la cepa donadora *E. coli* S17-1 que contiene la información necesaria para que se lleve a cabo la transferencia de DNA a través de la formación del pili.

La conjugación diparental (entre dos especies) se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo:

Se crecieron cultivos aeróbicos de *R. sphaeroides* WS8 en medio Sistro y de *E. coli* S17-1 en medio Luria, en presencia de sus respectivos antibióticos (ácido nalidíxico 20 µg/ml y kanamicina 25 µg/ml), inoculando una colonia en 2 ml de medio. Se inocularon 3 µl del cultivo de 12 hrs de *R. sphaeroides* en 10 ml de medio hasta alcanzar la fase logarítmica a las 20 hrs aproximadamente. También se realizó un subcultivo de *E. coli*, inoculando 20 µl del cultivo de 12 hrs en 5 ml de LB hasta alcanzar la fase logarítmica aproximadamente a las 3 hrs.

Se centrifugaron por separado 500 µl de cada cultivo a 6000 rpm durante 4 minutos. Se decantaron los sobrenadantes, y se resuspendieron las pastillas suavemente en 500 µl de medio Luria sin antibióticos; se centrifugó en las mismas condiciones que el paso anterior. Este procedimiento se repitió dos veces para eliminar los antibióticos de cada cultivo.

Las pastillas resultantes se resuspendieron en 100 µl de LB, y se mezclaron. La mezcla de conjugación se incubó sobre filtros de nitrocelulosa estériles previamente colocados en cajas de Petri con medio LB, y se incubó a 30°C durante 5-6 horas (Miller y Kaplan, 1978).

Posteriormente se colocaron los filtros en tubos para microcentrífuga Eppendorf, se agregaron 500 µl de LB y se agitó vigorosamente. Por último, se plaquearon 100 µl de la mezcla de conjugación en cajas LB con kanamicina para seleccionar la presencia del transposón, y ácido nalidíxico para eliminar las colonias de *E. coli* que son sensibles a dicho antibiótico.

Las cajas se incubaron durante 3-4 días a 30°C, obteniéndose así colonias mutantes de *R. sphaeroides* que contenían el transposón integrado en alguna parte del cromosoma.

Selección de las mutantes no móviles

Las mutantes se seleccionaron utilizando diferentes criterios:

Placas de Nado:

Las placas de nado o de agar suave contenían 0.03% de bacto-peptona, 0.03% de extracto de levadura y 0.3% de bacto-agar (Sockett y Armitage, 1991).

Se inocularon las colonias por punción utilizando un palillo estéril, se incubaron a 30°C durante 3 días y se observó la formación de un halo de nado, característico de las mutantes móviles. Se seleccionaron aquellas colonias que no formaron dicho halo.

Microscopía Óptica de Contraste de Fases y de Campo Oscuro de Alta Intensidad:

Se realizó un cultivo líquido de las bacterias resultantes de la mutagénesis inoculando una colonia en 2 ml de medio Sistrom en presencia de kanamicina (25 µg/ml). Se mantuvieron en iluminación constante durante 12 hrs y se analizaron al microscopio óptico colocando 2 µl del cultivo en un portaobjetos.

Al microscopio de contraste de fases resulta muy sencillo diferenciar las bacterias que nadan de aquellas que no lo hacen; las primeras presentan desplazamientos rápidos en diferentes direcciones y las segundas están sujetas a movimientos Brownianos. Después de este criterio, el cultivo se analizó en el microscopio de campo oscuro de alta intensidad en el que se puede distinguir si las bacterias presentan flagelo. La presente microscopía resulta de una modificación realizada a un microscopio de fluorescencia en el que se utiliza una fuente de luz muy poderosa, de manera que se pueden observar estructuras tan delgadas como el flagelo bacteriano. Con este criterio de selección se pueden distinguir diferentes fenotipos, es decir, si las bacterias que no nadan carecen de flagelo (Fla⁻), o bien si presentan un flagelo no funcional (Mot⁻ o Che⁻).

Microscopía Electrónica

Las mutantes obtenidas se analizaron al microscopio electrónico en el que se pudo verificar la ausencia de flagelo, o bien la presencia de subestructuras flagelares. Las bacterias se obtuvieron a partir de un cultivo líquido, o bien de las placas de nado, y se sometieron a varios lavados utilizando el amortiguador Tris 0.1 M pH 8.0. Posteriormente se colocó 1 μ l de la preparación en rejillas recubiertas con película de carbón para realizar la tinción negativa.

La tinción negativa se realizó utilizando ácido fosfotúngstico (PTA) al 2% pH 6.8, o bien acetato de uranilo 1% con el que se logró obtener un mayor contraste.

Las muestras se analizaron en un microscopio electrónico Jeol 1200X II a un voltaje de 60 ó 80 Kv.

Complementación en trans de las Mutantes

Los estudios de complementación se realizaron a través de conjugación diparental como se describió anteriormente. La cepa donadora de *E. coli* S17-1 se transformó con el fragmento de DNA a transferir, clonado en el plásmido pRK415 o el cósmido pLA2917 cuyos sitios de origen de replicación son reconocidos en *R. sphaeroides* (Donohue y Kaplan, 1991). De esta manera, la conjugación se realizó entre *E. coli* S17-1 y alguna cepa mutante de *R. sphaeroides*, obtenida por mutagénesis, que contenía el transposón *TnphoA* integrado en el cromosoma. Finalmente se seleccionaron las bacterias por su resistencia a kanamicina (conferida por el transposón), así como a tetraciclina 1 μ g/ml (resistencia que confieren los vectores utilizados pRK415, pLA2917) y ácido nalidíxico.

Posteriormente, las colonias obtenidas se sometieron a los criterios de selección de nado y presencia de flagelo antes mencionados para verificar el restablecimiento del fenotipo silvestre.

Purificación de la proteína del gancho: FlgE

Se crecieron 6 litros de un cultivo fotosintético de la mutante poligancha (MPG) en presencia de 25 µg/ml de kanamicina, inoculados con 2.5 ml de un pre-cultivo líquido en fase estacionaria. Las bacterias se mantuvieron en iluminación constante con 6 focos de 100 watts, durante 12 horas.

Las bacterias se cosecharon en fase de crecimiento logarítmica (D.O.= 0.6-0.8 a 660 nm), centrifugando a 5,000 rpm durante 15 min. Las pastillas se resuspendieron en 60 ml de amortiguador TE (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM pH= 8.0), en presencia de 25 µg/ml de TLCK). Todos los pasos se realizaron a 4°C.

El gancho se obtuvo por ruptura mecánica, pasando las bacterias varias veces a través de una cánula, o bien utilizando un homogenizador.

Se centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos para desechar las bacterias intactas y restos celulares que quedan en la pastilla. El sobrenadante se centrifugó a alta velocidad 35,000 rpm durante 1 hora en el rotor 60Ti. La pastilla se resuspendió en amortiguador TE y se sometió a un gradiente de cloruro de cesio (4.3 g de CsCl en 11 ml de TE).

Por último, se colectaron las diferentes fracciones, se dializaron, y se ultracentrifugaron para recuperar el gancho en la pastilla. La pureza de la preparación se verificó en geles de poliacrilamida SDS, así como al microscopio electrónico.

Secuenciación del extremo amino terminal de FlgE

La proteína del gancho obtenida se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida, y se transfirió a una membrana de Problot (polivinilidén fluoruro) durante 4 horas a 250 mA. La membrana se tiñó con 0.1% de azul de Coomassie R-250 en 50% de metanol, y se destiñó en 50% de metanol, 10% de ácido acético, después de lo cual se recortaron las bandas de interés (Matsudaira, 1987).

La secuencia de aminoácidos se obtuvo con un secuenciador

automático en la Fundación Keck de la Universidad de Yale, E.U.A.

Electroforesis

La caracterización electroforética se llevó a cabo en geles de poliacrilamida SDS al 15%, utilizando el método reportado por (Laemmli, 1970). La tinción de los geles se realizó con nitrato de plata.

La determinación de los pesos moleculares aproximados se obtuvo a través de barridos densitométricos con un haz de láser, en el aparato UltroScan XL de LKB. Se utilizaron los siguientes estándares como marcadores de peso molecular: fosforilasa b (97,400 da), albúmina sérica de bovino (66,200 da), ovoalbúmina (45,000 da), anhidrasa carbónica (31,000 da), inhibidor de tripsina de soya (21,500 da) y lisosima (14,400 da).

Determinación de la Concentración de Proteína

La cuantificación de proteína se realizó con el método del ácido bicinconínico (BCA) descrito por Smith y col., (1985).

Las absorbancias de las muestras problema se leyeron a 562 nm y se interpolaron con las lecturas de una curva patrón realizada con albúmina de bovino.

TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR:

Purificación de DNA Cromosomal

La purificación de DNA cromosomal de *R. sphaeroides* se realizó a partir de 250 ml de un cultivo fotosintético. Se cosecharon las bacterias centrifugando a baja velocidad y se resuspendieron en 10 ml de amortiguador de sacarosa (25% sacarosa, 50 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA), por cada litro de cultivo inicial.

Posteriormente se trataron las células con 3.0 ml de EDTA 0.25 M, 1.0 ml de lisosima 5 mg/ml y 0.1 ml de RNasa 10 mg/ml, para formar esferoplastos, se agitó suavemente y se dejó reposar durante 15 min en hielo. Las células se lisaron agregando 3.0 ml de mezcla lítica de Tritón X-100: tritón X-100 10%, 0.25 M EDTA pH 8.0, Tris 1 M pH 8.0; se mezcló y se dejó en hielo durante 15 min.

Las bacterias se centrifugaron a baja velocidad y se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 10 ml de amortiguador TES (Tris-Cl 50 mM pH 7.5, EDTA 2 mM pH 7.5, SDS 5%); y se agregó 1/10 del volumen de una solución de proteasa K 5 mg/ml, incubando durante 1 hr a 37°C.

Se realizaron numerosas extracciones con fenol saturado con Tris pH 8.0, centrifugando durante 10 min a 10,000 rpm para separar las fases. Finalmente se realizó una extracción con fenol-cloroformo 1:1, y dos extracciones adicionales únicamente con cloroformo. El sobrenadante (fase acuosa) se precipitó con 1/25 de NaCl 5M y 2 volúmenes de etanol 100%, se lavó y se secó (Sambrook y col., 1989).

El DNA se resuspendió en TE (Tris 10 mM-EDTA 1 mM pH 7.5).

Purificación de plásmidos y cósmidos

El DNA de plásmidos y cósmidos se purificó utilizando el kit de Qiagen (Inc., Alemania). A partir de cultivos de 100 ml (midiprep) o 500 ml (maxiprep) se purificaron los plásmidos a través de lisis alcalina seguida de una cromatografía de intercambio iónico por la que se pasó el extracto celular.

Para plásmidos con bajo número de copias, o bien para la purificación de cósmidos, el cultivo se amplificó durante 12 hrs con cloranfenicol 170 µg/ml.

Estrategia de Clonación

Los plásmidos se construyeron utilizando técnicas estándares descritas en Sambrook y col., (1989).

Los vectores e insertos utilizados se purificaron a partir de elución de geles de agarosa 1% con el sistema GeneClean, (Bio 101).

El vector linearizado y desfosforilado se incubó con el inserto de DNA a clonar, así como con la ligasa de DNA de T4. La ligación se realizó a 16 o 20°C dependiendo de si los extremos eran cohesivos o rasurados respectivamente.

La mezcla de reacción se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* preparadas con CaCl₂ 100 mM, y las clonas positivas se seleccionaron a través de digestiones de minipreparaciones de DNA. Las minipreparaciones se realizaron por lisis alcalina como se describe en Sambrook y col. (1989).

Construcción de la Clona pTnM20

El DNA adyacente al sitio de inserción del transposón en el cromosoma de la mutante MPG, fue clonado utilizando como marcador la resistencia a kanamicina que confiere *TnphoA*. Se digirió durante 12 hrs 1 µg de pUC19 y 3 µg de DNA cromosomal de MPG con la enzima SalI. El DNA resultante se extrajo con una solución de fenol-cloroformo y se precipitó con acetato de sodio y etanol. Los DNAs se ligaron y se transformaron en células competentes de *E. coli* JM103. Las transformantes se sembraron en cajas LB con 40 µg/ml X-gal y 75 µg/ml kanamicina para seleccionar el fragmento de DNA que incluyera el transposón. La clona resultante que se obtuvo contiene 4.6 kb de *TnphoA* y ~1.1 kb de DNA del gen mutado en *R. sphaeroides*.

Hibridación tipo Southern

La hibridación tipo Southern Blot se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Southern (1975). Las sondas utilizadas se marcaron con biotina a través de la técnica de "nick translation", siguiendo el protocolo del sistema (Bionick Labeling System, Gibco BRL). Aproximadamente 1 µg de DNA se incubó a 16°C durante 30 min, en presencia de desoxiligonucleótidos (incluyendo el marcado con biotina-14-dATP), y de las enzimas DNA Polimerasa I y DNasa I. La reacción se detuvo con EDTA, y se precipitó con EtOH varias veces para eliminar los nucleótidos que no se incorporaron. La sonda biotinilada se guardó en amortiguador de Tris-EDTA a -20°C.

La hibridación se realizó de acuerdo al protocolo de detección del sistema (PhotoGene, Gibco BRL). El DNA desnaturalizado en un gel de agarosa, se transfirió a membranas de Nylon durante 15 min con vacío. La membrana se prehibridó durante 4 hrs a 42°C en presencia de DNA de esperma de salmón, y se hibridó durante 18 hrs en presencia de la sonda biotinilada.

Posteriormente se realizaron varios lavados a la membrana en amortiguador SSC-SDS (NaCl 3 M, Citrato de sodio 0.3 M; SDS), ajustando la temperatura al nivel de astringencia que se requirió. La membrana se bloqueó durante 1 hr en una solución de albúmina, después de lo cual se le unió un conjugado de estreptavidina y fosfatasa alcalina, que a su vez se incorpora en las biotinas de la sonda marcada.

Finalmente la detección de la señal se realizó con un sustrato de la fosfatasa alcalina que emite luz al ser desfosforilado.

La membrana se expuso en un estuche con pantalla amplificadora y una placa para autorradiografía. La placa se reveló después de someterse a diferentes tiempos de exposición dependiendo de que tan fuerte era la señal.

Secuenciación

La secuenciación de nucleótidos se realizó de acuerdo al método enzimático de terminación de la cadena de Sanger y col., (1977). Las reacciones de secuencia se realizaron según el protocolo del sistema de deltaTaq DNA polimerasa Versión 2.0 (USB).

Alineación, Marcado y Terminación:

Todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando DNA de doble cadena, con plásmidos purificados por columnas de Qiagen. El DNA plasmídico (2 µg) se desnaturalizó con 2.0 M de NaOH durante 5 min. Para la reacción de alineación se agregaron 20 pmolas de oligonucleótido (cebador) y se neutralizó la solución con acetato de sodio 3 M pH 5.0, precipitando con 2.5 volúmenes de etanol 80%. Se incubó a -70°C durante 30 min y se centrifugó a 14000 rpm durante 12 min a 4°C. La pastilla resultante se lavó con etanol 80% y se secó en un liofilizador al vacío.

A la mezcla templado-cebador se le agregaron los desoxioligonucleótidos excepto el dCTP que se incluye como (α -³⁵S-dCTP), así como la enzima Taq DNA polimerasa. La reacción de marcado se incubó durante 5 min a 45°C.

Por otra parte, se añadió en 4 tubos, 4.0 µl de la mezcla de terminación que contenía cada uno de los dideoxinucleótidos; (4.0 µl de ddATP al primer tubo y así respectivamente a los siguientes).

Al terminar la reacción de marcado se tomaron 4 µl de la mezcla y se colocaron en cada uno de los 4 tubos que contenían la mezcla de terminación. Se incubó a 72°C durante 5 min, y se agregaron 4 µl de solución de término (stop solution). Las reacciones se guardaron a -20°C hasta ser utilizadas.

Cabe mencionar que en todas las reacciones se utilizó el desoxioligonucleótido análogo del dGTP: (7-deaza-dGTP) que se recomienda para DNAs con alto contenido G-C, ya que forma estructuras secundarias más débiles evitando la formación de compresiones en la electroforesis.

Las reacciones se incubaron a 70°C durante 5 min antes de

cargarse en un gel de secuencia. La electroforesis se realizó cargando 2.5 μ l de la reacción en un gel de acrilamida/bis-acrilamida tanto al 6% como al 4%. El gel se precalentó durante 1 hora, y se corrió fijando la corriente a 50 watts.

Al finalizar la electroforesis, se fijó el gel en ácido acético 10% y metanol 10% durante 30 min con agitación constante.

Por último se secó durante 1 hr a 130°C y se expuso durante 12 hrs en una placa de rayos-X para autoradiografía.

RESULTADOS

Aislamiento y Selección de la Mutante Poligancho

A través de la inserción del elemento transponible *TnphoA* en el cromosoma de *R. sphaeroides* se aislaron dos mutantes afectadas en la movilidad. Las mutantes se obtuvieron a través de conjugación diparental con una frecuencia de 2 colonias mutantes no móviles en 600 colonias exconjugantes, y se seleccionaron como colonias resistentes a los antibióticos: kanamicina (resistencia que confiere el transposón), así como a ácido nalidíxico (resistencia de la cepa silvestre *R. sphaeroides* WS8).

Las mutantes obtenidas son capaces de crecer tanto fotosintéticamente como en condiciones de aerobiosis, presentando la misma velocidad de crecimiento que la cepa silvestre.

El siguiente criterio de selección fue la capacidad de nado: en la **Figura 8** se muestra el análisis de movilidad en placas de nado o agar suave. Las mutantes no son capaces de producir el anillo de nado característico que forma la cepa silvestre al alejarse del punto de inoculación.

Por otro lado, la caracterización de las mutantes al microscopio óptico muestra que ambas son no móviles, y que no presentan estructuras flagelares distinguibles.

La caracterización morfológica de las mutantes al microscopio electrónico muestra que la mutante denominada MNM1 carece de cualquier estructura flagelar externa presentando un fenotipo Fla⁻; sin embargo, la mutante denominada MPG presenta un "flagelo pequeño" como se muestra en la **Figura 9**.

Para determinar a qué tipo de estructura flagelar correspondía lo observado en la mutante MPG, se analizó al microscopio electrónico el flagelo purificado de una cepa silvestre. La parte extracelular del flagelo (gancho y filamento), se aisló por ruptura mecánica, de la misma forma que se describe en la metodología para la purificación del gancho.

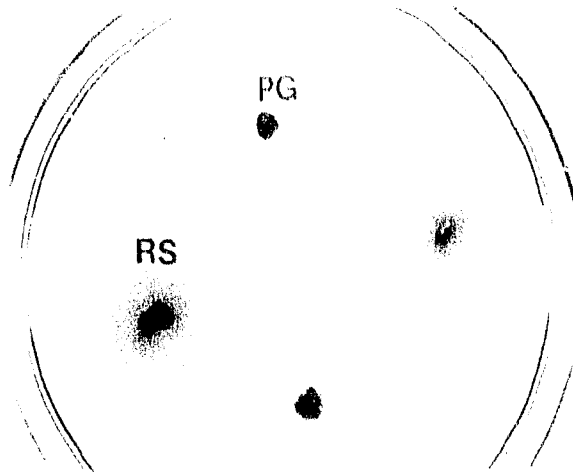


Figura 8 Placa de nado o agar suave (0.3%), en donde se muestran los anillos de nado que forman la cepa silvestre RS (extremo izquierdo y derecho de la caja de Petri), y la mutante poligancho PG (extremo superior e inferior de la caja de Petri), al alejarse del punto de inoculación.



Figura 9 Fotografía al microscopio electrónico de las mutantes MNMI en la parte superior (mutante Fla⁻), la barra corresponde a 500 nm; y MPG (mutante poligancho) en la parte inferior, la barra corresponde a 200 nm. Las flechas señalan el "flagelo pequeño". Las muestras fueron procesadas por tinción negativa como se describe en la metodología.

En la **Figura 10** se muestra una fotografía al microscopio electrónico del flagelo obtenido de una cepa silvestre, en donde se distingue el gancho, el filamento y las proteínas HAP de unión entre éstos. El patrón morfológico que se observa en el gancho, se distingue claramente del que muestra el arreglo de subunidades de flagelina en el filamento.

De esta manera, con el análisis del flagelo silvestre, se logró asignarle a la mutante MPG el fenotipo poliganchos, que se caracteriza por la formación de polímeros de ganchos de diferentes tamaños. En la **Figura 11** se muestra a un mayor aumento, que el patrón morfológico del "flagelo pequeño" en la mutante MPG, corresponde al del gancho.

El gancho en la mutante MPG presenta un tamaño anormal de hasta ~2000 nm de largo comparado con ~100 nm de la cepa silvestre. Por otro lado, la MPG es incapaz de ensamblar filamento y no aparecen las proteínas HAP de unión entre gancho y filamento (ver **figura 11**). El presente fenotipo se clasifica a su vez como Fla⁻ debido a la ausencia de filamento.

La continuación del trabajo se realizó únicamente con la mutante MPG.

Purificación de la Proteína del Gancho

Como se mencionó anteriormente, el gancho de una cepa silvestre es una estructura corta de aproximadamente 100 nm, y siendo *R. sphaeroides* una bacteria uniflagelada, la purificación de la proteína monomérica del gancho (FlgE), a partir de una cepa silvestre, genera rendimientos muy bajos. Debido a esto, se utilizó la mutante poliganchos para la purificación de la proteína FlgE, utilizando la metodología antes mencionada.

La pureza de la preparación se verificó a través de geles de poliacrilamida SDS, así como por microscopía electrónica.

En la **Figura 12** se muestra el patrón electroforético que se obtiene a partir de la ruptura de las estructuras extracelulares del flagelo, tanto en la cepa silvestre como en la mutante



Figura 10 Fotografía al microscopio electrónico de las estructuras extracelulares del flagelo de *R. sphaeroides* WS8. La flecha señala las proteínas HAP de unión entre el gancho (estructura recta en la parte derecha), y el filamento (del lado izquierdo de la flecha). La barra corresponde a 100 nm.

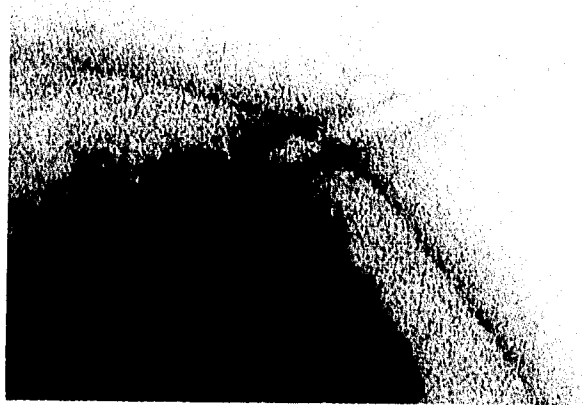


Figura 11 Fotografía al microscopio electrónico de la mutante poligancho. No se observan las proteínas HAP ni el filamento. La barra corresponde a 100 nm.

poligancho. En la cepa silvestre se observa una banda mayoritaria que corresponde a la flagelina (FlhC) con un peso molecular aproximado de 55 kDa como se había descrito anteriormente (Sockett y col., 1990), así como una proteína de menor peso molecular (~50 kDa) correspondiente a la proteína del gancho.

En el carril que corresponde a la mutante, no se observa la banda de flagelina, y se evidencia que la cantidad de proteína de gancho es mucho mayor en comparación con la cepa silvestre. A su vez, se muestra una tinción con plata del patrón electroforético del último paso de purificación de la proteína del gancho. Los pesos moleculares se obtuvieron a través de un barrido densitométrico como se mencionó en la metodología.

En la **Figura 13** se muestran las fotografías al microscopio electrónico obtenidas con la preparación de gancho. Como se observa, se conserva el mismo patrón morfológico que corresponde al del gancho en la cepa silvestre, y en la mutante MPG. El fenotipo poligancho se caracteriza por una desregulación del control de la longitud del gancho, por lo que se pueden encontrar poliganchos de diferentes tamaños a partir de 100 nm.

Por último, para corroborar que la banda observada en los geles de poliacrilamida correspondía a la proteína del gancho, se obtuvo la secuencia amino-terminal. En la **Figura 14** se muestra la secuencia N-terminal de la proteína FlgE, comparada con las secuencias de la misma proteína reportadas para otras especies bacterianas. Como se puede observar, la proteína del gancho de *R. sphaeroides* muestra el dominio conservado "SGL" que se ha observado en otras especies, así como aminoácidos altamente conservados y la presencia de héptadas repetidas (un aminoácido hidrofóbico cada 7 residuos).

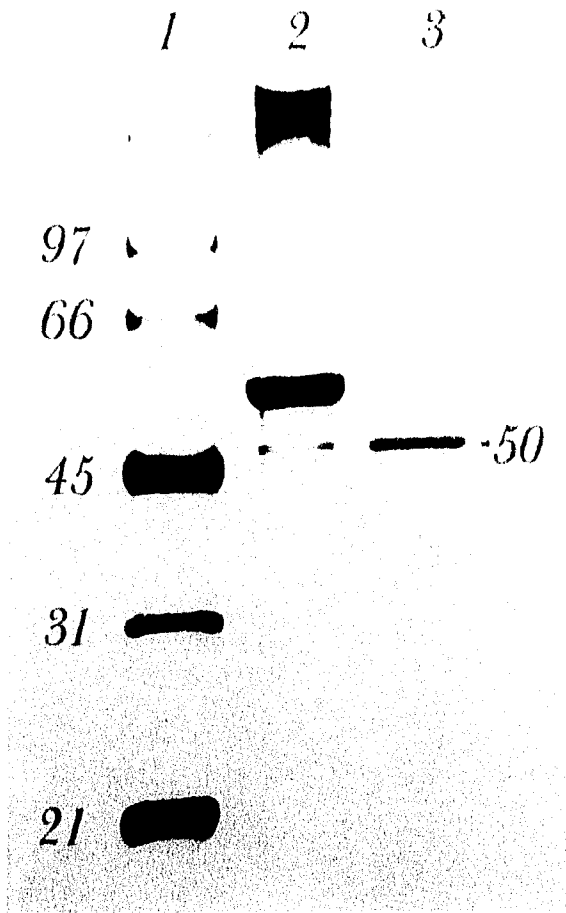
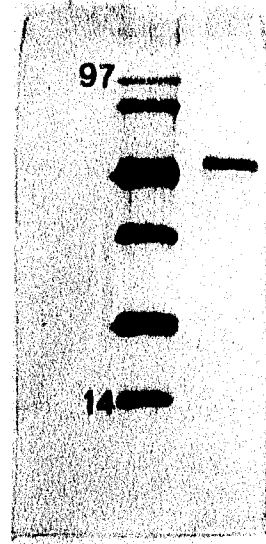
A**B**

Figura 12 A) Electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (15%). Tinción con plata de 1) marcadores de peso molecular (kDa) 2) componentes extracelulares purificados de la cepa silvestre: flagelina (con un peso molecular de 55 kDa) y gancho (50 kDa) 3) componentes extracelulares purificados de la mutante poligancho: proteína del gancho (50 kDa).

B) Tinción con plata del último paso de purificación de la proteína del gancho. No se observan pigmentos contaminantes de bajo peso molecular en la zona de 10 kDa.

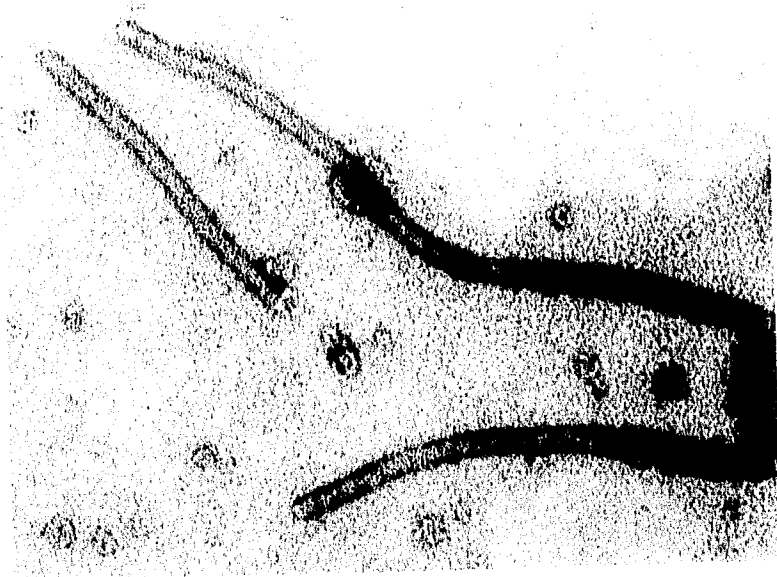


Figura 13 Fotografía al microscopio electrónico de los poliganchos obtenidos de MPG como se describe en la metodología. La barra corresponde a 200 nm.

Inserción de Tnp ϕ oA en el cromosoma de la mutante

Para demostrar la existencia de un único evento de inserción del transposón en el cromosoma de *R. sphaeroides*, se realizó hibridación tipo Southern utilizando como sonda un fragmento Hind III de 3.4 kb, del plásmido pU1800, que corresponde a una región interna de Tnp ϕ oA como se muestra en el mapa de la **Figura 15**.

La hibridación se realizó con DNA cromosomal purificado de MPG y digerido con las enzimas de restricción BamHI y SacI como se muestra en la **Figura 16**. El Tnp ϕ oA no es cortado por la enzima SacI, por lo que la banda de hibridación que se observa corresponde a la distancia que existe entre dos sitios SacI en los extremos 3' y 5' del sitio de inserción del transposón. Por su parte, existe un sólo sitio BamHI dentro de Tnp ϕ oA, por lo que la banda de 5 kb que se observa corresponde a dos fragmentos que comigran: el primero incluye 4.9 kb de Tnp ϕ oA y 55 pb del extremo 5' del DNA adyacente al sitio de inserción; y el segundo contiene 2.7 kb de Tnp ϕ oA y 2.3 kb del extremo 3' del DNA adyacente al sitio de inserción.

Los sitios BamHI del DNA cromosomal antes mencionados, se identificaron a través de mapas de restricción y por secuenciación, como se verá más adelante.

Estudios de Complementación

Para los experimentos de complementación y restablecimiento de la movilidad de la mutante, se utilizaron 3 cósmidos de una librería genómica de *R. sphaeroides*, donados por la Dra. Elizabeth Sockett de la Universidad de Nottingham (Reino Unido); en los que se encuentran representadas ~80 kb de DNA cromosomal.

A través de conjugación diparental se introdujeron los cósmidos en la mutante MPG. Las colonias exconjugantes se seleccionaron por resistencia a tetraciclina (conferida por el cósmido); kanamicina (por la presencia de Tn5) y ácido nalidíxico.

Con estos estudios se identificó un cósmido de ~25 kb denominado c140, que complemента a la MPG. La mutante

Tn_{phoA}

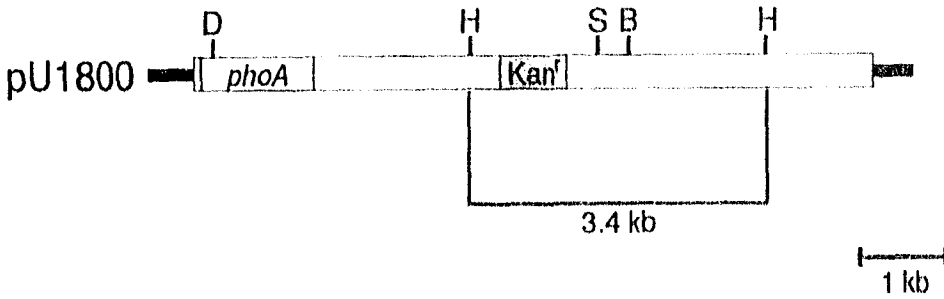


Figura 15 Mapa de Tn_{phoA} en el que se muestra la sonda de 3.4 kb utilizada para la identificación del transposón en experimentos de hibridación. Se señala el gene de la fosfatasa alcalina así como la zona que confiere resistencia a kanamicina. Las letras señalan las siguientes enzimas de restricción B (*Bam*HI), D (*Dra*I), H (*Hind*III) y S (*Sal*I).

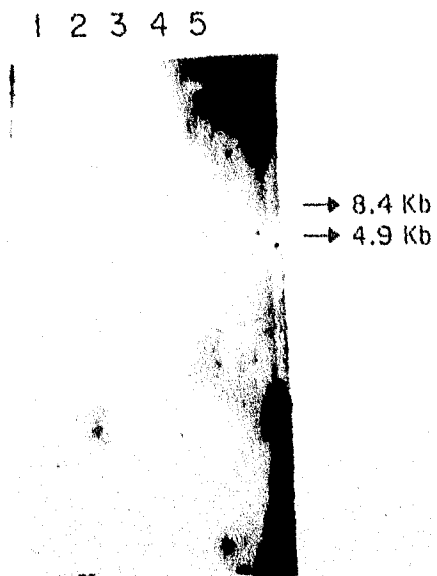


Figura 16 Hibridación tipo Southern del DNA cromosomal de la cepa silvestre digerido con *SacI* y *BamHI* (carriles 1 y 2); DNA cromosomal de MPG digerido con *SacI* (carril 4) y con *BamHI* (carril 5). En el tercer carril se corrieron estándares de peso molecular, lambda digerido con *BstI*.

complementada recupera la movilidad como se muestra en las placas de nado de la **Figura 17a**. El análisis al microscopio electrónico de la mutante complementada muestra el restablecimiento de una longitud de gancho normal, siendo éste capaz de ensamblar filamento como se muestra en la **Figura 17b**.

Subclonación de c140

Para la clonación del gen silvestre que se encuentra presente en el cósmido c140 (gen interrumpido por *TnphoA* en la mutante), se realizaron estudios de hibridación tipo Southern. Se utilizó como sonda específica un fragmento *SalI/DraI* de ~1.3 kb de la clona pTnM20, que contiene el DNA de *R. sphaeroides* MPG adyacente al sitio de inserción del transposón, y 254 pb correspondientes al extremo 5' del gen de la fosfatasa alcalina en el *TnphoA* (ver **Figura 18**).

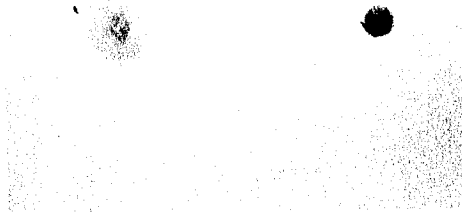
En la **Figura 19** se muestra el patrón de hibridación obtenido a partir de digestiones del cósmido c140 con diferentes enzimas de restricción, utilizando la sonda *SalI/DraI* antes descrita.

Cabe mencionar que se realizaron experimentos de hibridación heteróloga utilizando como sonda un fragmento *BamHI/PstI* de 1.3 kb del plásmido pIK800 que contiene al gen *fliK* de *S. typhimurium*. Sin embargo, no se logró identificar ninguna banda en el DNA cromosomal de *R. sphaeroides* que hibridara con dicha sonda, aun en condiciones de baja astringencia.

Complementación de la Mutante Poligancho

Un criterio para identificar al gen responsable del fenotipo que presenta la mutante, es el de restablecimiento de la movilidad por complementación en trans. Debido a esto, las bandas de hibridación de la **figura 19** provenientes de c140, fueron clonadas en el vector pRK415, obteniéndose las siguientes construcciones: pBG0201, pBG0502, pBG0503 y pBG0405 (ver tabla de plásmidos). Los

A



B



Figura 17 a) Placas de nado en agar suave de la mutante poligancho del lado derecho, y la mutante poligancho complementada con el c140 del lado izquierdo.

b) Fotografía al microscopio electrónico del flagelo purificado de la MPG complementada, en la que se muestra el restablecimiento del tamaño del gancho normal, así como el ensamblaje de las proteínas HAP (señaladas por la flecha) y del filamento. La barra corresponde a 100 nm.

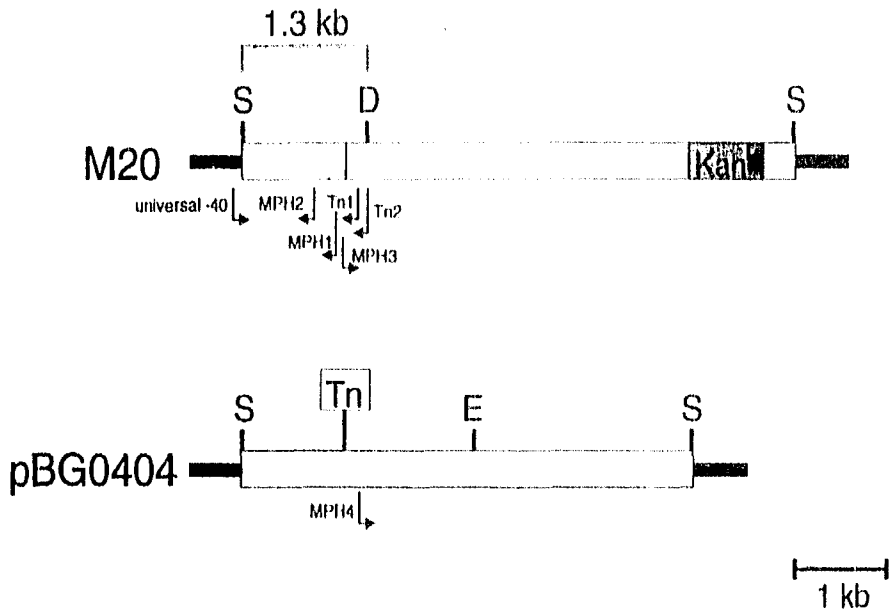


Figura 18 Mapa de la clona pTnM20. Se muestra el fragmento *SalI/DraI* de 1.3 kb que se utilizó como sonda para identificar la banda *SalI* de 4.6 kb de la clona pBG0404. Las flechas representan la estrategia de secuenciación utilizada. Las letras señalan las siguientes enzimas de restricción: D (*DraI*), S (*SalI*), E (*EcoRI*).

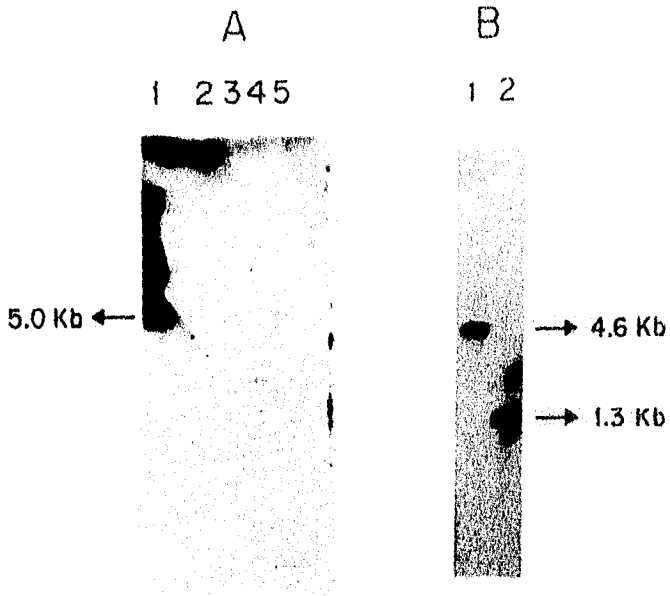


Figura 19 Patrón de hibridación obtenido para el c140 con diferentes enzimas de restricción.

A 1) DNA de la clona pTnM20 como control positivo; cósmido c140 digerido con 2) *Bam*HI 3) *Sma*I 4) *Pst*I 5) *Eco*RI

B 1) Digestión de c140 con *Sal*I 2) control positivo (inserto *Sal*I-*Dra*I de 1.3 kb que se utilizó como sonda).

cuatro plásmidos se introdujeron en la MPG a través de conjugación, y las colonias exconjugantes se analizaron con los criterios de movilidad antes descritos.

Ninguna de las construcciones generadas fue capaz de restablecer el nado a la mutante poligancho, lo que posiblemente indique que los genes se encuentran en la orientación opuesta al promotor del vector.

Por su parte, la construcción pTB0515 fue a su vez utilizada para complementar la MPG, siendo también el resultado negativo. Estos resultados se analizarán en la discusión.

Clonación del gen mutado y Secuenciación

Las primeras reacciones de secuencia se realizaron utilizando la clona pTnM20 ver **figura 18**. Se utilizaron los siguientes desoxioligonucleótidos: 2 diseñados a partir de la secuencia del extremo 5' del *TnphoA* denominados Tn1 y Tn2; el cebador universal -40 para secuenciar a partir del vector pUC19; así como desoxioligonucleótidos internos que se fueron diseñando conforme se obtuvo la secuencia, denominados MPH1, MPH2 y MPH3.

Por otro lado, el fragmento *SalI* de ~4.6 kb del c140 se clonó en el vector pTZ19R, generando la construcción pBG0404 (**Figura 18**). Con esta nueva construcción se utilizó el desoxioligonucleótido MPH3 para leer hacia el extremo 3' del sitio de inserción del transposón en el gen interrumpido, como se muestra en la **Figura 20**. De esta manera se corroboró la presencia del gen mutado en este fragmento *SalI*.

En la **Figura 20** se muestra el total de pares de bases secuenciadas (1555 pb), así como el sitio de inserción del *TnphoA*. El contenido de G-C en esta secuencia es del 76%.

A partir de la secuencia nucleotídica, se obtuvo la secuencia de aminoácidos y se realizó un análisis parcial de similitud entre un marco de lectura abierto de la secuencia de *R. sphaeroides* y el gen *fliK* de *S. typhimurium* (**Figura 21**). Se observa una identidad del 20%, sin embargo fue necesaria la introducción de 7 ventanas en

la secuencia de *R. sphaeroides*. A su vez, se puede distinguir una zona de similitud de secuencias en la parte central de la proteína FliK de *S. typhimurium*, sin embargo se requerirá la secuencia completa para la verificación del presente análisis.

5411
 GTCGACCGCTC CTGTGCCGTC AGAGGGCAACG TCCCGGATGC CGTGGGGCCC GCTCTGTCCG
 CCCGATCCGA CCGAGCCGGC CCCGGCCACC GTGGGTCAAT TCGCGTGGCC CCTGCCCGAG
 GACTCATCCG GGGCGATGCC TTTACCGCC GGTATGCGGT TCGGACCCTG CCCCGTCCCT
 CGGGTCTGCT GAGGTCCGGG GTCCCGATGG CGCTCCGGGA ACGCAGGGCC TCCACAGGG
 ACCGCACCC TCCGTCCGGC TCAGCGGGCC TGCTCTTGC GGGCATGTGG GAATCTCGA
 CCTCCGCCGA AGCCGCCCTC GCGCTGCCAG AGGAGGAAGA TCTTTCGAA GAGCCGCAGC
 ATTCCTCCGC GTCCGAGACT GGGCCCGAG GCTCGGCCG CGCAGATGG GCCACGTCCG
 CGGGGGATGA CCTGGCCGGG GCCAGGCGC GGGCCACCGT GCTTGGCGCC AATCCGACCG
 TCTCAGCTCT CCCCAGCGGC GCGTTCCTC TTCCGGGAGG GTCCGGCCCC CCTGCCGACC

TnphoA C15

GAAACGCTCAGAGA GGGCTT GAGGGTGTGG CGCCCGCCG AGCCCGGCC GACGCTCCGC
 CCCGGAGCGT CCGCGGGTTC CGTCCGCGA GCGCGGCCG GCGCAGCAG CCTCTCCCT
 GCCCGCTCG TCGCACTTC GCGCCGGCC CCAACCGGG ACAGCCGGC GGGAGGGCG

<-- oligo MPH2

CGCCCGCGCT CATCCCGCG CTGCGGGGAC AGTGCCTCG GCGAGGGT CAGCCGACAC
 AACCCACCG TCTCCCGCTC CTGCGGCACA GAGGCCGGAG ATCGCAGCG CGCCCGCCG
 AACCCCGGG AAGGTGGCC ACGCGTCCGA GGCACCGCC GCGAGAACC GTTCCCGCG

<-----

GACCGTCGGA CAGGACGGG CAGAGACGG TCTGGCCGTG GAGCCCGCC GGGCCACTCT

<-- oligo MPH1

CGCCGGGTCA GATCCGGTGG CCCCCGCCC CCTGACCGCC CTTCGAGCG ACCTGCGCT
 CGAGCGGGC GCGAGCCCC GGGCGGGCC GACGGGGCC CTGCGCTCG CGGCCCGGA

oligo MPH3 -->

CGCACCGCC GAGTCCAGG ACAGGATCT CGAGGCCGC GCAGGGGAG GCGAGATCGA

TnphoA M20

GATCGTGCT CCCCCGAGA CCCTGGGCC GCTCCGCATC CGCTCGAGA TCGCGACGG
 CACCGCGCAG GTGAGCTTCA CCACCGAAAC GCGCGAGGC GCGCTCTCC TGTCCGGGG

oligo MPH4 -->

GGAAGGACGC CTGTCCGACC TCCTTGAGAA GCACGGCTC TCGCTCGGCC GGCACGAGGC
 CGGACAGGG GACACCGGCC GCGCTCCGA GCGCGTGC GACGCCCG CCGCGGCC
 TCCGCTTGC CCCCATCTT TCAGAGCCG GCGCGTNCN CGGACCGTC AATCTGATG
 CCTGAGAAC CGCCGTGAC CGACGCTCC GCTCCCTCGA CACGAAGCC CGCCGNNCG
 GCCTCTTGC GCGCTGGTC TCTGTGCT CGGGCCTTC CTGCTGGCC GCGG

Figura 20 Se muestra el total de pares de bases secuenciadas, así como el sitio de inserción del *TnphoA* M20 de la mutante poligancho (M20). Se señalan a su vez los desoxi-oligonucleótidos internos que se utilizaron para secuenciar, denominados MPH.

```

FLIKST - MITLPQLITTTDNTAGLTGGKTTGSAEDFLALLAGALGADGAGGKDARI - 50
                |. . . | | | |
ORF2 - C-----GGRRSPPRRSAPMRRAGPLAERAGRADDABPV - 32

FLIKST - TLADLQAAGGKLSKELLTQHGHTQQAVKILADLLAQKANATDNTITDILTQA - 100
                |||
ORF2 - PASSHPAAGQPG----- - 45

FLIKST - QHLLSTLTPSLKTBALAALESKTAQDEKTPALSDREDLASLHALFAMLPQQ - 150
                . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
ORF2 - -----TAGREGAARAHFAAAGTVPBGGGAADTTPEPAPAAQ - 82

FLIKST - PVATPVAGETPAENHIALPSLIRGDMPSAPQSEHTLSPFSEHKORTBAS - 200
                | . | | | | | | | | | | | | | | | |
ORF2 - RPRIAAAPATAOK-----VADASEAPAAEN-----AG - 110

FLIKST - LARABDDRATQFALTPLVVAANAATSAKVEVDSPPAVTHGAAMPTLSBAT - 250
                | | | | | | | | | | | | | | | | | |
ORF2 - AATVQDQAE---TALAVEPAGATLAGSDPVAPPLTALPSDLRLERAG - 156

FLIKST - AQPILPVASAPVLSAPLQSHHWQTFBQQVMLPTRQQQSAQLRLHPEKIQ - 300
                |. | | | | | | | | | | | | | | | |
ORF2 - KPRAGADGFLALAAPDAPAEIQDRILRAAA---GEGEIHIVIAFETLQ - 201

FLIKST - QVHISLKLDDHQAQLQMVSPHSHVRAALBAALFMLRTQLAEGGIQLGQSB - 350
                . | . . | | | . . . | | | | | | | | | |
ORF2 - RLRIRVEMRDGTAQVSPFTTETAARILLBQQHRLSDLLKFKHGLSLGRHE - 251

FLIKST - ISSSEFAGQQQSSSQSSRAQHTDAFGASDDIALAAPASLQAARNGNA - 400
                . . . . . | . . . . . | . . . . . |
ORF2 - AQQGDTORRBEAAAAAFAARPPFC-----PRBFRARARXRDRQSDC - 292

FLIKST - VDIFA - 405
ORF2 - LRNRP - 297

```

Figura 21 Comparación preliminar de aminoácidos entre un marco de lectura abierto (ORF2) en la secuencia de *R. sphaeroides*, y la proteína Flik de *S. typhimurium*. La línea vertical indica los aminoácidos idénticos y los puntos señalan los aminoácidos conservados. Las secuencias muestran una identidad del 20% y una similitud de 10%.

DISCUSION

Aislamiento de mutantes Fla⁻, selección y complementación

Como se ha mencionado a lo largo del trabajo, no es posible aislar estructuras flagelares que puedan ser identificadas por su actividad biológica. Por ello, resulta indispensable para el estudio del flagelo en *R. sphaeroides*, o en cualquier otra especie bacteriana, utilizar diferentes enfoques experimentales como, en este caso, la generación de mutantes incapaces de nadar. De esta manera, el estudio bioquímico de las proteínas flagelares requiere que primero se localice, clone y se secuencie el gen correspondiente.

Debido a esto, es lógico encontrar que el estudio del flagelo procarionte se encuentre mucho más avanzado en bacterias como *E. coli*, que es un organismo muy estudiado en cuanto a su genética molecular. Sin embargo, es también cierto que en los últimos años el estudio del flagelo bacteriano en diferentes organismos como *Caulobacter*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Rhodobacter*, etc., ha generado nueva información en diferentes aspectos como los mecanismos de regulación genética, diferenciación celular, patogenicidad y funcionamiento del motor flagelar.

El trabajo de biología molecular en bacterias púrpuras no sulfurosas se ha desarrollado con lentitud debido principalmente a dificultades técnicas como la ausencia de vectores de expresión, el alto contenido de G-C del DNA de entre 68-70% (Donohue y Kaplan, 1991), así como por la dificultad de introducir DNA en bacterias fotosintéticas con los métodos de transformación y electroporación comunmente utilizados. Debido a esto, se han tenido que desarrollar diferentes metodologías como la conjugación diparental, para conseguir la movilización de DNA con alta eficiencia en estos organismos.

En el presente estudio, las mutantes poligancho y MNM1 generadas por la inserción de Tn5, se obtuvieron con una frecuencia de 2:600, mucho mayor que las frecuencias reportadas de 1-10:100000

(Donohue y Kaplan, 1991). El hecho de que las mutantes obtenidas crecieran en condiciones tanto fotosintéticas como aeróbicas, y a la misma velocidad que la cepa silvestre fue un buen indicio de que se había mutado específicamente un gen flagelar, y que la incapacidad de las bacterias para nadar no era el resultado de una mutación en alguna ruta metabólica, por ejemplo, que pudiera afectar de manera indirecta la síntesis de flagelo.

Para la selección de las mutantes se utilizaron diferentes criterios, resultando la microscopía electrónica una herramienta indispensable para la asignación de fenotipos.

El presente trabajo constituye el primer aislamiento de una mutante poligancho en *R. sphaeroides*. Gracias a esto, se logró purificar la proteína del gancho con un alto grado de pureza que se evidenció a través de diferentes criterios. Por otro lado, con la secuencia N-terminal de FlgE así como con una secuencia de aminoácidos interna, se diseñaron oligonucleótidos que podrán ser utilizados para la localización y amplificación del gen estructural del gancho.

Después de la obtención de las mutantes no móviles, resultó muy ventajoso el contar con una biblioteca genómica de DNA, con lo que se logró identificar el fragmento de DNA que complementaba la MPG, y que por lo tanto, contenía al gen de interés. A partir de este punto, el trabajo se centró en la subclonación del cósmido c140.

Clonación del gen responsable del fenotipo poligancho

Con estudios de hibridación tipo Southern se identificaron fragmentos de c140 que contenían el gen de interés. Tal es el caso del inserto *Sall* de la construcción pBG0404.

En la figura 20 se muestra el total de pares de bases secuenciadas hacia los dos extremos del sitio de inserción del transposón, sin embargo, sólo un porcentaje pequeño de las bases corresponde al gen interrumpido en la mutante poligancho. Recientemente se identificó en el laboratorio el sitio de inserción

del transposón de una mutante Fla denominada C15, en la que no existe ninguna estructura flagelar visible (ver *figura 20*). Es decir, gran parte de la secuencia que se obtuvo corresponde a la del gen aledaño al de la MPG.

Al realizar la traducción a aminoácidos en las diferentes fases de lectura, se encontró un marco de lectura abierto con un codón de inicio cercano al sitio de inserción de *TnpHoA*, lo que pudiera indicar que todavía falta gran parte del gen por ser secuenciado.

Para terminar de secuenciar el extremo 3' de dicho gen se diseñó el oligonucleótido MPH4 como se muestra en la *figura 20*, el cual se utilizará para secuenciar el DNA de la subclona *Sall/EcoRI* (pBG0206).

¿El gen mutado en *R. sphaeroides* es el homólogo a *fliK* de *S. typhimurium* y *E. coli*?

Se realizaron experimentos de hibridación heteróloga utilizando como sonda al gen *fliK* de *S. typhimurium*, y no fue posible detectar alguna señal. Este primer resultado podía simplemente reflejar la diferencia de contenido G-C entre estos organismos, o bien que no existía un gen homólogo en *R. sphaeroides*.

Por otro lado, el alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida del gen mutado en *R. sphaeroides* con las proteínas *FliK* de *E. coli* y *S. typhimurium*, no muestra que existan datos significativos de que se trate de estructuras homólogas como se observa en la *figura 21*. Sin embargo, aun no contamos con toda la secuencia del gen de *R. sphaeroides*, por lo que la zona que se esta analizando pudiera ser una zona variable del gen homólogo a *fliK*. De cualquier forma, no se puede descartar la posibilidad de que exista un producto génico diferente, que esté involucrado en el proceso y que aun no se haya identificado en las bacterias entéricas.

Por otro lado, se tiene que considerar lo siguiente:

Los genes *fliK* de *E. coli* y *S. typhimurium* han sido clonados y secuenciados (Bartlett y Matsumura, 1984; Kawagishi, 1990), y la secuencia de aminoácidos indica que las proteínas no se parecen mucho entre estas dos especies (50%), en comparación con otras proteínas flagelares como las del switch que presentan hasta 95% de identidad (Figura 22). Por otro lado, la mayor similitud entre ambas proteínas se observa en la región C-terminal, que es la más conservada.

Por otra parte, la construcción pTB0515 contiene 5.3 kb de DNA de la cepa silvestre *R. sphaeroides* 2.4.1. Dicha clona contiene un fragmento del gen *fliH*, el gen *fliI* y el gen *fliJ*, que se encuentran organizados dentro de un operón (Ballado y col., 1996). Si consideramos la organización cromosomal de dichos genes en *E. coli* y *S. typhimurium*, *fliK* debería corresponder al último gen de ese operón.

Recientemente en el laboratorio se obtuvo la secuencia nucleotídica del fragmento de DNA adyacente a los genes *fliH*, *fliI* y *fliJ* de pTB0515, encontrándose una zona de secuencia idéntica a la obtenida en la clona pTnM20, por lo que el gen responsable del fenotipo poligancho se localiza en pTB0515.

De esta manera, resulta altamente probable, dada la organización cromosomal de los genes en pTB0515, que sea un gen *fliK* homólogo al de bacterias entéricas el que se encuentre mutado en *R. sphaeroides*.

Sin embargo, resultados preliminares del presente trabajo indicaron que la construcción pTB0515 no se digería con la enzima de restricción *SalI*, sitio que debería existir en caso de que el gen *fliK* estuviera en pTB0515. Este resultado contradictorio en cuanto a la ausencia del sitio *SalI* en el fragmento de 5.3 kb, se puede explicar de la siguiente manera: el fragmento de 5.3 kb se obtuvo de la cepa *R. sphaeroides* 2.4.1, y la clona pTnM20 se obtuvo de *R. sphaeroides* WS8; en ambas cepas no existen los mismos sitios de restricción.

Por lo anterior, podemos concluir que es muy probable que el gen localizado en pTB0515 y pBG0404 corresponda a *fliK*.

Resultados de Complementación

El hecho de que en los experimentos de complementación, en los que al introducir en la mutante poligancho las construcciones pTB0515, pBG0405 y pBG0503 que contienen al gen silvestre completo, no se reestablezca la movilidad, se puede explicar debido a que las construcciones se encuentren clonadas en la orientación incorrecta.

El vector pRK415 contiene al promotor de lactosa y de tetraciclina, ambos en la misma dirección; por lo que se requiere que el gen clonado en dicho vector contenga su propio promotor, o bien sea clonado en la orientación que permita su expresión (Shah y Sockett, 1995). Si *fliK* de *R. sphaeroides* se encuentra al final del operón *fliF* como en las entéricas, el promotor no se localiza en ninguna de las construcciones.

Actualmente se trabaja en la reorientación de dichas clonas con lo que se espera obtener el restablecimiento del fenotipo silvestre en la mutante.

Mecanismo de Regulación de la Longitud del Gancho

Como se mencionó en la introducción, inicialmente se creyó que la regulación del tamaño del gancho dependía de la proteína monomérica FlgE, sin embargo, diferentes estudios indicaron que no es una modificación bioquímica de FlgE la responsable de regular la longitud de dicha estructura. De hecho, el gen *fliK* ha sido hasta ahora el único identificado como directamente responsable de generar ganchos de tamaños anormales (Silverman y Simon, 1972; Patterson-Delafield, 1973). Sin embargo, se desconoce el mecanismo mediante el que ocurre dicha regulación.

Desde este punto de vista, resulta importante el contar con una mutante poligancho en un organismo uniflagelado, con un gancho recto. Es decir, el aislamiento de una mutante poligancho en *R. sphaeroides* indica que a pesar de ser un organismo con un flagelo estructural y funcionalmente distinto, así como con un mecanismo de movimiento diferente, la biogénesis de la estructura involucra

mecanismos semejantes.

El modelo hasta ahora más aceptado en cuanto al mecanismo utilizado por la proteína FliK para regular la longitud del gancho es el propuesto por Kutsukake y col., (1994), que se basa en la siguiente serie de evidencias:

Existen mutantes supresoras intragénicas que generan un fenotipo pseudo-revertante poligancho-filamento, es decir se restablece sólo uno de los defectos ocasionados por la mutación de *fliK* (Hirano y col., 1994). De esto se concluye que la proteína FliK se encuentra involucrada tanto en el proceso de regulación de la longitud del gancho, como en el de síntesis del filamento.

Por otro lado, el mismo grupo reportó la existencia de supresoras intergénicas que mapean en el gen *flhB*, lo que también implica a FlhB en el inicio de la formación del filamento. De estos experimentos se concluye que el proceso de regulación del tamaño del gancho involucra no sólo la terminación de la elongación del gancho, sino la iniciación de la síntesis del filamento, teniendo *fliK* un papel dual al intervenir en ambos procesos.

El análisis de la secuencia de diferentes mutaciones en *fliK*, y de sus correspondientes pseudo-revertantes intragénicas, indican que los extremos amino y carboxilo terminales pueden tener diferentes funciones (Williams, 1995). Se observa que mutaciones en la región C-terminal del gen producen un poligancho incapaz de ensamblar filamento, mientras que una interrupción en el extremo correspondiente al N-terminal genera poliganchos que retienen cierta capacidad de ensamblaje de flagelina (Williams, 1995). Debido a esto, se propone que FliK presenta dos dominios que se pueden distinguir en la secuencia de aminoácidos, y que se encuentran separados por una región central rica en prolina como se muestra en la *figura 22*.

Por otra parte, se demuestra que la proteína FlhB consiste de dos regiones estructuralmente diferentes, con el extremo N-terminal hidrofóbico en la membrana y una región C-terminal hidrofílica (Minamino y col., 1994).

Por último, en el proceso de ensamblaje flagelar, existe una proteína cuya exportación depende de la formación correcta del

gancho. La proteína FlgM es un factor anti-sigma que previene la expresión de los genes tardíos hasta que el gancho este correctamente ensamblado. En este punto, FlgM es exportado hacia el exterior celular (Hughes y col., 1993; Kutsukake, 1994).

Con todos estos datos se propuso el siguiente modelo: La proteína FlhB presenta dos dominios, la región hidrofóbica que es esencial para el proceso de ensamblaje de las proteínas del eje y del gancho, y la región hidrofílica que se encarga de inhibir la exportación de la proteína FlgM. A su vez, la proteína FliK presenta dos dominios, uno de los cuales se encarga de monitorear, a través de un mecanismo desconocido, la longitud del tamaño del gancho; y el otro que es el encargado de interactuar con el extremo C-terminal de FlhB, permitiendo la exportación de FlgM y por tanto la síntesis de flagelina (Kutsukake y col., 1994).

El modelo antes expuesto implica que debe existir un mecanismo que pueda monitorear el grado de ensamblaje del gancho; y predice que FliK tiene la capacidad de apagar la exportación de la proteína FlgE y prender la de FlgM, en un punto específico del proceso de ensamblaje flagelar: la construcción de un gancho de tamaño definido. Sin embargo, continúa abierta la pregunta acerca del mecanismo que registra la longitud del gancho.

Por otro lado, si el presente modelo fuera correcto, implicaría que en *R. sphaeroides* debe existir FlgM, y que por lo tanto, la regulación de la expresión de los genes flagelares pudiera ser un mecanismo muy parecido al de bacterias entéricas.

Existen muchos estudios interesantes a realizar con la proteína responsable del fenotipo poligancho, entre los que se encuentra la localización celular de la proteína, lo que ayudaría a entender el mecanismo que se utiliza para regular la longitud del gancho.

Por otro lado, se podría estudiar la interacción de FliK con otras proteínas del sistema flagelar que pudieran estar involucradas en el proceso de regulación de la longitud del gancho. Por ejemplo, sería muy interesante conocer si existe alguna interacción directa con la proteína FlgE que codifica para el monómero del gancho, o bien corroborar que existe interacción con

la proteína FlhB. Debido a esto resulta también importante la obtención de mutantes supresoras en *R. sphaeroides*, con lo que se podrían encontrar otros productos génicos que estuvieran involucrados en dicho proceso.

Como se mencionó anteriormente, la mutante poligancho permitió la purificación de la proteína FlgE, lo que facilitará por una parte la clonación del gen, y por otra, la caracterización bioquímica del monómero en esta especie cuyo gancho es recto. Es decir, la organización tridimensional de las subunidades de gancho pudiera ser diferente a la de bacterias entéricas. Estos estudios se pueden realizar con reconstrucción de imágenes a partir de las micrografías electrónicas de la proteína del gancho obtenida de MPG. A su vez, la generación de anticuerpos anti la proteína FlgE servirán para la caracterización de fenotipos en otras mutantes Fla⁻, en las que no se pueda distinguir al microscopio electrónico la presencia del gancho; así como para experimentos quimiotácticos de rotación flagelar, en los que se adhieren las células a un portaobjetos a través de los anticuerpos. Con esta metodología se puede observar la rotación flagelar en respuesta a diferentes estímulos.

Por último, con el enfoque experimental utilizado se podrán estudiar a largo plazo aspectos interesantes como la organización cromosomal y la regulación de la expresión de los genes flagelares en *R. sphaeroides*.

En conclusión, el presente trabajo representa un acercamiento importante en el estudio de la biogénesis flagelar en *Rhodobacter sphaeroides*.

REFERENCIAS

- Adler, J. (1966) Chemotaxis in bacteria. *Science* **153**: 708-716
- Alex, L.A. y Simon, M.I. (1994) Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *TIG* **10**
- Armitage, J.P. (1992a) Behavioral responses in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **54**: 683-714
- Armitage, J.P. (1992b) Bacterial motility and chemotaxis. *Sci. Progress Oxford.* **76**: 451-477
- Armitage, J.P. y Macnab, R.M. (1987) Unidirectional intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **169**: 514-518
- Armitage, J.P. (1988) Tactic responses in photosynthetic bacteria. *Can. J. Microbiol.* **34**: 475-481
- Armstrong, J.B. y Adler, J. (1967) Genetics of motility in *Escherichia coli*: Complementation of paralyzed mutants. *Genetics* **56**: 363-373
- Ballado, T., Campos, A., Camarena, L. y Dreyfus, G. (1996) Flagellar genes from *Rhodobacter sphaeroides* are homologous to genes of the *fliF* operon of *Salmonella typhimurium* and to the type III secretion system. *Gene* (en prensa)
- Barak, R. y Eisenbach, M. (1992) Correlation between phosphorylation of the chemotaxis protein CheY and its activity at the flagellar motor. *Biochemistry* **31**: 1821-1826
- Bartlett, D.H. y Matsumura, P. (1984) Identification of *Escherichia coli* Region III flagellar gene products and description of two new flagellar genes. *J. Bacteriol.* **160**: 577-585
- Berg, H.C. y Brown, D.A. (1972) Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature* **239**: 500-504
- Berg, H.C. (1974) Dynamic properties of bacterial flagellar motors. *Nature* **249**: 77-79
- Berry, R.M. (1993) Torque and switching in the bacterial flagellar motor. An electrostatic model. *Biophys. J.* **64**: 961-973
- Blair, D.F. y Berg, H.C. (1990) The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor. *Cell* **60**: 439-449

- Blair, D.F. y Dutcher, S.K. (1992) Flagella in prokaryotes and lower eukaryotes. *Curr. Op. Genet. Develop.* **2**: 756-767
- Blat, Y. y Eisenbach, M. (1994) Phosphorylation-Dependent Binding of the Chemotaxis Signal Molecule CheY to Its Phosphatase, CheZ. *Biochemistry* **33**: 902-906
- Brown, S., Poole, P.S., Jeziorska, W. y Armitage, J.P. (1993) Chemokinesis in *Rhodobacter sphaeroides* is the result of a long term increase in the rate of flagellar rotation. *Biochim. Biophys. Acta* **1141**: 309-312
- Chun, S.Y. y Parkinson, J.S. (1988) Bacterial Motility: Membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein. *Science* **239**: 276-278
- Clayton, R.K. y Sistrom, W.R. (1978) *The Photosynthetic Bacteria*. New York y London. Plenum Press
- Cohen-Bazire, G., Sistrom, W.R. y Stanier, R.Y. (1957) Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Comp. Cell. Physiol.* **49**: 25-68
- Colin, J.I. y Armitage, J.P. (1987) Involvement of Transport in *Rhodobacter sphaeroides* Chemotaxis. *J. Bacteriol.* **169**: 5801-5807
- Dean, G.E., Macnab, R.M., Stader, J., Matsumura, P. y Burks, C. (1984) Gene sequence and predicted amino acid sequence of the MotA protein, a membrane-associated protein required for flagellar rotation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **159**: 991-999
- DePamphilis, M.L. y Adler, J. (1971) Attachment of flagellar basal bodies to the cell envelope: Specific attachment to the outer, lipopolysaccharide membrane and the cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* **105**: 396-407
- Donohue, T.J. y Kaplan, S. (1991) Genetic Techniques in Rhodospirillaceae. *Methods in Enzymology* **204**: 459-485
- Dreyfus, G., Williams, A.W., Kawagishi, I. y Macnab, R.M. (1993) Genetic and biochemical analysis of *Salmonella typhimurium* Flit, a flagellar protein related to the catalytic subunit of F₁F₀ ATPase and to virulence proteins of mammalian and plant pathogens. *J. Bacteriol.* **175**: 3131-3138
- Driks, A. y DeRosier, D.J. (1990) Additional structures associated with bacterial flagellar basal body. *J. Mol. Biol.* **211**: 669-672.
- Eisenbach, M. (1990) Functions of the flagellar modes of rotation in bacterial motility and chemotaxis. *Mol. Microbiol.* **4**: 161-167
- Fahrner, K.A., Block, S.M., Krishnaswamy, S., Parkinson, J.S. y Berg, H.C. (1994) A mutant hook-associated protein (HAP3) facilitates torsionally induced transformations of the flagellar filament of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **238**: 173-186

- Francis, N.R., Irikura, V.M., Yamaguchi, S., DeRosier, D.J. y Macnab, R.M. (1992) Localization of the *Salmonella typhimurium* flagellar switch protein Flig to the cytoplasmic M-ring face of the basal body. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 6304-6308
- Godchaux, W., Gorski, L. y Leadbetter, E.R. (1990) *J. Bacteriol.* **172**: 1250
- Gudrun, L.S. y Stock, J.B. (1993) Response regulation in bacterial chemotaxis. *Journal of Cellular Biochemistry.* **51**: 41-46
- Harrison, D.M., Packer, H.L. y Armitage, J.P. (1994) Swimming speed and chemokinetic response of *Rhodobacter sphaeroides* investigated by natural manipulation of the membrane potential. *FEBS Lett.* **348**: 37-40
- Hazelbauer, G.L., Berg, H. C. y Matsumura, P. (1993) Bacterial Motility and Signal Transduction. *Cell* **73**, 15-22.
- Helmann, J.D., Marquez, L.M. y Chamberlin, M.J. (1988) Cloning, sequencing, and disruption of the *Bacillus subtilis* σ^H gene. *J. Bacteriol.* **170**: 1568-1574
- Mirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K. y Aizawa, S-I. (1994) Roles of FliK and FlhB in determination of hook length in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**: 5439-5449
- Nirotta, N., Kitada, M. y Imae, Y. (1981) Flagellar motors of alkalophilic *Bacillus* are powered by an electrochemical potential gradient of Na⁺. *FEBS Lett.* **132**: 278-280
- Homma, M. y Iino, T. (1985) Locations of hook-associated proteins in flagellar structures of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **162**: 183-189
- Homma, M., DeRosier, D.J. y Macnab, R.M. (1990a) Flagellar hook and hook-associated proteins of *Salmonella typhimurium* and their relationship to other axial components of the flagellum. *J. Mol. Biol.* **213**: 819-832
- Homma, M., Kutsukake, K., Hasebe, M., Iino, T. y Macnab, R.M. (1990b) FlgB, FlgC, FlgF y FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **211**: 465-477
- Huang, C. y Stewart, R.C. (1993) CheZ mutants with enhanced ability to dephosphorylate CheY, the response regulator in bacterial chemotaxis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1202**: 297-304
- Hughes, K.T., Gillen, K.L., Semon, M.J. y Karlinsey, J.E. (1993) Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science.* **262**: 1277-1280

- Iino, T. (1969) Polarity of flagellar growth in *Salmonella*. J. Gen. Microbiol. **56**: 227-239
- Ikeda, T., Homma, M., Iino, T., Asakura, S. y Kamiya, R. (1987) Localization and stoichiometry of hook-associated proteins within *Salmonella typhimurium* flagella. J. Bacteriol. **169**: 1168-1173.
- Irikura, V.M., Kihara, M., Yamaguchi, S., Sockett, H. y Macnab, R.M. (1993) *Salmonella typhimurium* *fliG* and *fliN* mutations causing defects in assembly, rotation and switching of the flagellar motor. J. Bacteriol. **175**: 802-810
- Jones, C.J., Macnab, R.M., Okino, H. y Aizawa, S-I. (1990) Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*. J. Mol. Biol. **212**: 377-387
- Jones, C.J. y Aizawa S-I. (1991) The Bacterial Flagellum and Flagellar Motor: Structure, Assembly and Function. Adv. Microb. Physiol. **32**: 110-172
- Kagawa, H., Owaribe, K., Asakura, S. y Takahashi, N. (1976) Flagellar hook protein from *Salmonella* SJ25. J. Bacteriol. **125**: 68-73
- Kato, S., Okamoto, M. y Asakura, S. (1984) Polymorphic transition of the flagellar polyhook from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. J. Mol. Biol. **173**: 463-476
- Kawagishi, I. (1990) Studies on *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* genes of flagellar region III involved in the formation of the axial structure of the flagellum. Tesis Ph. D. 149 pp.
- Kawagishi, I., Muller, V., Williams, A.W., Irikura, V.M. y Macnab, R.M. (1992) Subdivision of flagellar region III of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* chromosomes and identification of two additional flagellar genes. J. Gen. Microbiol. **138**: 1051-1065
- Khan, S. (1993) Gene to Ultrastructure: The Case of the Flagellar Basal Body. J Bacteriol. **175**: 2169-2174
- Kleene, J.S., Hobson, C.A., y Adler, J. (1979) Attractants and repellents influence methylation and demethylation of methyl-accepting chemotaxis proteins in an extract of *Escherichia coli*. Biochemistry. **76**: 6309-6313
- Komeda, Y., Suzuki, H., Ishidsu, J.I. y Iino, T. (1975) The role of cAMP in flagellation of *Salmonella typhimurium*. Mol. Gen. Genet. **142**: 289-298
- Kondoh, H. y Yanagida, M. (1975) J. Mol. Biol. **96**, 641-652

- Kornacker, M.G. y Newton, A. (1994) Information essential for cell-cycle-dependent secretion of the 591-residue *Caulobacter* hook protein is confined to a 21-amino-acid sequence near the N-terminus. *Mol. Microbiol.* **14**: 73-85
- Kubori, T., Shimamoto, N., Yamaguchi, S., Namba, K. y Aizawa, S-I. (1992) Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **226**: 433-446
- Kuo, S. y Koshland, D. Jr. (1987) Roles of *cheY* and *cheZ* gene products in controlling flagellar rotation in bacterial chemotaxis of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 1307-1314
- Kutsukake, K. (1994) Excretion of the anti-sigma factor through a flagellar structure couples flagellar gene expression with flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* **243**: 605-612
- Kutsukake, K. y Iino, T. (1994) Role of the FliA-FlgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**: 3598-3605
- Kutsukake, K., Minamino, T. y Yokoseki, T. (1994) Isolation and characterization of FliK-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**: 7625-7629
- Kutsukake, K., Ohya, Y. y Iino, T. (1990) Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **172**: 741-747
- Kuwajima, G., Kawagishi, I., Honma, M., Asaka, J.I., Kondo, E. y Macnab, R.M. (1989) Export of an N-terminal fragment of *Escherichia coli* flagellin by a flagellum-specific pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 4953-4957
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680
- Larsen, S.H., Adler, J., Gargus, J.J. y Hogg, R.W. (1974) Chemomechanical coupling without ATP: The source of energy for motility and chemotaxis in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71**: 1239-1243
- Losick, R. y Shapiro, L. (1993) Checkpoints that couple gene expression to morphogenesis. *Science* **262**: 1227-1228.
- Macnab, R.M. (1977) Bacterial flagella rotating in bundles: A study in helical geometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 221-225

Macnab, R.M. (1987a) Flagella. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, F.C. Neidhardt, J. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H.E. Umbarger (eds.) 1: 70-83. American Society for Microbiology Publications, Washington, DC.

Macnab, R.M. (1987b) Motility and Chemotaxis. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. Primera Edición. F.C. Neidhardt (Ed. en jefe) American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Macnab, R.M. (1992) Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 129-156

Macnab, R.M. (1995a) Flagella and motility. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, Segunda Edición. F.C. Neidhardt (Ed. en jefe) American Society for Microbiology, Washington, D.C. (en prensa)

Macnab, R.M. (1995b) Flagellar switch. En: Two-Component Signal Transduction, J.A. Hoch and T.J. Silhavy, (eds.) pp. 181-199. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Macnab, R.M. y Aizawa, S-I. (1984) Bacterial motility and the bacterial flagellar motor. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **13**: 51-83

Macnab, R.M. y DeRosier, D.J. (1988). Bacterial flagellar structure and function. *Can. J. Microbiol.* **34**: 442-451

Macnab, R.M. y Koshland, D.E., Jr. (1972) The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**: 2509-2512

Matsudaira, P. (1987). Sequence from Picomole Quantities of Proteins Electroblotted onto Polyvinylidene Difluoride Membranes. *J. Biol. Chem.* **262** (21): 10035-10038

Miller, L. y Kaplan, S. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* **187**, 229

Minamino, T., Iino, T. y Kutsukake, K. (1994) Molecular characterization of the *Salmonella typhimurium* *flhB* operon and its protein products. *J. Bacteriol.* **176**: 7630-7637

Moore, M.D. y Kaplan, S. (1989) Construction of *TnphoA* gene fusions in *Rhodobacter sphaeroides*: isolation and characterization of a respiratory mutant unable to utilize dimethyl sulphoxide as a terminal electron acceptor during anaerobic growth in the dark on glucose. *J. Bacteriol.* **171**: 4385-4394

Morgan, D.G., Macnab, R.M., Francis, N.R. y DeRosier, D.J. (1993) Domain organization of the subunit of the *Salmonella typhimurium* flagellar hook. *J. Mol. Biol.* **229**: 79-84

- Morgan, D.G., Owen, C., Melanson, L.A. y DeRosier, D.J. (1995) The 11 Å structure of bacterial flagellar filaments: Packing of the helices. *J. Mol. Biol.* (en prensa)
- Muller, V., Jones, C.J., Kawagishi, I., Aizawa, S.-I. y Macnab, R.M. (1992) Characterization of the *fliE* genes of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* and identification of FliE protein as a component of the flagellar hook-basal body complex. *J. Bacteriol.* **174**: 2298-2304
- Namba, K., Yamashita, I. y Vonderviszt, F. (1989) Structure of the core and central channel of bacterial flagella. *Nature.* **342**: 648-654
- Ohnishi, K., Ohto, Y., Aizawa, S.-I., Macnab, R.M. y Iino T. (1994) FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**: 2272-2281
- Packer, H.L. y Armitage, J.P. (1993) The Unidirectional Flagellar Motor of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 Can Rotate Either Clockwise or Counterclockwise: Characterization of the Flagellum under Both Conditions by Antibody Decoration. *J. Bacteriol.* **175**: 6041-6045
- Packer, H.L. y Armitage, J.P. (1994) The Chemokinetic and Chemotactic Behavior of *Rhodobacter sphaeroides*: Two Independent Responses. *J. Bacteriol.* **176**: 206-212
- Parkinson, J.S. (1993) Signal Transduction Schemes of Bacteria. *Cell.* **73**: 857-871
- Patterson-Delafield, J., Martínez, R.J., Stocker, B.A.D. y Yamaguchi, S. (1973) A new *fla* gene in *Salmonella typhimurium-flaR-* and its mutant phenotype-superhooks. *Arch. Microbiol.* **90**: 107-120
- Pfennig, N. y Truper, H.G. (1989) Anoxigenic Phototrophic bacteria. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 3*. (Editores. Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. y Holt, J.G.) Williams y Wilkins Co. altimore 1635-1709
- Poole, P.S., Brown, S. y Armitage, J.P. (1990) Potassium chemotaxis in *Rhodobacter sphaeroides* *FEBS Lett.* **260** (1): 88-90
- Poole, P.S., Smith, M.J. y Armitage, J.P. (1993) Chemotactic signalling in *Rhodobacter sphaeroides* requires metabolism of attractants. *J. Bacteriol.* **175**: 291-294
- Power, M.E., Alm, R.A. y Trust, J.T. (1992) Biochemical and Antigenic Properties of the *Campylobacter* Flagellar Hook Protein. *J. Bacteriol.* **174**: 3874-3883
- Sanger, F., Niklen, S. y Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5463-5467

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shah, D.S. y Sockett, E. (1995) Analysis of the *motA* flagellar motor gene from *Rhodobacter sphaeroides*, a bacterium with a unidirectional, stop-start flagellum. *Mol. Microbiol.* **17**: 961-969
- Shapiro, L. (1995) The Bacterial Flagellum: From Genetic Network to Complex Architecture. *Cell.* **80**: 525-527
- Silva-Herzog, E. y Dreyfus, G. (1995) El flagelo: Organelo locomotor de bacterias. *Ciencia.* **46**: 46-63
- Silverman, M.R. y Simon, M.I. (1972) Flagellar assembly mutants in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **112**: 986-993
- Silverman, M. y Simon, M. (1974a) Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature* **249**: 73-74
- Silverman, M. y Simon, M. (1974b) Characterization of *Escherichia coli* flagellar mutants that are insensitive to catabolite repression. *J. Bacteriol.* **120**: 1196-1203.
- Silverman, M. y Simon, M. (1976) Operon controlling motility and chemotaxis in *E. coli*. *Nature* **264**: 577-580
- Sistrom, W.R. (1960) A requirement for sodium in the growth of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J. Gen. Microbiol.* **22**: 778-785
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.H. y Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using Bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85
- Sockett, R.E. y Armitage, J.P. (1991) Isolation, characterisation, and complementation of a paralyzed flagellar mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8. *J. Bacteriol.* **173**: 2786-2790
- Sockett, R.E., Armitage, J.P. y Evans, M.C.W. (1987) Methylation-independent and methylation-dependent chemotaxis in *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **169**: 5808-5814
- Sockett, R.E., Foster, J.C.A. y Armitage, J.P. (1990) Molecular biology of the *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. *FEMS Symp.* **53**: 473-479
- Sockett, H., Yamaguchi, S., Kihara, M., Irikura, V.M. y Macnab, R.M. (1992) Molecular analysis of the flagellar switch protein FliM of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **174**: 793-806
- Southern, E.M. (1975) *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517

Stock, J.B., Surette, M.G., McCleary, W.R. y Stock, A.M. (1992) Signal Transduction in Bacterial Chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **267**, 28: 19753-19756

Susuki, T. y Iino, T. (1981) Role of the *fliA* gene in flagellar hook formation in *Salmonella* spp. *J. Bacteriol.* **148**: 973-979

Swanson, R.V., Schuster, S.C. y Simon, M.I. (1993) Expression of CheA Fragments Which Define Domains Encoding Kinase, Phosphotransfer, and CheY Binding Activities. *Biochemistry* **32**: 7623-7629

Trachtenberg, S. y DeRosier, D.J. (1987) Three-dimensional structure of the frozen-hydrated flagellar filament. The left-handed filament of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **195**: 581-601

Vogler, A.P., Homma, M., Irikura, V.M. y Macnab, R.M. (1991) *Salmonella typhimurium* mutants defective in flagellar filament regrowth and sequence similarity of FliI to F₀F₁, vacuolar, and archaeobacterial ATPase subunits. *J. Bacteriol.* **173**: 3564-3572

Wagenknecht, T., DeRosier, D., Shapiro, L. y Weissborn, A. (1981) Three-dimensional reconstruction of the flagellar hook from *Caulobacter crescentus*. *J. Mol. Biol.* **151**: 439-465

Ward, M.J., Harrison, D.M., Ebner, M.J. y Armitage, J.P. (1995a) Identification of a methyl-accepting chemotaxis protein in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* **18**(1): 115-121

Ward, M.J., Bell, A.W., Hamblin, P.A., Packer, H.L. y Armitage, J.P. (1995b) Identification of a chemotaxis operon with two *cheY* genes in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* **17**(2): 357-366

Williams, A. W. (1995) The Roles of FliI, FliK and FlhB in the Export and Assembly of the Bacterial Flagellum. Tesis PhD 158 pp.