6

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

FACULTAD DE MEDICINA-INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

" CARACTERIZACION Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN fliC(FLAGELINA EN Rhodobacter sphaeroides"

296595

T E S I S :
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

LIC. EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BASICA.

P R E S E N T A :

NAIKA GEORGINA RUEDA SÁNCHEZ

MÉXICO,D.F. **2001**

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS ---------- i

RESUMEN ---------- iii

INTRODUCCIÓN

-Generalidades ---------- 1

-Estructura del flagelo ---------- 7

-Expresión de genes flagelares ---------- 13

-*Rhodobacter sphaeroides* ---------- 15

OBJETIVOS ---------- 18

MATERIAL Y MÉTODO

-Cepas bacterianas

-*Escherichia coli* ---------- 19

-*Rhodobacter sphaeroides* ---------- 19

-Plásmidos empleados ---------- 19

-Condiciones de cultivo ---------- 20

-Transformación por CaCl ---------- 20

-Conjugación bi o triparental ---------- 21

-Purificación de plásmidos:

-Miniprep hervidos ---------- 22

-Lisis alcalina ---------- 22

-Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa ---------- 23

-Extracción de DNA cromosomal ---------- 23

-Southern Blot ---------- 24

-Western Blot ---------- 27

-Purificación de RNA total ---------- 29

-Northern Blot ---------- 30

-Purificación de cadena sencilla para secuenciación ---------- 34

-Secuenciación de DNA por el método de Sanger ---------- 35

-Determinación de la actividad de β-glucuronidasa ---------- 36

-Concentración de proteínas por medio del reactivo de Bradford ---------- 38

-Amplificación de DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa 38

RESULTADOS

-Identificación y secuenciación del gen *fliC* de *R. sphaeroides* WS8 ------- 40

-Análisis de las secuencias río arriba y río abajo del gen *fliC* ---------- 42

-Funcionalidad del gen *fliC* ---------- 43

-Identificación y secuenciación del ORF ubicado río abajo del gen *fliC* ------- 46

-Actividad de sigma 54 en la cepa $FliC^-_b$ ---------- 50

-Caracterización del promotor del gen *fliC* de *R. sphaeroides* ---------- 52

-Actividad del promotor de *fliC* dependiente del factor σ^{28} en mutantes flagelares de *E. coli* ---------- 55

-Actividad del promotor *fliCp* dependiente del factor σ^{28} en cepas mutantes de *R. sphaeroides* ---------- 56

DISCUSIÓN ---------- 60

CONCLUSIONES ---------- 67

PERSPECTIVAS ---------- 67

APENDICE A ---------- 68

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ---------- 63

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Quimioefectores atrayentes y repelentes para *E. coli* ---------- 5

Tabla 2. Características de los tres dominios de la flagelina ---------- 9

Tabla 3. Quimioefectores atrayentes y repelente para *R. sphaeroides* ---------- 17

Figura 1. Esquema general del flagelo bacteriano ---------- 2

Figura 2. Arreglos flagelares ---------- 3

Figura 3. Esquema de las proteínas involucradas en la quimiotaxis bacteriana -------- 5

Figura 4. Esquema del mapa de densidad electrónica transversal al eje del filamento 9

Figura 5. Imagen de microscopía electrónica de la sección transversal al eje del filamento que muestra la arquitectura del mismo ---------- 10

Figura 6. Diagrama del arreglo estructural de la flagelina de *S. typhimurium* -------- 10

Figura 7. Mapa de densidad del filamento y su relación con los monómeros de flagelina 12

Figura 8. Proteínas flagelares que conforman al flagelo en enterobacterias -------- 13

Figura 9. Cascada jerárquica del regulón flagelar de *E. coli* ---------- 14

Figura 10. Mapa de restricción del plásmido pRS602 ---------- 40

Figura 11. Alineación de la proteína FliC de *R. sphaeroides* (LCNR-Sockett) ------- 41

Figura 12. Alineación de las secuencias río arriba y río abajo del gen *fliC* ------- 42

Figura 13. Esquema del plásmido pRS602 [*fliC::aad-uidA*] ---------- 44

Figura 14. Fotografía de una caja de swarm de WS8 vs mutantes FliC$^-$ ---------- 45

Figura 15. Fotografía de una caja de swarm de WS8 vs mutantes FliC$^-$ complementadas 46

Figura 16. Secuencia nucleotídica y traducción del gen *rpoN3* ---------- 47

Figura 17. Alineación de las cuatro proteínas σ^{54} del genoma de *R. sphaeroides* 2.4.1 48

Figura 18. Árbol de homología de las proteínas del factor σ^{54} encontrados en *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 ---------- 49

Figura 19. Comparación de RpoN2 y RpoN3 por matriz de punto ---------- 49

Figura 20. Esquema de la organización por dominios y regiones del factor σ^{54} de *E. coli* 50

Figura 21. Actividad de β-glucuronidasa expresada a partir del promotor del gen *fliO* dependiente de σ^{54} ---------- 51

Figura 22. Western Blot utilizando un anticuerpo anti-sigma 54 ---------- 52

Figura 23. Actividad de β-glucuronidasa expresada a partir del promotor del gen *fliC* dependiente de σ^{28} en *E. coli* ---------- 53
Figura 24. Actividad de β-glucuronidasa expresada a partir del promotor del gen *fliC* dependiente de σ^{28} en *R. sphaeroides* ---------- 54
Figura 25. Comparación de las regiones promotoras del gen *fliC* de *R. sphaeroides* y *E. coli* ---------- 54
Figura 26. Actividad de β-glucuronidasa expresada a partir del promotor del gen *fliC* dependiente de σ^{28} en mutantes FliK$^-$ y FliM$^-$ de *E. coli* ---------- 55
Figura 27. Actividad de β-glucuronidasa expresada a partir del promotor del gen *fliC* en las cepas mutantes de *R. sphaeroides* ---------- 57
Figura 28. Northern Blot del mRNA de *fliC* en la cepa WS8 y en las mutantes TE1 (*flgE::Tn5phoA*) y NG1 (*fliM::uidA-aad*) de *R. sphaeroides* ---------- 58
Figura 29. Actividad de β-glucuronidasa expresada a partir del promotor cromosomal del gen *fliC* en *R. sphaeroides* WS8 (cepa silvestre) y en las cepas mutantes TE1 (*flgE::Tn5phoA*) y SP5 (*fliMΔ1*) ---------- 59
Figura 30. Esquema de la predicción de la estructura secundaria de la flagelina de *Rhodobacter sphaeroides* ---------- 60
Figura 31. Comparación de la estructura de la flagelina de *R. sphaeroides* y *S. typhimurium* ---------- 61

DEDICATORIAS

A Narda:

La mejor amiga que cualquier persona pudiese tener. A la que admiro, respeto, amo y tengo la fortuna de decirle: MAMÁ.

A Aurelio:

La combinación perfecta de padre y amigo que siempre sabe ayudarme y apoyarme en todos los aspectos. Al que admiro por ser tal como es.

A Montserrat y Orsy:

Por ser tan originales y únicos. Ustedes me motivan para seguir creciendo.

DEDICATORIAS

A Narda:

La mejor amiga que cualquier persona pudiese tener. A la que admiro, respeto, amo y tengo la fortuna de decirle: MAMÁ.

A Aurelio:

La combinación perfecta de padre y amigo que siempre sabe ayudarme y apoyarme en todos los aspectos. Al que admiro por ser tal como es.

A Montserrat y Orsy:

Por ser tan originales y únicos. Ustedes me motivan para seguir creciendo.

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TRABAJO DE TESIS:

El presente estudio fue realizado en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., bajo la dirección de la Dra. Laura Camarena.

"Here is a test to find whether your mission in earth is finished or not:
If you are alive, it isn't."

RESUMEN

En este trabajo se identificó el gen que codifica para la flagelina (*fliC*) en *Rhodobacter sphaeroides*. Asimismo, se estudiaron los mecanismos que podrían estar involucrados en su regulación.

Mediante un estudio de hibridación tipo Southern Blot, se identificó un fragmento de DNA cromosomal de aproximadamente 6 kb que hibridó con una sonda de *fliC* obtenida a partir de la secuencia nucleotídica del gen *fliC* de *R. sphaeroides* depositada en Gene bank con número de acceso: CAA75001. La secuenciación de dicho fragmento, nos permitió identificar el gen *fliC*. El producto de este gen mostró una gran similitud (50%) con las flagelinas reportadas en otras bacterias. La funcionalidad del mismo fue comprobada al mutar por medio de recombinación homóloga el gen *fliC* de la cepa silvestre WS8, con una copia del mismo interrumpida por el cassette *uidA-aad*. Se obtuvieron dos mutantes de acuerdo a la orientación del cassette (i.e. $FliC^-_a$: *WS8 fliC::uidA-aad* y $FliC^-_b$: *WS8 fliC::aad-uidA*). Ambas mutantes son incapaces de nadar en medio líquido y tampoco en agar semi-sólido. Posteriormente, una copia del gen *fliC* completo fue introducida en estas cepas mutantes y el nado sólo fue recuperado en la mutante $FliC^-_a$. Esto sugiere que la mutante $FliC^-_b$, que contiene al alelo *fliC::aad-uidA*, tiene alguna mutación adicional que impide la complementación; ésta mutación adicional puede ser debida a una recombinación heteróloga al momento de insertar el gen mutado que ocasionaría la mutación de algún otro gen, o bien pudiese ser debida a una diferencia en la polaridad del cassette y que éste sólo ejerciera un efecto polar al insertarse en la orientación opuesta a la transcripción del gen *fliC*. Esta última interpretación se encuentra parcialmente sustentada en el hecho de que un fragmento que expresa *fliC* y el gen río abajo, es capaz de complementar a la cepa $FliC^-_b$ (*fliC::aad-uidA)*.

Con el objeto de determinar la identidad del gen cuya expresión podría estar afectada por la mutación *fliC::aad-uidA*, se secuenció río abajo del codon de término del gen de la flagelina y se encontró una secuencia que muestra gran similitud con el gen que codifica para el factor sigma 54 en varias especies bacterianas. El producto de este gen mostró un 40% de similitud con uno de los factores sigma 54 previamente reconocidos en *Rhodobacter sphaeroides*. Para evaluar el posible efecto polar que en la cepa $FliC^-_b$ podría ocurrir, se introdujo un plásmido de bajo número de copias con el gen reportero de la β-glucuronidasa expresado a partir de un promotor flagelar reconocido por el factor sigma 54. Los resultados mostraron que a pesar

de que el promotor es reconocido en la cepa silvestre produciendo así un alto nivel de β-glucuronidasa, en la cepa mutante no se observó ninguna actividad. Este resultado apoya la idea de que el promotor del cual depende la expresión del gen reportero no es reconocido en la cepa $FliC^-_b$.

En *R. sphaeroides* existen 4 diferentes genes que potencialmente codifican para factores sigma 54 funcionales, con el fin de determinar si en la cepa $FliC^-_b$ el nivel de expresión de sigma 54 se encontraba disminuido, se realizó un Western Blot usando anticuerpos anti sigma 54 de *Rhizobium meliloti*. En este ensayo se observó sólo una ligera disminución en la cantidad de sigma 54 en la cepa mutante $FliC^-_b$ (WS8 *fliC*::*aad-uidA)* con respecto a la cepa silvestre (WS8*)*. Los resultados anteriores sugieren que al menos uno de los otros genes que codifican para los factores sigma 54 en *R. sphaeroides* es expresado en estas condiciones, y éste es incapaz de reconocer al promotor flagelar dependiente de σ^{54}.

Por otra parte, se observó en la región 5' del inicio del gen *fliC* una secuencia similar al promotor consenso reconocido por el factor sigma 28 y se hipotetizó que éste podría ser el promotor funcional del gen *fliC*. Se decidió evaluar la actividad del gen reportero (*uidA*) regulada por el promotor del gen *fliC* de *R. sphaeroides* en *Escherichia coli*. Dicha construcción promueve un alto nivel de expresión del gene *uidA* en la cepa silvestre de *R. sphaeroides*; sin embargo, en *E. coli*, muestra escasa actividad. Este resultado podría ser interpretado en términos de las diferencias o cambios de nucleótidos entre las regiones consenso del promotor del gen *fliC* dependiente de sigma 28 de *R. sphaeroides* y las secuencias reconocidas por el factor sigma 28 de *E. coli*.

Por otro lado, se decidió evaluar si la expresión del gen *fliC* se encuentra regulada por la presencia de una estructura gancho-cuerpo basal funcional. Para ello se introdujo el plásmido que lleva el gen reportero bajo control del promotor del gen *fliC*, en la cepa silvestre WS8, así como en cepas con defectos en el switch ($FliM^-$) y en el gancho ($FlgE^-$) flagelar. La actividad de β-glucuronidasa observada parece indicar que las mutantes no reprimen la expresión de *fliC* como se ha observado en *E. coli*, sobre todo si notamos que la actividad de la mutante *fliMΔ1* cuadriplica la actividad de la cepa silvestre. Sin embargo, en un estudio de hibridación tipo Northern Blot (DNA-RNA), se observó que la cantidad de transcrito de flagelina es mucho menor en las cepas mutantes, sobre todo en la mutante *flgE*::Tn*5phoA*. Estos resultados sugerirían la

existencia de algún mecanismo de regulación post-traduccional que controla la vida media del mensajero de *fliC*. Sin embargo, no puede ser descartado un artefacto debido al efecto multicopia o a la estabilidad de la enzima β-glucuronidasa (GUS).

Por lo anterior, se evaluó la expresión de la construcción *fliC*::*uidA-aad* al reemplazar el gen *fliC* silvestre del cromosoma de las cepas WS8 (silvestre), SP5 (*fliMΔ1*) y TE1 (*flgE*::Tn*5phoA*). Los resultados obtenidos, muestran una actividad de beta-glucuronidasa que refleja los niveles de transcrito de flagelina observados en el Northern blot. Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo que controla negativamente la expresión de flagelina en ausencia de una estructura gancho-cuerpo basal funcional. Por otro lado, estos resultados también sugieren que esta regulación es enmascarada cuando la construcción *fliC*::*uidA-aad* se encuentra en plásmido, probablemente debido a un efecto multicopia.

Estos resultados apoyan la idea de la existencia de una cascada jerárquica en *R. sphaeroides* con tres niveles de organización en la cual los promotores del nivel II dependen del reconocimiento por el factor sigma 54 y los del nivel III dependen del factor sigma 28. El factor sigma 54 responsable de la expresión de los genes flagelares se encuentra expresado por el gen *rpoN* ubicado río abajo de *fliC*.

INTRODUCCIÓN

Generalidades

El movimiento bacteriano se conoce prácticamente desde el momento mismo en que Leeuwenhoek descubrió a las bacterias a finales del siglo XVII (1), pero ha tomado casi tres siglos el conocer algunas de las bases celulares y moleculares que regulan y permiten que las bacterias lleven a cabo este movimiento o nado.

Algunas bacterias son capaces de moverse gracias a que cuentan con filamentos helicoidales llamados flagelos, que funcionan como propelas insertadas en el cuerpo celular. Cada flagelo rota gracias a que cuenta con un motor que se encuentra embebido en la membrana, el cual utiliza como fuente energética el gradiente de protones (H^+) existente alrededor de la membrana celular. Las bacterias de la especie *Vibrio* (bacterias alcalófilas) aceptan Na^+ como donador de protones por tener ciertas modificaciones estructurales en su motor. Algunos mecanismos específicos y estructuras responsables para utilizar esta energía proveniente del flujo de protones, han sido descritos recientemente para enterobacterias y se discutirán más adelante (1,2).

Hay tres requisitos necesarios para el movimiento y la quimiotaxis de las bacterias: la presencia del aparato flagelar, la habilidad del flagelo para rotar, y la habilidad de las bacterias para ser atraídas hacia atractores o alejadas de los repelentes. Las abreviaturas que se han dado para estas funciones son fla, para la producción del flagelo (genes *flg*, *flh* y *fli*), mot, para la motilidad (*motA*, *motB* y algunos genes *fli*), y che, para la quimiotaxis (genes *che*)* (2), por lo que son varias las proteínas responsables de que la bacteria sea capaz de ensamblar su(s) flagelo(s) y poder rotarlo(s) para nadar.

El flagelo está constituido por tres estructuras principales (Fig. 1): un filamento helicoidal largo de aproximadamente 5-10 μm (equivalentes a 2-5 cuerpos celulares), el gancho o conector del filamento con el cuerpo basal, y el cuerpo basal que consiste de un eje central y varios anillos (C, MS, L y P) (3).

*Apéndice A

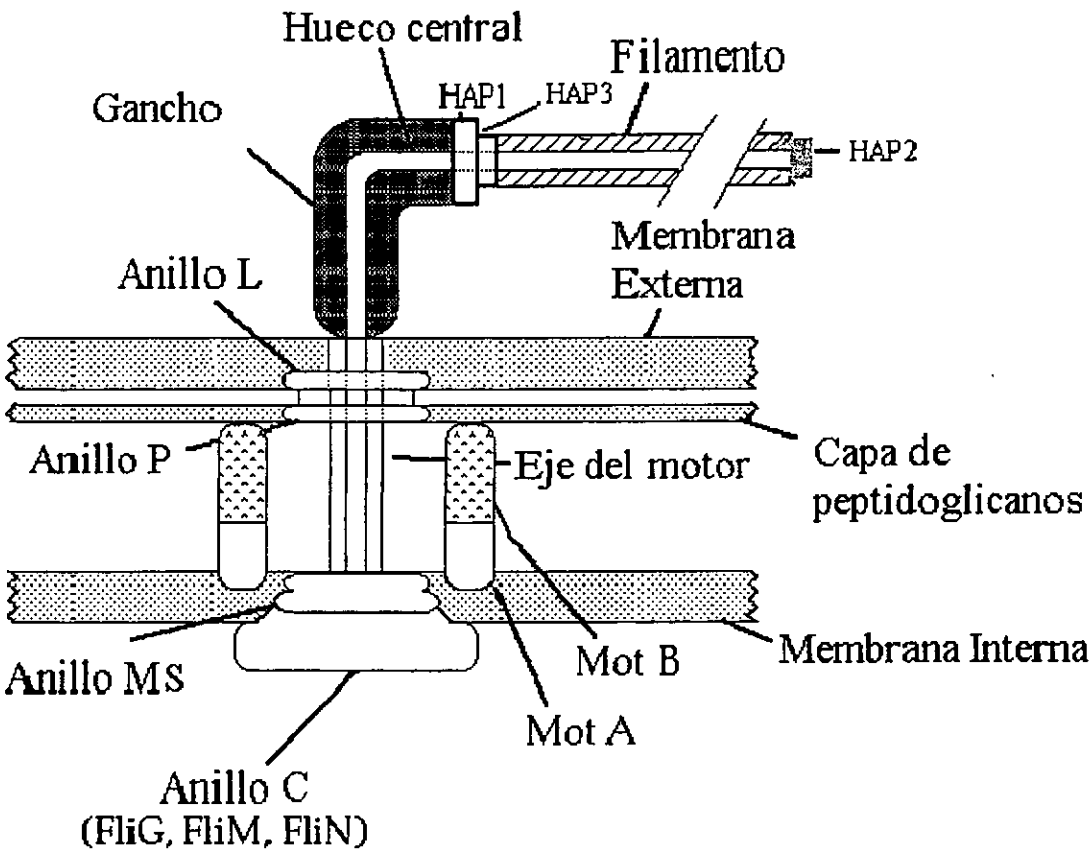


Fig. 1. Esquema general del flagelo bacteriano. Se muestran las estructuras que conforman al cuerpo basal (motor, anillos C, MS, L y P, y el eje); el gancho, las proteínas de unión al filamento (HAPs) y el filamento. [Modificado de http://www.bio.cmu.edu/Courses/03441/TermPapers/old_tp/FlagellaMotor/FlagellaMotor.html]

Por otra parte, dependiendo del número y la colocación de los flagelos en las bacterias, éstas se clasifican en: perítricas (es decir, están rodeadas de múltiples estructuras flagelares), tal como *Escherichia coli, Salmonella typhimurium* y *Proteus mirabilis*; lofótricas (varios flagelos localizados en el polo celular en forma de penacho) tal como *Sinorhizobium meliloti* y *Spirillum volutans*; anfítricas (varios flagelos en forma de penachos en ambos polos); y monótricas (que contienen un solo flagelo insertado en el cuerpo celular), tal como *Rhodobacter sphaeroides*. Estos arreglos flagelares se muestran en la Fig. 2.

Fig. 2 Arreglos flagelares.

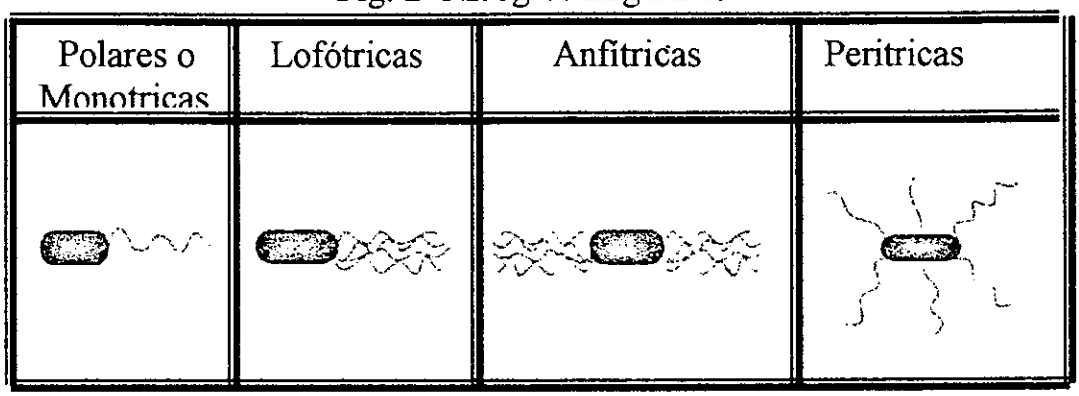


Fig. 2. Diagrama que muestra los diferentes arreglos que pueden tener los flagelos en una bacteria. Se ha postulado que estos arreglos en distintas bacterias representarían una ventaja adaptativa dependiendo del nicho ambiental en el que se desarrollen (4).

El cuerpo basal es la estructura que, inmersa en la membrana citoplásmica y en la pared celular, es necesaria para la rotación flagelar y el anclaje del gancho-filamento al cuerpo celular. Se piensa que interactúa con el aparato de exportación flagelar, el cual está involucrado en la exportación de los monómeros de las proteínas requeridas para formar las estructuras extracelulares del flagelo.

El motor flagelar (incluido en el cuerpo basal) tiene un componente citoplásmico que forma una estructura tipo campana cuando es aislado y observado en el microscopio electrónico. Dicha estructura, denominada anillo-C es responsable de una serie de capacidades importantes para la motilidad, tales como la inducción de la rotación del flagelo, permitir el cambio de dirección de rotación del giro del flagelo (en enterobacterias) (5), y regular la tasa de rotación del flagelo (6).

El motor flagelar contiene al menos 12 proteínas diferentes. Las mutantes Mot$^-$ tienen su estructura flagelar completa pero pierden la habilidad para moverse, este fenotipo es resultado del defectuoso transporte membranal de los protones energéticos o bien, del desacoplamiento del flujo protónico en la generación de la fuerza o energía necesaria para la inducción del torque y rotación del flagelo (7).

En *E. coli* y *S. typhimurium*, las proteínas denominadas FliG, FliM y FliN conforman el complejo del switch flagelar que se encarga de cambiar la orientación del giro del flagelo de dirección contraria al sentido de las manecillas del reloj (CCW) hacia el sentido de las manecillas del reloj (CW). Estas proteínas forman el anillo C y se ubican en la base del flagelo bacteriano (Fig. 1).

En un ambiente estable el motor flagelar en enterobacterias del tipo silvestre rota en dirección CCW durante una fracción de tiempo mayor en comparación a la rotación CW. Dado que en *E. coli* el flagelo es una hélice de mano izquierda, la rotación en el sentido CCW da lugar a la propulsión de la célula bacteriana. Mientras que la rotación CW produce la reorientación de la célula, dado el movimiento no coordinado de los flagelos que rodean a la bacteria.

Las funciones quimiotácticas de la célula y las habilidades asociadas al switch del motor también han sido relacionadas con el anillo C. El modelo que relaciona a las proteínas del anillo C con la respuesta quimiotáctica se explica brevemente a continuación:

La región amino terminal de la proteína FliM interacciona con la proteína reguladora de la respuesta quimiotáctica CheY en estado fosforilado (fosfo-CheY) (8); se piensa que esta interacción provoca un cambio conformacional en la proteína FliM, y este cambio es trasmitido a FliG lo que da lugar al cambio en la dirección de la rotación del flagelo (de CCW a CW) (9). Sin embargo, para que todo esto ocurra, es necesario que las proteínas receptoras denominadas MCP's (Methyl-accepting Chemotactic Proteins) perciban la presencia de atractores o repelentes (Tabla 1). La molécula receptora está compuesta de dos dominios transmembranales que conectan a un sitio de unión a ligando dentro del periplasma a un dominio citoplásmico que se unirá al complejo CheA unida a CheW. La presencia de atractores inhiben la actividad de cinasa de CheA, reduciendo la cantidad de CheY fosforilado (10), lo cual permite que los flagelos roten durante un intervalo de tiempo mayor en dirección CCW, permitiendo que la bacteria se acerque así al atrayente. Inversamente, en presencia de repelentes se activa la actividad de cinasa de CheA y por lo tanto la cantidad de fosfo-CheY que se unirá a la proteína FliM, lo que da lugar a la rotación CW del motor, y consecuentemente a la reorientación de la célula. Otra proteína citoplásmica, CheZ, facilita la desfosforilación de fosfo-CheY, impidiendo la estabilización del estado CW (11;Fig. 3).

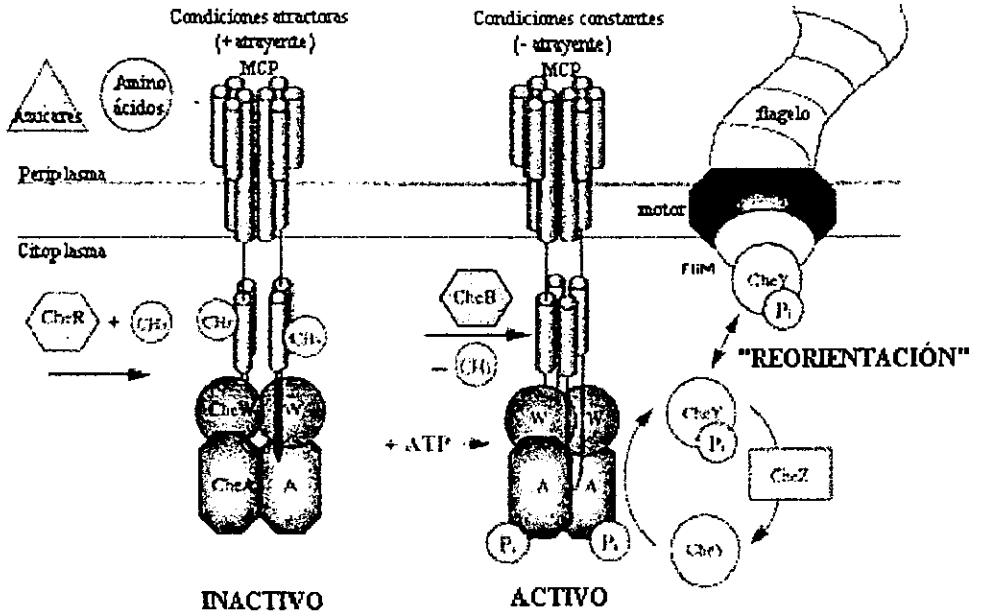


Fig. 3. Esquema general de las proteínas involucradas en la quimiotaxis bacteriana. [Modificado de 12].

Algunas de las moléculas quimioefectoras de *E. coli* se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Quimioefectores atrayentes y repelentes para *E. coli*.

E. coli	
ATRAYENTES	REPELENTES
Compuestos orgánicos	Compuestos orgánicos
N-acetilglucosamina	Acetato
D-Fructosa	Isopropanol
D-Galactosa	Fenol
D-Glucosa	Leucina
D-manosa	Valina
Maltosa	Benzoato
Manitol	Salicilato
Ribosa	Estímulos relacionados con energía
Aspartato	Altas concentraciones de oxígeno
Serina	Luz azul de alta intensidad
Disorbitol	Miscelánea
Trealosa	Indol
Estímulos relacionados con energía	Glicerol
Oxígeno	pHs extremos (ácidos o básicos)
Prolina como donador de electrones	Co^{2+} y Ni^{2+}

(13)

En relación con el resto de las proteínas que conforman el anillo C, la proteína FliG está ubicada cerca del anillo MS formando parte del anillo C, y está involucrada tanto en la rotación como en el cambio de dirección (*switch*) del flagelo. Algunas mutaciones sin sentido en el gene *fliG* resultan en un fenotipo Fla$^-$. De los 331 residuos de la secuencia proteíca, 26 posiciones están asociadas con la capacidad de la mutante para rotar en el sentido CW, mientras que sólo 10 están asociadas con la rotación en sentido CCW. Se ha encontrado que la mayoría de la región N-terminal de esta proteína no es necesaria para el ensamblaje flagelar. De hecho, cerca de un tercio del total de los aminoácidos pueden ser eliminados sin ningún efecto en la estructura flagelar, pero estas deleciones resultan en un flagelo incapaz de rotar (Mot$^-$). Así, la mayoría de la secuencia de FliG no esta involucrada de una forma importante en el ensamblaje de la estructura flagelar como tal. Actualmente, se considera que de las proteínas que conforman el anillo C, solamente FliG esta involucrada en la generación del torque (5).

La proteína FliN se ubica en el anillo-C y su función exacta es aún desconocida. Las mutaciones en FliN que provocan que el flagelo pierda la capacidad de rotar en dirección CW se encuentran asociadas a cambios en sólo 4 aminoácidos, mientras que las mutaciones en FliN incapaces de rotar el flagelo en dirección CCW se asocian al cambio de un solo aminoácido. La poca dependencia del cambio de rotación flagelar con FliN sugiere que esta proteína no está directamente involucrada en este proceso y por lo tanto, se postula que las escasas mutaciones en FliN que provocan defectos en la rotación flagelar son causadas por defectos en la estructura de FliN, los cuales impedirían la propagación de los cambios estructurales hacia FliG o a FliM. Por otro lado, se sospecha que FliN podría estar involucrada en la exportación de los componentes flagelares puesto que su secuencia es homóloga a las proteínas Spa33, HrcQ, YscQ, etc., las cuales están involucradas en la formación del aparato de exportación tipo III de los factores de virulencia en *Shigella flexneri* (invasinas o Ipas), *Xanthomonas campestris* (Hrps) y *Yersinia spp.* (Yops), respectivamente (5).

Por otra parte, se han propuesto diversos modelos para explicar la forma en la cual los protones fluyen a través de la estructura flagelar. A la fecha el mas aceptado sugiere que la conducción de los protones es a través de una vía o canal continuo conformado por las proteínas MotA y MotB, posteriormente alrededor de las estructuras dinámicas de los anillos C y MS,

dando lugar a la energización del motor. La naturaleza instantánea del switch entre la rotación CCW y CW parece ser debida a un sistema "complejo" que permite redireccionar el flujo de protones a través del eficiente cambio conformacional de las proteínas FliG y/o FliN que permitirían el cambio en la dirección de la rotación (9,14).

Estructura del flagelo

Las tres estructuras diferenciadas del flagelo están conformadas por el ensamblaje de varios monómeros proteícos. El cuerpo basal se encuentra localizado entre las membranas de la célula bacteriana, mientras que el gancho y el filamento flagelar son estructuras que se encuentran en la parte externa de la célula.

El gancho es la estructura que se encuentra unida al eje del motor siendo la primera estructura extracelular. Es ensamblado a partir de monómeros de la proteína FlgE y éstos son ensamblados de la base hacia la parte distal de la célula. El gancho es una estructura con una longitud determinada, siendo la proteína FliK la que regula que esta longitud sea la apropiada (15). Esta longitud ha sido determinada entre 50 y 105 nm dependiendo de la especie. En el centro de la estructura del gancho, hay un canal de 2.5 nm de diámetro que, se ha postulado, es parte de la vía de exportación de las subunidades del gancho y de la flagelina durante el ensamblaje del filamento. Aquí es importante destacar que el gancho en enterobacterias es una estructura curva (de ahí su nombre), pero en *R. sphaeroides* es una estructura recta, que al igual que en los ganchos de enterobacterias cuenta con las proteínas necesarias para el ensamblaje del filamento inmediatamente después del gancho. Estas proteínas se conocen como proteínas asociadas al gancho y son tres: HAP1 y HAP3 se encuentran en este orden entre el gancho y el filamento, y la proteína HAP2 (también conocida como FliD o proteína de coronamiento) se encuentra en la parte distal del filamento. Todas estas proteínas [FlgE, FliC, FlgK(HAP1), FlgL(HAP3) y FliD(HAP2)]* se conocen como proteínas axiales y se caracterizan por tener una gran homología en las regiones amino y carboxilo terminales, de lo cual depende la correcta formación del flagelo.

*Apéndice A

El filamento es la parte distal del flagelo y se conforma por monómeros de flagelina autoensamblados. Se cree que su longitud es controlada por la proteína de coronamiento FliD, aunque el mecanismo por el cual se regula no es entendido aún. Se ha determinado que FliD posee una arquitectura pentamérica y ayuda a la polimerización de las subunidades de flagelina (16). Así mismo, FliD impide que los monómeros de flagelina escapen hacia el medio extracelular y se ha asociado la presencia de esta proteína con la represión de la expresión de los genes de clase III (17).

Los monómeros de flagelina, también tienen extremos terminales con alta homología y se piensa que su ensamblaje esta determinado por dos tipos de conformaciones de la proteína denominadas de mano izquierda (*left-handed*) y de mano derecha (*right-handed*). Estas dos confomaciones permiten que la estructura del filamento sea una hélice y no un cilindro como ocurriría en el caso de que la flagelina tuviese sólo una conformación y todos los monómeros de esta proteína se autoensamblasen de la misma forma. Cada monómero de flagelina, se acomoda en la hélice de la siguiente manera: las regiones amino y carboxilo terminales ensambladas en alfa hélices se localizan en la parte interna de la hélice, mientras la región central de la proteína, que es la más variable, se ubica en la parte externa de la estructura del filamento helicoidal, representando una ventaja para la bacteria, dado que coadyuva a la variabilidad antigénica.

Estudios de la estructura del filamento han mostrado que hay 5.5 monómeros de flagelina por vuelta en la hélice y que la longitud del eje helicoidal del filamento aumenta 4.78 Å por subunidad que se adiciona al filamento. También se sabe que cada monómero de la proteína está conformado por tres dominios (Fig. 4), cuyas características se mencionan en la Tabla 2.

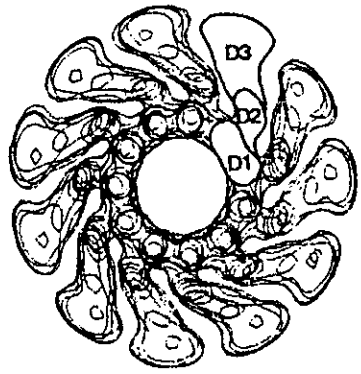


Fig. 4. Esquema en el que se muestra el mapa de densidad electrónica transversal al eje del filamento. Se marcan los 3 dominios encontrados en estas subunidades.
[Tomado de 18]

Tabla 2. Características de los tres dominios de la flagelina (FliC).

DOMINIO	UBICACIÓN	CARACTERÍSTICAS
Dominio 1 (D1)	aa 1-176 de la región amino terminal aa 402-493 de la region carboxilo terminal	Alto contenido de alfa hélices (corresponde al 30% del volumen total) Contiene regiones importantes para el ensamblaje conformacional del filamento (forma parte de las regiones circunscritas ro y ri de la estructura terciaria de la proteína vista por micrografía electrónica a 11 Åde resolución) (Fig. 5)
Dominio 2 (D2)	aa 177 - 189 región amino terminal 284 - 401 región carboxilo terminal	Alto contenido en cadenas beta aa Corresponde al 25% del volumen total Se subdivide en 2 regiones altamente hidrofóbicas denominadas D2a y D2b. D2a interacciona con el D3 de la subunidad de flagelina (Fig. 6)
Dominio 3 (D3)	aa 190-283 región central	Bajo contenido de alfa hélices Esta región esta principalmente conformada por cadenas beta. Corresponde al 45% vol. total Se le ha relacionado con interacciones entre monómeros de flagelina que apoyan la estabilidad del filamento.

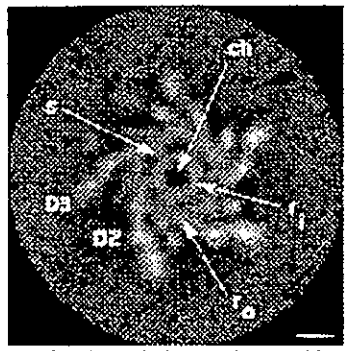


Fig. 5. Imagen de microscopía electrónica de la sección transversal al eje del filamento en la que se muestran los dominios D3 y D2; el anillo externo (ro) e interno (ri); s representa el radio ("spoke") entre ro y ri; mientras que ch es el hueco o canal central.
La línea ubicada en la parte inferior derecha representa 50 Angstroms.
[Tomada de 19].

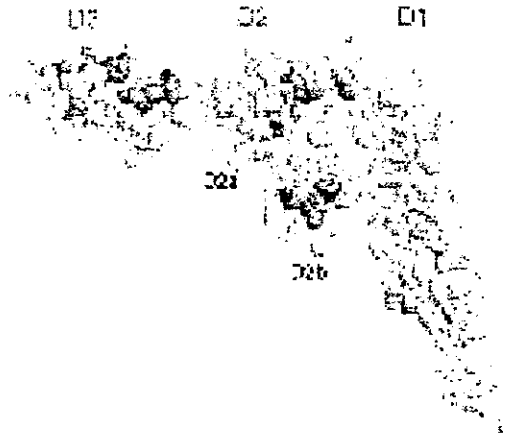


Fig. 6. Diagrama en el que se muestra el arreglo estructural y los dominios de la flagelina de *Salmonella typhimurium*.
[Tomado de 20].

Por medio de estudios de difracción de rayos X y microscopia electrónica, se ha observado que el canal o hueco interno en el filamento es de 30 Å de diámetro (21) (Fig. 5) por el cual se asume transitan los monómeros de flagelina; se considera que D3-D2-D1 avanzan en una

forma vertical en este orden secuencial hasta llegar a la parte distal del filamento en donde se encuentran con la proteína HAP2 (FliD) y se autoensamblan formando la hélice, dejando el hueco interno y estableciéndose a la derecha (i.e., en el sentido de las manecillas del reloj) cada nuevo monómero que se va agregando al filamento, formando así la hélice macroscópica. Todo lo anterior se observó con monómeros de flagelina del filamento normal de *Salmonella typhimurium* (18). Como ya se había mencionado, se han descrito dos conformaciones posibles en las cuales se autoensamblan los monómeros de flagelina: L y R (de acuerdo al giro de mano izquierda (L) o mano derecha (R) en el cual se ensamblarán las subunidades de flagelina en el filamento). Estas dos conformaciones se caracterizan por la distancia de repetición (i.e. la distancia entre los monómeros de flagelina ensamblados) y las interacciones laterales entre los monoméros.

El filamento se compone por 11 fibrillas, cada una de las cuales se compone por monómeros de flagelina autoensamblados en la siguiente manera: la región amino terminal de la proteína contribuye con dos alfa hélices y la región carboxilo terminal con un alfa hélice para formar el D1, que conforma a los dos anillos ro y ri que rodean el canal interno del filamento (Fig. 7). Las alfa hélices del D1 están íntimamente ligadas con el ensamblaje de las fibrillas y por ende del filamento como tal. El D2 y el D3 también están involucrados en las interacciones entre los monómeros de flagelina, y se ha propuesto que el D3 ayuda a estabilizar la conformación de las fibrillas. Aunado a lo anterior, se ha caracterizado un motivo β-hairpin dentro del D1 que se encuentra en una región hidrófobica de este dominio, el cual se cree es el interruptor entre las dos conformaciones previamente mencionadas (L o R) (20).

La formación del filamento helicoidal en base a las fibrillas observadas en el mismo, es descrito en base a que las fibrillas están ensambladas en conformación L o R de acuerdo a la conformación del monómero por el cual esta compuesta. En un filamento normal de *Salmonella* con rotación en dirección CCW, se observan 9 fibrillas L y dos R. Al ocurrir el switch y por ende el cambio en la dirección de rotación del flagelo, el filamento sufre un cambio conformacional en el cual observan de 4 a 5 fibrillas R (20).

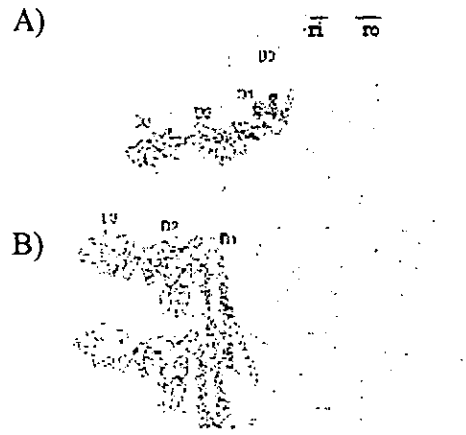


Figura 7. Mapa de densidad del filamento. En 7A se muestran los dominios de la flagelina descritos en el texto y los dos anillos tanto interno como externo (ri y ro, respectivamente). En 7B se muestra las posibles interacciones de dos monómeros de flagelina en una fibrilla.
[Tomado de 20].

También debemos mencionar que la característica del filamento de autoensamblarse con monómeros de la proteína flagelina (expresada por el gen *fliC*), no es un modelo para todas las bacterias, puesto que existen varias especies cuyos filamentos bacterianos son formados por el ensamblaje de diferentes flagelinas, por mencionar algunos ejemplos: *Vibrio cholera*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Caulobacter crescentus*. En el caso de *C. crescentus*, se han identificado 6 genes que codifican para la proteína flagelina, estos genes están arreglados en 2 clusters denominados α y β. En el cluster α se encuentran *fljJ*, *fljK* y *fljL* entre los genes *flaE* y *flaF*. FljJ es una proteína de 29 kDa, FljK de 25 kDa y FljL de 27 kDa. En el cluster β se encuentran *fljM*, *fljN* y *fljO* que codifican para proteínas de 25 kDa cada una. Se ha visto que el filamento se conforma primeramente por la proteína FljJ cercana al gancho, seguida por la proteína FljL y posteriormente por la combinación de las proteínas de 25 kDa (FljK, FljM, FljN y FljO). Por lo anterior, la funcionalidad del filamento no se ve tan comprometida por la ausencia de una de las flagelinas, puesto que en *C. crescentus*, las flagelinas restantes pueden suplir a la flagelina faltante. Un dato interesante es que la transcripción del cluster α (*fljJKL*) es dependiente del factor sigma 54, mientras que el cluster β (*fljMNO*) es independiente de este factor, por lo que en *C. crescentus* la deleción del gen *rpoN* (sigma 54) da lugar a un filamento corto más no a la ausencia de éste (22).

Expresión de los genes flagelares

En *E. coli* y *S. typhimurium* los genes flagelares son expresados siguiendo un patrón jerárquico de expresión que es altamente regulado. Para que el flagelo sea conformado (Fig. 8), es necesaria la expresión de más de 40 genes que en *E. coli* se encuentran organizados en 14 operones que se clasifican en 3 categorías de acuerdo a su ubicación física, forma de ser regulados, y momento en que son expresados (23).

Estas tres categorías o niveles son coincidentes con las estructuras que se van requiriendo para el ensamblaje del flagelo. El nivel I (también conocido como operón maestro), es el encargado de recibir las señales del medio ambiente. Es regulado principalmente por el complejo cAMP/CAP, es decir señales ambientales y por OmpR (24).

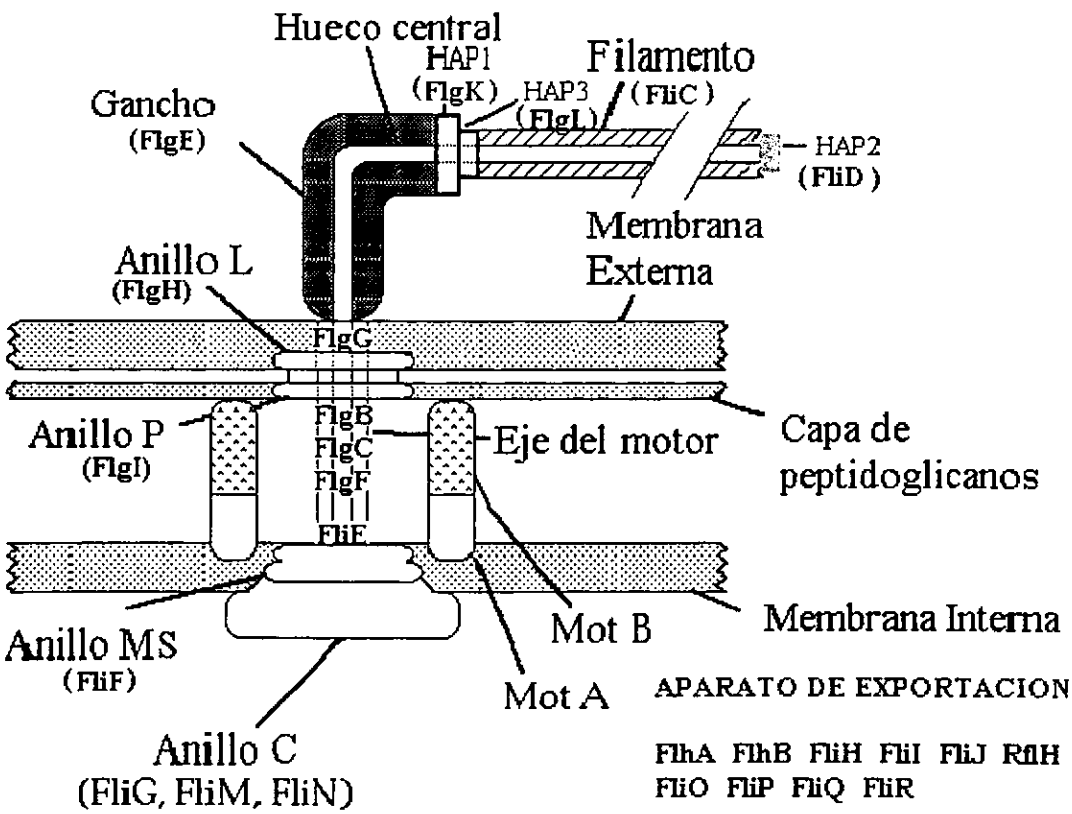


Fig. 8. Proteínas flagelares que conforman al flagelo en enterobacterias.

[Modificado de http://www.bio.cmu.edu/Courses/03441/TermPapers/old_tp/FlagellaMotor/FlagellaMotor.html]

El operon maestro está compuesto por los genes *flhC y flhD*. Las proteínas codificadas por estos genes forman un complejo heterotetramérico que permite el reconocimiento por la RNA polimerasa de los genes de la clase II del regulón flagelar (2, 3, 25). Pertenecen a esta última clase o nivel los genes necesarios para la formación del cuerpo basal, el gancho, el aparato de exportación y las proteínas FliA y FlgM. FliA codifica para el factor sigma 28 que se encarga de expresar a los genes flagelares del tercer nivel. FlgM es un factor antisigma que mantiene secuestrado a sigma 28 hasta el momento en que el cuerpo basal y el gancho estén completamente ensamblados, una vez que esto ocurre la proteína FlgM se exporta fuera de la célula liberando a FliA (sigma 28) para transcribir los genes de la clase III (26). Este mecanismo garantiza la no expresión de genes tardíos si en la bacteria no existen las estructuras previas a las que deban unirse las nuevas estructuras o monómeros proteicos.

Finalmente, en la clase III tenemos a *fliC* que, como ya se mencionó, codifica para la proteína flagelina que autoensamblada a otros monómeros de flagelina conforman al filamento. También la proteína de coronamiento (FliD) se ubica en los genes de este nivel. En una forma general, los genes de la clase II son expresados gracias a la RNA polimerasa asociada al factor sigma 70, mientras que los promotores de la clase III son reconocidos por el factor sigma 28 (25, 27).

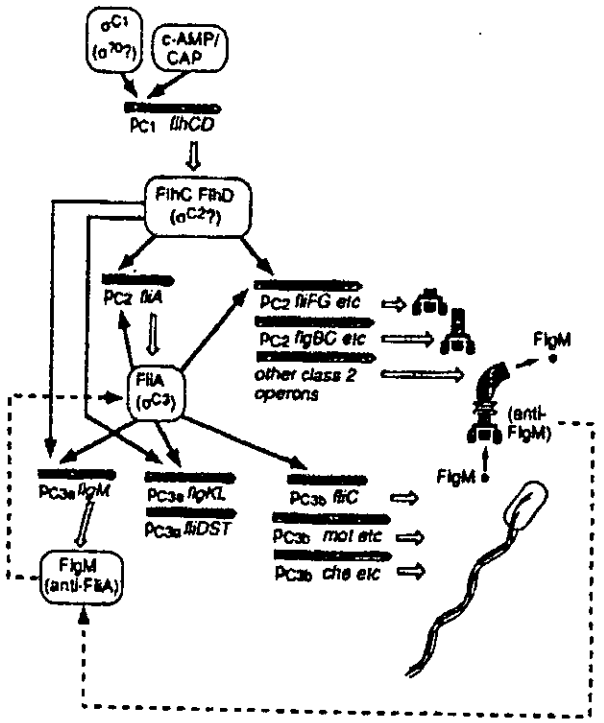


Fig. 9. Cascada jerárquica del regulón flagelar de *E. coli*. Los operones están marcados con líneas oscuras, las proteínas estan marcadas con líneas blancas a partir del operon que las codifica, los reguladores positivos estan marcados con flechas negras y los reguladores negativos estan marcados con flechas punteadas. Los promotores de diferentes clases están marcados como pC1 (promotor de clase I), pC2 (promotor de clase 2), etc. (2).

Rhodobacter sphaeroides

Rhodobacter sphaeroides pertenece al subgrupo-α de las proteobacterias. Este grupo se caracteriza por un alto contenido de G+C (arriba del 60%), incluye especies encontradas en una amplia variedad de ambientes y muestran una gran flexibilidad metabólica. Algunos otros miembros de este subgrupo son *Agrobacterium, Azospirillum, Caulobacter* y *Sinorhizobium*. De estas, la más cercana a las entéricas es *Caulobacter* y las más lejanas son *Sinorhizobium* y *Rhodobacter* (28).

A diferencia de las enterobacterias, muchos miembros del subgrupo-α muestran motores flagelares que solo giran en una dirección. *Rhodobacter sphaeroides* tiene un solo flagelo de ubicación subpolar (29). Su flagelo generalmente gira CW, pero se han encontrado variantes CCW (30).

También se ha observado, que en lugar de nadar y reorientarse, *R. sphaeroides* nada y para, reorientándose durante la pausa. Se ha observado que durante los episodios de paro el flagelo se encuentra relajado en su parte distal y se enrolla en dirección del cuerpo celular. Durante este periodo, la célula es reorientada y cuando el flagelo se desenrolla, la célula nada en una nueva dirección. Se asume que el movimiento browniano es el responsable de la reorientación de la bacteria durante los periodos de pausa (29).

En presencia de atrayentes (Tabla 3), *R. sphaeroides* aumenta la velocidad de nado hasta en un 25% y reduce la frecuencia de paro. Este aumento se sostiene durante alrededor de 10 minutos y al parecer regresa a su velocidad normal sólo después de que el efector ha sido metabolizado de alguna manera (28).

Hasta el momento no se sabe exactamente cual es la señal metabólica que controla el nado de *Rhodobacter*, pero han sido identificados algunos genes homólogos a las MCP de entéricas (31), estos codifican para las proteínas denominadas Tlp. TlpA, pesa alrededor de 70 kDa y tiene un solo dominio que podría atravesar la membrana, aunque estudios con anticuerpos sugieren que es una proteína citoplásmica. La otra TlpB, pesa menos de 40 kDa y tiene un solo dominio de señalamiento, homólogo a las MCPs con una pequeña región hidrofóbica que podría anclarse a la membrana. El que carezcan de un dominio sensor puede indicar que interactúan con alguna otra proteína posiblemente anclada a la membrana. Ambas proteínas son citoplásmicas y probablemente sensen intermediarios metabólicos específicos en el citoplasma. En cepas con mutaciones en *tlpA*, se reduce la quimiotaxis a varios de los compuestos utilizados como fuente de carbono pero sólo en condiciones aeróbicas, lo cual sugiere la existencia de una vía de transducción de señales alterna. TlpB se expresa en condiciones de anaerobiosis, pero la deleción del gen *tlpB* tiene poco efecto en el comportamiento en cualquiera de las dos condiciones de cultivo. La introducción de estos dos genes en una cepa *mcp*$^-$ de *E. coli* aunque no complementan la mutante, inhibieron la quimiotaxis de la cepa silvestre, sugiriendo un efecto sobre la quimiosensibilidad de *E. coli* (28).

En cuanto a los genes de quimiotaxis, se han caracterizado a las bacterias del subgrupo-α y todas presentan una organización similar entre ellas y muy diferentes a *E. coli*. En los miembros del subgrupo estudiados hasta el momento, hay por lo menos dos genes *cheY*, pero no hay *cheZ*. En *R. sphaeroides* se identificó primero un operón de genes de quimiotaxis constituido por los genes $cheY_1$, *cheA*, *cheW*, *cheR* y $cheY_2$. Al hacer la deleción de este operon, la respuesta quimiotáctica hacia el acetato y propionato (Tabla 3) sólo cambió ligeramente. Estos datos sugirieron que existe una vía alternativa de quimiotaxis en *R. sphaeroides*, tal como fue comprobado por la identificación de un segundo operon de genes flagelares funcionales, que presenta copias adicionales de los genes *cheA*, *cheR*, una primera copia de *cheB* y dos homólogos a *cheW* (32).

Algunas de las moléculas quimioefectoras de *R. sphaeroides* que han sido descritas en la literatura se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Quimioefectores atrayentes y repelente para *R. sphaeroides*

R. sphaeroides	
ATRAYENTES	REPELENTE
Ácidos orgánicos débiles Acetato Aspartato Benzoato Glutamato Propionato Otros Alanina Fructosa Luz de 650 nm (Desviación estándar 10nm) Oxígeno Potasio	Luz azul (único repelente identificado)

(28, 33, 34, 35, 36)

La existencia de varias copias de los genes quimiotácticos marca una diferencia importante del esquema planteado en enterobacterias. Una primera especulación ante la presencia de más de una copia de estos genes, es que estos fueran utilizados diferencialmente en distintas vías de transducción de señales quimiotácticas, como en el caso de *cheW2 y cheA2*, los cuales se requieren para la respuesta quimiotáctica en respuesta a un gradiente en la intensidad de la luz (fotorespuesta) (37). Sin embargo, a la fecha no existe información experimental para sustentar o rechazar ésta hipótesis.

Por otro lado, el sistema genético flagelar de *R. sphaeroides* no está completamente caracterizado. Sin embargo, recientemente fue reportado que los genes que codifican para las proteínas involucradas en la formación del gancho y del cuerpo basal son dependientes del factor σ^{54} (25). A partir de ello surge la posibilidad de que la expresión de la flagelina pudiera también ser dependiente del factor σ^{54} como es el caso en *C. crescentus*. Sin embargo, en el laboratorio se contaba con evidencia de la existencia del gen *fliA* en el cromosoma *de R. sphaeroides*. Por esta razón se decidió identificar el gen de la flagelina (*fliC*) *de R. sphaeroides* y estudiar los mecanismos que controlan su expresión.

OBJETIVOS

1. Identificar el gen *fliC* de *Rhodobacter sphaeroides*

    1.1 Determinación de la secuencia nucleotídica del gen identificado.

    1.2 Determinar la funcionalidad del gen mediante el aislamiento de una cepa *fliC*.

2. Estudio y caracterización de la región promotora del gen *fliC*.

    2.1 Identificar las regiones consenso importantes para la transcripción del gen.

    2.2 Comprobar la funcionalidad del promotor.

3. Comparar cuantitativamente la expresión del gen *fliC* a partir de su promotor en *R. sphaeroides* y en *E. coli.*

4. Determinar el nivel de expresión del promotor cromosomal de *fliC* en función de la presencia o ausencia de la estructura gancho-cuerpo basal.

5. Estudiar las regiones río arriba y río abajo cercanas al gen e inferir posibles implicaciones en la regulación de la expresión de *fliC*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas Bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas durante este trabajo fueron:

- *Escherichia coli*

HB101: F^-, *thi*-1, *hsds*20 (rB^-, mB^-), *recA*13, *ara*-14, *leuB6*, *proA*2, *lacY1*, *galk2*, *rpsL20* [(Str^r), *xyl-S*, *mtl-1*, *supE44*, λ^-] (38)

JM103: Δ*(lac-pro)*, *thi*, *strA*, *supE*, *endA*, *sbcB*, *hsd R*$^-$, F'*tra D36*, *proAB*$^+$, *lac I*^{q}, *Z ΔM15* (39)

RP437: cepa derivada de *E. coli* K-12, F^-, *thi*, *thr*, *leu*, *his*, (*gal-att* λ)$^+$, *strA*, *eda*$^+$, *recA*$^+$ (che^+, fla^+, mot^+) (40)

S17-1: Pro^- Res^- Mod^+ recA-plasmido integrado RP4-Tc::Mu-Km::Tn*7* (41)

- *Rhodobacter sphaeroides*

WS8N: cepa resistente espontánea a nalidíxico derivada de WS8 (42)

SP5: WS8N *fliMΔ1*; Nal^r (43)

NG1: WS8N *fliM*::*uidA-aad*; Spc^r Nal^r (25)

TE1: WS8N *flgE*::Tn*5phoA*; Km^r Nal^r (44)

Plásmidos

pJQ200mp18:	Gm^r, mob^-, *sacB*, *ori*T, *tra*J, *ori*V, p15a (el cual es funcional sólo en enterobacterias) (45)
pRK415:	pRK404 derivada con un sitio múltiple para clonación (MCS) modificado, Mob^+, Tc^r, *ori*T, *lac Zα* IncP, RK2 *ori*V (plásmido con promotor *lac* empleado en esta tesis para clonar genes de interes de *Rhodobacter sphaeroides*) (46)
pRK2013:	Mod^-, Tra^+, Km^r, *ori*ColE1 (no se replica en *R. sph.*) (47)
pTZ18R:	vector de clonación, pUC, *ori*M13, pMB1, Amp^r (48)
pTZ19R:	vector de clonación, pMB1, Amp^r (Pharmacia)
pWM5:	contiene el cassette (*uidA-aad*), *ori*ColE1 (no se replica en *R. sph.*) (49)
pRS602:	Fragmento *Bam*HI de 6 kb que lleva el gen *fliC* de *R. sphaeroides* clonado en pTZ19R.

Condiciones de cultivo

E. coli se creció a 37°C aeróbicamente en el siguiente medio: Luria-Bertani (LB), el cual contiene 1 % de bactotriptona, 0.5 % de extracto de levadura y 1 % de cloruro de sodio. Se esteriliza por autoclave 20 minutos, a 15 lb y 121 °C antes de usarse.

Para los cultivos en medios sólidos, se utilizaron los mismos medios, adicionándose 15 g/l agar.

La cepa RP437 y derivadas se crecieron en triptona 1.3%-NaCl 0.7% a 30 °C en agitación.

Las concentraciones de los antibióticos empleados, cuando eran requeridas fueron: ampicilina 50 μg/ml, tetraciclina 25 μg/ml, cloramfenicol 20 μg/ml, kanamicina 50 μg/ml, espectinomicina 50 μg/ml y gentamicina 30 μg/ml.

Rhodobacter sphaeroides se creció a 30°C heterotróficamente, en medio mínimo reportado por Sistrom (50) con agitación rigurosa (300 r.p.m.) en la oscuridad. La concentración de los antibióticos empleada fue tetraciclina 1 μg/ml, kanamicina 25 μg/ml, gentamicina 30 μg/ml, espectinomicina 25 μg/ml, cloramfenicol 20 μg/ml y ácido nalidíxico 25 μg/ml.

Los cultivos se usaron a una densidad óptica de 0.6 ± 0.05 a 600 nm.

Transformación de *E. coli* por CaCl (51).

A partir de un cultivo de la cepa deseada, se inocularon 10 ml de LB con 0.2 ml del cultivo. Se crecieron hasta una densidad óptica de 0.5 a 550 nm y se incubaron en hielo 10 minutos; posteriormente se centrifugaron en condiciones de esterilidad en tubos de policarbonato 5 minutos a 4000 r.p.m. Se resuspendieron en 5 ml de $CaCl_2$ 100 mM e incubaron 20 minutos en hielo. Se centrifugaron por 5 minutos a 4000 r.p.m. y se resuspendieron en 0.66 ml de $CaCl_2$ 100 mM. Se incubaron una hora en hielo para posteriormente tomar 200 μl de células que se adicionaron a un tubo Eppendorf con 200 ng de plásmido. Se incubaron 30 minutos en hielo y se les dió un choque térmico a 42°C durante 2 minutos. Se incubaron otros 2 minutos en hielo y se les agregó 0.8 ml de LB. Se incubaron a 37°C durante 45 minutos para que las células expresasen la resistencia al antibiótico y se centrifugaron 5 minutos a 5000 r.p.m. Se resuspendieron las células en el líquido que queda después de decantar y se plateó todo en medio selectivo.

Conjugación bi o triparental (52)

La conjugación biparental se utilizó cuando se emplearon cepas de *E. coli* que contenían los genes necesarios para la mobilización de plásmidos integrados en su cromosoma (tal como la cepa Sl7-1) para su posterior conjugación con *R. sphaeroides*. Triparental para el caso en el que la cepa de *E. coli* que contenía el fragmento a transferir no tuviese los genes y, por lo tanto, las proteínas para llevar cabo la mobilización de DNA a *R. sphaeroides*, por lo que se incluía una cepa que lleva un plásmido helper que sí contiene estos genes.

Se pusieron cultivos de las cepas de interés a crecer hasta una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. En condiciones de esterilidad, se tomaron 1.5 ml de cada uno de los cultivos y se centrifugaron a 14000 r.p.m. por 5 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 1 ml de LB. Se centrifugaron por 5 minutos a 14000 r.p.m. y a temperatura ambiente. Se resuspendieron en 500 µl de LB y se transfirieron las 2 ó 3 cepas a un solo tubo eppendorf, y se mezclaron cuidadosamente (sin vortex de ser posible). Se centrifugaron a 14000 r.p.m. por 4 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió en aproximadamente 50 –100 µl.

Las células se colocaron en un rectángulo de nitrocelulosa (0.5 cm x 1 cm) en una placa de LB sin antibiótico. Posteriormente, se incubaron a 30°C por un período de 6 horas en las cuales se llevó a cabo la conjugación. Se resuspendieron las células en 1 ml de LB en un tubo eppendorf. Se centrifugaron 3 minutos a 14000 r.p.m. a temperatura ambiente. Se decantó y resuspendió en aproximadamente 50 µl. Posteriormente se plateo en cajas de LB a las cuales se les había añadido el antibiótico adecuado para la selección de las bacterias exconjugantes.

Por este método se conjugó *Rhodobacter sphaeroides* con *E. coli* (S17 para conjugación biparental o JM103 para conjugación triparental ayudado por el plásmido pRK2013 para las funciones de corte y transferencia genética).

Purificación de plásmidos por el método de mini-prep hervidos (53)

A partir de 3 ml de un cultivo de toda la noche en medio selectivo, se pasaron las células a un tubo Eppendorf donde se centrifugaron 4 minutos. Se decantó y se resuspendió en lo que quedo de medio y se agregaron 300 µl de STET (8% sacarosa, 5 % tritón, 50 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris-HCl pH 8.0) y 30 µl de lisozima 10 mg/ml. Se agitaron en vortex 2 segundos, se hirvieron 45 segundos exactamente y se centrifugaron a 14000 r.p.m. a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se decantó el sobrenadante a un nuevo eppendorf y se agregaron 400 µl de isopropanol a este sobrenadante. Se incubaron en hielo 10 minutos y posteriormente se centrifugaron 20 minutos a 14 000 r.p.m. a 4°C. La pastilla se lavó con etanol al 70 % y se secó al vacío durante 10 minutos. La pastilla se resuspendió en 30 µl de agua y se corrieron 3 µl en un gel de agarosa al 1 %.

Purificación de plásmidos por lisis alcalina (54)

Se tomó una colonia de la cepa de interés y se inocularon en 3 ml de medio selesctivo. Se incubaron con agitación rigurosa a 37°C por aproximadamente 8 horas. Posteriormente, se inocularon 30 ml de medio selectivo con 200 ml del cultivo anterior y se dejaron crecer durante toda la noche (12-16 horas) en agitación a 37°C. Al día siguiente se incubaron las células 10 minutos en hielo y posteriormente se centrifugaron 10 minutos a 5000 r.p.m. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió en el reactivo P1 del kit de QIAGEN siguiéndose los pasos descritos en el manual de este kit (QIAGEN Plasmid Midi Kits). El procedimiento de éste kit puede ser descrito en tres fases: en la primera, por medio de lisis alcalina (pH 12.0 - 12.6) se provoca la desnaturalización del DNA cromosomal permaneciéndo el DNA del plásmido en su naturaleza CCC (covalently closed circular); en la segunda, la neutralización del extracto en presencia de una alta concentración de sales en la cual la precipitación del DNA cromosomal ocurre permaneciendo el plásmido en la fracción soluble. También el RNA celular y las proteínas se precipitan bajo estas condiciones siempre y cuando las proteínas esten en complejo con un detergente aniónico SDS; en la tercera, la fracción soluble se precipitó con un volumen de isopropanol a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos. Posteriormente, se

centrifugaron a 15000 r.p.m. por 40 minutos a 4°C; se decantó el sobrenadante y el paquete de DNA se purificó por medio de una columna Qiagen-Tip20 provista en el kit. Una vez obtenida la elución del plásmido de interés, se precipitó con 0.7 volúmenes de isopropanol durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se centrifugó a 14000 r.p.m. por 30 minutos a 4°C y se lavó con 500 µl de etanol al 70%. Se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, se resuspendió en agua bidestilada y desionizada estéril (200 - 500 µl de acuerdo a la concentración del plásmido obtenido).

Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.

Se empleó el kit QIAEXII de Qiagen, cuyo principio básico es la extracción y purificación de fragmentos de DNA al solubilizar la agarosa, adsorber los ácidos nucleicos en las partículas de silica-gel de la columna del kit en la presencia de altas sales caotrópicas. La elución del DNA se llevó a cabo con una solución baja en sales tal como el buffer Tris 10 mM o bien en agua desionizada.

Extracción de DNA cromosomal de *Rhodobacter sphaeroides* (55)

Se pusó un cultivo de la cepa de la cual se deseaba extraer el DNA cromosomal en 10 ml de medio mínimo (con los antibióticos correspondientes) durante toda la noche. Se centrifugó durante 10 minutos a 4000 r.p.m. Se eliminó el sobrenadante en su totalidad y se resuspendió en 1.5 ml de TE 10 mM con un pH 8. Se agregaron 90 µl de SDS al 10 % y 15 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C.

Al día siguiente el DNA se tomó con un tip de plástico y se transfirieron 0.6 ml a un tubo eppendorf de 1.5 ml de capacidad. Se añadieron 0.25 ml de fenol y 0.25 ml de cloroformo. Se mezclaron muy bien usando una micropipeta de 1 ml hasta formar una emulsión blanca. Posteriormente, se centrifugó durante 6 minutos a temperatura ambiente a 14000 r.p.m. Se tomó la fase acuosa y se pasó a un tubo limpio repitiéndose la extracción 2 veces más. Se precipitó la fase acuosa en un tubo nuevo con 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M y 1 volumen de isopropanol.

Se tomó la hebra de DNA con una pipeta Pasteur, y se lavó con etanol al 70 %. Se dejó secar al aire a temperatura ambiente hasta que se volvió totalmente translúcido. Se resuspendió en agua (el volumen depende del tamaño de la hebra de DNA). Se corrieron 3 µl en gel de agarosa al 1%. Se cuantificó por espectrofotómetro determinando la absorbancia de la muestra a 260 nm.

Hibridización DNA:DNA (Southern Blot) (56)

Procedimiento de Southern Blot

Se corrió un gel de agarosa al 1% con las muestras de DNA cromosomal digerido totalmente con distintas enzimas. Se digirieron 2 µg de DNA cromosomal con *Sma*I, *Sal*I y *Bam*HI. Después de correr el gel, éste se tiñó con bromuro de etidio (aprox. 200 µg/ml) y se sacó una fotografía.

Para desnaturalizar el gel:

Se colocó el gel en 5 volúmenes de HCl 0.25 M con agitación suave, durante 15 minutos. Durante este periodo el azul de bromofenol (el cual es un colorante utilizado para monitorear la electroforesis del DNA) adquirió una coloración amarilla en el gel. Inmediatamente se eliminó la solución y se substituyó con 5 volúmenes de NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M, se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Este lavado se repitió una vez más.

Para neutralizar el gel:

Se neutralizó dos veces el gel en 5 volúmenes de una solución de Tris 1M pH 7.5 -NaCl 1.5 M durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se verificó la eficiencia de la neutralización del gel, probando el pH. Si éste no era menor de 8.5, se repetía el último lavado.

Para transferir el gel:

Se cortó un pedazo de nylon Hybond-N (Amersham) y se hidrató en agua desionizada. Se montó una cámara de transferencia (Stratagene) con una presión de 50 mmHg por 30 minutos.

Para fijar el DNA:

El DNA se fijó a la membrana de nylon mediante la incubación de la membrana a 65°C durante toda la noche.

Prehibridación del filtro:

El filtro se prehibridó durante 4 horas a 42°C con la siguiente solución:

Para 16 ml de solución

	Concentración Final	Volumen Requerido
Formamida 100%	50% (v/v)	8.0 ml
SSPE 20X	6X	4.8 ml
(SSPE 20X: NaCl 3M, $NaH_2PO_4.H_2O$ 0.2 M, Na_2EDTA, 0.02, pH 7.4)		
Denhart 50X	5X	1.6 ml
SDS 10%	1%	1.6 ml

De una solución de DNA de timo de ternera a concentración de 10 mg/ml, se tomaron 20 µl por cada ml de solución de prehibridación y se desnaturalizó a 95°C durante 5 min. Transferiéndose inmediatamente a hielo. Posteriormente, se añadió a la solución de prehibridación este DNA desnaturalizado.

Para hibridar el filtro:

Se utilizó 40% de formamida y la temperatura de hibridación fue de 37°C. La solución de hibridación que se utilizó fue la siguiente (8 ml):

	Concentración Final	Volumen Requerido
Formamida 100%	40% (v/v)	3.2 ml
SSPE 20X	6X	2.4 ml
Denhart 50X	5X	0.8 ml
SDS 10%	1%	0.8 ml
Agua	10%	0.8 ml

El DNA de timo (10 mg/ml) fue utilizado en un volumen de 20 µl por cada ml de solución. Éste DNA fue desnaturalizado junto con la sonda marcada con el kit de BioNick (125 µl que contenían 40 ng/ml de la sonda) hirviéndolo durante 10 minutos y poniéndolo en hielo durante 5 minutos.

Para lavar el filtro:

Se lavó 2 veces con SSC5X y 0.5% SDS a 42 °C durante 5 minutos.
Se lavó 1 vez con SSC 0.1X y 1% SDS a 42 °C durante 30 minutos.
Se lavó una vez con SSC 2X a temperatura ambiente durante 5 minutos.
(SSC 20X: NaCl 3 M, Citrato de Sodio 0.3 M)

Para unir el conjugado de estreptovidina-fosfatasa alcalina (SA-AP):

Se lavó el filtro en TBS-Tween20 (Tris base 100mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05% (v/v), pH 7.5 filtrado a través de una membrana de 0.45 µm estéril) durante un minuto. No se dejó que la membrana se secase. Se añadió la solución bloqueadora (BSA 3% en TBS-Tween20; filtrado), precalentada a 65°C. Se incubó una hora a 65°C con agitación suave. Posteriormente, se regresó la solución de bloqueo a su tubo y se agregó a la membrana el conjugado SA-AP diluido(1:1000 en TBS-Tween). Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se enjuagó la membrana con TBS-Tween durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavó durante una

hora con solución fresca de TBS-Tween. Se lavó la membrana con una dilución 1:10 de la solución de lavado final 10X (Tris base 100 mM, NaCl 100mM, $MgCl_2.6H_2O$ 50 mM, pH 9.5), incubándose una hora a temperatura ambiente. Se pusó la membrana en un folder y se agregaron 450 µl del reactivo de detección. El folder se cerro y el reactivo se extendió a lo largo de la membrana sin dejar burbujas. Se incubó durante 5 minutos a 37°C. Se puso a exponer una placa de radiografía durante 1-5 minutos y se reveló.

Preparación de la sonda de DNA:

La sonda utilizada para el Southern Blot fue marcada con el sistema de marcado de BioNick (Sistema de detección de ácidos nucleicos quimioluminiscente Gibco BRL), equivalente al procedimiento de Nick Translation, pero en vez de utilizar un nucleotido radioactivo se incorporó a la sonda Biotina-14-dATP, mismo que es revelado por el procedimiento de unión del conjugado SA-AP (estreptavidina-fosfatasa alcalina).

Inmunodetección de Proteína (Western Blot)

Extractos totales para Western Blot:

Se crecieron las bacterias hasta una D.O. (600 nm) de 0.6-0.7
Se centrifugaron durante 5 minutos a 6000 r.p.m. a 4°C, en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
Se resuspendieron en 60 µl de Buffer de corrida de Laemmli (0.125 M Tris_HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% β-mercaptoetanol) (57).
Se congelaron a -70°C hasta su uso.

Procedimiento de Western Blot

Se preparó un gel de acrilamida al 12% y se utilizaron separadores de 0.75 mm. Las muestras de los extractos totales se hiervieron por 5 minutos y se cargaron 10 µl. A su lado se corrieron 5 µl del marcador de peso molecular.

Gel de Proteínas:

-Gel separador 12%	
Acrilamida-Bis	
(30%-0.8%)	2 ml
Tris 1M pH 8.8	1.87 ml
SDS 10%	50 µl
Agua bidestilada	1 ml
Persulfato al 10%	38 µl
TEMED	2.5 µl
	4.96 ml

-Gel concentrador 4%	
Acrilamida	0.67 ml
Tris 1M pH 6.8	0.625 ml
SDS 10%	50 µl
Agua bidestilada	3.6 ml
Persulfato al 10%	50 µl
TEMED	2.5 µl
	4.99 ml

Buffer de corrida:

Glicina	14.4 g
Tris base	3 g
SDS 10%	10 ml

Ajustar el pH a 8.3 y aforar a 1 litro.

El gel se corrió a 20 mA durante 1 hora 30 minutos. Posteriormente, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa empleando un aparato de electro transferencia humeda de la casa comercial BioRad. La membrana se incubó con un anticuerpo anti-sigma54 durante toda la

noche. Posteriormente se incubó 1 hora con un anticuerpo anti-IgG el cual está acoplado a la enzima fosfatasa alcalina. Posterior a este paso, la membrana se lavó con buffer final de lavado (ver metodología de Southern blot) y finalmente se añadió el reactivo de detección. Se expuso y se reveló empleando una placa de rayos X.

Purificación de RNA total (58)

Todo el material utilizado durante la manipulación de RNA debe estar horneado (en caso de material de vidrio), o ser nuevo y esterilizado en autoclave durante 25 minutos (en caso de material de plástico). El manejo durante todos los procesos debe llevarse a cabo con guantes y no debe ser tocado por las manos. Los frascos de reactivos como etanol, cloroformo, fenol, etc. Debe ser nuevo y solamente introducir pipetas horneadas.

Soluciones de lisis:

NaAc 20 mM pH 5.5
EDTA 1mM
SDS 0.5%
Esterilizar por autoclave
Fenol bidestilado saturado con NaAC 20 mM pH 5.5 y EDTA 1 mM
Acetato de sodio 3M pH 5.5 (estéril)
Etanol absoluto
Etanol al 70%

Procedimiento:

Se hizó un cultivo de toda la noche de la cepa deseada en medió mínimo con sus requerimientos respectivos.

Se inoculan matraces con 0.1 ml por cada 10 ml de medio y se crecieron hasta una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. Una vez lograda esta densidad, inmediatamente centrifugar en corex siliconizados de 30 ml, a 10000 r.p.m. durante 1 minuto a 4°C. Se resuspendió en 1/10 del

volumen de solución de lisis. Posteriormente, se calentó a 65°C un minuto y se le agregó 1 volumen de fenol previamente calentado a 65°C. Se agitó en incubadora a 65°C durante 10 minutos a 200-300 r.p.m. asegurando que las fases se mezclaran. Se centrifugó a 4000 r.p.m.durante 10 minutos a temperatura ambiente. Sin mezclar las fases, se sumergieron los tubos unos segundos en baño maría a 65°C, se tomó la fase acuosa repitiéndose dos veces más la extracción. Se precipitó con 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.5 más 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C durante toda la noche. Se centrifugo a 10000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Se resuspendió en 500 µl de agua y se extrajo con un volumen de cloroformo. Se volvió a precipitar. Se centrifugó a 10000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C, se lavó con etanol al 70%, se secó la pastilla ligeramente y se resuspendió en 50 µl de agua. Se leyó en el espectrofotómetro 5 o 10 µl de la muestra en 1 ml de agua a 260, 280 y 310 nm. El valor de la relación 260 nm equivale a 40 µg/ml de RNA.

Hibridización DNA:RNA (Northern Blot) (59)

Soluciones:

MENP 10X (1 lt)

MOPS	41.8 gr	
NaAc	6.8 gr	Ajustar pH a 7.0
EDTA	3.7 gr	

Mezcla de muestra (610 µl):

Formamida desionizada	400 µl
Formaldehído 37%	46 µl
MENP 10%	90 µl
H_2O	84 µl

Fosfato de sodio y potasio 1M pH 6.9

Solución de azul de bromofenol (10 ml)

5 ml de glicerol

0.05% de azul de bromofenol

100 µl de fosfato de sodio y potasio pH 6.9

5 ml de H_2O

SSC 20X

NaCl	3 M
Citrato de Sodio	0.3 M

Denhart 50X:

Ficoll	1%
Polivinilpirrolidona	1 %
BSA	1 %

Solución de prehibridación (10 ml)

Formamida	5.0 ml
20X SSC	2.5 ml
Fosfato de Na y K pH 6.9	0.5 ml
Pirofosfato de Na 2%	0.5 ml
SDS 10%	0.1 ml
Denhart 50X	1.0 ml
DNA de timo (10 mg/ml)	0.25 ml
EDTA 0.5 M	0.05 ml
H_2O	0.05 ml

Se desnaturalizó el DNA de timo por 5 minutos a 100°C, se puso en hielo y se añadió a la solución de prehibridización.

Solución de hibridación (10 ml)

Formamida	5.0 ml
20X SSC	2.5 ml
Fosfato de Na y K pH 6.9	0.5 ml
Pirofosfato de Na 2%	0.5 ml
SDS 10%	0.1 ml
Denhart 50X	0.2 ml
DNA de timo (10 mg/ml)	0.25 ml
Sonda marcada	0.125 ml
EDTA 0.5 M	0.05 ml
H_2O	0.05 ml

Se desnaturalizó el DNA (del timo y sonda juntos) 5 minutos a 100°C, se pusieron en hielo y se añadieron a la solución de prehibridación.

Preparación de la sonda de DNA.

A partir de un producto de PCR del gen *fliC* (1491 pb) de *Rhodobacter sphaeroides* obtenido a partir de primers específicos para amplificar este gen, se corrió un gel y se cortó una banda de 1.5 kb que correspondía a éste gen y se purificó por el método de purificación de fragmentos a partir de geles de agarosa. 300 ng del fragmento fueron marcados por el método de Nick Translation del kit de BRL con dCTP $\alpha^{32}P$.

Gel desnaturalizante

La agarosa se preparó poniendo por cada 100 ml finales de agarosa:
10 ml MENP 10X + 1.5 gr agarosa (gel al 1.5%). Se aforó con 94.6 ml de agua.
Se esterilizó durante 15 minutos. Cuando se hubo enfriado hasta 65°C se añadieron 5.35 ml de formaldehído para una concentración final de 0.66 M.

Tanto el peine como el molde para el gel y la cámara de electroforesis se trataron contra RNAsas. Se sumergieron en NaOH 0.5 M durante toda la noche y se enjuagaron con agua desionizada estéril. El buffer de corrida fue MENP 1X, y se utilizó una bomba peristáltica para recircular el buffer durante toda la corrida, misma que se llevó a cabo en el cuarto frío.

Preparación de las muestras.

Se tomaron 7.5 µl de RNA (20 µg) y se les agregó 22.5 µl de la mezcla de muestras recién preparada y se mezcló. Se calentó a 65°C dos minutos y se pusó en hielo cinco minutos. Se añadieron 3 µl de solución de azul de bromofenol, se mezcló y se cargó el gel. El gel se corrió toda la noche en el cuarto frío a 20 V.

Transferencia

El gel se pasó a una cámara de transferencia que contenía SSC 20X. Se transfierió por medio de presión durante 1 hora. Después de la misma la nitrocelulosa se dejó secar entre 2 filtros whatman, y luego se horneó a 80 °C durante 2.5 horas en un horno con vacío.

Hibridación:

El filtró se enjuagó con SSC 4X durante 5 minutos y se dejó escurrir (casi secar), se pusó en una bolsa para hibridización y se le añadió la solución de prehibridización. La bolsa fue sellada y se prehibridizó a 42°C durante toda la noche. Al día siguiente, se abrió una esquina de la bolsa y se sacó la solución de prehibridización; posteriormente se llenó con solución de hibridización con la sonda radioactiva. Se hibridizó toda la noche. Se desechó la solución de hibridización y se lavó el filtro.

Lavado del filtro:

El filtro se lavó tres veces durante 5 minutos a temperatura ambiente en SSC 2X y SDS 0.1 %. Después se lavó dos veces durante 10 minutos en SSC 0.1X y SDS 0.1% a 42°C. Por último, el

filtro se enjuagó en 0.1X de SSC dos veces durante 15 minutos, se secó en un filtro whatman y se expuso con un film de rayos X.

Purificación de cadena sencilla para secuenciación (60)

Se inocularon 5 ml de LB suplementados con ampicilina con un precultivo de la cepa JM103 con el plásmido pTZ19R que llevaba clonado el inserto a secuenciar. Cuando el cultivo estuvo a $D.O._{550} = 0.5$, se sacaron tantos mililitros como fuesen necesarios para dejar el matraz con sólo 2 ml a los que se les agregó $1x10^5$ fagos M13 K07. Se incubó 1 hora a 37°C. Posteriormente, se tomaron 200 µl y se inocularon 6 ml de LB con kanamicina. Se incubaron a 37°C con agitación toda la noche.

Al día siguiente, se centrifugaron 4 tubos eppendorfs con 1.5 ml del cultivo a 14 000 r.p.m. por 5 minutos. Se tomaron 0.65 ml del sobrenadante y se transfirieron a otros tubos eppendorfs para volver a centrifugar por 5 minutos a 14 000 r.p.m. Posteriormente, se transfirieron 1.2 ml a un nuevo tubo eppendorf y se agregaron 0.25 ml de polietilén glicol y se mezclaron cuidadosamente. (El PEG se preparó en NaCl 2.5 M a una concentración final del 20%). Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente.

Se centrifugó a 14 000 r.p.m. por 15 minutos y las pastillas se secaron perfectamente. Se resuspendió la pastilla en 100 µl de agua desionizada.

Se extrajo: con ½ volumen (100 µl) de fenol
con 1 volumen de fenol-cloroformo 50:50 (v/v)
con 1 volumen de cloroformo

Se precipitó con 1/10 del volumen con Acetato de sodio 3 M pH 4.8 y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se incubaron por 30 minutos en hielo seco y se centrifugaron por 30 minutos a 14 000 r.p.m. a 4°C.

Se secó y resuspendió en 25 µl de agua desionizada. Se corrieron 3 µl en un gel de agarosa al 1% y se cuantificó la cadena sencilla (se empleará para secuenciar de 0.5 - 1 pmol). Se guardó a -20°C.

Secuenciación de DNA por el Método de Sanger (61)

Una de las metodologías para la secuenciación de ácidos nucléicos es la de Sanger, llamado comúnmente método por terminación de cadenas ó método de los dideoxinucleotidos. El plásmido utilizado para secuenciar en ésta tesis es el pTZ19R que mide 2870 pb; el cual contiene un origen de replicación de M13, lo cual permite que al infectar la cepa con un bacteriofago M13 defectivo, se replique el plásmido en forma de cadena sencilla, las cuales se empaquetan y son purificadas para su secuenciación. Se utilizó el kit thermosequenase (Amersham).

1) Para cada templado, se hizó la siguiente reacción de alineación:

Primer	0.5 pmol
DNA cadena sencilla	0.5 – 1.0 pmol
Buffer de alineación 5X	2 µl
(200 mM Tris-HCl pH 7.5	
100 mM $MgCl_2$	
250 mM NaCl)	
H_2O para un volumen final de 13 µl.	

2) Se calentó la reacción a 65°C durante 3 minutos, luego se dejó que se enfriara lentamente hasta temperatura ambiente.

3) Aparte se prepararon las siguientes mezclas:

1 µl de dATP (3µM)

1 µl de dTTP (3µM)

1 µl de 7 deaza-dGTP (3µM)

0.5 µl de dCTP-αS^{35} (3 000 Ci/mol)

2 µl de thermosequenasa

Se agregó la reacción de alineación a este tubo. Se incubó durante 5 min a 45°C.

4) Mientras tanto se etiquetaron 4 tubos "G", "A", "T", "C". Se llenarón con 4 µl de la mezcla de terminación de dideoxinucleótidos (ddG: 150 µM de cada dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP, 1.5 µM ddGTP; ddC: 150 µM de cada dATP, dTTP, 7-deaza-dGTP, dCTP, 1.5 µM ddCTP; ddA: 150 µM de cada dATP, dTTP, 7-deaza-dGTP, dCTP, 1.5 µM ddATP; ddT: 150 µM de cada dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP, 1.5 µM ddTTP)

5) Se transfirieron 4 µl de la reacción del paso 3 a los 4 tubos que contenían la mezcla de cada dideoxi. Se incubaron por 10 min a 72°C.

6) Al cabo de ese tiempo, se añadieron 4 µl de la solución de terminación (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.05% azul de bromofenol y 0.05 % xilen-cianol ff) a cada tubo, se mezcló y se congeló.

7) Para cargar el gel de secuencia, se calentaron las muestras a 75°C durante 7 min y se cargaron de 2 a 3 µl en cada carril.

Las muestras se corrieron en geles de acrilamida al 5% con 8 M de urea a 40 Watts. Los geles se secaron a 60°C toda la noche antes de ponerse a exponer con una placa Kodak X-O mat K durante 72 horas, después de lo cual se leyeron las secuencias.

Determinación de la actividad de β-glucuronidasa (62)

Soluciones:

-Buffer de Reacción

5 ml de Na_2HPO_4 0.1M

7 µl de β-mercaptoethanol

200 µl de EDTA pH 7

100 µl de Triton al 10%

4.7 ml de H_2O desionizada y estéril.

Lo anterior se preparó en frío y se guardó a 4°C cubierto con papel aluminio.

-Buffer de Ensayo

Se adicionaron 1.76 mg de 4-Metilumbeliferil β-D-glucuronido (MUG) a 5 ml de Buffer de Reacción, se mezclaron bien y se almacenaron a 4°C cubierto con papel aluminio.

Procedimiento

Se crecieron los cultivos de las cepas de interés hasta una $D.O._{600}$ = 0.5 -0.6. Se tomaron 3 ml y se resuspendieron en 0.4 ml de Buffer de Extracción. Inmediatamente y manteniendo las muestras en hielo, se sonicaron 2 veces 10 segundos con intervalos de 30 segundos por

sonicación para evitar el sobrecalentamiento de la muestra. Posteriormente, se centrifugaron a 14000 r.p.m. por 2 minutos a 4°C. Se tomaron 80 µl de la muestra una vez centrifugada y se mezcló con 320 µl de Buffer de Ensayo de GUS previamente incubado a 37°C. Una vez adicionado el extracto al Buffer de Ensayo se empezó a correr el tiempo de la reacción, el cual era de 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos, etc., después del cual se tomarón 100 µl de la reacción y se colocaron en tubos de ensayo que contenían 900 µl de Na_2CO_3 0.2 M para detener la reacción.
Para determinar la actividad de glucuronidasa en nmoles, se incluyó la siguiente curva estándar:
100 nmoles (10 µl de MUG 10 µM + 90 µl de Buffer Extracción + 0.9 ml de Na_2CO_3 0.2 M + 1 ml H_20 desionizada)
500 nmoles (50 µl de MUG 10 µM + 50 µl de Buffer Extracción + 0.9 ml de Na_2CO_3 0.2 M + 1 ml H_20 desionizada)
1000 nmoles (100 µl de MUG 10 µM + 0.9 ml de Na_2CO_3 0.2 M + 1 ml de H_20 desionizada)
Las muestras se midieron en un fluorómetro a una longitud de onda de excitación de 366 nm y de emisión de 565 nm. Los valores obtenidos de la curva estándar se graficaron en papel milimétrico poniendo en el eje horizontal los nanomoles (nmoles) y en el eje vertical los valores de fluorescencia. Los 3 puntos correspondientes a 100, 500 y 1000 nmoles se unieron con una línea recta; esta línea nos permitió extrapolar los nmoles de las muestras a los tiempos escogidos (1 minuto, 2 minutos, 5 minutos, etc.) Posteriormente, se determinó la concentración proteica de los extractos utilizando el reactivo de Bradford (ver más adelante) y se calculó la actividad específica de β-glucuronidasa en nmoles/min/mg de proteína.

Determinación de la concentración proteica utilizando el reactivo de Bradford.

El reactivo de Bradford utilizado en este trabajo se adquirió comercialmente de la compañía BioRad. El reactivo de Bradford se diluyó (1 ml de reactivo al cual se añadieron 4 ml de agua desionizada), de esta dilución se utilizaron 5 ml para cada extracto que se queria medir y 5 más para el control de albúmina bovina (BSA) a una concentración determinada.
De ésta forma, se empleó un tubo de ensayo por cada muestra y uno más para el control. Se etiquetó cada tubo de ensayo y se adicionaron 5 ml del Bradford diluido en cada uno. A el tubo de ensayo #1 (control), se le adicionaron 50 µl de BSA y a los siguientes tubos (correspondientes

a las muestras de las cuales se deseaba saber la concentración proteica), se agregaron 20 µl de la muestra correspondiente a cada tubo.

Se esperaron 10 minutos exactos para medir en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Posteriormente, se calculó la concentración de proteínas mediante una simple regla de tres considerando que la lectura obtenida del BSA equivale a 50 µg de proteína.

Amplificación de DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En un tubo eppendorf de 500 µl de capacidad, se adicionó lo siguiente:

H_2O desionizada	59 µl
Buffer de Alta Fidelidad para PCR 10X	10 µl
$MgSO_4$ 0.2 mM	3 µl
dNTPs (stock 2mM)	13 µl
DMSO (Sigma)	10 µl
Oligo forward (100 pmoles/µl) (Tm 32°C)	2 µl
Oligo reverse (100 pmoles/µl) (Tm 36°C)	2 µl
Taq Platinum High Fidelity (Gibco)	1 µl
	100 µl

(La Tm de los oligos se calculó considerando 4°C para las Gs y 2°C para las Ts).

Se agregaron aproximadamente 50 ng del plásmido que contenía el fragmento de DNA templado, es decir, la región que se deseaba amplificar por la reacción de PCR. (Se añadieron 2 gotas de aceite mineral (Sigma) que impiden la evaporación de la muestra).

Posteriormente, se programó un controlador térmico con el siguiente programa:

1.- 94°C 1'
2.- 94°C 30"
3.- 55°C 30"
4.- 68°C 2'
5.- Repetir en forma cíclica del paso 2 al 4 por 24 veces.

RESULTADOS

Identificación y Secuenciación del gen *fliC* de *Rhodobacter sphaeroides* WS8N

Con objeto de clonar el gen *fliC*, se realizó un análisis de hibridación tipo Southern Blot utilizando DNA cromosomal total de *R. sphaeroides* digerido con *Bam*HI y utilizando como sonda un fragmento obtenido por PCR en base a la secuencia genómica parcial del gen *fliC* de *R. sphaeroides* depositado en Gene bank con número de acceso CAA75001. Se identificó un fragmento *Bam*HI de aproximadamente 6 kb que hibridó con la sonda de detección de flagelina (*fliC*)[Material y métodos]. Posteriormente, se clonó este fragmento en pTZ19R y el plásmido resultante fue denominado pRS602.

Este plásmido fue sujeto a varias digestiones para poder obtener su mapa de restricción (Fig. 10) y adicionalmente, se inició la secuenciación de este fragmento utilizando subclonas construidas con los fragmentos *Eco*RI – *Bgl*II y *Bgl*II – *Hind*III. Comparando la secuencia obtenida y buscando homología con otras secuencias de DNA, se identificó al gene *fliC* a 662 pb después del primer sitio *Bam*HI. El gene consta de 493 aa codificados en 1479 pb.

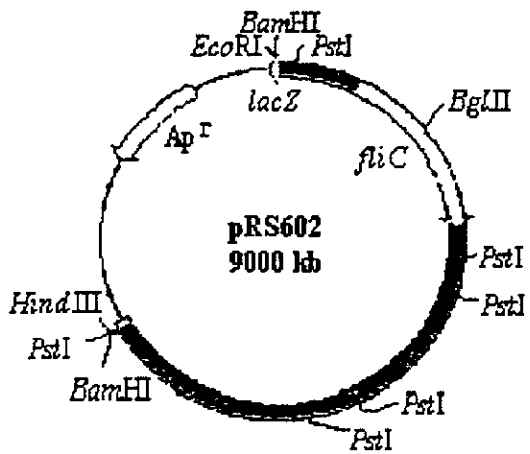


Fig. 10. Mapa de restricción del plásmido pRS602, que contiene el fragmento *Bam*HI de 6 kb en pTZ19R.
En amarillo se muestra la localización del gene *fliC* y el sitio *Bgl*II en el cual se insertará el gene reportero de la β-glucuronidasa (*uidA*).

En el transcurso de éste trabajo, el grupo de R. E. Sockett publicó la secuencia completa del gen *fliC* (63). Esta secuencia presenta una identidad del 99.59% con nuestra secuencia; los únicos cambios fueron V353I y T397S (Fig. 11), sin embargo, estos cambios no alteran el grupo funcional del aminoácido correspondiente a esas posiciones.

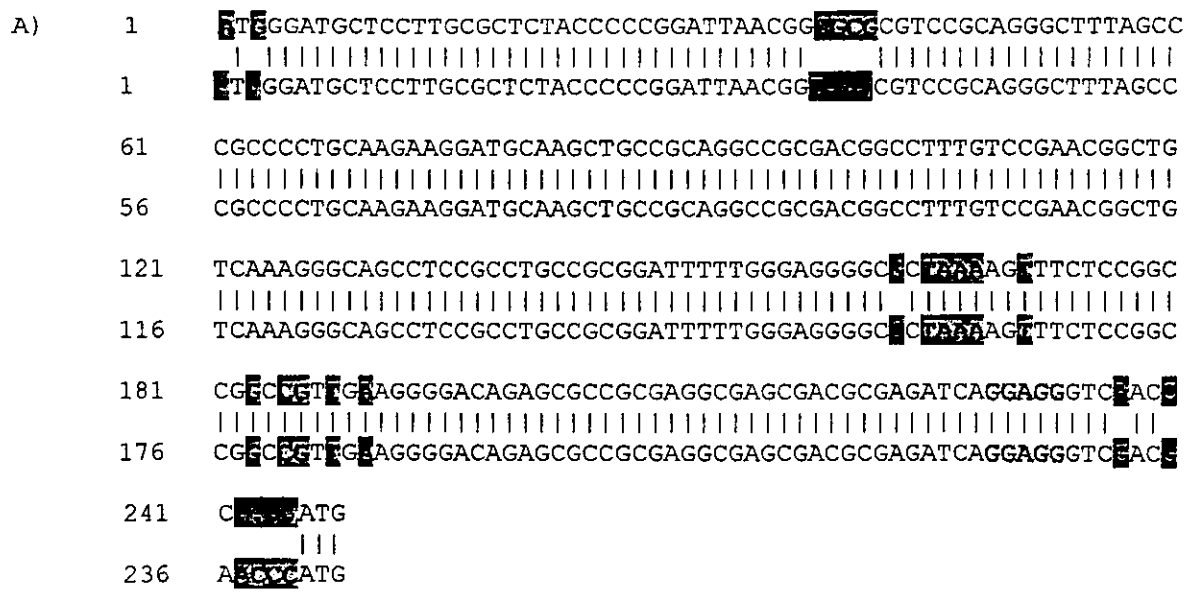
```
1      MTTINTNIGAIAAQANMTKVNDQFNTAMTRLSTGLRINAAKDDAAGMAIGEKMTAQVMGL
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1      MTTINTNIGAIAAQANMTKVNDQFNTAMTRLSTGLRINAAKDDAAGMAIGEKMTAQVMGL

61     NQAIRNAQDGKNLVDTTEGAHVEVSSMLQRLRELAVQSSNDTNTAADRGSLAAEGKQLIA
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
61     NQAIRNAQDGKNLVDTTEGAHVEVSSMLQRLRELAVQSSNDTNTAADRGSLAAEGKQLIA

121    EINRVAESTTFNGMKVLDGSFTGKQLQIGADSGQTMAINVDSAAATDIGAHKISSASTVV
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
121    EINRVAESTTFNGMKVLDGSFTGKQLQIGADSGQTMAINVDSAAATDIGAHKISSASTVV

181    ADAALTDTTIAASTDITITGFAGSDKITTAAGDSARTLAESINKKTSSTGVEATATTKAQ
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
181    ADAALTDTTIAASTDITITGFAGSDKITTAAGDSARTLAESINKKTSSTGVEATATTKAQ

241    LSGFTKGDTVSFKIGTADGNEVSIGDVSITDASDVRGLRDAINAVSGQTGITAAMAKDDN
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
241    LSGFTKGDTVSFKIGTADGNEVSIGDVSITDASDVRGLRDAINAVSGQTGITAAMAKDDN

301    SKIVLTDANGDDIMLTSVSSTTADFKVTALKSDGTATATNVDVGFGTNKSAGVTGQVDLV
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||:||||||||||||||||||
301    SKIVLTDANGDDIMLTSVSSTTADFKVTALKSDGTATATNVDIGFGTNKSAGVTGQVDLV

361    STKSFSVAASVSGSATAHFANANEGSELSSVAEIDLSTAEGASAAIGVIDVALSKISQSR
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||.||||||||||||||||||||||||
361    STKSFSVAASVSGSATAHFANANEGSELSSVAEIDLSTAEGASAAIGVIDVALSKISQSR

421    SELGAVSNRLDSTISNLTNISTSVQAAKSQVMDADFAAESTNLARSQILSQASTAMLAQA
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
421    SELGAVSNRLDSTISNLTNISTSVQAAKSQVMDADFAAESTNLARSQILSQASTAMLAQA

481    NSSKQNVLSLLRG
       |||||||||||||
481    NSSKQNVLSLLRG
```

Fig. 11. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la traducción del gene *fliC* de *R. sphaeroides* WS8N. Arriba FliC determinado en el laboratorio. Abajo FliC – R. E. Sockett. Se observaron solamente dos diferencias en la traducción de la secuencia, estos cambios fueron: V353I y T397S, los cuales se remarcan en rojo.

Análisis de las secuencias río arriba y río abajo del gen *fliC*

Al alinear las secuencias río arriba y río abajo de la región codificadora del gen *fliC* (Fig. 12), se observaron los siguientes cambios:

- En la región río arriba existen 4 gaps (en azul) en la secuencia Sockett con respecto a la secuencia obtenida en el laboratorio, además de 4 sustituciones o cambios en el nucleótido correspondiente (en verde). (Fig. 12A) Sin embargo, es importante destacar que en ambas secuencias se localizaron secuencias consenso importantes para la regulación del gen *fliC* (tales como Shine-Dalgarno (en amarillo) y secuencias -35 y -10 putativas para la unión del factor sigma 28 (en rosa).
- En los primeros 280 nt río abajo del gen *fliC*, encontramos sólo un par de sustituciones (Fig. 12B).



```
121   CAAACTGAAATTTTGCCCGGCCGGCCATTTTCCGCCACTCTGTTCCTACGACAGGGTGGG
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
121   CAAACTGAAATTTTGCCCGGCCGGCCATTTTCCGCCACTCTGTTCCTACGACAGGGTGGG

181   GATGACGCCGGGAATGCAGCTTTACACCGCACAGAGCTT--CACAGCGCCAGTCGCTCGT
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||
181   GATGACGCCGGGAATGCAGCTTTACACCGCACAGAGCTTGCCACAGCGCCAGTCGCTCGT

241   GGTGACGGCACAGCTCCAGCAGGCCATCTGCCTGCTGCAG
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
241   GGTGACGGCACAGCTCCAGCAGGCCATCTGCCTGCTGCAG
```

Fig 12. Alineación de las secuencias de nt que se encuentran río arriba y río abajo del gen *fliC* tanto en la secuencia obtenida en el laboratorio como de la secuencia presentada por R.E. Sockett. A) Alineación de la secuencia de nt río arriba del gen *fliC*. La secuencia obtenida en el laboratorio arriba y la secuencia obtenida por Sockett *et. al.* abajo. B) Alineación de la secuencia de nt río abajo del gen *fliC*. Arriba, la secuencia obtenida en el laboratorio y abajo la secuencia de Sockett.

Funcionalidad del gen *fliC*

Para comprobar que la secuencia identificada corresponde al gen funcional de flagelina, se aislaron mutantes de la cepa WS8N por medio de la recombinación homóloga del gen *fliC* con una copia del mismo gen interrumpido por el cassette *uidA-aad*. Para ello, el plásmido pRS602 fue digerido con *Bgl*II. Este sitio se localiza a 171 aminoácidos a partir de la posible metionina inicial. El cassette *uidA-aad* fue obtenido como un fragmento *Bam*HI de 4 kb a partir del plásmido pWM5 (49). El gen *uidA* codifica para la β-glucuronidasa y el gen *aad* proporciona resistencia a espectinomicina (Spc). El producto de la ligación de estos fragmentos fue tranformado en JM103 y las colonias Ap^r Spc^r fueron seleccionadas. Digestiones de los plásmidos de 8 colonias independientes mostraron que en todas ellas el cassette se insertó en la orientación que se muestra en la Fig. 13. Una de estas transformantes fue seleccionada y el plásmido purificado con el objeto de subclonar el fragmento *Bam*HI de aprox. 10 kb que lleva el alelo *fliC*::*aad-uidA* en el plásmido pJQ200 (45). Este último plásmido es incapaz de replicarse en *R. sphaeroides* y por lo tanto, la única forma de obtener colonias Spc^r es mediante un evento de recombinación entre el plásmido y el cromosoma.

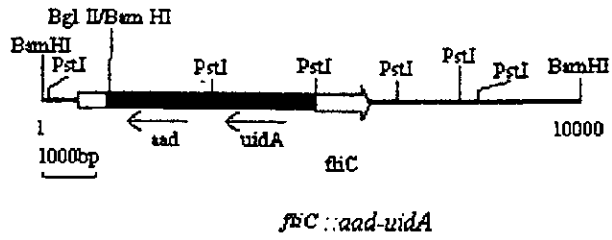


Fig 13. Esquema del plásmido pRS602 [*fliC*::*aad-uidA*].

Por otro lado, para obtener el alelo *fliC*::*uidA-aad*, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar el gen *fliC* por medio de PCR. El producto de PCR fue clonado en pTZ19R utilizando sitios de restricción que fueron diseñados en cada uno de los oligonucléotidos (*Xba*I para el oligonucléotido forward y *Kpn*I para el oligonucléotido reverse). La clona correcta fue secuenciada y en el sitio *Bgl*II se insertó el cassette *uidA-aad* como un fragmento *Bam*HI de 4 kb. En esta ocasión, entre las colonias transformantes obtenidas de ésta reacción de ligación, sí fue posible obtener un plásmido que llevó el alelo *fliC*::*uidA-aad*. Posteriormente, el fragmento *Xba*I-*Kpn*I de 5.4 kb fue subclonado al plásmido pJQ200 y posteriormente transferido a *R. sphaeroides* por conjugación. Las clonas recombinantes fueron aquellas en las que el proceso de doble recombinación entre el plásmido y el cromosoma se llevó a cabo y por lo tanto tienen la resistencia a espectinomicina (Spc^r).

Las mutantes fueron llamadas $FliC^-_a$: WS8N *fliC*::*uidA-aad* y $FliC^-_b$: WS8N *fliC*::*aad-uidA*. Como era de esperarse, el fenotipo de estas mutantes es Fla^-, por lo que no nadan en medio líquido ni en agar semisólido (Fig 14).

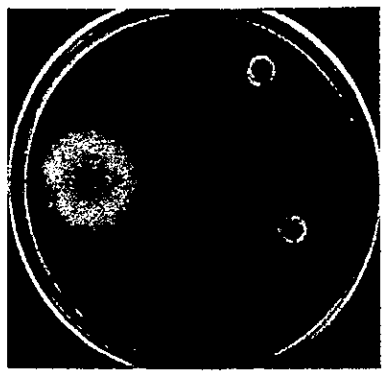


Fig. 14. Fotografía de una caja de swarming en la que se muestra la cepa WS8N silvestre (izquierda) y las cepas mutantes FliC^-_a (arriba y a la derecha) y FliC^-_b (abajo y a la derecha). En la fotografía se observa que las mutantes carecen del halo característico de la cepa silvestre que tiene motilidad.

El gen *fliC* (intacto) fue clonado en el plásmido pRK415 como un fragmento *Pst*I de aprox. 2.5 kb, en la misma orientación que el promotor de pRK415[Material y métodos]. Al introducir este plásmido en la mutante FliC^-_a el nado es recuperado. Sin embargo, este mismo plásmido es incapaz de complementar a la mutante FliC^-_b, por lo que suponemos que esta mutante que contiene el alelo mutado *fliC*::*aad-uidA* comprobado por Southern Blot, tiene alguna mutación adicional que impide la complementación. Esta mutación adicional puede ser debida a una recombinación heteróloga al momento de buscar la clona recombinante, lo cual implicaría la mutación de algún otro gene, o bien pudiese ser debida a una diferencia en la polaridad del cassette de acuerdo a su orientación que ocasiona efectos adicionales a la mutación del gen *fliC* (64) tales como la no expresión del(os) gen(es) ubicado(s) río abajo de *fliC*.

Por lo anterior, se decidió introducir a las mutantes previamente descritas el fragmento *Bam*HI de aproximadamente 6 kb del plásmido pRS602, el cual contiene al gen *fliC* y aproximadamente 4 kb río abajo del gen. Este fragmento *Bam*HI fue entonces clonado en pRK415 y conjugado en las mutantes FliC$^-$. Tanto la mutante FliC^-_a como la mutante FliC^-_b llevando este último plásmido recuperaron el nado en medio líquido y en agar semi sólido (Fig. 15). Lo anterior apoya la idea de que la inserción del cassette *uidA-aad* insertado en el gen *fliC* en orientación inversa al promotor del mismo gen (mutante FliC^-_b) (Fig. 13), ejerce un efecto polar, es decir, impide la expresión de los genes ubicados río abajo del gen *fliC*.

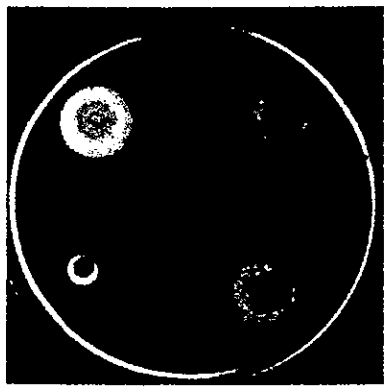


Fig 15. Fotografía de una caja de swarming en la que se muestra WS8N (cepa silvestre) a la izquierda y arriba, la mutante $FliC^-_a$ a la izquierda y abajo, y las mutantes $FliC^-_a$ (abajo y a la derecha) y $FliC^-_b$ (arriba y a la derecha) complementadas con el fragmento *Bam*HI de 6 kb de pRS602.

Identificación y secuenciación del ORF ubicado río abajo del gen *fliC*

Por lo anterior, con objeto de determinar la secuencia río abajo del gen de la flagelina, el plásmido pRS602 fue secuenciado utilizando oligonucleótidos específicos. A 181 pb río abajo del codón de término del gene *fliC*, encontramos el inicio de un marco de lectura abierto, el cual mostró alta similitud con el factor sigma 54 de varias especies bacterianas. Con uno de los factores sigma 54 previamente reconocidos en *Rhodobacter sphaeroides* la alineación realizada por el programa BLAST mostró un 39% de identidad. El gene identificado está codificado en 442 aminoácidos y tiene un peso molecular estimado de 47.41 kDa. La secuencia nucleotídica y su traducción se muestran a continuación.

```
ATGACGCCGGGAATGCAGCTTTACACCGCACAGAGCTTCGCACAGCGCCAGTCGCTCGTG
 M  T  P  G  M  Q  L  Y  T  A  Q  S  F  A  Q  R  Q  S  L  V

GTGACGGCACAGCTCCAGCAGGCCATCTGCCTGCTGCAGATGCCGAACGCCGAACTGTCC
 V  T  A  Q  L  Q  Q  A  I  C  L  L  Q  M  P  N  A  E  L  S

TCGTTCATCGAGAGCCAGTCGGAGGAAAACCCTTTCATCGAACTGCGCCTGCCGCCGGCG
 S  F  I  E  S  Q  S  E  E  N  P  F  I  E  L  R  L  P  P  A

CCGGTGCCGTCCGCTCCTCTGGGCAAGACCGCACCCGAGGACTGGGACCGCGTGGCAGGG
 P  V  P  S  A  P  L  G  K  T  A  P  E  D  W  D  R  V  A  G

CTTGCCGCCGATCCGGGGCCGTCGCTCTATGTGCATGTGGCGGCCGAGATCGCGCGTCTG
 L  A  A  D  P  G  P  S  L  Y  V  H  V  A  A  E  I  A  R  L

GGGTTCGATGCCCCGCAAGCGGCGGCCGCCCAGGTCTTTCTCGACGCGCTCGAACCCTGG
 G  F  D  A  P  Q  A  A  A  A  Q  V  F  L  D  A  L  E  P  W

GGCTGGCTCGGTCGCCCGATGGAGGAACTTGCCTTCCGCGCGGGCCTGTCGCTCGAGGCG
 G  W  L  G  R  P  M  E  E  L  A  F  R  A  G  L  S  L  E  A

GCCGAGGCGCTGCTCGCCCGGCTTCAGAAGATCGAACCCGCAGGGCTCTTTGCGCGCACG
 A  E  A  L  L  A  R  L  Q  K  I  E  P  A  G  L  F  A  R  T
```

```
CTTGCCGAATGCCTGCAGCTTCAGGCGGAAGAGCAGGGGCTGCTCACCCCGCTGTTCGCC
 L  A  E  C  L  Q  L  Q  A  E  E  Q  G  L  L  T  P  L  F  A

GCCGTTCTCGCGCATCTCCCGCTGCTGGCTGCGGCCGATCTCAAGGGCCTGTGCCGCGCT
 A  V  L  A  H  L  P  L  L  A  A  A  D  L  K  G  L  C  R  A

TGCGGCTGCGGGATGGAGGATCTGAAGGCCGTGCTGCGCAGCCTGCGCGGTCTCAATCCC
 C  G  C  G  M  E  D  L  K  A  V  L  R  S  L  R  G  L  N  P

AAGCCGGGCGCGCTGTTCGACGCGGCCCCTCCGCCCCAGCGGCCGCCGGATCTGGTGGTC
 K  P  G  A  L  F  D  A  A  P  P  P  Q  R  P  P  D  L  V  V

AGCCGCGGCGCCGAACGGTGGCGGGTGGATCTGAACCGCTCGACGCTGCCGTCCGTCGTG
 S  R  G  A  E  R  W  R  V  D  L  N  R  S  T  L  P  S  V  V

GTGCGCTCGGACGCTGCGGAAGGCTTCGCCCGGACGGCCGCGCCCTATGTGGGCGAGCGG
 V  R  S  D  A  A  E  G  F  A  R  T  A  A  P  Y  V  G  E  R

CTGTCGGTCGCGAAGTGGCTTGCGAGGGCCGTCGAGCATCGCAACCAGACCACGCTCAAG
 L  S  V  A  K  W  L  A  R  A  V  E  H  R  N  Q  T  T  L  K

ATCGGCGCCGAGGTGGTCCGCCGTCAGCGCGGCTTCCTCGAGGAGGGGCTGGCGCGCATG
 I  G  A  E  V  V  R  R  Q  R  G  F  L  E  E  G  L  A  R  M

GCGCCCATGACGCTGCGCGAAGTGGCCGATGCGGTGGGCGTGCATGAGAGCACCGTCAGC
 A  P  M  T  L  R  E  V  A  D  A  V  G  V  H  E  S  T  V  S

CGGGTGAGCTCGGGGCTGATGATCGCCACGCCGCAGGGCACCTTCCCGCTGAAGTCGTTT
 R  V  S  S  G  L  M  I  A  T  P  Q  G  T  F  P  L  K  S  F

TTCACCGCAGCGCTGGCCGCCCGCGAGGGCGACACGGCGGGATCGGCCGCCGCTGTCCGG
 F  T  A  A  L  A  A  R  E  G  D  T  A  G  S  A  A  A  V  R

CACCGCGTCCGCCAGCTCGTGCAGGCGGAATCGCCCGACGATCCGCTGAGCGACGATGCG
 H  R  V  R  Q  L  V  Q  A  E  S  P  D  D  P  L  S  D  D  A

ATCGCAAAGATCATTTCCGACGAGGGCGTGACGCTCGCCCGGCGCACCGTCGCCAAATAT
 I  A  K  I  I  S  D  E  G  V  T  L  A  R  R  T  V  A  K  Y

CGCGAGCAGCTGAACATCCCCTCGTCGGTGCAGCGCCGCCGTCAGGCCATCGTCACCGGC
 R  E  Q  L  N  I  P  S  S  V  Q  R  R  R  Q  A  I  V  T  G

GCACTCTGA
 A  L  *
```

Fig. 16. Secuencia nucleotídica y su traducción del gen denominado *rpoN3*, que se encuentra río abajo de *fliC*.

Recientemente, fue liberada la secuencia completa del DNA genómico de la cepa 2.4.1 de *R. sphaeroides* y en esta base de datos realizamos una búsqueda de secuencias similares al gen *rpoN* que identificamos río abajo de *fliC*. De esta búsqueda encontramos cuatro posibles genes que potencialmente codifican para el factor sigma 54: *rpoN1*, *rpoN2*, *rpoN3* (corresponde al gen río abajo de *fliC* con un 99.7% de identidad) *y rpoN4*. La alineación de las cuatro proteínas correspondientes a estos genes identificados en el genoma de la cepa 2.4.1. se muestra en la Fig. 17 y el árbol de homología de las mismas proteínas se muestra posteriormente (Fig. 18).

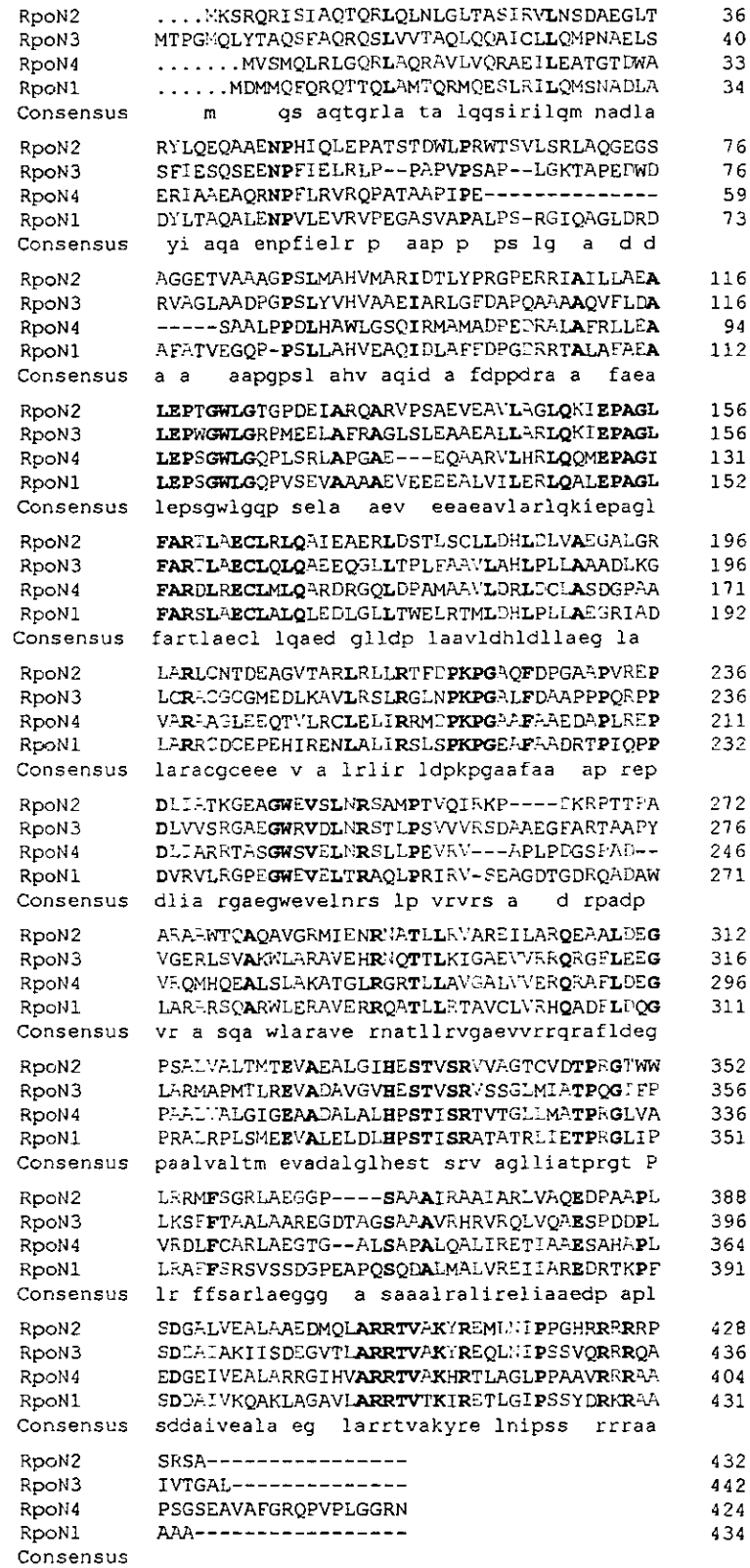


Fig. 17. Alineamiento de las cuatro proteínas de sigma 54 del genoma de *R. sphaeroides* 2.4.1. En negritas se muestran los aminoácidos idénticos (100% de similitud), en rosa los aminoácidos similares al menos 75% y en azul los aminoácidos que son similares al menos en un 50%. (El parámetro de similitud se refiere a que se conserve o no

el grupo funcional (i.e. polar, neutro, básico, etc.) de los aminoácidos que ocupan la misma posición en la alineación).

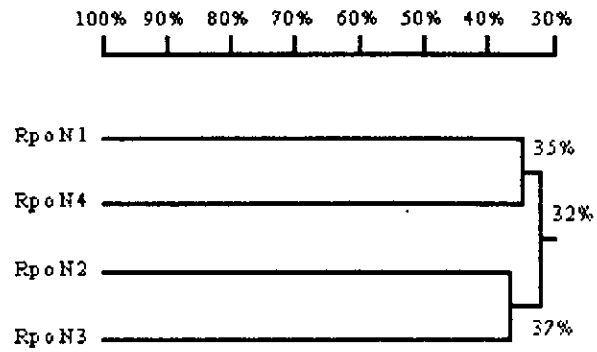


Fig. 18 Árbol de homología de las proteínas del factor sigma 54 encontradas en *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1.

Adicionalmente, decidimos comparar RpoN2 y RpoN3 que son los que muestran mayor homología utilizando una matriz de punto, que se muestra a continuación:

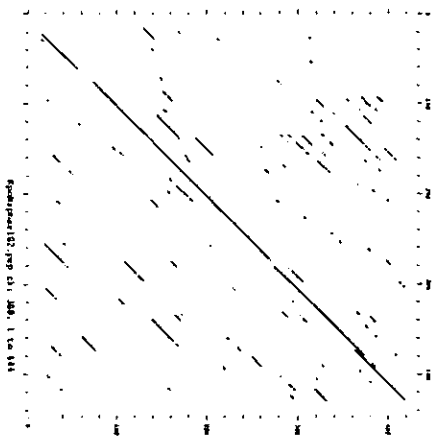


Fig. 19 Comparación de RpoN2 y RpoN3 por matriz de punto.

Lo que vimos con esta matriz, es que existe gran similitud entre estas dos proteínas. Importantemente, las regiones del aminoácido 145/146 al 163/164 (RpoN2/RpoN3) y del aminoácido 403/413 al 410/420 (RpoN2/RpoN3) son conservadas, por lo que se realizó la comparación con los dominios funcionales en los que está organizada la proteína sigma 54 de *E. coli*. Estos dominios están distribuidos en 3 regiones (I, II y III), los cuales están involucradas en

la activación y modulación de la holoenzima σ^{54}-RNA polimerasa (65). En la Fig. 20 se muestra un esquema de los dominios importantes en la función del factor sigma 54.

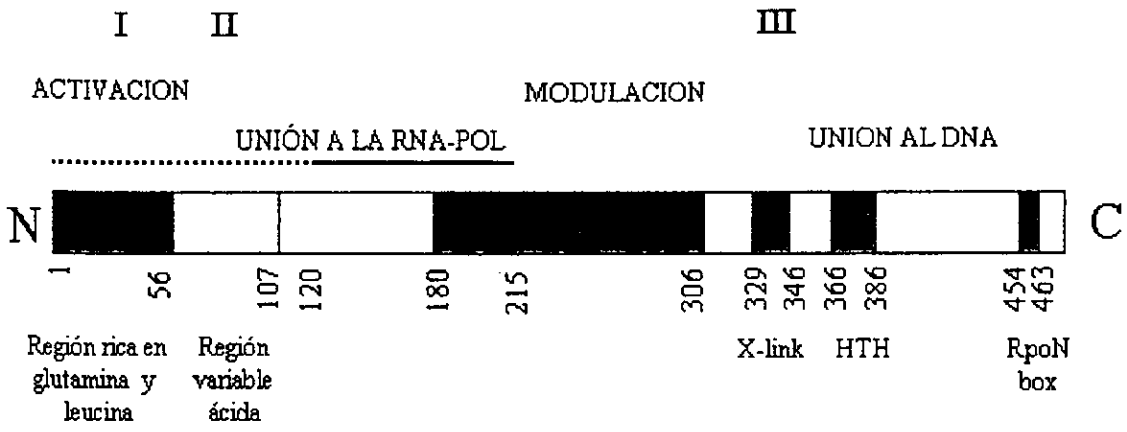


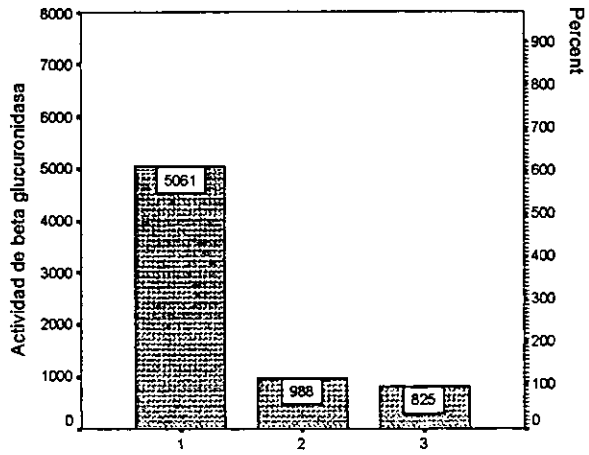
Fig. 20. Esquema de la organización por dominios y regiones de la proteína sigma 54 de *E. coli*.
Las funciones de unión al DNA y motivos asociados (región de entrecruzamiento con el DNA (XLINK), el motivo de hélice, vuelta, hélice (HTH) y la caja RpoN (RpoN box) se localizan en el extremo carboxilo terminal, cerca de las secuencias que modulan la unión con el DNA (aa 180-306). La respuesta a los activadores involucra a las secuencias de la región I, rica en leucinas y glutaminas (66), y la región II es ácida y variable. El principal determinante para que se lleve a cabo la unión con la RNA polimerasa se localiza entre los aminoácidos 120 a 215 (67).

Con base en lo anterior, y por medio de una extrapolación, podemos decir que en RpoN3 y RpoN2 se encuentran las regiones conservadas que corresponden a: 1) el dominio de unión a la RNA polimerasa (este dominio dada su importancia se encuentra altamente conservado en las proteínas sigma 54 funcionales)(68), y 2) al dominio de la caja RpoN. A éste dominio se le ha atribuido la unión del factor sigma 54 con la región consenso –24 de los promotores dependientes de sigma54 (69).

Actividad de sigma 54 en la cepa FliC^-_b

Dado que la cepa FliC^-_b (*fliC::aad-uidA*) no puede ser complementada solamente con el gen *fliC*, pero recupera el nado al complementarse con un fragmento de 6 kb que incluye *fliC*, *rpoN3*, y un posible ORF. Se hipotetizó que el cassette de resistencia ejerce un efecto polar sobre la expresión del gen *rpoN3*. Para probar esta hipótesis, se introdujo un plásmido que lleva el gen reportero

uidA bajo control del promotor flagelar *fliOp*, el cual es dependiente del factor sigma 54 (25). La actividad de β-glucuronidasa se comparó entre la cepa silvestre y la mutante FliC^-_b, ambas conteniendo el plásmido con la construcción *fliOp-uidA-aad*. Como control negativo se empleó a la mutante FliC^-_b sin plásmido alguno. Las actividades obtenidas se muestran en la siguiente figura:



CEPA	WS8N	FliC^-_b	FliC^-_b
Plásmido *fliO$_p$-uidA-aad*	+	+	-

Figura 21. Actividad de β-glucuronidasa expresada a partir del promotor del gen *fliO* dependiente de sigma 54. El control negativo es la cepa FliC^-_b (columna 3) sin plásmido. El control positivo es la cepa WS8N (cepa silvestre) con el plásmido que contiene la fusión *fliO$_p$-uidA-aad*. La columna 2 es la cepa FliC^-_b que lleva el plásmido con la fusión. [El valor de la actividad de beta glucuronidasa es el promedio de tres ensayos cuya desviación estándar se muestra en la figura].

Este resultado apoya la idea de que el cassette *uidA-aad* al estar insertado en la orientación *aad-uidA* (mutante FliC^-_b), ejerce un efecto polar sobre el gen *rpoN3* dado que la actividad del gen reportero (regulada por el promotor *fliOp* dependiente de sigma 54), escasamente aumenta un 20%, lo cual no es estadísticamente significativo ($p = 0.321$) con respecto a la cepa sin plásmido. Por otra parte, observamos que el promotor de *fliOp* es reconocido por el producto de este gen (*rpoN3*) puesto que la cepa silvestre que tiene al plásmido con el gen reportero dependiente de *fliOp*, aumenta un 614% con respecto a la cepa mutante, lo cual es obviamente estadísticamente significativo ($p = 0.017$).

Por otra parte, se realizó un estudio de tipo Western Blot utilizando un anticuerpo obtenido a partir de *Sinorhizobium meliloti* (Lab. del Dr. Enrique Morett) para ver la cantidad del factor sigma 54 en la cepa WS8N silvestre y en la mutante FliC^-_b (Fig. 22).

Fig. 22 Western Blot utilizando un anticuerpo anti-sigma 54. El carril 1 es la cepa silvestre WS8N y el carril 2 es la mutante FliC^-_b.

Este ensayo, mostró que ambas cepas cuentan con un polipéptido reconocido por el anticuerpo antisigma 54 casi en la misma proporción. A pesar de que este no es un ensayo cuantitativo, se puede apreciar una ligera disminución en la cantidad de sigma 54 en la mutante FliC^-_b pero esta disminución no fue dramática. Por lo tanto, este resultado sugiere que en las condiciones de cultivo empleadas, al menos uno más de los genes *rpoN* (*rpoN1,rpoN2* o *rpoN4*) debe ser expresado.

De los dos estudios anteriores podemos concluir que el promotor flagelar dependiente de sigma 54 es reconocido en la cepa silvestre WS8N y la β-glucuronidasa es expresada (Fig. 21). Sin embargo, en la mutante FliC^-_b, la poca actividad del gene reportero sugiere que los otros factores sigma 54 codificados por los genes *rpoN1, rpoN2 y rpoN4*, no reconocen eficientemente a este promotor. Alternativamente no puede ser descartado que la mutación en la cepa FliC^-_b haya afectado también alguna otra secuencia, tal y como el ORF3, y parte de los resultados de la complementación puedan ser explicados por la alteración de más de un solo gen.

Caracterización del promotor del gen *fliC* de *R. sphaeroides*

Al analizar la región río arriba de la secuencia codificadora del gen *fliC*, se encontró una secuencia similar al consenso de los promotores reconocidos por el factor sigma 28 (Fig. 12A, nucleótidos remarcados en rosa). Se decidió evaluar si esta región era capaz por sí misma de

promover la expresión de un gen reportero en *R. sphaeroides*. Asimismo, como el factor sigma 28 se encuentra presente también en *E. coli*, decidimos explorar la actividad de este promotor putativo también en *E. coli*.

Para ello se realizó la siguiente fusión transcripcional: un fragmento de 662 pb correspondiente a la región reguladora del gen *fliC* y aproximadamente las primeras 540 pb del gen estructural, fueron clonadas río arriba del cassette *uidA-aad*. Esta construcción fue clonada en pRK415 en la orientación contraria al promotor del vector, de esta forma el cassette *uidA* (el cual carece de promotor) se expresa a partir del promotor del gen *fliC*. El plásmido fue transferido a la cepa WS8N y los resultados obtenidos (Fig. 23) muestran que la cepa WS8N con el plásmido tiene elevada actividad mientras que, en la misma cepa sin el plásmido (control negativo) no se detecta actividad. Estos resultados son estadísticamente significativos (n = 2, p = 0.011) e implican que el promotor es reconocido en *R. sphaeroides*.

ACTIVIDAD DE β-GLUCURONIDASA EN *R. sphaeroides* REGULADA POR *fliCp*

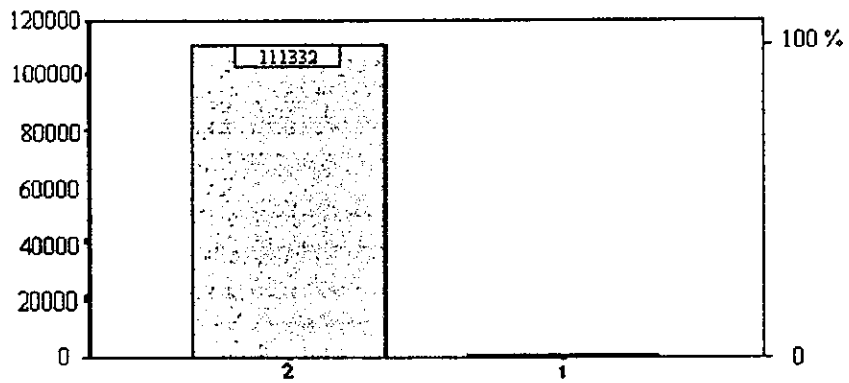


Fig. 23. Actividad de la β-glucuronidasa en la cepa WS8N de *R. sphaeroides*. Se observó que la actividad del gen reportero regulada por *fliCp* en la cepa WS8N (2) es significativamente diferente a la cepa WS8N (1) que no contiene la construcción que contiene al gen reportero. [n=2, p=0.011, desviación estándar columna 2=2601.9, desviación estándar columna 1=1.925].

Posteriormente, el mismo plásmido con la construcción que lleva al gen reportero se introdujo en la cepa RP437 de *E. coli* y se midió la actividad de beta glucuronidasa. Los resultados obtenidos (Fig. 24) muestran que el promotor de *fliC* de *R. sphaeroides* es ligeramente reconocido en *E. coli*. Aunado a este último resultado, se observó que la actividad de β-glucuronidasa (producida por el mismo plásmido) en cepas mutantes derivadas de RP437 fue muy similar a la observada

para la cepa silvestre (ver resultados posteriores), lo cual apoyó la idea de que en realidad es muy bajo el nivel de reconocimiento del promotor de *fliC* en *E. coli.* Por lo tanto, es factible que este promotor no sea adecuadamente reconocido por el factor sigma 28 en esta bacteria.

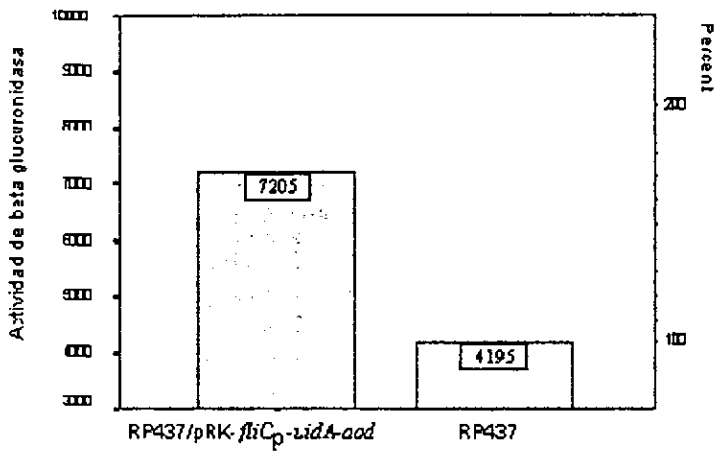


Figura 24. Actividad de beta glucuronidasa regulada por el promotor del gen *fliC* de *R. sphaeroides* en *E. coli.* La cepa sin el plásmido que contiene al gen reportero (RP437) se muestra a la derecha y la misma cepa con el plásmido que contiene al gen reportero se muestra a la izquierda. [Experimento representativo]

Estudios adicionales a este trabajo realizados en el laboratorio en los que fue aislada una cepa de *R. sphaeroides* que lleva una lesión en el gen que codifica para el factor σ^{28} (*fliA*::Tn*phoA*) (Rivera-Osorio, A; Osorio A; Poggio, S; Camarena L. Resultados sin publicar) demostraron que la actividad de beta glucuronidasa producida por el plásmido que lleva la fusión *fliC*::*uidA-aad* es totalmente dependiente de la presencia del gen *fliA* funcional. Asimismo, este resultado apoya la idea de que el gen *fliC* en *R. sphaeroides* es expresado a partir del promotor sigma 28 localizado río arriba del gen *fliC*. Por lo tanto, el factor sigma 28 de *E. coli* debe reconocer de forma muy ineficiente a este promotor. Por lo anterior, se decidió comparar las regiones promotoras dependientes de sigma 28 en estas dos bacterias.

GGGCGC **TAAAAGTT** TATCCGGCCG **GCCGTTGA** AGGGGACAGAGCGCC N_{36} **ATG**

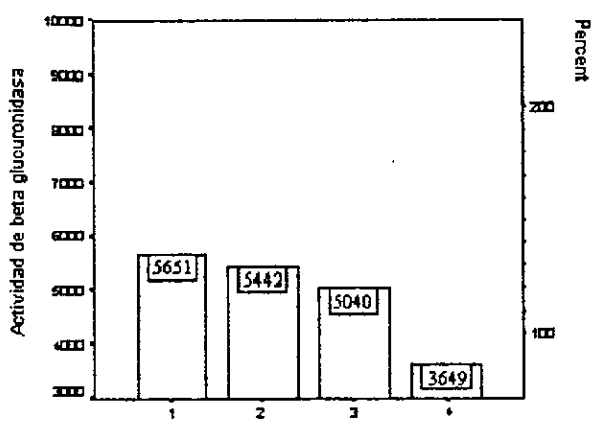
AAATTC **TAAAGGTT** GTTTTACGACA **GACGATAA** CAGGGTTGACGGCGA N_{61} **ATG**

Fig. 25. Comparación de las regiones promotoras del gen *fliC* de *R. sphaeroides* (arriba) y *E. coli* (abajo). La secuencia consenso de reconocimiento del factor sigma 28 se encuentra subrayado. Los cambios de nucleótidos entre estas secuencias se muestran en rosa.

Tal como se muestra en el esquema anterior, existen algunas diferencias o cambios de nucleótidos en estas regiones consenso (principalmente en las regiones –35 y –10) que podrían estar influyendo significativamente en el reconocimiento del promotor de *fliC* dependiente de sigma 28 en *E. coli* (70).

Actividad del promotor de *fliC* dependiente del factor sigma 28 en mutantes flagelares de *E. coli*

Al cuantificar la actividad del gen reportero expresado a partir de *fliCp* (de *R. sphaeroides*), en mutantes del control de la longitud del gancho (*fliK*⁻) y del switch flagelar (*fliM*⁻) (de *E. coli*) se obtuvo la Fig. 26.



CEPA	FliM⁻	FliK⁻	FliM⁻	FliK⁻
pRK-*fliCp-uidA-aad*	-	+	-	-

Fig. 26. Actividad de beta-glucuronidasa en mutantes de *E. coli*. La primera y la última columna representan a las mutantes en switch *fliM*⁻ (1) y en el control de la longitud del gancho *fliK*⁻ (4) sin el plásmido que tiene la construcción *fliCp-uidA-aad*. Las columnas 2 y 3 representan a la mutante *fliM*⁻ y *fliK*⁻ con el plásmido que contiene al gen reportero regulado por el promotor de *fliC*.
[Valores representativos (n=1) de un ensayo de beta-glucuronidasa en cepas de *E. coli*].

Tal como se ve en la Fig. 26, el reconocimiento del promotor de *fliC* de *R. sphaeroides* por el factor sigma 28 de *E. coli* es ineficiente, es decir, no hay diferencias significativas entre las cepas mutantes solas o con el plásmido pRK-*fliCp-uidA-aad*. Estas actividades aunadas a la Fig. 25, nos dan fundamentos para decir que el promotor del gen *fliC* de *R. sphaeroides* es ineficientemente reconocido por el factor sigma 28 de *E. coli*.

Actividad del promotor *fliCp* dependiente del factor sigma 28 en cepas mutantes de *R. sphaeroides*

En enterobacterias la expresión de los genes flagelares se encuentra regulada en forma jerárquica, en donde el factor sigma 28 (FliA) se requiere para la expresión de los genes de la clase III. Este factor sigma 28 es regulado por FlgM, el cual es un factor antisigma que secuestra a FliA hasta que la estructura del cuerpo basal y gancho (HBB por sus siglas en inglés) se encuentra ensamblada; una vez que esto ocurre FlgM se exporta hacia el exterior de la célula (71, 26).

Dado que el gen *fliC* de *R. sphaeroides* también es expresado utilizando el factor sigma 28, decidimos analizar la actividad del promotor *fliCp* en cepas de *R. sphaeroides* que llevan mutaciones en las estructuras del gancho y del cuerpo basal. Para ello, el mismo plásmido empleado anteriormente conteniendo al gen reportero (*uidA*) dependiente del promotor del gen *fliC* fue introducido en la cepa mutante TE1, la cual tiene interrumpido el gen *flgE** por Tn*phoA*, por lo tanto no ensambla gancho (44), y la mutante SP5, la cual lleva el alelo *fliMΔ1**, y muestra fenotipo Fla$^-$ (25). Debido a que estos genes en enterobacterias se encuentran dentro de la clase II de la cascada jerárquica, fue sorprendente el hecho de encontrar que la actividad de β-glucuronidasa fuese mayor en las mutantes TE/pRK-*fliCp-uidA-aad* y SP5/pRK-*fliCp-uidA-aad*, que en la cepa silvestre WS8N/pRK-*fliCp-uidA-aad* (Fig. 27).

*Apéndice A

ACTIVIDAD DE β-GLUCURONIDASA DEPENDIENTE DEL PROMOTOR DEL GEN *fliC* EN LAS CEPAS MUTANTES DE *R. sphaeroides*

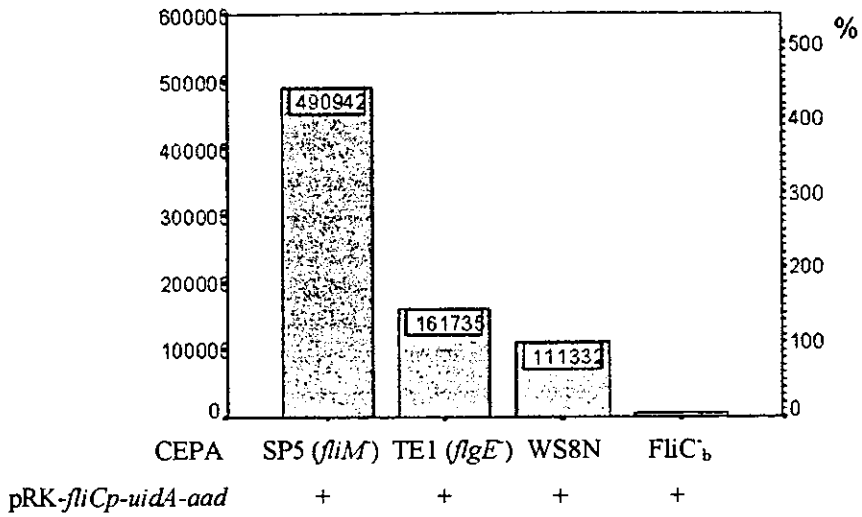


Fig. 27 Actividad de β-glucuronidasa dependiente del promotor de *fliC* en la cepa WS8N, SP5 (*fliM*), TE1 (*flgE*) y FliC^-_b. [El valor graficado es el promedio de dos ensayos de beta-glucuronidasa, las desviaciones estándar para cada cepa son las siguientes: SP5=2561.97, TE=12023.6, WS8N=2601.9 y FliC^-_b=172.6].

Tal como se ve en la Fig. 27, la mutante SP5/pRK-*fliCp-uidA-aad* tiene una actividad 350% mayor con respecto a WS8N/pRK-*fliCp-uidA-aad*, lo cual es estadísticamente significativo ($p = 0.000$). La diferencia entre la mutante TE/pRK-*fliCp-uidA-aad* y la cepa control WS8N/pRK-*fliCp-uidA-aad* no es estadísticamente significativa ($p = 0.084$), mientras que la diferencia entre la mutante FliC^-_b/pRK-*fliCp-uidA-aad* y la misma cepa control WS8N tiene una significancia estadística de $p = 0.013$. Por lo anterior, dado que al parecer la mutación en genes de la clase II (mutantes SP5 y TE1), es decir de estructuras previas al filamento flagelar no regulan transcripcionalmente la expresión del gen de la flagelina (*fliC*), decidimos comprobar la expresión de este gen al nivel de mRNA por medio de un Northern Blot (Fig. 28).

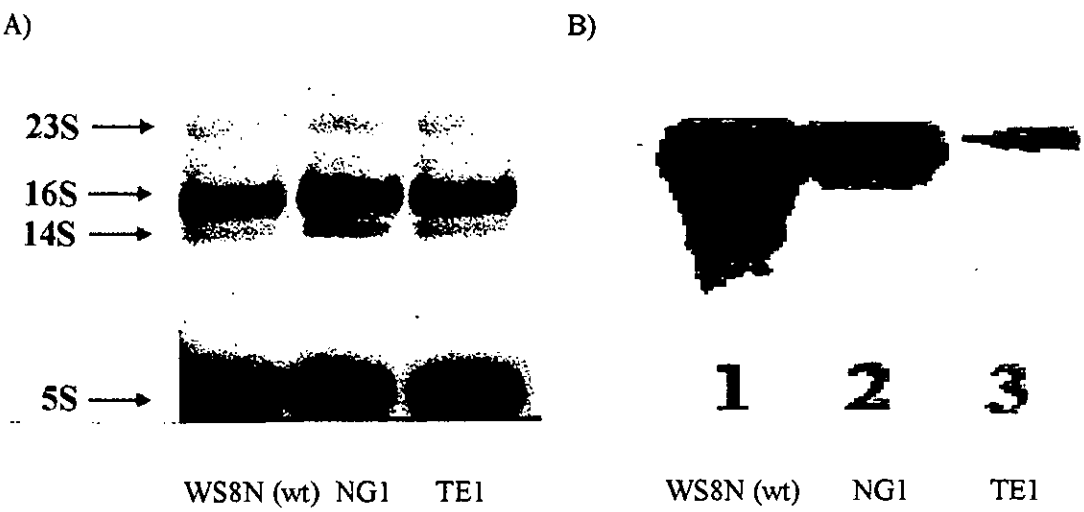


Fig. 28. A) Fotografía de un gel de agarosa con RNA total que muestra la expresión de las subunidades ribosomales en las diferentes cepas empleadas en B, B) Northern Blot del mRNA de *fliC* en la cepa WS8N y en las mutantes NG1 [*fliM*::*uidA-aad*] y TE1 [*flgE*::Tn*5phoA*] (25).

Tal como se ve en la Fig. 28, la cantidad de mRNA de flagelina en la cepa silvestre es mayor que en las mutantes, lo cual nos sugiere que en realidad si existe un control de la expresión del gen *fliC* que mantiene el orden de la expresión de cada una de las proteínas que se encargarán de autoensamblarse para formar la estructura flagelar. Tomando en cuenta los resultados anteriores (Fig. 27), podría proponerse la existencia de un control post-transcripcional que regula la vida media del mRNA de flagelina, tal como se ha reportado en *C. crescentus* (72).

Sin embargo, debido a que los resultados de la Fig. 27 podrían ser causados por un mayor número de copias debidas al plásmido empleado, se decidió integrar al cromosoma de *R. sphaeroides* la construcción del gen reportero regulado por el promotor de *fliC*. Para ello, el alelo *fliC*::*uidA-aad* clonado en el plásmido suicida pJQ200, fue introducido en las cepas TE1 (*flgE*::Tn*phoA*) y SP5 (*fliMΔ1*). Las cepas en las que ocurrió un evento de doble recombinación fueron seleccionadas y la actividad de β-glucuronidasa fue determinada para cada una de estas dobles mutantes (Fig. 29).

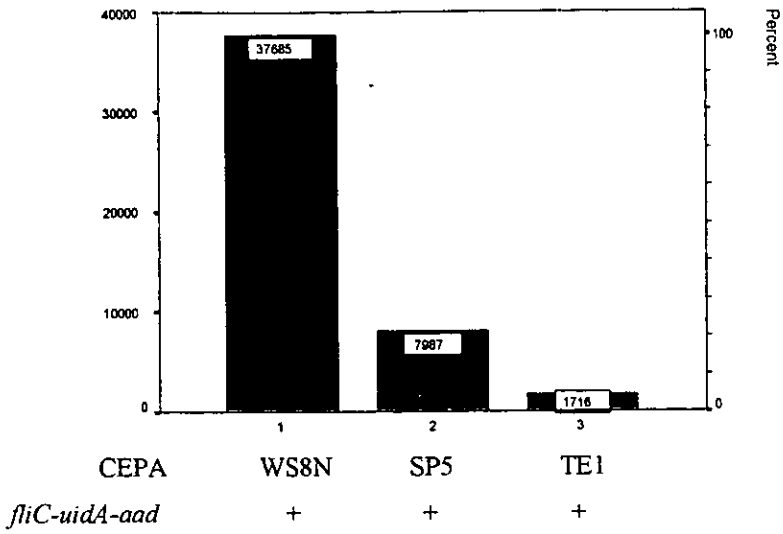


Fig. 29 Actividad de beta glucuronidasa en *R. sphaeroides*. En este caso, la actividad es regulada por el promotor cromosomal de *fliC*. [Las desviaciones estándar son las siguientes: WS8N=1785.41, SP5=317.47 y TE1=81.86].

De acuerdo a los resultados observados (Fig. 29), podemos decir que las tres columnas son estadísticamente diferentes ($n = 3$, $p = 0.001$). Y que la actividad del gen reportero regulada por el promotor cromosomal del gen *fliC* genera los mismos resultados que los observados con el Northern Blot de la Fig. 28.

Los resultados anteriores nos sugieren que existe algún mecanismo de regulación transcripcional que controla la expresión de la flagelina de acuerdo al ensamblaje de estructuras previas al filamento, tal como se ha observado en *E. coli, S. typhimurium y B. subtilis.*

DISCUSION

En *R. sphaeroides*, el filamento es la estructura más larga del flagelo y se constituye por monómeros del producto del gene de la flagelina, *fliC*. En este trabajo identificamos y secuenciamos el gen *fliC* de *R. sphaeroides*; encontramos una similitud cercana al 50% con las flagelinas de *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus* y *Pseudomonas fluorescens*, entre otras. La flagelina de *R. sphaeroides* esta compuesta de 493 aa codificados en 1479 pb; la predicción de estructura secundaria (Fig. 30) muestra un arreglo tridimensional similar al esperado por la comparación con flagelinas de otras especies, es decir, las regiones amino y carboxilo terminales muestran una gran tendencia para ensamblarse en alfa hélices, mientras que la región central de la proteína muestra una mayor tendencia a formar cadenas β-planares y pequeñas regiones que le ayudan en la conexión y giro de las cadenas, permitiendo el ensamblaje terciario de la proteina (3).

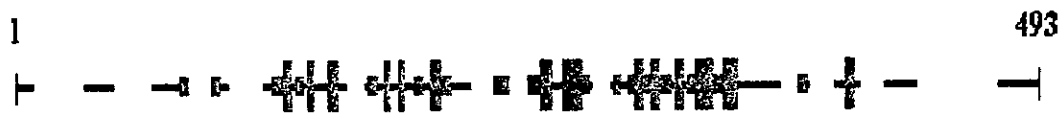
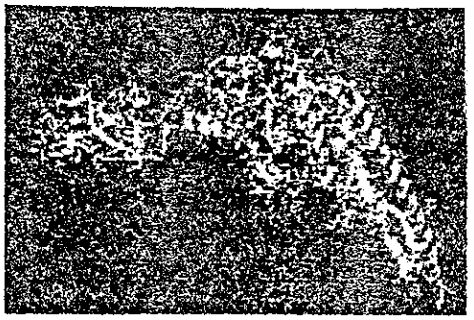


Fig. 30. Esquema de la predicción de estructura secundaria de la flagelina de *R. sphaeroides* WS8N. Las cajas amarillas representan α-hélices, las cajas verdes representan cadenas beta y las cajas moradas representan vueltas. (Este esquema se realizó con el consenso de la predicción de estructura secundaria de proteínas de los programas SOPM, SSP, Predator, DNAMAN). http://www.expasy.ch

Por otra parte, recientemente se cristalizó la flagelina de *S. typhimurium*, por lo cual, decidimos crear un modelo teórico de la estructura tridimensional de la flagelina de *R. sphaeroides* a partir de los datos obtenidos de la difracción del cristal de *Salmonella* (Fig. 30).

A)



B)

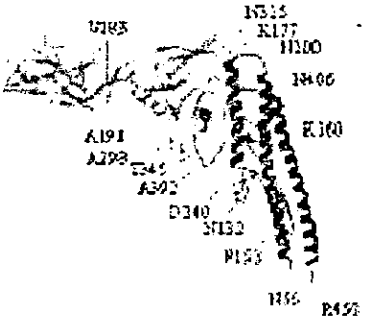


Fig. 31. Comparación de la estructura de la flagelina de *R. sphaeroides* (A) y *S. typhimurium* (B). [Fig. 31B tomada de 21].

En la Fig. 31A, se muestra el modelo teórico de la estructura de la flagelina de *Rhodobacter sphaeroides*, el cual se realizó en base al cristal de la flagelina de *Salmonella typhimurium* (Fig. 31B) por medio del programa Spdv-swissmod (73, 74, 75). El análisis de la estructura muestra rotámeros y loops poco frecuentes en otras estructuras. También predice, en base a la distribución de los aminoácidos internos y externos en la estructura, que la flagelina es parte de una estructura multimérica. Tal como se muestra en esta figura, la estructura es muy similar entre las dos flagelinas. Ambas parecen tener los dominios necesarios para su ensamblaje dentro del filamento, esto es: hélices que conforman al D1, las cadenas beta en lo que es el D3, y un arreglo tridimensional en el D2 igualmente muy similar. Adicionalmente, observamos loops entre los aminoácidos N135, K177 y N100 en ambas estructuras, siendo que se ha predicho que estos loops son responsables de la interacción entre el D2 y el D1 de dos flagelinas ensambladas dentro de una fibrilla (ver introducción). Por lo anterior, podemos suponer que el arreglo tridimensional y ensamblado de estos monómeros debe ser casi idéntico.

Por otra parte, el grupo de R. E. Sockett recientemente publicó la secuencia de la flagelina (*fliC*) de *Rhodobacter sphaeroides* cepa WS8N (63). Al hacer la alineación entre su secuencia *fliC* y la secuencia obtenida en este trabajo, encontramos sólo dos cambios en la secuencia de aminoácidos; Sin embargo, en ambos casos estos cambios no alteran el grupo funcional del aminoácido. Esto es: la valina por una isoleucina en la posición 353 no altera el hecho de que

ésta posición es ocupada por un aminoácido polar neutro; mientras que la treonina que cambia por serina en la posición 397 conserva un aminoácido alifático no polar en esta posición. Por lo anterior, podemos suponer que las características de la flagelina codificada por ambas secuencias no se alteran por éstos cambios.

Adicionalmente, se ha liberado recientemente la secuencia del genoma de *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. Esta secuencia se encuentra organizada en contigs (fragmentos de DNA de longitud variable) disponibles en la siguiente página electrónica:
http://www-mmg.med.uth.tmc.edu/sphaeroides

Dada la cercanía filogenética de esta cepa (2.4.1.) con la cepa WS8N, se decidió alinear la secuencia de *fliC* de la cepa WS8N con aquella obtenida a partir del genoma de la cepa 2.4.1. Se encontró al gene *fliC* de la cepa 2.4.1. en el contig 102 y se observó que conserva una identidad del 99.39 % con el gene *fliC* de la cepa WS8N de *Rhodobacter sphaeroides*.

En cuanto a la funcionalidad del gen *fliC*, ésta se verificó al confirmarse que mutantes por interrupción del gen con el cassette omega, eran incapaces de nadar en medio líquido y tampoco fueron capaces de realizar el anillo de expansión que forman las cepas silvestres en cajas de swarm. Al introducir en las cepas mutantes un plásmido que solamente contiene el gen *fliC* intacto y sin modificaciones, se observó que sólo la mutante FliC^-_a (*fliC*::*uidA-aad*) se complementó y el nado fue recuperado. Sin embargo, la cepa mutante FliC^-_b (*fliC*::*aad-uidA*), no se complementó. Este resultado podría ser explicado en términos de que el cassette omega tenga diferencias en la polaridad ejercida causadas por la orientación del mismo, es decir, que estando en la orientación contraria al sentido de la transcripción del gen *fliC*, ejerza una mayor inhibición sobre la expresión de los genes que se encuentran río abajo de *fliC*. Este efecto ha sido documentado en el caso de *Azotobacter vinelandi* en donde observan un cambio en la polaridad del cassette omega de acuerdo a la orientación en la cual se inserta este cassette. Al igual que lo observado en esta tesis, la inserción del cassette omega sólo provoca un efecto polar cuando el cassette se inserta en sentido opuesto a la transcripción del gen interrumpido (76). En base a esta explicación, secuenciamos la región río abajo del gen *fliC* e identificamos el gen *rpoN*, el cual codifica para el factor sigma 54.

La secuencia nucleotídica de este factor sigma 54, muestra las dos regiones conservadas que son indispensables para su funcionalidad, las cuales son la caja RpoN para su interacción con el DNA (específicamente con la región -24 de los promotores dependientes de este factor sigma) y una región de unión a la polimerasa. La funcionalidad de este gen fue apoyada por los estudios de expresión del promotor *fliO*p en la cepa FliC^-_b (Fig. 27). Este resultado, junto con el resultado del Western Blot, utilizando anticuerpos anti-sigma 54 nos sugieren que los otros factores sigma 54 que se encuentran en *R. sphaeroides*, no reconocen a este promotor flagelar.

Lo anterior, nos lleva a hipotetizar que en la mutante FliC^-_b el nivel de expresión del gen *rpoN* podría ser insuficiente para la adecuada expresión de los genes flagelares de la clase II (los cuales son dependientes de este factor). Esta idea fue apoyada por dos líneas de evidencia. Primero, la exitosa complementación de la cepa FliC^-_b con un plásmido que lleva clonado tanto a *fliC* como a *rpoN3*. Segundo, se observó que el promotor *fliOp* (clase II) fue incapaz de promover la expresión de un gen reportero en la cepa FliC^-_b. En este sentido, sería importante obtener evidencia física que nos permita comprobar si los genes *fliC* y *rpoN3* conforman un operón.

En base a la secuencia genómica de *R. sphaeroides 2.4.1.*, tenemos que el gen *fliC* está ubicado en una región de genes flagelares con el siguiente orden:

flgKL → *flaK* → ← *fliD* → *fliC* → *rpoN* → ← *flhB*

Este orden varía en comparación con la región de genes flagelares que contiene al gen *fliC* en *E. coli* y *Salmonella*, el cual es:

← *flhCD* ← ← ← *fliABC* → *fliDST*

(77)

Sin embargo, no podemos pensar que el orden afecte de una manera importante la regulación transcripcional de estos genes dado que la regulación de los mismos es dependiente de los promotores que los controlan. Sin embargo, en *R. sphaeroides*, una característica física importante es la presencia de *rpoN* río abajo del gen *fliC*, puesto que pareciera que ambos genes

podrían estar formando parte de un superoperón. Ya que suponemos que el gen *fliA* (sigma 28) es expresado a partir de un promotor sigma 54, esto implicaría que existe una autoregulación por parte de sigma 28, es decir, sigma 28 expresa a *fliC* y aumenta la expresión de *rpoN* asegurando así su propia expresión. Sin embargo, hasta el momento no tenemos ninguna evidencia física de que esto suceda *in vivo*.

Además, es importante destacar que las observaciones que se realicen en la cepa 2.4.1 de *R. sphaeroides* no implican necesariamente que sean válidas para la cepa WS8N, ya que existen estudios sobre la complejidad genómica de varias cepas de *R. sphaeroides* que muestran que existe cierta heterogeneidad entre las diferentes cepas de este microorganismo, por ejemplo, se pueden encontrar uno o más operones transcritos en direción opuesta en relación al mismo operon(es) pero en otras cepas, además de diferentes patrones de digestión enzimática, etc. (78). Por lo que el estudio de los genes y regiones genéticas que codifican a las proteínas flagelares de la cepa WS8N pudieran mostrar diferencias en otras regiones de genes flagelares de la cepa 2.4.1, por lo que su estudio es importante.

Al analizar otras regiones de la base de datos del genoma de *Rhodobacter sphaeroides*, se encontró que el contig 75 contiene un gen homólogo (40 %) a *fljL* (la flagelina de 27 kDa) de *C. crescentus*. La alineación de la traducción de estos dos genes mostró un 46% de residuos similares. Además, fue interesante el encontrar que la alineación de las proteínas FliC y FljL de *R. sphaeroides*, muestra una similitud del 38% en la secuencia de aminoácidos, en la cual las regiones con mayor rango de alineación se encuentran tanto en la región amino y carboxilo terminales. Dado que en FliC estas regiones conforman el D1 que es necesario para el ensamblaje de las fibrillas del filamento, podríamos especular que esta proteína FljL podría ser ensamblada junto con FliC en el filamento. Alternativamente, este gen podría ser utilizado para la formación de alguna otra estructura involucrada o no en motilidad.

Sin embargo, se requieren estudios encaminados a averiguar el nivel de transcripción y tipo de regulación ejercida sobre éste gen para dilucidar si la proteína codificada por el mismo esta involucrada de alguna manera con el ensamblaje del filamento de *Rhodobacter sphaeroides* o bien con alguna otra estructura. Una alternativa, es crear mutantes FljL$^-$ (WS8N *fljL*::*aad*) y estudiar si forman o no filamento, o si este posee las mismas características que el de la cepa silvestre.

En el artículo de Sockett (63), se menciona que la flagelina de *Rhodobacter* no es exportada hacia el exterior de la célula en *E. coli*, y sugieren que esto pudiese ser debido a un defectuoso reconocimiento de la proteína por parte del aparato de exportación flagelar en *E. coli*. Con el actual conocimiento de la estructura de la flagelina y su traslado a través del canal central del filamento, (aunado a la alineación de las flagelinas de ambas especies), podemos sugerir que en alguna región del D3 de flagelina se encuentra el motivo que es reconocido para su transporte en *E. coli* dado que este es el primer dominio de la estructura de la flagelina que ingresa al canal interno del filamento para su transporte hacia la parte distal del mismo filamento, pero es necesario realizar experimentos para comprobar o rechazar esta hipótesis.

Por otra parte, en el trabajo experimental, se encontró que el promotor del gen *fliC* es reconocido por el factor sigma 28. Las diferencias funcionales encontradas en la expresión del gen reportero *uidA* transcrito a partir de este promotor entre *R. sphaeroides* y *E. coli*, pueden ser debidas a un mal reconocimiento del promotor por el factor sigma 28 existente en *E. coli* (70). Esto sugiere que las diferencias observadas en las regiones consenso del promotor de *fliC* en *R. sphaeroides* con respecto a las regiones consenso de *E. coli*, son trascendentales para su reconocimiento por el factor sigma 28 de *E. coli*. Por lo anterior, sería interesante realizar mutaciones puntuales en los nucleotidos en rosa del siguiente esquema para investigar cual o cuales son los nucleótidos trascendentales para permitir el reconocimiento del promotor de *R. sphaeroides* en *E. coli*.

R. sphaeroides GGGCGC **TAAAAGTT** TATCCGGCCG **GCCGTTGA** AGGGGACAGAGCGCC N_{36} **ATG**

E. coli AAATTC **TAAAGGTT** GTTTTACGACA **GACGATAA** CAGGGTTGACGGCGA N_{61} **ATG**

Por otro lado, al evaluar si la expresión del gen *fliC* es regulada por la presencia de una estructura gancho-cuerpo basal funcional por medio del plásmido que lleva el gen reportero bajo control del promotor del gen *fliC*, en la cepa silvestre WS8N, así como en cepas con defectos en el switch ($FliM^-$) y en el gancho ($FlgE^-$) flagelar, observamos que las mutantes no reprimen la expresión de este gen y en cambio notamos que la actividad de la mutante *fliMΔ1* cuadriplica la actividad de la cepa silvestre (Fig. 27). Sin embargo, al observar el transcrito de flagelina por medio de un estudio de hibridación tipo Northern Blot (Fig. 28), lo que vimos fue que la cantidad de transcrito de flagelina es mucho menor en las cepas mutantes, sobre todo en la

mutante *flgE*::Tn5*phoA*. Estos resultados nos sugieren la existencia de algún mecanismo de regulación post-traduccional que controle la vida media del mensajero de *fliC*. Sin embargo, no podía ser descartado un artefacto debido al efecto multicopia o a la estabilidad de la enzima β-glucuronidasa (GUS). Al evaluar la expresión de la construcción *fliC*::*uidA-aad* al reemplazar el gen *fliC* silvestre del cromosoma de las cepas WS8N (silvestre), SP5 (*fliMΔI*) y TE1 (*flgE*::Tn5*phoA*) (Fig. 29), obtuvimos resultados que muestran una actividad de beta-glucuronidasa que refleja los niveles de transcrito de flagelina observados en el Northern blot. Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo que controla negativamente la expresión de flagelina en ausencia de una estructura gancho-cuerpo basal funcional. Por otro lado, estos resultados también sugieren que esta regulación es enmascarada cuando la construcción *fliC*::*uidA-aad* se encuentra en plásmido, probablemente debido a un efecto multicopia.

CONCLUSIONES

- El gen *fliC* codifica para una proteína funcional de 493 aminoácidos (FliC).
- La expresión del gen *fliC* es dependiente de un promotor reconocido por el factor sigma 28
- El nivel de mRNA de flagelina se encuentra regulado a nivel transcripcional o post-transcripcional, mediante un mecanismo que detecta la existencia de las estructuras flagelares previas a la formación del filamento.
- La mutación *fliC*::*uidA-aad* ejerce un efecto polar sobre la expresión del gen *rpoN3*. Por lo tanto, *fliC* y *rpoN3* podrían conformar un operon.
- RpoN3 (sigma 54) es un factor transcripcional funcional del cual depende la expresión de varios genes de la clase II dentro de la cáscada jerárquica de *R. sphaeroides*.
- La estructura terciaria de la proteína FliC sugiere un ensamblado del filamento muy similar al descrito en *S. typhimurium*.

PERSPECTIVAS

- Cuantificar la posible regulación post-traduccional del mRNA de *fliC* mediante a) fusiones traduccionales y/o b) uso de rifampicina para cuantificar el mRNA de *fliC* en distintas condiciones y tiempos.
- Determinar el posible papel que desempeñe FljL en el ensamblado del filamento por medio de mutaciones en el gen *fljL*.
- Realizar posibles inferencias en la interacción de proteínas axiales con FljL por medio de programas de docking (en caso de que ésta proteína resulte ser funcional),
- Por medio de mutaciones puntuales del promotor del gen *fliC* dependiente de σ^{28} de *R. sphaeroides*, determinar los nucleótidos con mayor relevancia para su reconocimiento eficiente en *E. coli*.
- Determinar si FliC y RpoN3 conforman un operon mediante un estudio de Northern Blot o mapeo por S1.

Apéndice A. Genes flagelares, de motilidad y quimiotaxis, y sus funciones conocidas.

PRODUCTO GÉNICO	FUNCIÓN-LOCALIZACIÓN
Proteínas reguladoras	
FlhC, FlhD	Reguladores maestros del regulón flagelar actuando en operones clase 2. Factores de iniciación de la transcripción.
	Factor de Iniciación (s) para clases 3ª y 3b.
FliA	Factor anti-FliA. Activo sólo cuando la estructura formada
FlgM	no ha completado el gancho.
	Represores de la clase 3a y 3b
FliS, FliT, FliD ¿?	Represores del operon fliC
FljA	
Proteínas involucradas en el proceso de Ensamblaje	
FlhA, FliH, FliI, FliO, FliP, FliQ, FliR	Componentes propuestos del aparato de exportación.
FlgA	Ensamblaje del anillo P. (mutantes tienen flagelo)
FlgD	Iniciación del ensamblaje del gancho.
FlgK	Control de la longitud del gancho.
FlgB	Metilación de los residuos de lisina en la flagelina; la función e esta modificación se desconoce.
FlhB, FlhE	Son co-transcritas con FlhA, un componente del aparato de exportación flagelar.
FliL	Se ha observado que solo tiene un segmento intramembranal.
Componentes Estructurales del Flagelo	
FliF, FliM, FliN	Complejo del switch; involucrados en rotación, y determinación de la dirección de ésta.
MotA, MotB	Permiten la rotación; componentes del motor flagelar.
FliF	Anillo M-S
FliE	Componente del cuerpo-basal, posiblemente unión eje, anillo M-S
FlgB, FlgC, FlgF	Parte proximal del Eje.
FlgG	Parte distal del Eje.
FlgI	Anillo P
FlgI	Anillo L
FlgE	Gancho
FlgJ	Necesario para el ensamblaje en una etapa temprana (mutantes tienen flagelo)
FlgK, FlgL	Unión Filamento-Gancho.
FliC, FljB	Flagelina normal y flagelina alternativa en S. Typhimurium
FliD	Proteína de coronamiento
FliJ	Homologo a FliH de *B. Subtilis*
Proteínas Flagelares de Función Desconocida	
FlgJ, FlhB, FlhE, FliJ, FliW	
Componentes de la Transducción de la señal	
CheA	Cinasa de CheY y CheB
CheZ	Fosfatasa de CheY, antagonista de CheY en la regulación del switch.
CheW	Regulador positivo de la actividad de CheA
CheY	Regulador del switch, promueve rotación en dirección a favor de las manecillas del reloj, y nado al azar.
CheR	Metilación de los transductores. Adaptación a la señal
CheB	Desmetilación de los transductores. Adaptación a la señal.
Quimioreceptores o Transductores	
Tar (aspartato); Tap (péptidos en E. coli); Trg (ribosa); Trg (serina); receptores de azúcares en el sistema de fosfotransferencia.	

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

1. Armitage, J.P. 1992. "Bacterial motility and chemotaxis". Sci. Progress Oxford, 76:451-477.
2. Macnab R.M. 1996. "Flagella and motility", p. 123-145, In F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Waschington, D. C.
3. Macnab R.M. and D. J. DeRosier. 1998. "Bacterial flagellar structure and function", Canadian Journal of Microbiology, 34:442-451.
4. Paustian T. 2000. University of Wisconsin-Madison, "Surface structures", http://www.bact.wisc.edu/microtextbook/bacterialstructure/Flagella.html
5. DeRosier D.J. 1998. "The Turn of the Screw: The Bacterial Flagellar Motor", Cell 93:17-20.
6. Packer H.L., H. Lawther, J.P. Armitage. 1997. "The *Rhodobacter sphaeroides* flagellar motor is a variable-speed rotor". FEBS Letters 409:37-40.
7. Shah S.H.D., and R.E. Sockett. 1995. "Analysis of the *motA* flagellar motor gene from *Rhodobacter sphaeroides*, a bacterium with a unidirectional, stop-start flagellum", Molecular Microbiology 17(5):961-969.
8. Eisenbach, M. 1999. "Chemotactic-like response of *Escherichia coli* cells lacking the known chemotaxis machinery but containig overexpressed CheY. Molecular Microbiology 4:1125-1137.
9. Thomas D.R., D.G. Morgan, and D.J. DeRosier. 1999. "Rotational symmetry of the C ring and a mechanism for the flagellar rotary motor". Proceedings of the National Academy of Science 96:10134-10139.
10. Borkovich K.A., and M.I. Simon. 1990. "The Dynamics of Protein Phosphorylation in Bacterial Chemotaxis". Cell 63:1339-1348.
11. Blat Y., B. Gillespie, A. Bren, F.W. Dahiquist, and M. Eisenbach. 1998. "Regulation of Phosphatase Activity in Bacterial Chemotaxis". Journal of Molecular Biology 284(4):1191-1199.
12. Aizawa S.I., C.S. Harwood, and R.J. Kadner. 2000. "Signalin Components in Bacterial Locomotion and Sensory Reception". Journal of Bacteriology 1852(6):1459-1471.
13. Macnab R.M. 1994. "Motility and Chemotaxis", p. 123-145, In F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M.

Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 1st ed. ASM Press, Waschington, D. C.

14. Anat B., and M. Eisenbach. 2000. "How Signals Are Heard during Bacterial Chemotaxis: Protein-Protein Interactions in Sensory Signal Propagation". Journal of Bacteriology 182:6865-6873.
15. González-Pedrajo B., T. Ballado, A. Campos, R.E. Sockett, L. Camarena and G. Dreyfus. 1997. "Structural and Genetic Analysis of a Mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 Deficient in Hook Length Control", Journal of Bacteriology 179(21):6581-6588.
16. Macnab R.M. 2000. "Action at a Distance-Bacterial Flagellar Assembly". Science 290:2086-2087.
17. Seong J., J. Hoon, S. Il, and J. Sun. 1999. "Molecular Cloning and Characterization of the Helicobacter pylori *fliD* Gene, an Essential Factor in Flagellar Structure and Motility". Journal of Bacteriology 181(22):6969-6976.
18. Namba K., I. Yamashita, and F. Vonderviszt. 1989. "Structure of the core and central channel of bacterial flagella". Nature 342:648-653.
19. Morgan D.G., C. Owen, L.A. Melansongand, D.J. DeRosier. 1995. "Structure of Bacterial Flagellar Filaments at 11 Å Resolution: Packing of the α-Helices". Journal of Molecular Biology 249(1):88-110.
20. Samatey F.A., K. Imada, S. Nagashima, F. Vonderviszt, T. Kumasaka, M. Yamamoto, K. Namba. 2001. "Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling", Nature 410:331-337.
21. Kanto S., H. Okino, S.I. Aizawa. 1991. "Amino Acids Responsible for Flagellar Shape are Distributed in Terminal Regions of Flagellin". Journal of Molecular Biology 219:471-480.
22. Ely B., T.W. Ely, W. B. Crymes, and S.A. Minnich. 2000. "A Family of Six Flagellin Genes Contributes to the *Caulobacter crescentus* Flagellar Filament". Journal of Bacteriology 182(17):5001-5004.
23. Blair D.F., and SK Dutcher. 1992. "Flagella in prokaryotes and lower eukaryotes"; Current Opinion in Genetics and Development 2:756-767.
24. Newton A., N. Ohta, G. Ramkrishnan, D. Mullin and G. Raymond. 1989. "Genetic swithcing in the flagellar gene hierarchy of *Caulobacter* requires negative as well as positive regulation of transcription", Proceedings of the National Academy of Science USA 86:6651-6655.

25. Poggio S., C. Aguilar, A. Osorio, B. González-Pedrajo, G. Dreyfus and L. Camarena. 2000. "σ^{54} Promoters Control Expression of Genes Encoding the Hook and Basal Body Complex in *Rhodobacter sphaeroides*", Journal of Bacteriology 182(20): 5787-5792.

26. Karlinsey J.E., S. Tanaka, V. Bettenworth, S. Yamaguchi, W. Boss, S.I. Aizawa and K.T. Hughes. 2000. "Completion of the hook-basal body complex of the *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and *fliC* transcription", Molecular Microbiology 37(5):1220-1231.

27. Jones J. and I. Aizawa. 1991. "Genetic control of the bacterial flagellar regulon", Current Opinion in Genetics and Development 1:319-323.

28. Armitage J.P. and R. Schmitt. 1997. "Bacterial chemotaxis: *Rhodobacter sphaeroides* and *Sinorhizobium meliloti* - variations on a theme?", Microbiology 143:3671-3682.

29. Armitage J.P., and R.M. Macnab. 1987. "Unidirectional, Intermittent Rotation of the Flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*". Journal of Bacteriology 169(2):514-518.

30. Packer H.L., and J.P. Armitage. 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". Journal of Bacteriology 175:6041-6045.

31. Ward M.J., D.M. Harrison, M.J. Ebner, and J.P. Armitage. 1995. "Identification of a methyl-accepting chemotaxis protein in *R. sphaeroides*". Molecular Microbiology 18:115-121.

32. Hamblin P.A., B.A. Maguire, R.N. Grishanin, and J.P. Armitage. 1997. "Evidence for two chemosensory pathways in *Rhodobacter sphaeroides*. Molecular Microbiology 26(5):1083-1096.

33. Poole P.S., and J. P. Armitage. 1988. "Motility Response of *Rhodobacter sphaeroides* to Chemotactic Stimulations". Journal of Bacteriology 170(12):5673-79.

34. Packer H.L., and J. P. Armitage. 1994. "The Chemokinetic and Chemotactic Behavior of *Rhodobacter sphaeroides*: Two Independen Responses". Journal of Bacteriology 176(1):206-212.

35. Grishanin R. N., D.E. Gauden, and J. P. Armitage. 1997. "Photoresponses in *Rhodobacter sphaeroides*: Role of Photosynthetic Electron Transport". Journal of Bacteriology 179(1):24-30.

36. Kort R.W., W. Crielaard, J. L. Spudich, and K.J. Hellingwerf. 2000. "Color-sensitive motility and methanol release responses in *Rhodobacter sphaeroides*". Journal of Bacteriology 182(11):3017-3021.

37. Romagnoli S., and J.P. Armitage. 1999. "Roles of Chemosensory Pathways in Transient Changes in Swimming Speed of *Rhodobacter sphaeroides* Induced by Changes in Photosynthetic Electron Transport". Journal of Bacteriology 181(1):34-39.

38. Sambrook J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. "Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.

39. Ausubel F.M., R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl (ed). 1987. "Current protocols in molecular biology". John Wiley and Sons, New York, N.Y.

40. Parkinson J.S. 1978. "Complementation Analysis and Deletion Mapping of *Escherichia coli* Mutants Defective in Chemotaxis". Journal of Bacteriology 135(1):45-53.

41. Simon R., U. Priefer, and A. Pühler. 1983. "A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria". Bio/Technology 1:37-45.

42. Sistrom W.R. 1962. "Observations on the Relationship between the Formation of Photopigments and the Synthesis of Protein in *Rhodopseudomonas sphaeroides*". Journal of General Microbiology 28:599-605.

43. Poggio S., A. Osorio, G. Corkidi, G. Dreyfus, and L. Camarena. 2001. "The N Terminus of FliM is Essential to promote Flagellar Rotation in *Rhodobacter sphaeroides*". Journal of Bacteriology 183(10):3142-3148.

44. Ballado T., L. Camarena, B. Gonzáles-Pedrajo, E. Silvia-Herzog, and G. Dreyfus. 2001. "The Hook Gene (*flgE*) Is Expressed from the *flgbcdef* Operon in *Rhodobacter* sphaeroides: Study of an *flgE* mutant". Journal of Bacteriology 183(5):1680-1687.

45. Quandt J., Hynes M.F. 1993. "Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria". Gene 127(1):15-21.

46. Keen N.T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger. 1988. "Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria". Gene 70:191-197.

47. Leong S.A., G.S. Ditta, and D.R. Helinski. 1982. "Heme Biosynthesis in *Rhizobium*". Journal of Biological Chemistry 257(15):8724-8730.

48. Shine J., L. Dargarno. 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites". Proceedings of the National Academy of Science USA 71:1342-1346

49. Metcalf W.W., and B. L. Wanner. 1993. "Construction of new β-glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement". Gene 129:17-25.

50. Sistrom W.R. 1960. "A requirement for Sodium in the Growth of *Rhodopseudomonas sphaeroides*". Journal of General Microbiology 22:778-785.

51. Cohen S.N., A.C.Y. Chang, L. Hsu. 1972. "Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R factor". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 69:2110-2114.

52. Weaver D.E., and Tabita F.R. 1983. "Isolation and Partial Characterization of *Rhodopseudomonas sphaeroides* Mutants Defective in the Regulation of Ribulose Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase". Journal of Bacteriology 156(2):507-515.

53. Holmes D.S., and M. Quigley. 1981. "A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids". Analytical Biochemistry 114(1):193-197.

54. Birnboim H.C. 1983. "A Rapid Alkaline Extraction Method for the Isolation of Plasmid DNA". Methods in Enzymology 100:243-255

55. Maniatis T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. "Molecular cloning: A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory.

56. Southern E. 1975. "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". Journal of Molecular Biology 98:503.

57. Laemmli U.K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature 227:680-685.

58. Aiba H., S. Adhya, B. De Crombrugghe. 1981. "Evidence for two fuctional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells". Journal of Biological Chemistry 256:11905-11910.

59. Sanger F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. "DNA sequencing with chain terminating inhibitors". Proceedings of the National Academy of Science USA 74:5463-5469.

60. Schreir P.H., and R. Cortese. 1979. "A fast and simple method for sequencing DNA cloning in the single stranded bacteriophage M13", Journal of Molecular Biology 129:169-172.

61. Sanger F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. "DNA sequencing with chain terminating inhibitors". Proceedings of the National Academy of Science USA 74:5463-5467.

62. Jefferson R.A., S.M. Burgess, and D. Hirsh. 1986. "β-glucuronidase form *Escherichia coli* as a gene-fusion marker", Proceedings of the National Academy of Science USA 83:8447-8451.

63. Shah D.S.H., T. Perehinec, S.M. Stevens, S.I. Aizawa., and R.E. Sockett. 2000. "The Flagellar Filament of *Rhodobacter sphaeroides*: pH-Induced Polymorphic Transitions and Analysis of the *fliC* Gene". Journal of Bacteriology 182(18):5218-5224.

64. Windgassen M., A. Urban, D:E. Jaeger. 2000. "Rapid gene inactivation in *Pseudomonas aeruginosa*". FEMS Microbiology Letters 193:201-205.

65. Merrick M.J. 1993. "In a class of its own – the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σ^{N})". 1993. Molecular Microbiology 10(5):903-909.

66. Kustu S., Santero E., Keener J., Popham D., and Weiss D. 1989. "Expression of σ^{54} (*ntrA*)-Dependent Genes Is Probably United by a Common Mechanism". Microbiology Review 53(3):367-376.

67. Buck M., Gallegos M.T., Studholme D.J., Guo Y. And Gralla Y.D. 2000. "The Bacterial Enhancer-Dependent σ^{54}(σ^{N}) Transcription Factor". Journal of Bacteriology 182(15):4129-4136.

68. Hsieh M., H.M. Hsu, S.F. Hwang, F.C. Wen, J.S. Yu, C.C. Wen, and C. Li. 1999. "The hydrophobic heptad repeat in Region III of *Escherichia coli* transcription factor sigma 54 is essential for core RNA polymerase binding". Microbiology 145(11):3081-3088.

69. Taylor M., R. Butler, S. Chambers, M. Casimiro, F. Badii, and M. Merrick. 1996. "The RpoN-box motif of the RNA polymerase sigma factor σ^{N} plays a role in promoter recognition". Molecular Microbiology 22(5):1045-1054.

70. Karls R.K., D. Jun Jin and T.J. Donohue. 1993. "Transcription Properties of RNA polymerase Holoenzymes Isolated from the Purple Nonsulfur Bacterium *Rhodobacter sphaeroides*". Journal of Bacteriology 175(23):7629-7638.

71. Kutsukake K. 1994. "Excretion of the anti-sigma factor through a flagellar substructure couples flagellar gene expression with flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*". Molecular General Genetics 243:605-612.

72. Anderson D.K., and A.Newton. 1997. "Posttranscriptional Regulation of *Caulobacter* Flagellin Genes by a Late Flagellum Assembly Checkpoint". Journal of Bacteriology 179(7):2281-2288.

73. Guex N., A. Diemand, and M.C. Peitsch. 1999. "Protein modelling for all". Trends in Biotechnology Science 24:364-367.

74. Guex N., and M.C. Peitsch. 1997. "SWISS-MODEL and the Swiss-Pdbviewer: An environment for comparative protein modelling". Electrophoresis 18:2714-2723.

75. Peitsch M.C. 1995. "Protein modelling by Email". Biotechnology 13:658-660.

76. Vazquez A., S. Moreno, J. Guzmán, A. Alvarado, G. Espín. 1999. "Transcriptional organization of the *Azotobacter vinellandii algGXLVIFA* genes: characterization of *algF* mutants". Gene 232:217-222.

77. Kawagishi I., V. Muller, A.W. Williams, V.M. Irikura, and R.M. Macnab. 1992. "Subdivision of flagellar region III of the *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* chromosomes and identification of two additional flagellar genes". Journal of General Microbiology 138:1051-1065.

78. Siedenburg K., and Kaplan S. 1999. "Genomic Complexity among Strains of the Facultative Photoheterotrophic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides*". Journal of Bacteriology 181(5):1684-1688.