

00372



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

26

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización genética de la proteína FlgK, componente estructural del flagelo bacteriano en *Rhodobacter sphaeroides*

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

PRESENTA:

David Jaime Castillo Cornejo Director de Tesis: Dr. Georges Dreyfus

2003



Facultad de Ciencias UNAM

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: David Jaime Castillo Cornejo
FECHA: 29-10-03
FIRMA: [Signature]



A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# **PAGINACION DISCONTINUA**



UNIVERSIDAD DE VALPARAISO  
 VALPARAISO  
 1927

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Caracterización genética de la proteína FlgK, componente estructural del flagelo bacteriano en Rhodobacter sphaeroides".

realizado por David Jaime Castillo Cornejo

con número de cuenta 09852760-5, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
 Propietario

Dr. Georges Dreyfus Cortés

Propietario

Dr. Diego González Halphen

Propietario

Dr. Víctor M. Valdés López

Suplente

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía

Suplente

Dr. Heliodoro Celis Sandoval

Consejo Departamental de Biología

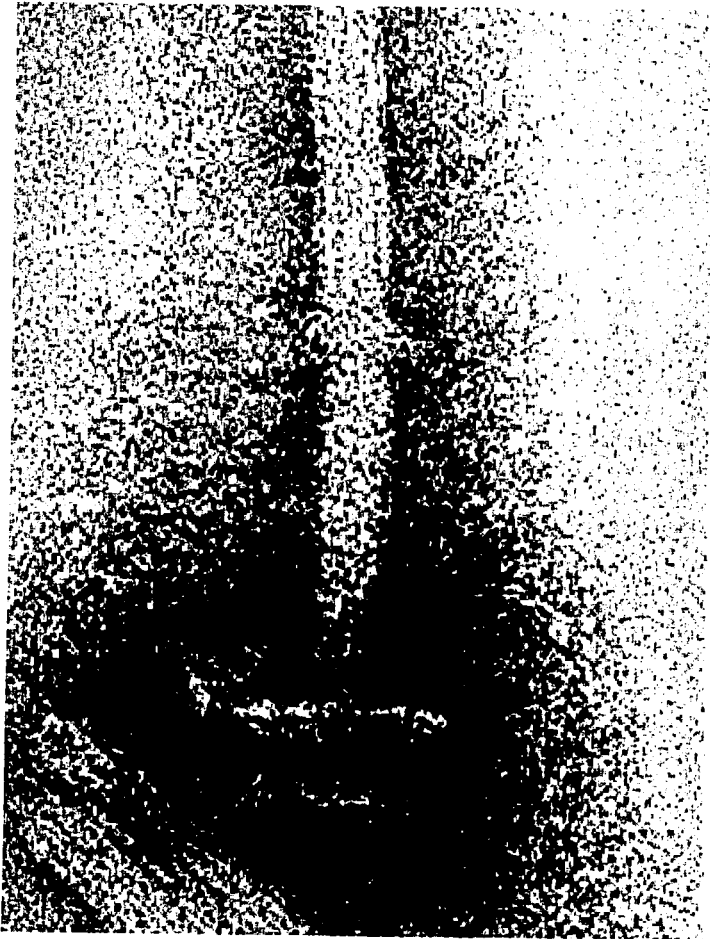
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS  
 U.N.A.M



DEPARTAMENTO  
 DE BIOLOGIA

6



Flagelo aislado de *Rhodobacter sphaeroides*. 40,000X, tinción negativa  
Imagen obtenida por microscopía electrónica de transmisión  
Unidad de Microscopía electrónica IFC-UNAM  
Cortesía de Mark West & Dr. Georges Dreyfus

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Este trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Georges Dreyfus C.  
En el laboratorio 222N del Departamento de Genética Molecular del  
Instituto de Fisiología Celular UNAM, con el apoyo de los donativos:  
CONACyT 38552-N y DGAPA (UNAM) IN221598

**Fe de ERRATAS**

Por razones administrativas el título del presente trabajo ha sido modificado de su original:

"Caracterización genética y molecular de la proteína FigK, componente estructural del flagelo bacteriano en *Rhodobacter sphaeroides*"

El autor se responsabiliza de las omisiones y excesos que en el contenido del manuscrito pudieran aparecer.



9

*"En todo hombre de ciencia existe el soplo de la fantasía"*

Giovanni Papini

*"I think of life as meaningless; but we give it meaning during our own existence"*

Francis Bacon, 1980

*"Al igual que alguien que desea llegar a la ciudad largo tiempo anhelada necesita ojos para ver el camino y pies para recorrerlo, también el que desea alcanzar la Ciudad del Nirvana necesita los ojos de la doctrina y los pies del método"*

Prajñā-Pāramitā-Sūtra

*"MENTE s. Forma misteriosa de la materia que es segregada por el cerebro. Su principal actividad consiste en esforzarse para determinar su propia naturaleza; la futilidad de este intento obedece al hecho que la mente sólo cuenta consigo misma para entenderse consigo misma"*

Ambroce Bierce 1875. Diccionario del Diablo.



## **Agradecimientos:**

Deseo expresar mi profundo agradecimiento al Dr. Georges Dreyfus por ser mi guía y un tutor permanentemente dedicado, quien ha logrado cultivar en mí, el interés y la pasión por la investigación, por medio de sus enseñanzas durante esta última, pero fundamental etapa de mi formación profesional.

Quiero agradecer la activa participación de la Dra. Laura Camarena Mejía, el Dr. Diego González Halphen, el Dr. Víctor Valdés y al Dr. Heliodoro Celis quienes han observado de cerca el desarrollo del presente trabajo y cuya labor en la revisión crítica y objetiva del manuscrito final han hecho posible la materialización de este esfuerzo.

Quiero agradecer al Instituto de Fisiología Celular UNAM, que a través de su personal académico y administrativo me han brindado las facilidades necesarias para participar en el desarrollo de investigación científica de calidad, atributo que caracteriza a esta dependencia.

Agradezco a las unidades de apoyo del IFC: Unidad de Microscopía Electrónica (Jorge Sepúlveda, Rodolfo Paredes), Unidad de Biología Molecular (Dra. Laura Ongay) Unidad de Cómputo, por las herramientas ofrecidas a través de su infraestructura y personal a cargo.

Deseo agradecer a los miembros del Laboratorio 222N del departamento de Genética Molecular:

A las enseñanzas y constante disposición de la QFB Tere Ballado, por su valiosa colaboración en el desarrollo técnico de este trabajo.

Al Q. Fco Javier de la Mora, por su participación en el desarrollo técnico de este proyecto.

Al Sr. Hilario Zamudio por su colaboración en el mantenimiento óptimo del laboratorio.

A la Facultad de Ciencias de la UNAM por albergarme en los años de mi preparación profesional.

A la Universidad Nacional por ser un espacio libre para el desarrollo y expresión de la ideas.

Marzo 2003

## **Agradecimientos Personales:**

A los múltiples factores que me han conducido hasta aquí, encarnados en todas las personas increíbles que he conocido en estos últimos tres años, desde los primeros pasos con Eugenia Silva-Herzog, entre elusiones desparramadas, "westerns" velados, pero sobre todo pláticas flagelológicas y no flagelológicas siempre interesantes. A los integrantes del laboratorio : Tere Ballado, Javier de la Mora e Hilario Zamudio, que día con día se esfuerzan por sacar a delante el proyecto, con apapachos, consejos aleccionadores y constante disposición, haciendo del trabajo un placer. A Axellé Ferré, por continuar con los segundos pasos y por la paciencia gala no siempre fácil de conciliar con la mexicana.

Al Dr. Dreyfus, quien ha confiado en mí y me ha incorporado al Clan (Gracias Doc por dejarme ser parte de esto de hacer ciencia...)

A los vecinos: al Dr. Celis, la Dra Irma Romero, a Israel ("cuacha"), Valeria, al Dr. Dimitris Georgellis por su siempre ávido interés y opiniones críticas. Al Dr. Zentella por las fugaces pláticas de pasillo, a los "neurolocos" del Lab de aprendizaje y memoria: Ísraela, Jimena, Luis, Maricela, que siempre "hechan la mano", al Dr. Bermúdez-Rattoni, antiguo "patrón" por permitirme la breve pero sustanciosa estancia.

A Lupita Ramírez y Domi, por sacarme en menos de un "teclazo" de los interminables apuros con los trámites de licenciatura y los del posgrado

A los Sinodales amigos y colaboradores: Dr Diego González-Halphen, la Dra. Laura Camarena Mejía, Sebastián Poggio, por su revisión exhaustiva y opinión crítica del proyecto.

A los flagelólogos que han dejado huella por aquí y a quien la parábola del hijo pródigo no les parecen solo palabrerías: Bertha González-Pedrajo y Mark West a quien agradezco sus opiniones sobre el desarrollo de este trabajo.

A la familia Raya, por el "emparentamiento" fortuito y siempre retribuyente apoyo.

A todos aquellos, aun que de forma tangencial siempre estuvieron involucrados: Isadora Andrade, Esteban López, Edgardo Sepúlveda, Ana Laura Ramos, Guiseppe Pasquetti, José María Alvarez, Fernanda Torregrosa, Julieta Jujnovski, Mariana Nava, entre muchos que engrosan la lista y a los que de antemano disculpo el raquítico espacio que tengo en esta hoja, más no así en mi memoria.

Al apoyo incondicional de mi familia: A mi madre, a Lita, A mi padre por ser mi mejor amigo.

A tod@s, mi gratitud.

**Caracterización genética de la proteína FigK, componente estructural del  
flagelo bacteriano en *Rhodobacter sphaeroides***

**PRESENTA**

**David Jaime Castillo Cornejo**  
**Facultad de Ciencias Departamento de Biología UNAM**  
**Instituto de Fisiología Celular UNAM**

**Director de tesis:**

**Dr. Georges Dreyfus Cortés**  
**Departamento de Genética Molecular**  
**Instituto de Fisiología Celular UNAM**

**Marzo 2003**

## INDICE

### 1 Introducción

- 1.1 Movilidad celular: Nanomáquinas
- 1.2 Movilidad bacteriana y quimiotaxis

### 2 Estructura del flagelo procarionte

- 2.1 Filamento
- 2.2 Gancho
- 2.3 Cuerpo basal
- 2.4 Motor flagelar y movilidad
- 2.5 Complejo de switch

### 3 Quimiotaxis

- 3.1 Organización y función del complejo supramolecular
- 3.2 Reguladores de la respuesta quimiotáctica

### 4 Aparato de exportación

### 5 Control de la expresión genética de los genes flagelares y quimiotácticos

- 5.1 Organización cromosomal de los genes flagelares
- 5.2 Biogénesis y regulación genética de los genes flagelares

### 6 Características sistemáticas de *Rhodobacter sphaeroides*

- 6.1 Características morfo-fisiológicas
- 6.2 El flagelo de *Rhodobacter sphaeroides*
- 6.3 Características generales de *flgK* HAP1

### 7 Objetivos

### 8 Materiales y Métodos.

- 8.1 Generación de mutante no polar, por interrupción del gen *flgK*
- 8.2 Reacción de amplificación de ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- 8.3 Construcción de plásmido recombinante
- 8.4 Conjugación bacteriana
- 8.5 Protocolo de conjugación
- 8.6 Selección de células mutantes
- 8.7 Ensayos de nado
- 8.8 Purificación de ADN cromosomal
- 8.9 Extracción de ADN por fenol-cloroformo
- 8.10 Análisis de material genómico por PCR
- 8.11 Análisis de material genómico por hibridización tipo Southern
- 8.12 Protocolo de hibridización
- 8.13 Diseño de construcción para ensayos de complementación
- 8.14 Diseño de una construcción con una remoción de la región central del gen *flgK*
- 8.15 Localización de flagelina libre en la mutante DC
- 8.16 Cálculo del factor K para uso del rotor A-100/30 (Beckman)
- 8.17 Separación de flagelina en SDS-PAGE
- 8.18 Inmunoréplica tipo Western blot

## 9 Resultados

- 9.1 HAP1 de *R. sphaeroides* características físico-químicas y estructurales
- 9.3 Alineamiento múltiple
- 9.4 Región central de FigK
- 9.5 Caracterización de la mutante *figK::aadA*
- 9.6 Ensayos de complementación
- 9.7 Reestablecimiento de la motilidad en la cepa interrumpida DC
- 9.8 Ensayos de complementación con las construcciones pDC-409 y pDC-104
- 9.9 Figuras de Placas de Nado y Micrografías electrónicas

## 10 Discusión

- 10.1 Región central de *figK* de *Rhodobacter sphaeroides*
- 10.2 FigK (HAP1) y su interacción con otras proteínas axiales
- 10.3 Evidencia de interacción de las HAP's con el aparato de exportación
- 10.4 Regulación de la expresión genética de *figK* de *R. sphaeroides*
- 10.5 Participación del promotor  $\sigma^{28}$  en la expresión de *figK*

## 11 Perspectivas

- 11.1 Posible función de la HAP's en el desempeño mecánico del filamento.
- 11.2 Propiedades mecánicas de las HAP's ¿Moduladores del estrés mecánico?

## 12 Conclusiones

### Bibliografía

### Apéndice

**Alineamientos de FigK *R. sphaeroides* contra otros 18 géneros**  
**Predicción de estructura secundaria de FigK ([www.psipred.com](http://www.psipred.com))**

### Apéndice técnico

Cepas y plásmidos.  
Soluciones de uso frecuente.  
Reactivos para electroforesis de ADN en TE-agarosa.  
Determinación espectrofotométrica de ADN.  
Transformación bacteriana por el método de  $\text{CaCl}_2$ .  
Reactivos para electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.  
Purificación de ADN plasmídico.  
Extracción de DNA de TE-agarosa.

## 1.- INTRODUCCIÓN

### 1.1 Movilidad celular: Nanomáquinas.

Una de las características físicas que poseen las células, es la capacidad de desplazarse; existen diversos mecanismos por medio de los cuales los diferentes tejidos en organismos pluricelulares se desplazan durante su morfogénesis y desarrollo o por medio de estructuras generadas a lo largo de su vida. Sin embargo, existen diferencias radicales en el diseño y función de tales mecanismos tan diversos como los organismos que los albergan, pero cabe señalar que cada uno de estos dispositivos tiene como objetivo el desempeño de trabajo mecánico que se traduce en desplazamiento. Desde que Newton en 1665 formulara las leyes del movimiento, no sólo desplazó las ideas aristotélicas dominantes por más de dos mil años respecto a este fenómeno, sino que proporcionó las herramientas necesarias para comprender el influjo de fuerzas naturales que inciden en el comportamiento de los objetos animados, incluidos los microorganismos. Así lo ejemplifica la correspondencia que mantuvo Antonie Van Leeuwenhoek con la Royal Society durante más de 40 años, donde describe estructuras y movimiento de "animáculos" por medio de una herramienta inseparable de la microbiología moderna: El microscopio.

Lo que Van Leewenhook y sus sucesores como Pfeffer y Engelmann en el siglo XIX observaron, esencialmente es la manifestación de los mecanismos subcelulares para desplazar a las células y responder ante estímulos ambientales, lo que actualmente se conoce como *taxis*. Existen diversas condiciones que favorecen una respuesta móvil desencadenada por agentes específicos y que confieren ventajas adaptativas a las células o grupos de células, expuestas a las variaciones en el ambiente que habitan. Estos agentes pueden ser atractores o repelentes, orientadores o agentes tróficos, sus características pueden ser químicas, lumínicas, e incluso electromagnéticas, entre otras, lo que deriva en respuestas: quimiotácticas, foto tácticas o magneto tácticas respectivamente.

Una máquina es un sistema cuyo funcionamiento básico es la generación de trabajo, por medio de la aplicación de una fuerza. (Hewitt 1995), de la misma forma la motilidad en las células, y en particular de los microorganismos a los que nos referiremos en el presente trabajo, requiere de esos mismos componentes para alcanzar una propulsión suficiente y desplazarse en el medio.

### 1.2 Movilidad bacteriana y quimiotaxis.

Las bacterias poseen una adaptabilidad metabólica que les permite colonizar los más diversos habitats, incluso en condiciones ambientales restrictivas para la mayoría de los organismos, como las ventilas hidrotermales en los océanos, en ambientes de alta salinidad, metales pesados, en la mucosa gástrica de diferentes hospederos e incluso en temperaturas inferiores a los -20°C . La casi omnipresente distribución que poseen los procariontes los define como especies cosmopolitas, es decir cuyo patrón de distribución abarca grandes extensiones.

Sin embargo a nivel inter específico hay una aparente contradicción ya que la biodiversidad de las bacterias tiene representaciones en hábitat limitados, manteniendo un estrecho contacto con su medio.

También podríamos definir al espacio físico (en dimensiones, volumen y superficies) como un componente más de las condiciones que permiten a ciertas bacterias colonizar el medio y desplazarse entre o sobre de él. En las bacterias existen básicamente tres mecanismos de movilidad hasta ahora bien caracterizados: **deslizamiento**, el **nado** y recientemente se ha descrito el **twitching motility** o retracción del Pili.

El **deslizamiento** en microorganismos se presenta en especies como Myxobacterias, Beggaiotoaceas, Flavobacterias y en el género *Proteus* donde inicialmente fue descrito. Este peculiar tipo de desplazamiento sobre superficies sólidas requiere de un mecanismo similar al encontrado en los movimientos ameboides en especies eucariontes. Recientemente se ha reportado en *Listeria monocytogenes* y *Shigella flexneri* un mecanismo complejo de deslizamiento bacteriano que comprende a proteínas muy similares a la actina eucarionte y receptores transmembranales de la superfamilia WASP ( Wiskott-Aldrich Syndrome Proteins). Estas proteínas de acoplamiento multimodular, conectan la actina bacteriana a una serie de receptores transmembranales entre ellos cinasas de tirosinas y proteínas heterodímeras capaces de hidrolizar guanosin trifosfato (Carlier, 2001). La fuerte analogía que este sistema posee con el citoesqueleto eucarionte, compuesto por una compleja red de microtúbulos y proteínas contráctiles, sugiere funciones similares para los lamelipodios en las bacterias caracterizadas donde también podrían existir fenómenos de transporte intracelular y fagocitosis.

Cabe señalar que muchos géneros bacterianos forman consorcios multicelulares llamados biopelículas (Consterton *et al* 1995) y los mecanismos de asociación, reconocimiento y desplazamiento de tales arreglos pueden involucrar a los sistemas anteriormente descritos.

El **nado** es el mecanismo que involucra una estructura especializada, constituida por múltiples subunidades de proteínas denominada flagelo, su estructura es similar a un látigo. Este organelo locomotor es el responsable de desplazar a las bacterias en un amplio rango de ambientes en tiempos muy cortos. Durante el nado, las velocidades alcanzadas por las bacterias oscilan entre 20 y 120  $\mu\text{m}/\text{seg}$  equivalentes a 60 cuerpos celulares por segundo (Armitage 1992). Si consideramos las dimensiones con reservas, esta velocidad equivale a llevar un auto de fórmula uno a su límite de aceleración en los primeros segundos de arranque o a la aceleración experimentada en un avión caza F-14 en ascenso (Purcell 1997). dependiendo de la especie, la velocidad de su desplazamiento también podría ser equivalentes a un motor supersónico (Atsumi 2001)

Una variación en el nado, es el nado sobre superficies sólidas que se ha denominado: "swarming" (enjambre) este tipo de desplazamiento involucra un mecanismo de diferenciación celular donde son producidas células hiperflageladas, elongadas que migran rápidamente y requieren estar coordinadas con el resto de las células adyacentes (Harshey 1994).

El **twitching motility** (retracción del Pili) involucra la retracción de las subunidades que componen el Pili (Parg *et al* 1995, Skerker & Berg, 2001) El Pili, al igual que el flagelo se compone de múltiples subunidades de una proteína, en este caso la pilina. Este tipo de movimiento requiere de un mecanismo de polimerización y repolimerización que permite la retracción del Pili, por medio de la traslocación de subunidades de pilina, desde la membrana hacia el espacio extracelular (Wolfgang *et al* 2000), de esta forma una bacteria puede alcanzar una velocidad de  $1\mu\text{m/s}$  (Merz *et al* 2000).

## 2 ESTRUCTURA DEL FLAGELO PROCARIONTE

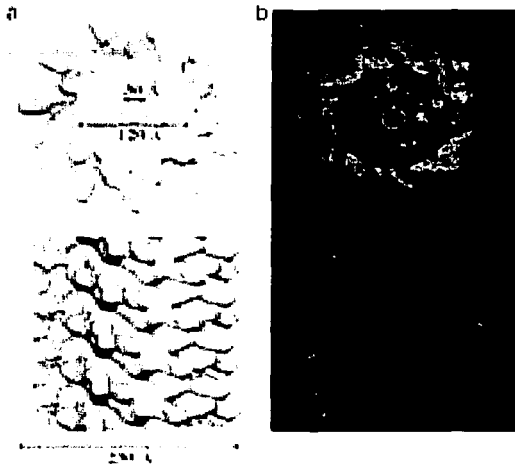
El flagelo es una estructura compleja que posee tres componentes básicos: un filamento helicoidal, una estructura curva denominada gancho y el cuerpo basal que incluye al motor responsable de generar la fuerza motriz. El filamento y el gancho son estructuras extracelulares, mientras el cuerpo basal se halla embebido entre la membrana y la pared celular y posee una cara citoplásmica (Macnab 1996, Jones & Aizawa 1991).

### 2.1 Filamento

El filamento es el componente responsable del desempeño del trabajo hidrodinámico en el medio y representa el principal componente flagelar en términos de costo biosintético. Posee además un interés clínico debido a que la antigenicidad de los residuos de las proteínas del filamento es comúnmente referida como el principal factor patogénico responsable en enfermedades infecciosas.

El filamento lo constituyen aproximadamente 20,000 subunidades de monómeros de flagelina (FliC) con un peso molecular entre 50 y 60 kDa. y con un coeficiente de rigidez de  $10^{15}$  dinas /cm<sup>2</sup>, 2 ordenes de magnitud mayor a la actina. La flagelina es una proteína con 3 dominios, un dominio carboxilo-terminal y un dominio amino-terminal altamente conservados entre las especies flageladas y un dominio central que aparente no es indispensable para el ensamblaje (Kuwajima 1998). Sin embargo es en ésta región donde se hallan los epitopes antigénicos (Macnab 1996). El filamento posee una longitud variable que va de entre 5 a 10  $\mu\text{m}$  y un diámetro conservado de aproximadamente 20 nm. Su simetría helicoidal se debe a la disposición de los monómeros de flagelina (FliC) dispuestos en una red cilíndrica con un arreglo pseudo hexagonal (Kondoh, Yanaguida 1975, Dreyfus & Silva-Herzog 1995) Este arreglo posee 5.5 monómeros por vuelta de hélice y cada una de las subunidades posee una inclinación de 45° en relación al eje de simetría del filamento.





TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 1

En el panel A la primera figura se muestra el diámetro interno del filamento (120Å) y el diámetro del canal interno (30Å) En la figura inferior al panel A se muestra el diámetro externo del filamento (30Å)

En el panel B se muestra la reconstrucción obtenida por resonancia magnética de un filamento de *Salmonella typhimurium*

La longitud de onda del filamento que entre cresta y valle hay entre 2 y 2.5µm y un diámetro helicoidal de entre 0.4 y 0.5 µm (Macnab 1996), su organización genera variaciones en la estructura filamental tanto macroscópicas como hidromecánicas, por ejemplo El filamento posee un canal central de aproximadamente 30 Å de diámetro (Ver figura 1), por donde pasan los monómeros de flagelina, aparentemente desnaturalizados hacia el espacio extracelular donde se autoensamblan el extremo del filamento naciente.

El filamento se organiza en 11 protofilamentos de flagelina paralelos al eje, que oscilan entre dos estados de conformación helicoidales o de superenrollamiento. Cuando el filamento cambia entre un estado de desplazamiento al de reorientación (Macnab en Neinhart *et al* 1987 ). El superenrollamiento se genera cuando dos tipos de interacciones entre las proteínas del filamento se orientan con una helicidad diestra denominada "R" (Right) o siniestra denominada "L" (Left), (Ver figura 2). Estas interacciones afectan la distancia y el empaquetamiento lateral entre las subunidades de flagelina, desplazando a los 11 protofilamentos (Namba & Vonderviszt, 1997). En *Salmonella typhimurium* la distorsión entre las hebras del filamento desplaza la distancia entre la subunidades ( 52 Å), disminuyendo en un 15% (8 Å) la interacción entre los tres dominios identificados de la flagelina. (Ver figura 3). Existen variaciones elásticas entre los dominios centrales y el extremo carboxilo terminal de la flagelina que generan desplazamientos en sus α-hélices, provocando la modificación en la disposición axial de las subunidades acortando las distancias y desplazando a los protofilamentos. (Samatey *et al* 2001), (Ver figura 4).

Mutaciones en las subunidades de la flagelina D107E, R124A, R124S, G426A y A449V dan lugar a filamentos rectos, mientras que mutaciones D313Y, A414V, A427V, N433D y A449T generan filamentos con una disposición helicoidal más dramática (Namba 2001).

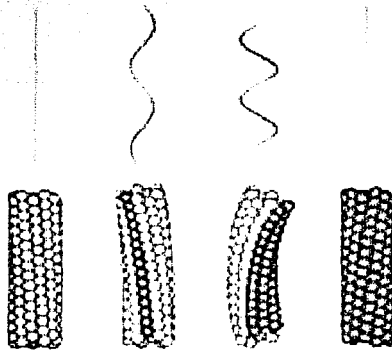


Figura 2

Las transiciones polimórficas observadas en el filamento flagelar se deben en gran parte a los cambios en la disposición de los monómeros de flagelina en alguno de los protofilamentos. En ésta figura se muestran la morfología adquirida por los filamentos dependiendo el número de protofilamentos desplazados, 1) muestra un filamento recto resultado de un tipo de flagelina con quiralidad levógira "L"; 2) Arreglo usualmente hallado en filamentos normales y sin transiciones quirales presenta una hélice orientada hacia la izquierda, 3) filamento con una torsión mayor, resultado de un desplazamiento de los protofilamentos hacia un estado "R", 4) cuando el número de protofilamentos con ésta orientación aumenta se conforma un filamento recto (Namba & Vonderviszt 1997).

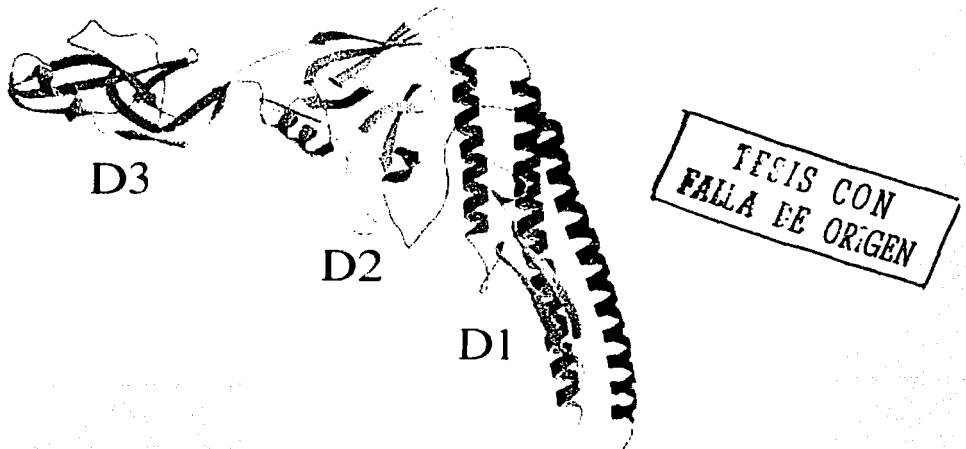


Figura 3  
Distribución en el filamento de los dominios estructurales de la flagelina cristalizada de *Salmonella typhimurium* (Samatey et al 2001).

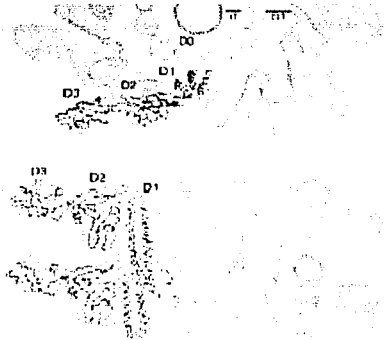


Figura 4  
Localización de la flagelina en estado polimérico en el filamento ensamblado de *Salmonella typhimurium* (Samatey *et al* 2001).

## 2.2 El gancho

El gancho es una estructura ubicada entre el eje y el filamento, que posee una constitución flexible responsable de transmitir la energía de propulsión generada en el motor y que probablemente también posee un papel amortiguador (Macnab, 1992). Las propiedades elásticas del gancho lo determinan como una estructura que posee una rigidez suficiente para transmitir la fuerza de torque generada desde el motor. La secuencia amino y carboxilo terminal tanto en las proteínas del gancho, las proteínas de unión (HAP's) y la flagelina, conserva dominios hidrofóbicos que forman estructuras secundarias llamadas "coiled coils" (colas enrolladas), estas estructuras se organizan en héptadas rígidas orientadas hacia el filamento (Macnab, 1996). Esta estructura está compuesta por aproximadamente 130 subunidades de la proteína FlgE que posee un arreglo helicoidal similar al filamento; forma una "malla" de 11 protofilamentos con una helicidad de media vuelta y una longitud de onda de 130 nm, con una longitud de 55 a 105 nm en contraste con los 10µm del filamento (Macnab 1996). Las regiones amino y carboxilo terminal de FlgE son similares a la flagelina del filamento a diferencia del resto de la proteína (Homma *et al* 1990). El arreglo helicoidal de las subunidades del gancho también genera un canal de 2.5 nm donde se ha sugerido se realiza la exportación de otros componentes axiales del flagelo. Al igual que las proteínas del filamento (FliC), las proteínas del gancho tienen la capacidad de polimerizarse *in vitro* (Kato *et al* 1982) y de la misma forma los ganchos resultantes sufren de transiciones polimórficas, en respuesta a variaciones en las condiciones experimentales como la salinidad, pH, fuerza iónica, entre otras. (Shah *et al* 2000)

TELIS CON  
FALLA LE OR.GEN.

Existen además otras 3 proteínas accesorias esenciales para el ensamblaje del flagelo (Homma 1984) llamadas proteínas asociadas al gancho o HAP's (Hook Associated Proteins) identificadas como componentes menores del gancho (Ikeda *et al* 1987). Estas proteínas son HAP1 (*flgK*), HAP2 (*fljD*) y HAP3 (*flgL*). HAP1 y HAP3 funcionan como conectores o adaptadores entre las proteínas del gancho y el filamento. Al igual que la flagelina y FigE, poseen extremos amino y carboxilo terminales muy conservados (Homma & Iino 1985). La proteína HAP1 en el caso de *Rhodobacter sphaeroides*, que estudiamos en el presente trabajo, posee una secuencia primaria de aminoácidos aproximadamente tres veces más grande que las reportadas en otros organismos, con un dominio central particularmente sobresaliente de aproximadamente 800 aminoácidos.

La longitud del gancho está regulada por una proteína moduladora FliK (Muramoto *et al* 1999). El fenotipo resultante de una mutante de FliK modifica la longitud del gancho generando un fenotipo con ganchos más largos que los silvestres, sin embargo se requiere de la presencia de FigK (HAP1) y FigL (HAP3) para que el gancho se ensamble apropiadamente. FliK inicia el ensamblaje del gancho y posteriormente la exportación de los monómeros de flagelina (Chilcott & Hughes 2000) HAP 2 o proteína de coronación forma un doble pentámero que controla la polimerización de los monómeros de flagelina en el extremo distal del filamento (Maki *et al* 1998), funcionando como una chaperona que modula el ensamblaje de los monómeros de flagelina (Ikeda *et al* 1996).

Las subunidades que están siendo exportadas son acopladas por un mecanismo rotatorio que permite al auto ensamblaje de los monómeros de FliC. (Yonekura *et al* 2000). Cabe aclarar que en *Rhodobacter sphaeroides* el gancho es una estructura recta, a diferencia de los ganchos flagelares en bacterias entéricas cuyo arreglo es curvo (West & Dreyfus 1997).

### **2.3 Cuerpo Basal**

El filamento y el gancho se unen a la célula a través del eje que interacciona con un complejo embebido en la membrana y pared celular denominado cuerpo basal (Khan 1993). Esta estructura se compone de un eje central de simetría cilíndrica y no hexagonal, además de un grupo de cuatro polímeros anulares. (Ver figura 5). Uno de ellos, el anillo MS, está constituido por monómeros de la proteína FliF (Ueno *et al* 1994) y es una de las estructuras que interacciona con el rotor y el complejo de switch, específicamente con la proteína FliG (Aizawa, 1990, Blair 1995).

Los anillos externos P (FigI) y L (FigH) forman dos "empaques" que sostienen al eje entre la pared de péptidoglicanos y la membrana de fosfolípidos (DePamphilis & Adler 1971). Estos anillos se encuentran ausentes en bacterias Gram positivas, lo que supone que su papel es evidente en organismos Gram negativos donde además requieren de dos proteínas para el acoplamiento de dichos anillos: FigA, necesaria para formación del anillo P (Kutsukake *et al* 1994) y FigJ que posee actividad de muramidasa (Nambu 1999).

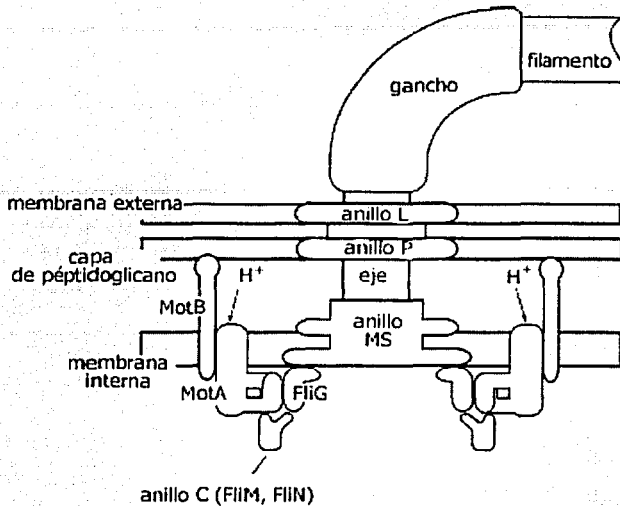


Figura 5  
Esquema que representa los elementos del cuerpo basal esquema modificado de (Atsumi, 2001)

El eje está conformado por cuatro subunidades FigB, FigC y FigF en la región proximal y FigG en la región distal (Homma 1990). El eje interactúa con el motor y el complejo del switch, debido a que el anillo MS y el eje forman una unidad estructural que rota en conjunto. El anillo MS, en bacterias entéricas, se proyecta hacia el citoplasma, por esa razón también se le denomina anillo "C" ó citoplásmico, formando una estructura parecida a la de una campana.

Mutaciones en el anillo MS, no solo generan fenotipos paralíticos, sino que la afinidad del anillo MS por una proteína del complejo de switch o interruptor (FliG) disminuye dramáticamente. Debido a que la proteína FliG, está implicada en la rotación y además se encuentra asociada a una de las proteínas del eje: FliF. Esto hace pensar que esta interacción es importante para la rotación del filamento. La estequiometría deducida de FliF y FliG es de 1:1 a partir del número de copias de FliF que son alrededor de 25 (Macnab1996).

## 2.4 El Motor flagelar y su movilidad

El motor flagelar es similar a un motor eléctrico fabricado por el ser humano, ya que requiere de una fuente de poder, un solenoide o bobina, un eje y un estator. La energía generada en un motor de corriente continua produce la rotación del eje que se sostienen por un estator constituido por bobinas. La torca es generada por un potencial electromotriz que se desplaza de forma perpendicular al plano del eje y en el caso de las bacterias, perpendicular al plano de la membrana (Según la regla de la mano izquierda de Fleming).

La composición del motor flagelar se ha estudiado intensivamente y existen evidencias bioquímicas, biofísicas y estructurales de su organización y función.

El motor consiste de tres partes principales: El anillo MS, el anillo C y un número variable de complejos de las proteínas MotA/B. El rotor, que está constituido por el anillo MS y la proteína FliG la cual está fija en el filamento flagelar. Alrededor del rotor se localizan varias copias del complejo MotA/B. Cuatro  $\alpha$ -hélices transmembranales de MotA y una de MotB conforman el canal iónico para  $H^+$  o  $Na^+$ , las regiones citoplásmicas de MotA (119 residuos entre las hélices 2 y 3 y 75 residuos entre las hélices 4 y el extremo carboxilo) se cree están asociadas para la generación de la torca (Togashi et al 1997, Zhou & Blair 1997). Si comparamos a un motor eléctrico con el motor del flagelo, las bobinas estarían representadas por un sistema quimiosmótico constituido por un grupo de canales iónicos, que corresponde a las proteínas MotA y MotB. Estas proteínas son responsables del paso de protones  $H^+$  deslocalizados por una diferencia de potencial traducida en voltaje (Kleutsch & Läger, 1990). Las bacterias alcalófilas emplean  $Na^+$  (Larsen 1974) y su activación es independiente del consumo de ATP. MotA y MotB son proteínas integrales de membranas, indispensables para la rotación del flagelo. Cuando ambas proteínas están ausentes generan un fenotipo paralizado, independientemente que este presentes el filamento, gancho y cuerpo basal; la estructura final es incapaz de rotar (Blair & Berg 1990). MotB posee un solo cruce transmembranal y un dominio de unión a la capa de peptidoglicanos (Parkinson 1985) a diferencia de MotA que posee cuatro cruces transmembranales, dos asas y una región citoplásmica (Dean 1983).

Los complejos de MotA/B forman el canal de protones e interaccionan de forma dinámica con el anillo C que se considera el estator.

La dirección de rotación puede ser en sentido de las manecillas del reloj o en el sentido contrario, sin que exista una modificación de la polaridad de la membrana como en el caso de algunos canales iónicos neuronales (Mitchel, 1984, Kandel 2000). Existen un método para monitorear la rotación del flagelo, que han probado ser útiles, el primero es la observación de las células adheridas por sus flagelos a una superficie de vidrio. La actividad de motor en la base de su filamento genera la rotación del cuerpo celular arriba de él, de esta forma su observación en un microscopio óptico es sencilla, estas células rotan con una frecuencia de aproximadamente 15 Hz (Meister *et al.*, 1989).

La velocidad rotacional generada por un flagelo es proporcional a la fuerza motriz generada por el flujo de protones, hasta de un valor de  $-80$  mV (Berg & Turner 1993). Para generar una revolución el sistema requiere 1000 protones que atraviesan del espacio periplásmico hacia el citoplasma. El motor alcanza una velocidad cercana a los 100Hz equivalente a 15,000 rpm (Berg, 1995).

En la actualidad, aun es motivo de especulación el mecanismo por el cual se genera la rotación en el flagelo, sin embargo existen algunos modelos que predicen su comportamiento. Uno de los modelos más conocidos sostiene que el movimiento se produce por medio de interacciones electrostáticas entre el estator y el rotor, a través del intercambio de cargas en residuos protonables que oscilan entre puntos fijos de los canales iónicos, y el rotor (Berry 1993).

Las proteínas FliG y FliF y probablemente FliM y FliN, son unidades estructurales del rotor. MotA y MotB conforman al estator formando un canal protónico que se acopla así mismo en la superficie de la pared celular. Los protones fluyen hacia el interior del espacio periplásmico, generando un flujo electromotriz requerido para generar el torque o fuerza necesaria para la rotación

El rotor consiste en un complejo de estructuras formadas por el anillo C, el anillo MS el cual se encuentra rígidamente conectado al eje e inmerso en la membrana citoplásmica. Al anillo C se encuentran asociados grupos de canales, agrupados en un complejo, (Ver figura 6). Cada uno de los complejos contiene dos medios canales ubicados perpendicularmente al plano de la membrana y están separados por la misma distancia que en los sitios aceptores de protones (Meister *et al.*, 1987, 1989).

Mutaciones en el extremo carboxilo de FliG, proteína del rotor y en MotA, constituyente del estator, demuestran que existen residuos cargados positivamente (Asp289, Asp288 en FliG, Glu98) en MotA y (Arg281 en FliG y Arg90) en MotA que son esenciales para la rotación del motor (Zhou *et al.*, 1998), (Ver figura 7). Otras evidencias demuestran que la estabilidad de la estructura terciaria de la proteína FliG modula la velocidad de rotación del flagelo (Donato & Kawula, 1998).

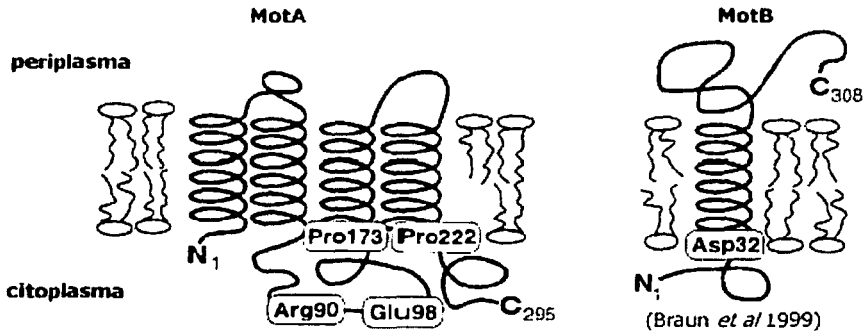


Figura 6  
Distribución de los aminoácidos cargados de los canales iónicos del estator involucrados en la generación de la torca (Braun *et al* 1999 )

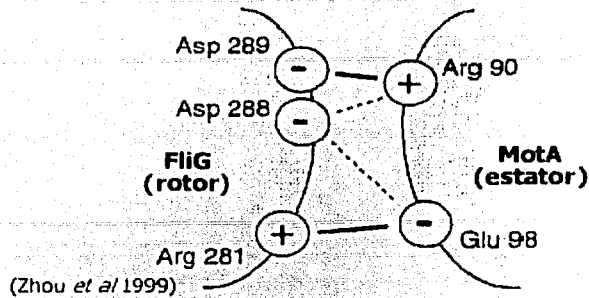


Figura 7  
Interacción entre residuos protonables de FliG y MotA (Zhou *et al* 1999)

Otro modelo sostiene que el torque es generado por cambios cíclicos en las cargas de los canales acoplados a la translocación de protones. Todos los canales trabajan en coordinación debido su cercanía con el anillo C; similar a la forma como trabajan los motores ultrasónicos fabricados con metales (Inaba *et al* 1987; Sashida & Kenjo 1993, Atsumi 2001).

Cuando un ión atraviesa por uno de los canales MotA/B su movimiento genera un cambio conformacional en el canal (Benitha *et al* 1997). Una vez que el ión entra, la región superior del canal se ensancha, mientras el ión viaja hacia la parte basal del canal, éste retorna a su conformación original (Ver figura 8). Este cambio provocaría que uno de los dominios del complejo MotA/B se desplace en forma paralela al plano de rotación del flagelo hacia una de las proteínas del motor, exponiendo una región que interactúa con la proteína FliG. Ya que se requiere que los cambios en los canales iónicos estén coordinados, el movimiento radial se transmitiría a lo largo de la circunferencia del rotor (Atsumi 2001).

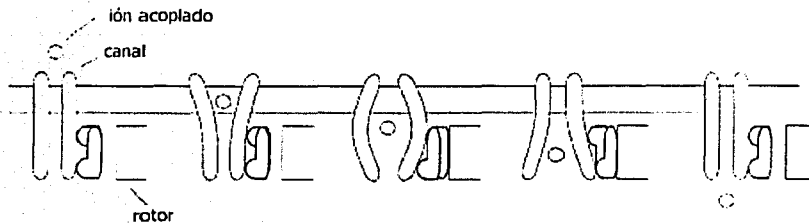


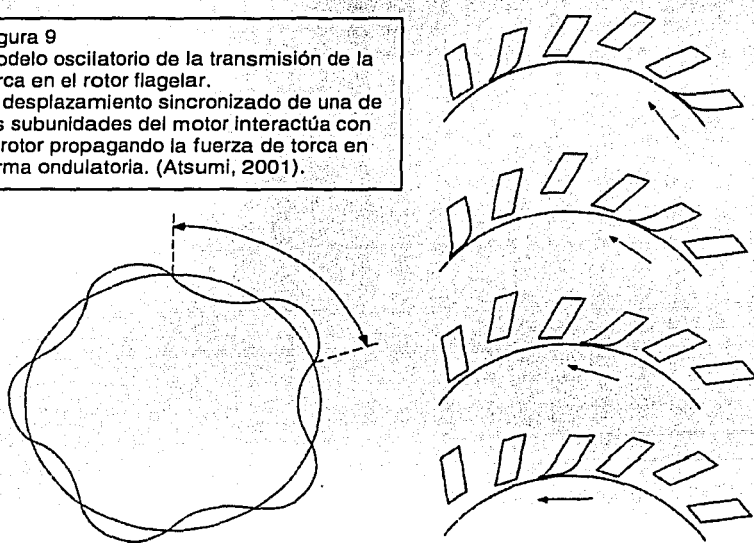
Figura 8  
Modelo de activación de los canales asociados al motor, involucrados en la generación de la torca. (Modificado de Atsumi 2001).



Este mecanismo tiene algunas desventajas que podrían limitar la hipótesis que presenta. Si son las oscilaciones en las cargas de los complejos MotA/MotB y sus cambios conformacionales lo que genera la torca del motor flagelar, debe ser esta interacción la que favorece la formación de un ambiente electrónico que module la interacción electrostática entre las subunidades involucradas, más que el equivalente a una serie en engranes. El motor flagelar se comporta como un motor bipolar con cambios en la distribución de cargas en un plano radial, del mismo modo si este ambiente electrónico es modificado, sería la influencia de momentos bipolares y la fuerza de atracción/repulsión la responsable de generar la fuerza ciertamente de una forma coordinada y cabría añadir polarizada.

Por lo tanto es posible que FlhG ubicada en el anillo C se encuentre directamente involucrada en la propagación de este movimiento cíclico a través de la circunferencia de rotor en forma de ondas. Este es el mecanismo de acción de muchos motores ultrasónicos comerciales (Sashida & Kenjo 1993).

Figura 9  
Modelo oscilatorio de la transmisión de la torca en el rotor flagelar. El desplazamiento sincronizado de una de las subunidades del motor interactúa con el rotor propagando la fuerza de torca en forma ondulatoria. (Atsumi, 2001).



La fuerza necesaria para la rotación se genera por vibraciones en el plano de rotación que se propagan en un plano en forma de ondas cuya longitud de onda depende de la circunferencia de rotación (Ver figura 9). Muchos de los motores ultrasónicos comerciales se emplean en los sistemas de auto focalización de equipos fotográficos, o en circuitos piezoeléctricos (Atsumi 2001).

La frecuencia de las vibraciones que generan estos motores depende del tamaño del motor. Por ejemplo un motor R-50 fabricado por Matsushita Electric, puede alcanzar una frecuencia de propagación de 35KHz y sólo posee 50 mm de diámetro (Tokushima et al 1987).

COPIA CON  
FALLA DE ORIGEN

La frecuencia de rotación generada por estos rotores es similar a la encontrada en muchos motores flagelares. En *E. coli* la velocidad de rotación puede alcanzar los 100Hz, en otras especies se conocen velocidades de rotación mayores a los 110Hz (Berg 1995, Magariyama *et al* 2001). La relación entre el torque y velocidad de rotación parece ser inversamente proporcional, debido a que la fuerza necesaria para desplazar una cierta unidad de volumen del medio en el que se desplaza depende más de la fuerza de arrastre generada que de la velocidad (Atsumi 2001) Como hay un límite de carga que el flagelo es capaz de soportar, por lo que el desplazamiento de la célula y la velocidad de rotación del flagelo son dos variables dependientes entre sí.

## 2.5 Complejo de switch

El complejo de "switch" o interruptor se encuentra localizado en la base del flagelo y esta conformado por FliG, FliM y FliN, se puede decir que forman un switch debido a que esta estructura se encuentra expuesta hacia el citoplasma de la célula. Es en este nivel donde la interacción entre cheY-P y el interruptor FliM se lleva a cabo.

Existen aproximadamente 27 copias de FliF, 35 copias de FliG y cerca de 100 copias de FliN por complejo (Bren & Eisenbach 2000). Mientras estas cifras generan poca discusión, aún se no se conoce con certeza el numero de copias de MotA y MotB en cada uno de los complejos.

## 3 QUIMIOTÁXIS

La cascada de señales que induce la movilidad flagelar en *E. coli* comienza en los receptores externos, los cuales se encuentran exclusivamente en la membrana y pared celular. Existen dos tipos de receptores: los receptores duales y los receptores quimiotáctico-específicos

Los receptores quimiotáctico-específicos son referidos como MCP (Methyl Accepting Proteins/ proteínasceptoras de grupos metilo); estas proteínas son receptores diméricos transmembranales. Los MCP's consisten de dos hélices transmembranales (TM1 y TM2), un dominio de acoplamiento a ligando y un dominio citoplásmico (Ver figura 10).

Los receptores diméricos están involucrados en el transporte de ligandos de los receptores quimiotáctico específicos, y cinco están presentes en *E. coli*, y son responsables de transmitir la información por medio de un atractor o un repelente. Estos receptores son **Tar**, **Tsr**, **Trg**, **Aer** y **Tap** (este último el único encontrado a *E. coli*) **Tar** une aspartato y maltosa, **Tsr**, une exclusivamente serina, **Trg** une ribosa, galactosa y glucosa, y finalmente **Tap** se une a dipéptidos. Cabe hacer notar que no todos los receptores se encuentran presentes en la misma proporción en la célula. **Tsr** y **Tar** son receptores que se presentan en mayor proporción que el resto.

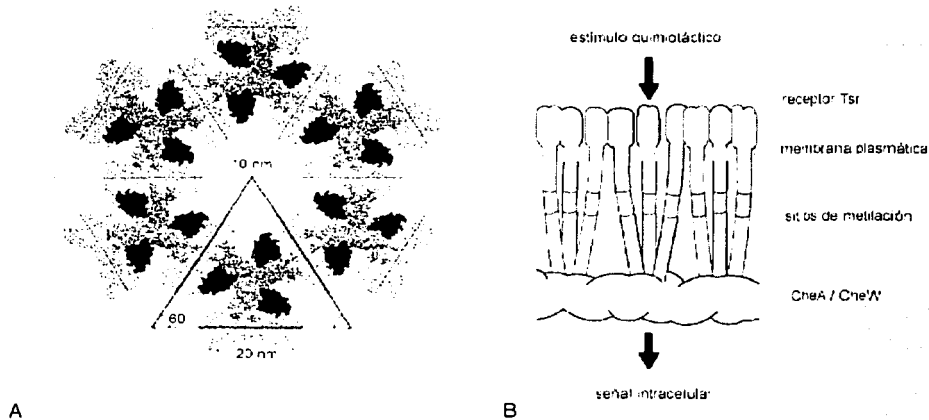


Figura 10  
 Representación gráfica de los receptores quimiotácticos y su organización en la membrana plasmática. En la figura A se muestra la posible estequiometría de los receptores (perspectiva superior al plano de la membrana celular) obtenida de la cristalización de los receptores Tsr. En la figura B se muestra la organización del complejo supramolecular y proteínas asociadas. Modificado de Shimizu, 2000

La composición del complejo supramolecular del receptor consiste en tres partes distintas: los receptores quimiotácticos específicos, una proteína de unión (CheW) y una cinasa de histidinas (CheA) (Shimizu, 2000). Posterior a la interacción del receptor con su atrayente, algunos residuos de glutamato en el dominio citoplásmico de los receptores son metilados por CheR, una metiltransferasa (Kehry & Dahlquist, 1984). La metilación de los receptores revierte los cambios conformacionales, una vez adquirida la conformación original, CheB (una metil esterasa) remueve los grupos metilo. Inicialmente se pensaba que el complejo contenía una receptor dímérico, dos moléculas de CheW y un dímero CheA. Evidencia experimental posterior, sugiere que la estructura es mucho más compleja y a partir de ello derivaron dos modelos. El primero que describe al receptor como un complejo de siete dímeros y de dos a cuatro moléculas de CheW y un único dímero de CheA. (Kim *et al* 2000). El segundo modelo demuestra que los extremos de tres receptores díméricos convergen, formando una estructura trimérica (Bren & Eisenbach, 2000). De modo que se ha predicho que múltiples complejos crean un hexágono bidimensional hecho de unidades trigonales. Este modelo sugiere que cada una de estas unidades posee dímeros de MCP, tres moléculas de CheW y tres monómeros de CheA. Aún existen inconvenientes para validar este modelo, pese a ello las evidencias más recientes inclinan el crédito al modelo trigonal.

Con la cristalización de CheA de *Thermotoga maritima* con una resolución de 0.25 nm se pudo determinar los sitios de interacción entre CheA y CheW. Debido a que CheA posee dominio de dimerización, es probable que la estequiometría del complejo molecular sea dimérica. Esta sería una ventaja que ofrecería estabilidad al complejo tanto en su estructura y durante el relevo de la señalización desde el receptor (Shimizu *et al* 2000).

Otro hallazgo importante con respecto al complejo supramolecular es que dos formas diferentes de CheA coexisten, a las cuales se les ha denominado CheAL y CheAS. CheAS es 97 residuos de aminoácidos más corta, y en la mayoría de las condiciones se encuentran en una proporción 1:1, sin embargo aun no se conoce con exactitud la estequiometría en los complejos supramoleculares.

### **3.1 Organización y función del complejo supramolecular**

Se han propuesto dos modelos de señalización transmembranal (Bray *et al* 1998); un modelo sostiene que la señalización se lleva a cabo por medio de una rotación entre las subunidades de los monómeros del receptor. El modelo alternativo es que la señalización es generada por medio de un cambio conformacional (Ver figura 11), únicamente en una de las subunidades del dímero (Borkovich *et al* 1990). Una de las preguntas más intrigantes es la forma como responde el complejo ante un pequeño porcentaje de receptores estimulados ante otros no estimulados y como se integran esa información para decidir la el sentido de la rotación del flagelo. Dos modelos derivan de esa pregunta: El primero es el mecanismo de apagado o "reseteo" y el segundo el mecanismo de amplificación.

El primer modelo propone que existen cambios conformacionales en el receptor que actúa como un interruptor, al ocurrir esto la actividad de la cinasa es modulada sólo por la señal del receptor estimulado. El mecanismo de amplificación propone que los mismos cambios en las interacciones del receptor causan la amplificación de la señal generada por la estimulación del receptor (Bray *et al* 1998) La información obtenida de los receptores es transmitida por medio del complejo supramolecular para regular la actividad de cinasa de CheA. Los atrayentes inhiben la actividad de la cinasa, si su concentración favorece la permanencia de la bacteria (Borkovich *et al* 1990). En el caso contrario, los repelentes activarían a la cinasa. Desde el dominio de fosfotransferencia de CheA la señal continúa hacia las proteínas CheY y CheB.

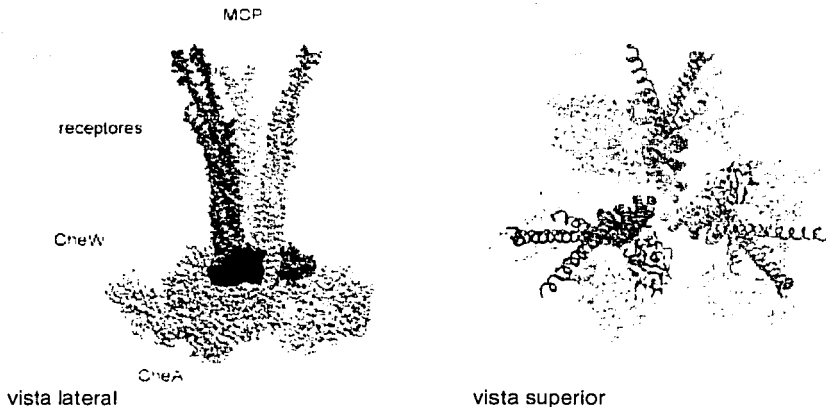


Figura 11  
 Unidad Estructural del complejo supramolecular, reconstruido a partir de los cristales de las proteínas que lo constituyen. El complejo contiene tres dímeros del receptor, tres monómeros de CheW y tres monómeros de CheA. Se muestra aquí esta unidad trigonal con tres dímeros de CheA.

### 3.2 Moduladores de la respuesta Quimiotáctica

CheY es una proteína de bajo peso molecular (aproximadamente 14 KDa) que transmite la señal desde el complejo supramolecular del receptor hacia el complejo de "switch" o interruptor que regula la dirección de giro del flagelo. CheA fosforila el residuo Asp57 de CheY. El acoplamiento de CheA y CheY genera un cambio conformacional en CheY, lo que permite la transferencia del grupo fosfato, al mismo tiempo que disminuye la afinidad entre el dímero CheA-CheY, permitiendo la liberación de CheY-P.

En el complejo de "switch" o interruptor, FliM interactúa con CheY fosforilada que posee una alta afinidad por FliM; CheY-P se acopla en el extremo amino del FliM (Wolfe *et al* 1987., Shah *et al*, 2000.) El resultado es la rotación del flagelo en la dirección CW, contraria a las manecillas del reloj. La probabilidad de rotación en esta dirección se incrementa con la concentración de CheY-P. La concentración de CheY-P determina si la rotación es en un sentido antihorario (CCW) u horario (CW). La concentración de CheY-P depende de la tasa con la que CheA fosforile a CheY y de que sea desfosforilada por la proteína CheZ.

Al respecto de la fosforilación de CheY por CheA; CheY sufre cambios conformacionales que no están restringidos al sitio de fosforilación Asp57. La extensión de los cambios conformacionales no está bien caracterizada pero aparentemente abarca una región más allá de los sitios de fosforilación. La activación de CheY es el resultado de estos cambios conformacionales y no exclusivamente de la adición del grupo fosfato. Esto muestra el hecho de que mutaciones en CheY pueden mantener su actividad pese a la ausencia de fosfato (Bren & Eisenbach, 2000).

TEJIS CON  
 FALLA LE ORIGEN

Otro cambio que CheY sufre es la acetilación en Lys92 y Lys109. Esta modificación no afecta el acoplamiento entre CheY y FliM pero si afecta la señalización a nivel de la interacción entre FliM y CheY. Aun no es claro el papel que posee la acetilación de CheY a nivel de los residuos de lisina y su efecto en la quimiotaxis. CheY-P puede ser desfosforilada por CheZ (aunque en *Rhodobacter sphaeroides* no se ha reportado esta enzima). Esta desfosforilación favorece la rotación del flagelo en sentido contrario a las manecillas del reloj (CCW).

La interacción entre CheZ y CheY-P acoplada a FliM desfosforila a CheY por medio de su acoplamiento al extremo C terminal de CheZ. esto ocurre en un lapso entre 50 y 100 ms (milisegundos) y el resultado es la defosforilación de CheY y el cambio de la torca hacia el sentido inverso (CCW) (Wolfe *et al* 1987, Manson *et al* 1998)

La modulación de las señales que modifican la rotación del flagelo a nivel del complejo de switch es poco conocido, pero existen evidencias para pensar que está íntimamente asociada con los sistemas de fotosíntesis, aero y quimiotaxis entre otros (Romagnoli *et al* 2002, Bellenger *et al* 2002 ).

Otra evidencia experimental (Turner *et al* 1999) sugiere la posibilidad de que el acoplamiento de CheY en el complejo de switch solo es requerido en condiciones estándar de temperatura (aproximadamente a 25°C). A 10°C y debajo de esa temperatura el motor cambia de rotación en ausencia de CheY y cerca de 0°C rota preferencialmente en sentido de las manecillas del reloj contrario a su rotación habitual en sentido anti-horario. Es interesante recalcar que la modulación por medio de la interacción CheY-FliM con mutaciones dobles (13DK, 106YW) conservan su actividad aun en ausencia de fosforilación, ya que la señalización desde los receptores quimiotácticos hasta el complejo de switch está mediada por la fosforilación de las proteínas anteriormente descritas (Scharf *et al* 1998).

En condiciones fisiológicas en las que un receptor quimiotáctico no posee ningún ligando asociado, la vía de amplificación quimiotáctica no se encuentra activa, resultando en un decaimiento en los niveles de CheY activa. En este caso la rotación anti horario habitual, continua (Stoddard 1998, Montrone 1998).

#### **4 APARATO DE EXPORTACIÓN**

Para que el flagelo se ensamble se requiere de un mecanismo que permita transportar desde el citoplasma hacia el exterior de la célula, cada una de las subunidades que componen el flagelo, desde las proteínas que conforman el cuerpo basal, hasta las proteínas del filamento. Existe un complejo de aproximadamente ocho proteínas que constituyen el sistema de exportación, (FliA, FliB, FliH, FliI, FliO, FliP, FliQ y FliR), este complejo interactúa con los anillos MS y anillo C en *Salmonella typhimurium* (Minamino & Macnab 1999, Katayama *et al* 1996). Este complejo es el responsable de la exportación o traslado de las proteínas del eje, gancho HAP's y filamento. Aun se desconocen muchos de sus mecanismos subyacentes, entre ellos la selectividad que debe poseer para que el sistema mantenga un orden en la exportación de las proteínas.

Ninguno de los sustratos exportados posee un péptido señal como los hallados en el extremo amino terminales de los productos del anillo L, P y FlgA, sin embargo se ha propuesto que posiblemente los motivos de héptadas repetidas encontradas en las proteínas axiales pudieran ser las responsables del reconocimiento durante su exportación (Homma et al 1990) La remoción de los residuos más conservados no interrumpe la exportación (Kornacker & Newton 1994), posiblemente sea el reconocimiento de ciertos motivos en la estructura secundaria de las proteínas las que pudieran estar involucradas en la selectividad del sistema de exportación. Otras evidencias experimentales, apoyan la idea que el reconocimiento de las proteínas flagelares es más dinámico, por ejemplo una de las proteínas del complejo de exportación Flil presenta una similitud con la subunidad  $\beta$  de la unidad  $F_0F_1$  de la ATP-sintasa (Dreyfus et al 1993, Müller et al 1992), esta proteína es capaz de hidrolizar ATP (Fan & Macnab 1996) y su actividad se incrementa en presencia de otros componentes que son exportados como proteínas de gancho (FlgE), y flagelina (FlhC) (Silva-Herzog & Dreyfus 1999).

El eje forma un canal de 25 y 30 Å por donde se piensa son transportados los monómeros filamentosos, que viajan parcialmente plegados, desde el citoplasma hasta el extremo distal del flagelo a 10  $\mu$ m; los mecanismos asociados al transporte y auto ensamblaje permanecen aun sin ser caracterizados.

## 5 CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES FLAGELARES Y QUIMIOTÁCTICOS

### 5.1 Organización cromosomal de los genes flagelares.

La biogénesis del flagelo procarionte es un proceso que implica la regulación, activación y expresión de más de 40 genes involucrados en la formación del mismo. A excepción de algunos genes de receptores extracelulares, que se encuentran localizados en loci aislados, la organización de los genes flagelares en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurim* se caracteriza por que estos se encuentran distribuidos en tres regiones localizadas dentro de su cromosoma y organizados en grupos de gran tamaño que albergan múltiples genes (Macnab 1992). Estos agrupamientos han sido denominados I, II y III. En cada una de las regiones, existen varios operones que contienen desde uno hasta nueve genes. Cada uno de estos operones está organizado con una jerarquía regulatoria y se le denomina regulón.

La región I comprende a los genes que forman parte del estator y estructuras del cuerpo basal del flagelo (*flgB*, *flgC*, *flgF*, *flgG*), los anillos externos (*flhH*, *flhI*), el gancho (*flgE*) y las proteínas de unión al gancho o asociadas a gancho HAP's (*flgK*, *flgL*) (Homma et al, 1990). Dentro de los genes que se encuentran agrupados en este primer grupo se encuentra *flgD* cuyo producto es responsable del crecimiento del gancho (lino 1987). Finalmente *flgA* y *flgM* tienen una función regulatoria, *flgA* promueve el ensamblaje de uno de los anillos externos del cuerpo basal y *flgM* tiene la función de evitar la expresión de los genes tardíos como son los constituyentes del gancho y filamento, hasta que el complejo basal y el gancho estén completos.

La región II contiene a los genes quimiotácticos (*cheA*, *cheB*, *cheR*, *cheW*, *cheY* y *cheZ*) dos de los genes de receptores: *tar* (en *E. coli*) *tap*, y dos genes de motilidad: *motA* y *motB*, estos genes son transcritos una vez que los componentes basales del gancho se han ensamblado. Esta región también contiene los genes maestros (*flhD*, *flhC*) (Barlett, 1987) y uno de los genes involucrados en la exportación (*flhA*).

Las regiones II y III están separadas por una región de 23 Kb que contiene genes no relacionados como *uvrC*. La región III, se subdivide en región IIIa y IIIb debido a que en el arreglo cromosomal en especies como *E. coli*. y *Salmonella typhimurium*. Estas regiones se encuentran separadas por un fragmento de 7 y 5 kbs respectivamente, que codifica para una alfa-amilasa y otras regiones aparentemente no codificantes (Macnab, 1992).

La región IIIa es una región pequeña que codifica para las proteínas del filamento. Contiene a *fliC*, el gen estructural de la flagelina. También ésta región incluye a *fliA* un gen que codifica para un factor  $\sigma$  que inicia la transcripción del gen *fliC* (flagelina). Además posee al gen de la proteína de coronamiento *fliD* (HAP2) y dos genes *fliS* y *fliT* que se les atribuyen funciones regulatorias.

La región IIIb contiene los genes que participan en las etapas tempranas del ensamblaje del flagelo incluidos el anillo MS, (*fliE*, *fliF*), los genes del switch (*fliG*, *fliM*, *fliN*) y genes involucrados en la exportación (*fliH*, *fliI*), además de *fliK*, un regulador de la extensión del gancho (Macnab, 1991).

## 5.2 Biogénesis y regulación de la expresión de los genes flagelares:

La expresión de los genes flagelares está estrictamente controlada y coordinada jerárquicamente, ya que la presencia de productos de un operón son necesarios para la expresión de los productos de operones sucesivos (Kutsukake 1990).

En muchos casos las regiones codificantes de genes adyacentes son muy cercanas o se encuentran superpuestas, sin embargo existen operones separados; por ejemplo, los codificantes para varios quimiorreceptores como el receptor de serina (*Tsr*) (Macnab 1991).

De la misma forma como se ha clasificado a los genes flagelares dependiendo de su ubicación en los cromosomas, también se ha elaborado una clasificación en referencia a su orden de expresión durante la biogénesis (Ver figura 12).

Los genes flagelares se clasifican de la siguiente forma:

Genes clase I, clase II, clase IIIa y clase IIIb, esta organización puede generar confusiones al respecto de la ubicación de los genes en un mapa físico o en el cromosoma; sin embargo esta clasificación se refiere a un orden temporal de la expresión de los productos codificantes de los genes agrupados en sus respectivos loci (Macnab, 1991, Aldridge 2001).



**Genes Clase I***flhDC***regulador maestro****Genes Clase II***fliFGHIJK, fliLMOPQR, fliE, fliHBAE***aparato de exportación***flgBCDEFGIJ, fliAZY, flgAMN***cuerpo basal****eje****gancho****Genes Clase III**IIIa *flgKL, flidST, flgMN***HAP's  
chaperonas de HAP's  
factores de transcripción**IIIb *fliC, tar, tap, cheRBYZ***filamento  
receptores quimiotácticos  
estator***MotAB cheAW*

Figura 12

La expresión de los genes flagelares es similar a una cascada donde la presencia de ciertos productos permite la activación de otros sucesivamente.

En la primera clase se ubica el operón maestro que es responsable de desencadenar la biosíntesis flagelar, activando a los operones de clase II. Este operón contiene dos genes *flhC* y *flhD* cuyo producto forma un complejo heteromultimérico que activa la expresión de los genes de clase II por medio de una ARN polimerasa dependiente de un factor  $\sigma^{70}$  (Malakooti 1994).

La activación de este operón no es clara pero depende de condiciones ambientales como la temperatura, la disponibilidad de fuentes de carbono, el super enrollamiento del DNA, los niveles de fosfolípidos, cambios en la osmolaridad, etc.

Muchos de los efectores que activan al operón maestro necesitan intermediarios proteínicos como OmsR, o proteínas de choque térmico o "heat-shock" como GrpE, DNAJ. Sin embargo existe una vía de represión de catabolitos que dirige mayoritariamente la expresión del operón maestro: Cuando la disponibilidad de glucosa es mayor, los niveles de AMPc disminuyen evitando que se active el operón maestro (Komeda 1975).

Los genes de clase III son regulados por factores codificados en genes de la clase II y cuyos productos son componentes estructurales tardíos como la flagelina, responsable de ensamblar el filamento flagelar, así como a los motores y canales iónicos encargados que generar la energía para el torque, entre otros productos (Macnab 1991).

La transcripción jerárquica de los genes del flagelo determina que se completen sus estructuras en el siguiente orden: anillo MS, switch, aparato de exportación, eje, anillo P, anillo L, gancho, HAP's, a esto le secunda la exportación de flagelina (FliC) y las proteínas de coronación (FliD). Estas últimas proteínas deben atravesar dos membranas y una distancia considerable para localizarse extra celularmente (Ver figura 13).

En *Salmonella typhimurium*, *flgK* es un gen de clase III, sensible a la regulación transcripcional por un factor transcripcional  $\sigma^{54}$  y preferencialmente por un factor  $\sigma^{28}$  (Kutsukae & Ide, 1995). Este último factor de transcripción es el mismo que desencadena la síntesis de genes como *flgM*, *flgN*, *fliC*, *fliD*, *fliS*, *fliT*, *fliJ*, *fliA*, *motA*, *motB*, *cheA*, *cheY*, y *cheZ* considerados como genes de expresión tardía o clase III (Macnab 1992). En la etapa de formación del gancho, FigD complementa la función de acoplamiento de las subunidades de proteínas que son exportadas por la misma vía de secreción HAP1 (FigK) (Ohnishi *et al* 1994).

La extensión del gancho está regulada por FliK que modula la exportación de los polímeros del gancho. Finalmente son exportadas las proteínas FigK, FigL, FliD (HAP1, HAP2 y HAP3, respectivamente), y los monómeros de flagelina (FliC) que se incorporan en la parte distal del filamento por medio de la interacción con el complejo decamérico formado por HAP2 (Maki *et al* 2001).

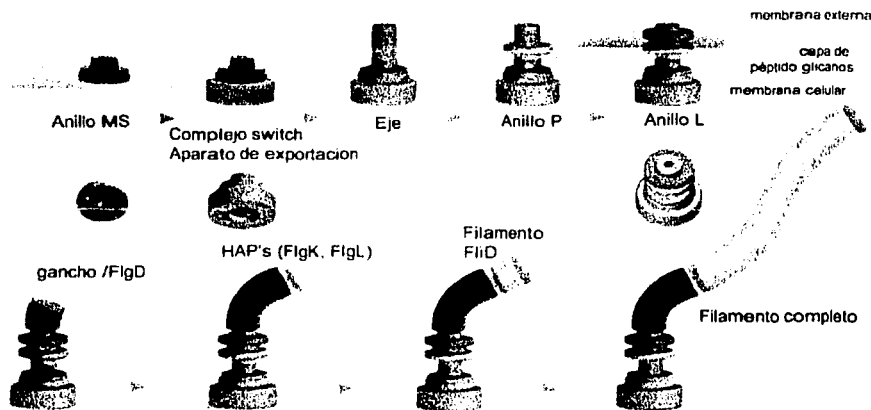


Figura 13

Biogénesis flagelar, la expresión coordinada de los diferentes genes flagelares permite el ensamblaje preciso de sus diversos componentes. Modificado de Aizawa 1998

TESIS CON  
FALLA LE ORIGEN

## 6 CARACTERISTICAS SISTEMATICAS de *Rhodobacter sphaeroides*

### 6.1 Características morfo-fisiológicas.

*Rhodobacter sphaeroides* es un bacteria fotosintética púrpura no sulfurosa perteneciente al grupo de las  $\alpha$ -proteobacterias (Woese et al 1994) A este grupo pertenecen también otras bacterias como *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Caulobacter* y *Sinorhizobium*, (ver figura 14). Estas bacterias poseen una adaptabilidad metabólica y son capaces de sobrevivir en condiciones microaeróbicas, sin luz y son capaces de emplear varios compuestos alternativos como fuentes de carbono. Estos géneros comparten la característica de poseer un genoma con contenido rico en C+G que oscila entre el 68 y 70%.

El genoma de *R. sphaeroides* consiste de dos cromosomas de 3Mb y 0.9Mb y 5 plásmidos endógenos (Suwanto & Kaplan 1992)

Las células de *R. sphaeroides* tienen una morfología variable, sobre todo aquellas que son crecidas en medios complejos, a diferencia de aquellas observadas en medios minerales o más pobres en nutrientes. Las células son esféricas-ovoides con un tamaño promedio de entre 0.7-4  $\mu\text{m}$ . En medios ricos en carbono las células pueden alcanzar hasta 2 y 2.5  $\mu\text{m}$  de ancho y una longitud de 2.5 a 3  $\mu\text{m}$ . Generalmente se les encuentra en pares, o formando una hilera de cuentas. (Según la clasificación de Pfennig & Trüper 1971)

Conforme aumenta la población del cultivo, la presencia de secreciones mucosas aumenta la viscosidad del medio, excepto cuando los azúcares son la única fuente de carbono. Estas secreciones impiden la motilidad, que es muy activa en las primeras fases de crecimiento, debido a la presencia de un flagelo sub-polar. La motilidad también cesa en medios alcalinos.

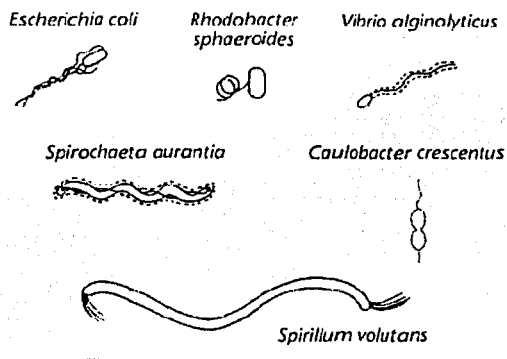


Figura 14

Esquema comparativo entre diferentes especies bacterianas y *R. sphaeroides*. La línea representan 10 $\mu\text{m}$ . (Tomado de Morgan et al 2001).

Los cultivos crecidos en condiciones anaerobias adquieren un color verde sucio a marrón, mientras aquellos cultivos crecidos en condiciones aeróbicas adquieren un color rojo. El color marrón de las células crecidas en anaerobiosis puede tornarse a rojo si son colocadas en condiciones aeróbicas y con agitación. Aparentemente es la luz la que estimula este cambio en la coloración e intensidad de los pigmentos.

Los rangos máximos de absorción espectroscópica de las células en crecimiento oscilan entre: 372-375, 446-450, 474-481, 507-513, 588-590, 800-805, 850-852, y de 870-880nm la absorbancia relativa se encuentra entre 850-880 nm, pero varía dependiendo de las condiciones del cultivo.

Los pigmentos fotosintéticos encontrados en *R.sphaeroides* son : Bacterioclorofila *a* (esterificada con un grupo fitol) y carotenoides de la serie de esferoidenos, incluyendo esferoidenos e hidroxiesferoidenos, transformados en cetocarotenoides bajo condiciones aeróbicas. Este cambio es el responsable de la coloración rojiza adquirida en esta condición de crecimiento.

El modo preferencial del crecimiento es el fotoheterotrófico en condiciones aeróbicas con la disponibilidad de compuestos orgánicos y fuentes de carbono y electrones. El crecimiento fotoautotrófico con hidrógeno o azufre molecular como aceptores de electrones, es lento. El crecimiento también es favorecido en condiciones aeróbicas, con varias fuentes de carbono y en ausencia de luz. El crecimiento bajo condiciones anaeróbicas en ausencia de luz y con piruvato y azúcares como fuentes de carbono solo es marginal.

El empleo de algunos compuestos orgánicos como fuentes alternativas de carbono depende de las condiciones de crecimiento, por ejemplo la utilización de glicerol depende de la presencia de CO<sub>2</sub>. El amoniaco, nitrógeno molecular, la alanina, el glutamato y el asparatato también pueden ser empleados como fuentes de carbono, algunas cepas son capaces de utilizar ácido úrico, guanina, xantina, cisteína, uracilo, guanina, timina y adenina (sólo en condiciones aeróbicas). El sulfuro puede ser empleado como donador de electrones y es oxidado a azufre molecular, el tiosulfato y el azufre molecular no son utilizados. La tiamina, la biotina y la niacina son requeridos como factores de crecimiento, que ocurre entre un pH de 6.0 a 8.5 (óptimo 7.0) y la temperatura de crecimiento óptima oscila entre los 30 y 34 grados Celsius.

## **6.2 El flagelo de *Rhodobacter sphaeroides*.**

Los primeras investigaciones realizadas para caracterizar al flagelo y la movilidad de bacterias fotosintéticas datan desde 1967 con los trabajos de Cohen-Bazire y London, sin embargo los modelos que se han desarrollado y de donde se conoce más sobre la estructura y función del flagelo procarionte, provienen de modelos de bacterias entéricas. Solo recientemente se ha podido caracterizar otras bacterias fotosintéticas entre ellas *R. sphaeroides*.

El flagelo de *R. sphaeroides* es de rotación unidireccional con una orientación preferencial en sentido de las manecillas del reloj (CW), pese a que se han encontrado algunas bacterias que invierten el sentido de rotación. (Armitage & Macnab 1987, Packer & Armitage 1993). Dentro de las múltiples diferencias que posee el flagelo de esta bacteria con los modelos entéricos, es que no existe alternancia en la rotación y su reorientación depende del estado de relajación del flagelo más que de un alto total en el nado, (Ver figura 15). Las velocidades alcanzadas por la propulsión de flagelo son superiores a las generadas en modelos entéricos, *R. sphaeroides* es capaz de desplazarse con una velocidad de entre 35 y 100  $\mu\text{m/s}$  contra los 20  $\mu\text{m/s}$  para *Salmonella enterica* serovar Typhimurim (Packer et al 1997), posiblemente estas diferencias no solo se deban a la composición de sus flagelos sino su desempeño en el desplazamiento y relación torca/velocidad. El nado de *R. sphaeroides* muestra variaciones en la velocidad y su reorientación parece deberse a movimiento Browniano más que a un mecanismo activo. Aun en condiciones donde no existe ningún estímulo o molécula que sirva como atractor (Schmitt & Armitage 1997). Existe otro fenómeno que altera la velocidad de rotación del flagelo de *R. sphaeroides*: La quimiocinesis; bajo el influjo de moléculas atrayente como el malonato, el  $\text{K}^+$  y el  $\text{Rb}^+$ , la velocidad de rotación aumenta hasta en un 25% sin que esto modifique el gradiente electroquímico de protones (Packer & Armitage 1993). El efecto quimiocinético permanece únicamente mientras el atractor esté presente y no genera un efecto de adaptación (Harrison et al 1994).

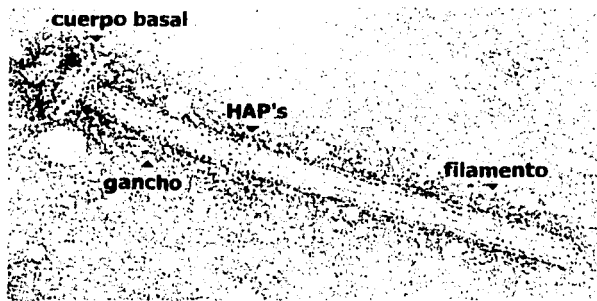


Figura 15  
Fotomicrografía electrónica de un flagelo aislado de *Rhodobacter sphaeroides*. West & Dreyfus 1997

### 6.3 Características generales de FlgK (HAP1)

Las proteínas HAP fueron inicialmente identificadas en *Salmonella typhimurium* como componentes menores, copurificados con elementos del gancho (Homma et al 1984). HAP1 y HAP3 ejercen una función de unión entre los componentes del gancho (FlgE) y el filamento (FlgC) y se acoplan en zonas muy cercanas entre estos componentes (Homma & lino, 1985; Ikeda et al 1987). Con marcaje radioactivo se ha identificado que existen aproximadamente 13 copias de HAP1, las mismas para HAP-3, y de 6 a 12 de HAP-2 en *Salmonella typhimurium* (Jones et al 1990).

La evidencia de que HAP-1 y HAP-3 se encuentran en concentraciones equimolares (Homma, 1984), sugiere que ambas proteínas pueden formar dos vueltas en la hélice del flagelo, si se ensamblan en las zonas adyacentes entre el gancho y el filamento (Aizawa 1991). Existe una homología entre los extremos terminales de las HAP's y de las flagelinas, los cuales participan en la polimerización del filamento (Homma *et al* 1990).

La secuencia de amino ácidos reportada para FlgK en *Rhodobacter sphaeroides* (AF317649.1 genbank) consta de 1363 residuos de aminoácidos, que corresponden a 4089 pares de bases. Este gen se encuentra agrupado en el contig 102:54, su inusual tamaño es 2.75 veces mayor que el tamaño de las copias de este gen en otros microorganismos. Esto genera interrogantes sobre la organización de sus dominios estructurales y la manera como desempeña su función, En comparten un alto grado de conservación con sus extremos amino y carboxilo terminales, otras secuencias homólogas de otras especies

La secuenciación de nucleótidos de *flgK* se obtuvo en el laboratorio del Dr. Georges Dreyfus en el Instituto de Fisiología Celular UNAM, a partir del trabajo de tesis doctoral de la Dra. Bertha González-Pedrajo. La identificación de los genes estructurales flagelares en *Rhodobacter sphaeroides* WS8-N se logró por medio del análisis de una mutante Rsg1 (WS8 *flgI::Tnpho*) (González-Pedrajo *et al* 2002) y muestran la ubicación de los genes asociados a las estructuras del cuerpo basal, gancho y HAP's. La mutante Rsg1 posee un fenotipo no móvil carente de filamento (Fla<sup>-</sup>), debido a que el gen *flgI* que codifica para las proteínas del anillo P está interrumpido. El gen *flgI* es indispensable para el ensamblaje del flagelo; sin embargo en los ensayos de complementación de esta mutante, el fenotipo silvestre no se restablece. Esto es resultado del efecto polar ejercido por el transposón hacia los genes en el extremo 3'. Para la identificación de los genes aledaños a la mutación se realizó una hibridación tipo southern sobre una digestión *Sall* del ADN cromosomal. Una de las bandas de 5.9kb hibridizó positivamente contra la sonda de un fragmento *Sall* - *PstI* de 1.6kb obtenido del plásmido pBG401 (fragmento *PstI* de 3.9Kb de ADN de *Rhodobacter sphaeroides* WS8-N clonado en pTZ19R que contiene los genes *flgG*, *flgH*, *flgI*, *flgJ* y una secuencia parcial de *flgK*). A partir de los fragmentos de restricción con la enzima *Sall* se generaron dos subclonas: pBG506 A y B, con las que se desarrolló el presente trabajo.

## 7 OBJETIVOS

La principal motivación que justifica el presente trabajo es la caracterización de la proteína asociada al gancho FlgK (HAP 1) de *Rhodobacter sphaeroides*, debido a que posee propiedades singulares, entre ellas el tamaño de una región central que comprende aproximadamente 800 aminoácidos, es decir el 58% de su tamaño, que no posee similitud con otras proteínas con funciones similares.

Empleando técnicas de biología molecular y algunos métodos bioquímicos, se pretende definir la relación entre la estructura y las funciones que desempeña HAP1 en el flagelo de *R.sphaeroides*.

## 8 MATERIALES Y METODOS

La mayoría de los protocolos descritos a continuación, son procedimientos estándares en biología molecular y microbiología experimental, usualmente contenidos en los manuales de laboratorio: Sambrook *et al* 1989, Sambrook *et al* 2000, en caso contrario se hace referencia a las fuentes consultadas.

### 8.1 Generación de una mutante no polar, por interrupción del gen *flgK* de *Rhodobacter sphaeroides* WS8

Para llevar a cabo la construcción de la mutante no polar se utilizó el plásmido **pBG506-A** (González-Pedrajo, 2000), (Ver figura 16), que posee un fragmento *Sal*I de 5.94 kb de *Rhodobacter sphaeroides* WS8-N, que contiene a los genes *flgJ*, *flgK*, y una secuencia parcial de de *flgL*, clonado en pTZ19R (Amp<sup>r</sup>). Se utilizó un sitio de restricción único: *Cla*I que se encuentra a 1731pb del extremo 5' de la secuencia de *flgK* como sitio de interrupción, donde se insertó el gen *aadA* (Metcalfe & Wanner 1993) que le confiere resistencia a espectinomicina.

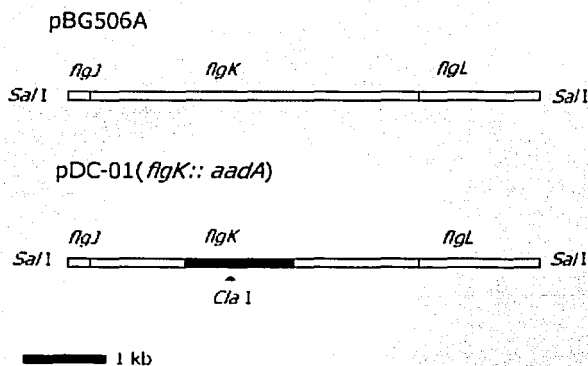


Figura 16  
Mapa del fragmento de DNA presente en la clona pBG506A. B. González, et al 2000.

El ADN de la construcción pBG506-A se obtuvo por medio del kit de purificación MiniSpin Kit (Qiagene). Este plásmido se utilizó para transformar la cepa *E. coli* GM33*dam*<sup>-</sup> por el método de CaCl<sub>2</sub> (Modificado de Mandel & Higa 1970, ver apéndice técnico).

La cepa de *E. coli*. GM 33*dam*<sup>-</sup> se utiliza cuando los sitios de digestión del ADN purificado como *Cla*I (ATCGAT) sufren de metilación. Muchas cepas de *E. coli* empleadas en las técnicas de clonación generalmente contienen tres ADN metilasas sitio-específicas. La metilasa codificada en el gen *dam* transfiere un grupo metilo de una S-adenosilmetionina a la posición N<sub>6</sub> en los residuos de la adenina en la secuencia GATC (Marinus 1973).

Algunos o todos los sitios de restricción de los plásmidos purificados de cepas que expresan metilasas pueden ser resistentes a la digestión con ciertas endonucleasas.

El fragmento de DNA que codifica para una aminoglicósido 3-adenil transferasa, que confiere resistencia a espectinomicina (*aadA*) fue obtenido por medio de PCR de un plásmido pWM5 *uidA-aadA* (Metcalf & Wanner 1993). Se utilizaron dos oligonucleótidos: *Fw* 2739 de 24pb y *Rv* 2740 de 24pb, sintetizados en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular-UNAM. Los cuales amplifican toda la región codificadora del gen *aadA*.

## 8.2 Reacción de PCR

La amplificación se realizó por medio de la PCR (Saiki *et al* 1986, Mullis *et al* 1986) empleando una DNA polimerasa *pfu* (Stratagene) termoestable aislada en forma nativa de una arqueobacteria hipertermófila *Pyrococcus furiosus*. Esta enzima multifuncional posee actividad de DNA polimerasa 5'-3' y actividad de exonucleasa 3'-5' además de una alta procesividad lo que le permite corregir errores durante el proceso de duplicación, manteniendo la fidelidad de las secuencias amplificadas. Posee un intervalo óptimo de actividad entre 72°C - 78°C y una eficiencia cercana al 98% a 95°C, lo que la hace muy recomendable para la amplificación de secuencias con alto contenido de Citosina /Guanina, como es el caso de *Rhodobacter sphaeroides*, que requieren de temperaturas de desnaturalización mayores a las reacciones estándar realizadas con la polimerasa Taq obtenida de *Thermus aquaticus*. La reacción de PCR se llevó a cabo con 50ng de ADN de pWM5, se agregó a una mezcla de reacción 10% DMSO, 10% amortiguador de reacción 10X (Stratagene), dNTP's 0.2mM, 100 pmolas de cada uno de los oligodesoxinucleótidos (*Fw*, y *Rv*), 2.5 unidades de *pfu* Polimerasa nativa (Stratagene). Hasta un volumen final de amortiguador de reacción 50µl. El programa de amplificación está descrito en la figura 17.

### Oligodesoxinucleótidos empleados

*Fw* 2739 5' CCT GAA TCG ATG GCA GAT CCG TGC 3'

*Rv* 2740 5' TCA TGA TCG ATC TCC CAA TTT GTG 3'

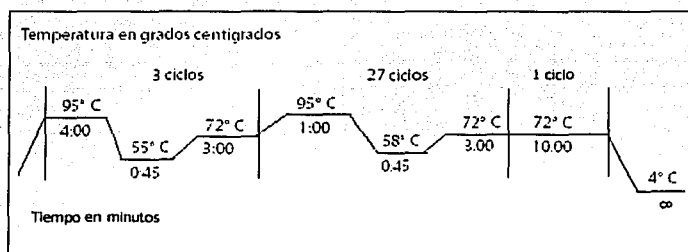


Figura 17

La reacción se realizó en un termociclador GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer) donde se utilizó el siguiente programa: Tres ciclos: 4' de desnaturalización a 95°C, 45" de alineamiento a 55°C y 3' de extensión a 72°C, 27 ciclos: 1' de desnaturalización a 95°C, 45" de alineamiento a 58°C y 3' de extensión a 72°C. Un último ciclo de extensión: 10' a 72°C y finalmente a 4°C, para terminar la reacción.



El fragmento amplificado de 1.4kb contiene la secuencia *aadA* (genebank M1021.1 [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) de extremos rasos. El amplicón se corrió en un gel de TE-agarosa al 1% y la banda se purificó empleando el Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagene) y posteriormente se digirió con la enzima *ClaI* (New England Biolabs). Finalmente se ligó en el sitio único *ClaI* de la construcción pBG506-A, donde se interrumpió el gen *flgK*.

Las condiciones de reacción para la digestión del fragmento *aadA* y el plásmido pBG506A fueron las siguientes:

50 u enzima *ClaI* (NEB)  
50 mM acetato de potasio  
20 mM Tris-Acetato  
10 mM acetato de Magnesio  
1 mM ditiotreitól  
100 µg/ml BSA  
pH 7.9 a 37°C, toda la noche

Condiciones de la reacción de ligasa:

Los fragmentos y el vector digerido fueron purificados por medio del sistema PCR Clean Kit (Qiagen) de los cuales se obtuvieron 16 ng/µl c/u. Los productos fueron ligados con una Ligasa T4 (Boehringer-Roche) en las condiciones de reacción:

10u de Ligasa T4 (Boehringer-Roche)  
20mM Tris-HCl  
1mM EDTA  
5mM ditiotreitól  
60mM KCl  
50% glicérol  
pH 7.5 a 16°C toda la noche.

Con el producto de la reacción de la ligasa se transformó la cepa JM109 (por medio del método de  $\text{CaCl}_2$ ). Las células se crecieron a 37°C en medio rico sólido (Luria Bertani Agar) adicionados con antibióticos: ampicilina 200µg/ml, espectinomicina 50 µg/ml (Sigma-Aldrich). La construcción resultante se nombró **pDC-01** (pBG506-A *flgK::aadA* 10.2kb).

La construcción pDC-01 fue purificada de un cultivo de células JM109, con el MiniSpin Kit (Qiagene) y posteriormente se digirió con la enzima *SalI* (NEB) para liberar un fragmento de 7.3 kb con las siguientes condiciones de reacción:

20 u enzima *Sal*I (NEB)  
 150 mM NaCl  
 10 mM Tris-HCl  
 10 mM MgCl  
 1 mM ditiotreitól  
 100 µg/ml de BSA  
 pH 7.9 a 37°C toda la noche.

El patrón de restricción con esta enzima permitió confirmar la presencia del fragmento clonado de *aadA*, el cual libera un fragmento de 7.3kb que contiene a los genes *flgJ*, *flgK* y una secuencia parcial de *flgL*, (Ver figura 18). La interrupción a nivel de *flgK* aumenta el tamaño del fragmento *Sal* I de 5.9 a 7.3kb

La construcción pDC01 fue transferida a la cepa GM33dam<sup>r</sup> para analizar el patrón de digestión generado con las siguientes enzimas, (Ver figura 19):

<i>Hind</i> III (Promega) Reacción 12 u 6 mM Tris-HCl 50 mM NaCl 1 mM DTT 6 mM MgCl <sub>2</sub> 0.15% Triton X-100 pH 7.5. a 37°C toda la noche	<i>Sal</i> I (NEB) Reacción 20 u 10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 10 mM MgCl 1 mM DTT 100 µg/ml BSA pH 7.9 a 37°C toda la noche	<i>Eco</i> RI (Promega) Reacción 20 u 90 mM Tris-HCl 50 mM NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> pH 7.5 a 37°C toda la noche	<i>Cla</i> I (NEB) Reacción 1u 20 mM Tris-HCl 50 mM KCl 10 mM Mg acetato 100 µg/ml BSA, pH 7.9, a 37°C toda la noche
---	--	--	--

### 8.3 Construcción de plásmido recombinante:

Para generar una mutante interrumpida de *flgK* se generó una construcción recombinante apartir del vector pJQ200mp18.

El vector pJQ200mp18 es empleado en ensayos de mutagénesis por sustitución alélica utilizando un mecanismo de doble recombinación (Quandt & Hynes, 1993). El plásmido contiene un origen de replicación *P15a ori* (de pACYC184) funcional únicamente en enterobacterias, un origen de transferencia *RP4* que permite la movilización de construcciones en bacterias gram negativas, el gen *aacC1* de pPHIJ, codificante para una Gm acetiltransferasa 3-1 que confiere resistencia a gentamicina y el gen *sacB* de *Bacillus subtilis* como marcador de selección positiva de la pérdida del vector. Además, contiene una secuencia  $\lambda$ -*cos* que permite la inserción de fragmentos de hasta de 40kb y finalmente los genes del operón *lacZ $\alpha$*  que permiten la selección de insertos clonados en el vector al emplear un sitio de multiclonación que interrumpe la producción de  $\beta$ -galactosidasa (Sambrook 2000) permitiendo el monitoreo de colonias por adición de X-gal (2%, US Biochemicals).

El gen *sacB* es inducible en un medio con sacarosa 5% (Sigma-Aldrich) y su expresión es letal para la célula lo que evita la replicación del vector.

Para generar la construcción recombinante, se corrió en un gel TE-agarosa 1%, una reacción de digestión con la enzima *SalI* (NEB) de la construcción pDC01. El fragmento de 7.3 kb fue aislado por disección del gel y éste se purificó con el Qiaquick Gel Extraction (Qiagen). Posteriormente fue clonado en un sitio *SaI* I del plásmido suicida **pJQ200mp18**, utilizando una ligasa T4 (Boehringer-Roche) con las mismas condiciones de reacción descritas en la página 24. La construcción resultante se denominó **pDC-02**.

Se realizó un análisis de restricción de la construcción pDC-02, empleando las enzimas descritas en la siguiente tabla, así como una reacción de PCR para comprobar la presencia de la secuencia *aadA*, utilizando los oligodesoxinucleótidos 2739 y 2740 antes descritos con el mismo programa de amplificación empleado para la secuencia *aadA* a partir del vector pWM5 (página 24), (Ver figura 20).

<i>SalI</i> (NEB)	<i>EcoRI</i> (Promega)
Reacción O/N	Reacción O/N
(20 U/μl), 37°C	20 U/μl a 37°C
10 mM Tris-HCl	90 mM Tris-HCl
150 mM NaCl	50 mM NaCl
10 mM MgCl	10 mM MgCl <sub>2</sub>
1 mM DTT	pH 7.5
pH 7.9	
con un suplemento de	
100 μg/ml BSA	

La construcción pDC-02 se utilizó para transformar células de la cepa S17-1 (con el método de CaCl<sub>2</sub>). Las células transformantes se seleccionaron en placas de LB sólido (LB-Agar, Difco) adicionado con espectinomicina 50 μg/ml y gentamicina 30 μg/ml (Sigma-Aldrich).

La cepa S17-1 se utiliza para inducir la movilización de la construcción pDC-02 hacia la cepa WS8 de *Rhodobacter sphaeroides*, por medio de conjugación.

## 8.4 Conjugación bacteriana

La conjugación es un proceso de intercambio horizontal de material genético que en ocasiones implica la recombinación de grandes extensiones de ADN generalmente de origen extracromosomal. Los mecanismos involucrados en la conjugación requieren de los productos de múltiples genes, entre ellos un factor de movilización que permita la migración del material genético de una célula a otra. Existen varios grupos de genes asociados con la movilización de plásmidos, cósmidos o transposones; por ejemplo, las secuencias *mob*: *tra*, *oriT*, por mencionar a las mejor caracterizadas. Las secuencias *tra* son responsables de la formación del Pili, sólo una proteína, la pilina, está directamente asociada a la generación del Pili, el resto de las 10 proteínas están asociadas con el transporte y ensamblaje del Pili o en la transferencia de ADN. Las secuencias *oriT* son el sitio donde inicia la transferencia del ADN plasmídico y donde termina y se recirculariza una vez transferido hacia otra célula.

Estas secuencias poseen un sitio de corte para una endonucleasa codificada en las secuencias *tra*. Una helicasa codificada en el plásmido está involucrada en el desenrollamiento de la doble cadena y es a partir de la región 5' de la secuencia *oriT* que se transfiere una sola hebra del ADN plasmídico. La célula receptora promueve la síntesis de la cadena complementaria a través de iniciadores (primers) de ARN's que se acoplan a apartir del extremo 3'. (Snyder & Champness 1997 )

La construcción pDC-02 se introdujo en la cepa silvestre WS8 de *Rhodobacter sphaeroides* por medio de conjugación diparental (movilización de un plásmido de una bacteria *E.coli* a *R. sphaeroides*). Se escogieron las colonias exconjugantes que tuvieran un evento de doble recombinación, empleando como marcador la resistencia a espectinomicina, y aquellas colonias sensibles a gentamicina como marcador de la ausencia del plásmido pJQ200mp18.

## 8.5 Protocolo de conjugación:

### Primer día

Se colocó un precultivo de pDC-02 (S 17-1) en 2ml de medio LB adicionado con espectinomicina 50 µg/ml y gentamicina 30 µg/ml (Sigma-Aldrich) Se creció con agitación vigorosa (250rpm) a 37°C toda la noche.

Se creció un precultivo fototrófico de *Rhodobacter sphaeroides* WS8 en 2 ml de medio SUX-succinato.

### Segundo día

Se colocó un segundo cultivo de 5ml LB con espectinomicina 50 µg/ml gentamicina 30 µg/ml (Sigma-Aldrich) inoculado con 50 µl del precultivo del día anterior, se creció con agitación vigorosa (250rpm) a 37°C, hasta que alcanzó una D.O.<sub>550nm</sub> de 0.5

Se colocaron dos cultivos aeróbicos de 10ml de *Rhodobacter sphaeroides* WS8 de medio SUX succinato inoculados con 3 y 7µl del precultivo fototrófico. Se crecieron con agitación vigorosa (250rpm) a 30°C hasta que alcanzaron una D.O.<sub>550nm</sub> de 0.5 en un equipo de espectrometría de luz visible Spectronic 20. (Milton Roy)

Se dividieron los cultivos en tres alícuotas de 500µl  
S17-1: X 3 de 500µl  
WS8: X3 de 500µl

Se tomó una alícuota como control de c/u

Se centrifugó a 6,000 rpm 4' a 4°C para coleccionar las células  
Se lavaron con 500 µl LB 2X  
Y se resuspendieron en 100 µl LB c/u

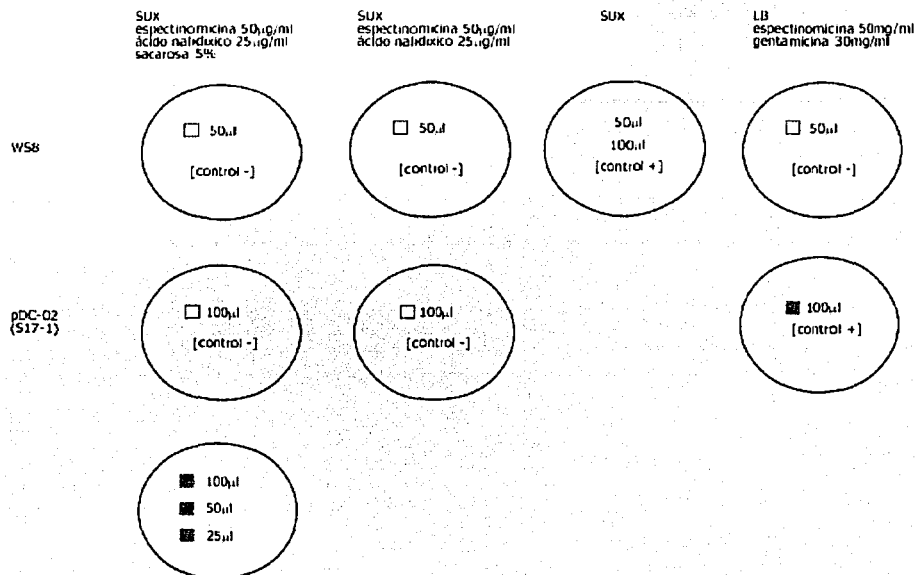
Controles: *E. coli* S17-1 y *R. sphaeroides* de los 100µl se agregaron 100µl mas de LB

De las células se colocaron alícuotas de 100 µl de cada cultivo en tubos eppendorf estériles para conjugación siempre primero la S17-1 (100 µl) y después se agregó la cepa WS8 (100 µl). Se agitó suavemente; de la mezcla WS8/S17-1(pDC-02) se tomaron alícuotas de 50 µl de c/u y se colocaron en recortes de nitrocelulosa (Biorad) de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> sobre una caja de LB sólido (LB-Agar) durante 5 hr a 30°C. Después de éste tiempo de incubación se sacaron los recortes y se colocaron en tubos eppendorf. Se añadieron 500 µl de LB y se agitaron con un vortex para desprender las células.

Se hicieron diluciones de las células 10µl en 1000µl LB c/u y se plaquearon alícuotas de 25 y 50µl.

## 8.6 Selección de células exconjugantes

Tabla 1.1 de Medios de selección para células exconjugantes



En cada uno de los círculos se muestra la cantidad de inóculo (en  $\mu$ l) plasmeados de cada cepa

- espectinomicina / gentamicina
- espectinomicina
- ácido nalidixico
- sin resistencia

Las cajas se dejaron crecer durante 3 días a 30°C y se tomaron cincuenta colonias exconjugantes, se parcharon en medio SUX espectinomicina 50  $\mu$ g/ml (Sigma-Aldrich). De las cincuenta colonias se seleccionaron 2 parches que son capaces de crecer en presencia este antibiótico y que llevan la interrupción del gen. La mutante así obtenida se denominó DC (WS8 *flgK::aadA*)

## 8.7 Ensayos de nado

Una colonia de cada uno de los parches seleccionados se cultivó fototróficamente en medio SUX-succinato adicionado con espectinomycin 50 µg/ml (Sigma-Aldrich). Se colocó otro cultivo en condiciones fototróficas de medio 1.5ml SUX-succinato, inoculado con la cepa WS8. Ambos cultivos se crecieron durante toda una noche hasta que alcanzaron una  $D_{550nm}$  de 0.85. Posteriormente se tomaron alícuotas de 3µl de cada uno de los cultivos y se colocaron sobre placas de agar en una concentración de 0.3%; las cajas se incubaron a 30°C durante cinco días. La colonias que no presentaron un halo de motilidad fueron seleccionadas y se denominó a esta mutante DC (WS8 *flgK::aadA*), (Ver figura 21).

Para confirmar que el sitio de recombinación del casete se encuentra en la región codificante del gen *flgK*, se purificó material cromosomal de la mutante DC (WS8 *flgK::aadA*) y de la cepa silvestre WS8, para realizar una hibridización tipo Southern con dos sondas diferentes.

## 8.8 Purificación de ADN cromosomal

Para hacer la purificación del ADN cromosomal de la cepa silvestre WS8 y la cepa mutante DC, se crecieron tres cultivos fototróficos en 25ml medio SUX-succinato, uno inoculado con la cepa WS8 y otros dos con dos colonias de la cepa DC, crecidas en presencia de espectinomycin 50µg/ml (Sigma-Aldrich). Los cultivos se dejaron crecer hasta alcanzar una  $D_{500nm}$  de 1.5.

Se centrifugaron las células a 6,000 rpm 5'

Se eliminó sobrenadante

Se resuspendió la pastilla con una solución de sacarosa (1/50 del vol. de cultivo)

Se agregó una solución de EDTA 0.25M pH 8.0, [1/100 del vol. inicial]

Se agregó lisozima 5mg/ml en Tris 0.25M pH 8.0; [1/2000 del vol. inicial]

Se agregó RNA'sa 10mg/ml en NaAc. 0.1M pH 5.0 [1/3500 del vol. inicial]

Se dejó en hielo 15'

Se añadió Tritón Lytic Mix 3X [1/100 del vol. inicial]

Se dejó en hielo 15'

Se agregó H<sub>2</sub>O 1/50 del vol. inicial

Se centrifugo a máxima velocidad (14,000 rpm) 30'

Se eliminó el sobrenadante

Se resuspendió la pastilla en de Buffer A [1/50 del vol. inicial]

Se añadió 1/10 del volumen de Proteinasa K, previamente incubada a 37°C por 30'

La mezcla se dejó a 37°C en agitación 200 rpm, durante toda la noche.

Se añadió RNAsa (Sigma) 0.3mg/ml, [1/2000]. Se incubó a 37°C por 1hr.

### **8.9 Extracción de ADN con fenol-cloroformo**

El fenol y el cloroformo son dos solventes orgánicos que permiten eliminar las proteínas del ADN. El fenol desnaturaliza a las proteínas de manera eficaz y debido a que las ARN'asas no son degradadas con ese solvente, evita la contaminación por RNA. La consecuente adición de cloroformo y alcohol isoamílico, (24:1) permite la eliminación de fenol de la preparación inicial.

Se extrajo el ADN cromosomal de los cultivos de WS8 y DC (dos cultivos) con una mezcla de  $\text{CHCl}_3$  - fenol 1:1, (1 volumen de c/u)

Se extrajeron dos veces con ésta misma proporción hasta que la interfase blanca de proteínas desapareció. Se realizó una segunda extracción con un volumen de  $\text{CHCl}_3$  - alcohol Isoamílico en una relación 24:1

Se centrifugó a 10,000 rpm 10' recuperando la fase acuosa.

El sobrenadante recuperado se precipitó con 1/25 del volumen de una solución NaCl 5M y dos volúmenes ETOH 100%

Se lavó con dos volúmenes de ETOH 80% -20°C

Se centrifugó a 10,000 rpm 10' y se eliminó el sobrenadante de ETOH

El ADN cromosomal se secó y se resuspendió en 50µl de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril

Se obtuvieron 300µg totales de ADN cromosomal de WS8, y 200µg (totales) de cada una de las dos colonias crecidas de la mutante DC, (Ver figura 22).

### **8.10 Análisis de ADN genómico por PCR**

Para comprobar la presencia de la secuencia *aadA* en el material genómico de las cepas mutantes DC, se realizaron las siguientes reacciones de PCR, (Ver figura 23).

#### **Primera reacción:**

ADN cromosomal purificado de la cepa silvestre WS8, se realizó una reacción de PCR, empleando los oligonucleótidos Fw1349 y Rv 1350



### **Segunda reacción:**

Se realizó una reacción de PCR control I , empleando los oligonucleótidos Fw 2739 y Rv 2740 y ADN cromosomal purificado de la cepa silvestre WS8

### **Tercera reacción:**

Se realizó una reacción empleando los oligonucleótidos Fw1349 y Rv 1350 y ADN cromosomal purificado del la mutante DC (WS8 *flgK::aadA*)

### **Cuarta reacción:**

Se emplearon los oligonucleótidos Fw 2739 y Rv 2740 y ADN cromosomal purificado del la mutante DC (WS8 *flgK::aadA.Fla*),

Se colocaron las reacciones de amplificación en las con la siguientes condiciones:

El ADN cromosomal de la mutante DC (WS8 *flgK::aadA*) y WS8 (50ng y 10ng/ $\mu$ l) se agregó a una mezcla de reacción 10% DMSO, 10% Reaction Buffer 10X (Stratagene), dNTP's 1.0mM  
100 pmolas de cada uno de los oligodesoxinucleótidos( Fw, Rv)  
*pfu* Native Polymerase (Stratagene) 2.5 unidades.  
Volumen final aforado a 50 $\mu$ l.

Los oligodesoxinucleótidos utilizados se sintetizaron en la UBM-IFC-UNAM.

#### **Región interna de *flgK***

Fw 1213 5' CAA GCC CGT CGG ACC TCG TG 3'  
Rv 1420 5' GGA TGG AGA CCG TCT GAC GG 3'

#### **Cassette *aadA***

Fw 2739 5' CCT GAA TCG ATG GCA GAT CCG TGC 3'  
Rv 2740 5' TCA TGA TCG ATC TCC CAA TTT GTG 3'

La reacción se realizó en un termociclador GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer) donde se utilizó el siguiente programa para cada reacción.

Un primer ciclo de desnaturalización a 95°C 4'

Tres ciclos:

1' de desnaturalización a 95°C, 45" de alineamiento a 55°C y 3' de extensión a 72°C

27 ciclos:

1' de desnaturalización a 95°C, 45" de alineamiento a 58°C y 3' de extensión a 72°C

Un último ciclo de extensión:

10' a 72°C y finalmente a 4°C

### 8.11 Análisis de ADN genómico por hibridización tipo Southern.

La hibridización tipo Southern es un método empleado para determinar la presencia de secuencias específicas en ADN genómico.

El ADN genómico es digerido con una o más endonucleasas y los fragmentos resultantes son separados de acuerdo a su tamaño por medio de una electroforesis en un gel de agarosa. El ADN es desnaturalizado *in situ* y posteriormente inmovilizado en un soporte sólido. La ubicación relativa de los fragmentos se conserva durante su transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa o nylon. El ADN inmovilizado en la membrana es hibridizado con una sonda de ácidos nucleicos marcada radioactivamente. Una autoradiografía con una placa fotográfica permite localizar las bandas complementarias a la sonda. De esta manera se puede identificar en el material genómico, la presencia de secuencias homólogas a la sonda empleada.

Se ocupó un producto de PCR de una región central de *flgK* 1.8 kb que fue marcado utilizando dCTP [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] (NEN Life Sciences) para generar una sonda de hibridación. El marcaje se realizó por medio un sistema de marcaje aleatorio *rediprime* II (Amersham-Pharmacia Biotech) El sistema emplea un mecanismo de síntesis de hexanucleótidos marcados que sustituyen a los nucleótidos no marcados de un templado desnaturalizado a emplearse como sonda de hibridación, por medio de un fragmento Klenow. (Feinberg & Vogelstein) Esta enzima modificada posee una actividad máxima de incorporación específica de nucleótidos marcados dCTP [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] de  $1.9 \times 10^9$  dpm/ $\mu\text{g}$  después de 10' de incubación a 37°C.

### 8.12 Protocolo de hibridación:

Se escogieron como muestras de hibridación los siguientes productos

ADN cromosomal de mutante DC (WS8 *flgK::aadA*. Fla') digerido con la enzima *SalI* (NEB)

ADN cromosomal de la cepa WS8 digerido con la enzima *SalI* (NEB)

Producto de 3.2kb amplificado por PCR (oligonucleótidos 1213 y1420) a partir del ADN cromosomal de la mutante DC (WS8 *flgK::aadA*. Fla')

Producto de 1.8kb amplificado por PCR ADN cromosomal WS8, *flgK* (control)

Producto de 1.4 kb amplificado por PCR de pWM5, *aadA* (control)

Se marcaron dos productos como sondas de hibridación

(I) Producto de 1.8 kb, amplificado por PCR (región interna de *flgK*)

(II) Producto de 1.4 kb amplificado por PCR de pWM5 (cassette *aadA*)

- 1) Se corrieron las muestras de DNA en un gel TE- Agarosa 1% (Biorad)
- 2) Se determinó la ubicación y tamaños de las bandas obtenidas por medio de flourecencia de ADN intercalado con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) en una concentración de 10mg/ml
- 3) Se enjuagó dos veces el gel con 500ml H<sub>2</sub>O desionizada para eliminar trazas de Et Br.
- 4) El Gel se lavó con una solución desnaturalizante (A) y una solución neutralizante (B):
  - A.- 1M NaCl, 0.5M NaOH dos lavados con 100ml durante 20' a temperatura ambiente.
  - B.- 1M Tris, 3M NaCl dos lavados con 100ml durante 20' a temperatura ambiente.
- 5) Para transferir los fragmentos de ADN digeridos del gel a una membrana de nylon de empleó el siguiente sistema:
- 6) El gel se colocó en una cámara de electroforesis sobre papel Whatman embebido en una solución de transferencia SSC 6X; sobre de él se colocó un recorte de 11.2 x 9.2 cm de una membrana de Nylon de 0.45µm (Gibco BRL) y finalmente se colocaron varios folios de papel secante. El sistema de transferencia (Ver figura 24), permaneció durante 3 días a temperatura ambiente, hasta que la solución de transferencia fue movilizizada por capilaridad hacia los folios de papel.

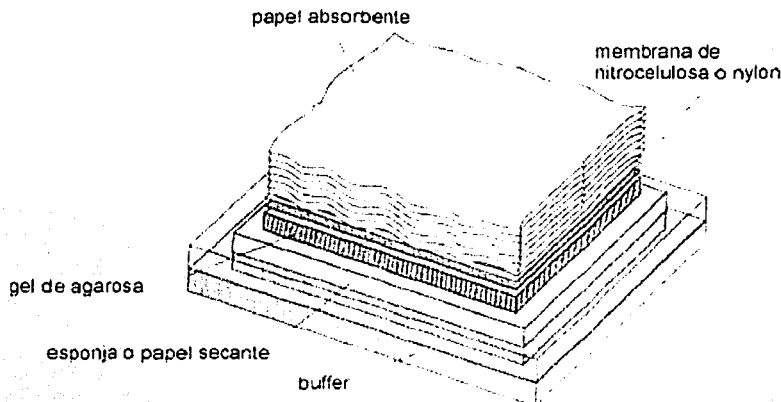


Figura 24  
Sistema de transferencia capilar de ADN. El gel de agarosa es colocado debajo de la membrana de nitrocelulosa o nylon para que el ADN que contiene sea transferido por capilaridad

7) La membrana fue retirada y se aplicaron cuatro ciclos de luz UV 0.125 joules /cm<sup>2</sup> para entrecruzar al DNA con la membrana. Se utilizó un entrecruzador UV Fotodyne TFL-254

8) La membrana se incubó durante 4hrs a 42°C con una solución de prehibridación (5ml). Esta solución está compuesta de: formamida 50%, solución Denhardt's (50X) 1/10 del vol. y agentes de alta fuerza iónica EDTA (0.5M pH 8) 1/500 del vol., SDS (20%) 1/50 del vol., Tris (1M, pH 7.5) 1/50 del vol. y ADN digerido de esperma de salmón (100µg/ml) como agente bloqueador de sitios inespecíficos. El ADN de bloqueo debe ser diferente del DNA hibridizado, la elección como agente bloqueador en la hibridación de material de origen procarionte es el esperma de salmón

9) Finalizado el tiempo de incubación se agregó la sonda I (Producto de 1.8 kb, amplificado por PCR, región interna de *flgK* marcada con dCTP [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] y se dejó toda la noche a 42°C

10) Se lavó la membrana para eliminar la marca radioactiva no incorporada, como sigue:

Tres lavados iniciales con 200ml de una solución 2X SSC, 0.1% SDS durante 5' a temperatura ambiente.

Cuatro lavados con 200ml de una solución 0.1X SSC, 0.1% SDS durante 5' a 45°C con agitación moderada.

Un lavado con 50ml de una solución 0.1X SSC durante 5' a temperatura ambiente

11) La membrana se secó y se expuso durante tres horas en una placa de fluorescencia (Molecular Dynamics) y la Imagen se analizó en el equipo Storm (Molecular Dynamics) de la Unidad de Biología Molecular del IFC

La membrana se lavó y se reutilizó para hibridarla contra la sonda II (Producto de 1.4 kb cassette *aadA* amplificado por PCR de pWM5), repitiendo desde el paso 8) y sustituyendo en el paso 9) por la sonda II y continuando hasta el paso 11)

### 8.13 Diseño de construcciones para ensayos de complementación

La complementación es una metodología experimental que permite identificar la función de un gen cuando éste se encuentra mutado o ausente.

Se utilizó el plásmido pRK415 10.5kb (Keet et al 1988) que posee un factor de movilización para complementar a la mutante DC con una construcción que contiene los genes *flgJ* (secuencia parcial 187pbs), *flgK* y *flgL* (secuencia parcial de 1,057) así como la secuencia consenso de un promotor  $\sigma^{28}$ , aparentemente inactivo, ubicado en una región intergénica de 108pb entre *flgJ*, y *flgK* (González-Pedrajo et al 2002).

La construcción pBG506B fue purificada con el MiniSpin Kit (se recuperaron 1ng/ $\mu$ l) y después fue digerida con la enzima *Hind* III (Promega) El producto de la digestión se corrió en un gel TE-agarosa 1% y la banda de 5.2kb fue cortada y purificada por medio del Gel Extracción Kit (Qiagen)

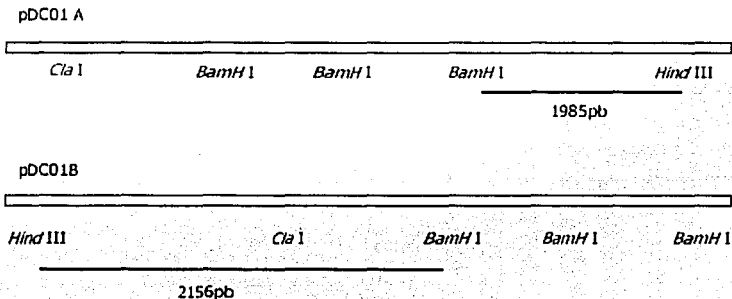
(El fragmento de 5.2 Kb, flaqueado por los sitios *Hind* III se obtuvo de la construcción pBG506B 5.9 kbs (González-Pedrajo, 2000) idéntica a la pBG-506 A, sólo que en la orientación contraria.)

Paralelamente se digirió el plásmido pRK415 con la enzima *Hind*III (Promega) y el producto se purificó con el PCR Clean Kit (Qiagen)

El producto de 5.2 kbs fue clonado en el vector **pRK415** en el sitio *Hind*III empleando la ligasa T4 (Boehringer-Roche) a 16°C durante toda la noche (100 U/ml) en una reacción conteniendo 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 mM ditiotreitol, 60 mM KCl, 50% glicerol, pH 7.5 y el producto de la clonación transformado en células de la cepa S17-1

La construcción resultante se denominó **pDC-C01**, para determinar la orientación de las subclonas se hizo un análisis de restricción con la enzima *Cla*I (NEB) y *Bam*HI (NEB). El patrón de restricción (Ver figura 26) generó dos bandas diferentes de 1.98kb en la orientación en fase con el promotor *Tc* (tetraciclina) y otra de 2.15kb en orientación contraria (Mapa figura 27)

#### Mapa de orientación de las construcciones pDC-C01A/B Subclonas de complementación A y B (clonadas en pRK 415) [Fig 27]



### **8.14 Diseño de una construcción con una remoción en la región central del gen *flgK* de *Rhodobacter sphaeroides* WS8**

Para analizar el papel de la región central de la proteína FlgK, se diseñó una construcción para la complementación de la mutante DC, donde se eliminó un fragmento de 3,048 pb, ubicado en la región central de *flgK*, codificante para 1016 aminoácidos que no presentan similitud con secuencias de HAP1 de otras especies, además de poseer pocos sitios con alta probabilidad de formar estructuras secundarias como "coiled coils" necesarias para el ensamblaje y reconocimiento entre las subunidades de las proteínas axiales. (Homma et al 1990)

Para la escisión de 3,048pb de la región central de *flgK* se realizó según el protocolo de mutagénesis por PCR descrito en Tao & Lee 1994, como sigue:

Se diseñaron cuatro oligonucleótidos según la secuencia reportada para *flgK* (genbank AF317649); los primeros dos (1 y 2) amplifican una región codificante para el extremo amino terminal de HAP1 y los otros dos oligonucleótidos (3 y 4) amplifican al extremo carboxilo terminal.

En dos reacciones independientes se amplificaron dos productos derivados de un templado de *flgK* (pBG506A). Se generaron dos fragmentos uno de 720 pbs y otro de 324 pb que corresponden a los extremos amino y carboxilo terminales respectivamente. Los extremos terminales se delimitaron con base en la extensión de los aminoácidos que alineaban con secuencias conservadas de otras proteínas HAP's en la misma región, así como la probabilidad que posee su secuencia a formar "coiled coils" según el método de predicción de Lupas (1991).

Los oligonucleótidos internos (2 y 3) se diseñaron para que los productos amplificados tuvieran una región de superposición de 24 pb, 12 de ellas correspondientes a los últimas pares de bases del producto amplificado de la región amino terminal (708-720 5' CTC GAG GGG ACG 3') y 12pb del inicio del extremo carboxilo (3768-3780 5' CGA ATT GCC GCT 3').

Los productos obtenidos de 720pb y 324pb fueron purificados por medio del PCR Clean Kit (Quiagen) y posteriormente fueron empleados como templado en una tercera PCR, para la obtener un producto de 1.04kb (Ver figura 28)

Al producto truncado de *flgK* de 1.04kb se colocó en un sitio de restricción *HindIII* en el extremo 5' y en el extremo 3' el sitio *XbaI* clonarlo en el vector pTZ-19R y posteriormente en el plásmido de movilización pRK415 para su complementación en la mutante DC. Esta última construcción se denominó **pDC-104** ( $\Delta$  3.04Kb)

En las tres reacciones de amplificación se utilizó el siguiente programa:

Primera desnaturalización 4' 95°C

Tres ciclos:

1' de desnaturalización a 95°C, 45" de alineamiento a 55°C y 3' de extensión a 72°C

27 ciclos:

1' de desnaturalización a 95°C, 45" de alineamiento a 58°C y 3' de extensión a 72°C

Un último ciclo de extensión:

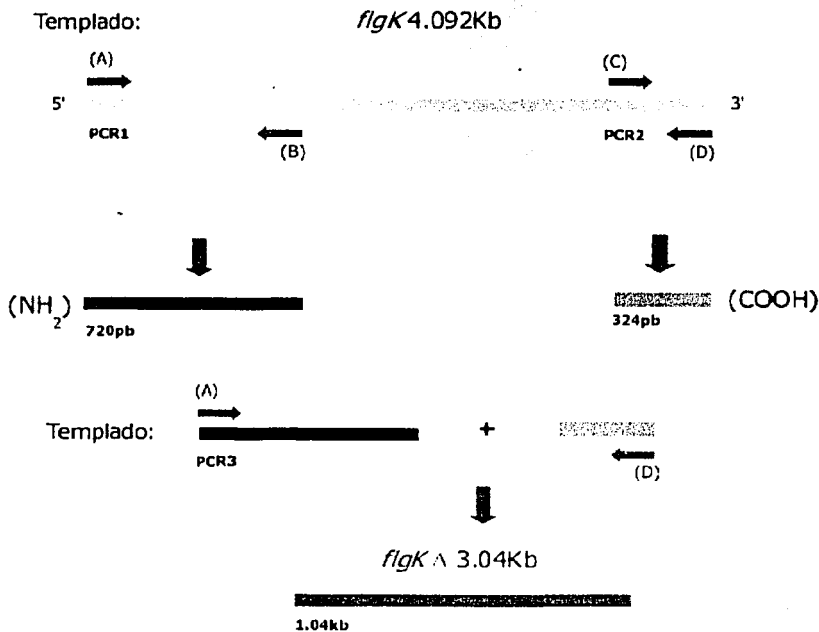
10' a 72°C y finalmente a 4°C (infinito)

**Secuencias de los oligonucleótidos (invitrogene) empleados para la generación de la clona pDC-104 (*flgK* Δ 3.04kb)**

- 1) F<sub>w1</sub> 5' CCC **AAG CTT** TTG TCC ATC CTC GAC 3' *HindIII*
- 2) R<sub>vmt</sub> 5' CGA ATT GCC GCT CGT CCC CTC GAG 3'
- 3) F<sub>wα</sub> 5' ACC GGC AAT TCG GGC GGC GGC GAG 3'
- 4) R<sub>v1</sub> 5' CTA **GTC TAG** ATC ACA GCG CGT TCA G 3' *XbaI*

**Tabla 1.2 Reacciones de PCR sucesivas para formación del producto trunco de *flgK* en la región central.**

En el siguiente gráfico se muestran los pasos sucesivos para la generación de un producto trunco de *flgK* con una remoción en la región central de poca similitud.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Se diseñó una última construcción: **pDC-409**, contiene un producto de 4,09kb correspondiente al gen silvestre de *flgK* clonado en el plásmido pTZ19 R y finalmente en pRK415. El producto del gen silvestre se obtuvo de una reacción de PCR, empleando los oligonucleótidos 1 y 4 (anteriormente descritos) y un programa de amplificación similar al utilizado para generar los productos de la construcción pDC-104, pero modificando los tiempos de extensión, en los cuales se emplearon 8' debido al tamaño del producto

### 8.15 Localización de flagelina libre en la mutante DC

Debido a que HAP1 es la proteína responsable de conectar el filamento con el gancho, los efectos de una mutación en este nivel pueden modificar la incorporación de monómeros de flagelina en el filamento. La flagelina del *Rhodobacter sphaeroides*, codificada por el gen *fliC* es una proteína de 59kDa. Para identificar el estado de polimerización de la flagelina se realizó un protocolo para visualizar las fracciones solubles de esta proteína presentes en el medio.

Dos precultivos de medio SUX-succinato, uno adicionado con espectinomicina 50µg/ml, (Sigma-Aldrich) inoculado con la cepa DC y otro sin espectinomicina inoculado con la cepa silvestre WS8; se crecieron fototróficamente durante toda una noche. Después se tomaron alícuotas de 100 µl de cada uno con las que fueron inoculados dos cultivos de 10 ml de medio SUX-succinato, espectinomicina 50µg/ml, (Sigma-Aldrich) y otro cultivo del mismo volumen medio SUX-succinato, sin espectinomicina. Se crecieron a 30°C durante 12h y se extrajeron alícuotas de 500µl y se tomó lectura de densidad óptica a 550nm luz visible (Milton-Roy) cada tres horas (Ver figura 29)

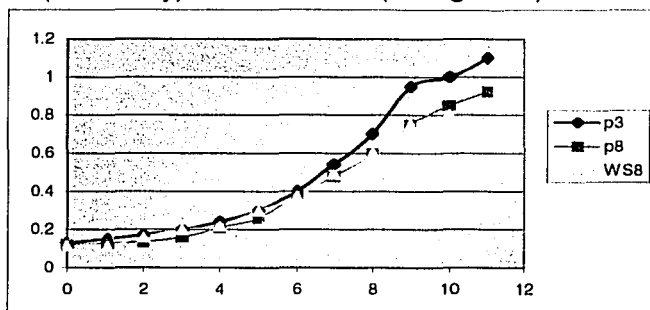


Figura 29  
Crecimiento de mutantes y cepa silvestre (WS8) en condiciones aeróbicas 30°C, agitación vigorosa (250rpm). El crecimiento fue monitoreado cada 3h en un equipo de espectrometría luz visible a 550nm

Las alícuotas se centrifugaron a baja velocidad (4,000 rpm, 4°C) en una micro centrífuga Eppendorf, el sobrenadante se apartó y se ultracentrifugó en una ultra aero centrífuga. (Beckman) Este equipo es una modificación a escala de las ultracentrífugas convencionales, que permite ultracentrifugar a alta velocidad muestras de hasta 400µl en tiempos más cortos. Se emplea un rotor A-100/30.

1995 CON  
FALLA LE ORIGEN



## 8.16 Cálculo del factor K para uso del rotor A-100/30 (Beckman)

Para calcular el tiempo y la velocidad para centrifugar la flagelina se tomó como referencia la separación de monómeros de flagelina por medio de ultracentrifugación con un rotor 60Ti (Beckman) a 30,000rpm 1hr

60Ti: 60,000 rpm vel max.

Radio promedio: 63.4

Factor K: 63

$$K_{adj} = K (60,000/x)^2$$

$$K_{60Ti} = 63 (60,000/30,000)^2 = 252$$

$$K_{A-100} = 19 (92,000/x)^2$$

$$RCF = (rW^2/g) = RCF = 1.12r (rpm/1000)^2$$

$$RCF/1.12r = (RPM/1000)^2 = \sqrt{(RCF/1000^2/1.12r)} = rpm$$

RCF para rotor 60ti

$$rav = 63.4 \approx 67,500 \text{ g's a } 30,000 \text{ rpm}$$

r radio de A<sub>100/30</sub> (13.2)

por lo tanto

$$\sqrt{(67,000 \cdot (1000^2) / 1.12 \cdot 13.2)} = 67,570 \text{ rpm en u rotor } 60ti$$

$$rav = 63.4 = RCF = 125,000$$

del mismo modo

$$\sqrt{[(1000^2) (125,000) / 14,784]} = 91,951 \text{ rpm}$$

$$Vmax \text{ de } A_{100/30} = 92,000 \text{ rpm}$$

### Tiempos de centrifugación

A partir de:

$$ka/kb = ta/tb$$

$$ta = katb/kb$$

sustituyendo :

$$ka A_{100/30} = 19(92,000/68,910)^2 = 34$$

$$ka 60ti = 63(60,000/30,000)^2 = 252$$

por lo tanto

$$ta = 34/252 = 0.13 \text{ hrs} = 8.09 \text{ mins}$$

A partir del cálculo se determinó utilizar una velocidad de 67,570 rpm durante 8'

De cada una de las alícuotas tomadas durante 12 hrs se cargaron 400 µl del sobrenadante en tubos de polialómero (Beckman). Empleando un rotor A<sub>100/30</sub> se aplicó una presión de aproximadamente de 16 psi para alcanzar una velocidad de 67,570 rpm durante 8' con una fuerza de gravedad incrementada 92,000 veces. Es decir una aceleración de 902.2 m/s<sup>2</sup>

Se apartaron sobrenadante y pastilla y el sobrenadante se precipitó con una mezcla de metanol-cloroformo (ver apéndice técnico)

Se precipitaron 200µl de cada una de las muestras centrifugadas y fueron desecadas en un equipo Hetto (Hofer) para eliminar trazas de solvente.

### **8.17 Separación de flagelina en SDS-PAGE**

De cada una de las muestras centrifugadas y precipitadas, se resuspendieron en 50µl de una mezcla de carga 0.5M Tris-HCl pH 6.8 glicerol 10%, SDS 10%, 0.1% azul de bromofenol y β-mercaptoetanol 5%.

Las muestras se hirvieron a 90°C durante 5' y se cargaron 20µl de cada una de las muestras en un gel PAGE-SDS (Laemmli) 12.5%.

### **8.18 Inmunorreplica tipo Westernblot**

Las proteínas se transfirieron del gel SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa 0.2µm Transblot (Biorad) en una cámara de transferencia semiseca Hofer (Pharmacia Biotech) aplicando 0.8mA/cm<sup>2</sup>/ 1hr

La membrana con las proteínas transferidas se bloqueó con una solución TTBS conteniendo 5% de leche descremada durante 1hr con agitación suave a temperatura ambiente.

Se hicieron 3 lavados con una solución de TTBS, uno por 15' y dos lavados de 10'

Se incubó con anti-FliC (flagelina) en una dilución de 1:5,000 con una solución TTBS 0.1% de leche descremada a temperatura ambiente durante 1hr

Se hicieron 3 lavados con una solución de TTBS, uno por 15' y dos lavados de 10'

Se incubó anti-HIS-TTBS en una dilución 1/10,000 durante 1hr

Se hicieron 3 lavados con una solución de TTBS, uno por 15' y dos lavados de 10'

Finalmente la membrana se reveló con anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano (ECL/Amersham). La reacción de quimioluminiscencia genera un tipo de radiación a la que una placa fotográfica es sensible

Finalmente el gel se expuso en una placa fotográfica Kodak  
[ver sección de resultados]

## 9 RESULTADOS

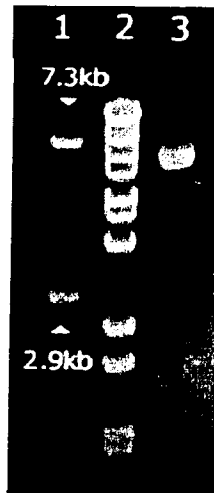


Figura 18

Digestión con la enzima *SalI* (NEB) de la construcción pDC-01 10kb (pBG506A 8.8kb + 1.4kb de *aadA*)

- 1) Se libera un fragmento de 2.9k correspondiente a el vector de clonación pTZ-19R y un fragmento de 7.3 kb que contiene el fragmento *SalI* que contiene a *flgK::aadA* 1.4 Kb.
- 2) Lambda *BstE II* (marcador)
- 3) 1  $\mu$ l de la construcción pDC-01, 10.2kb, sin digerir

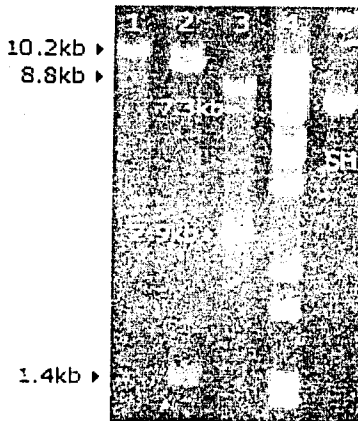


Figura 19

Análisis de restricción de la construcción pDC-01, digerida con las enzimas

- 1) *EcoRI*, linearización del plásmido pDC-01 (10.2Kb).
- 2), *ClaI*, liberación del fragmento 1.4kb *aadA*
- 3) *SalI*, liberación del fragmento 7.3kb y el vector pTZ-19R 2.9kb
- 4) Lambda *BstE II*.
- 5) Plásmido pDC-01, 10.2kb sin digerir.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

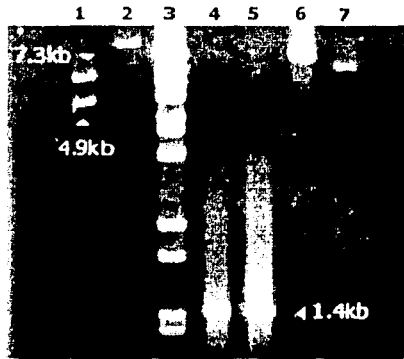


Figura 20

Análisis de restricción de la construcción pDC02

- 1) *SalI* se liberan el fragmento *flgK::aadA* (7.3kb) y el plásmido linealizado pJQ200mp18 (4.9kb),
- 2) Linearización de la construcción pDC02 con la enzima *EcoRI*,
- 3)  $\lambda$  BtsE II
- 4) Producto de PCR amplificados de la construcción pDC-02 (secuencia *aadA* 1.4kb)
- 5) Control positivo amplificado de pWM5 (secuencia *aadA* 1.4kb)
- 6) Plásmido pDC02 sin digerir
- 7) Plásmido pWM5 sin digerir.

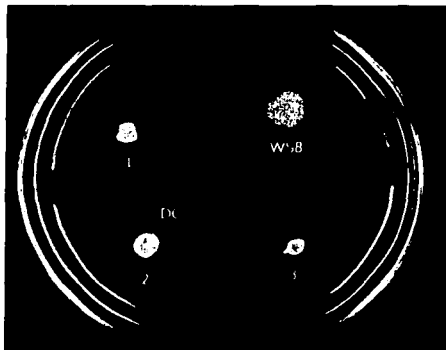


Fig 21 Placa de nado en agar suave (0.3%) Se muestra el la formación del halo de nado de la cepa silvestre WS8 en contraste con el fenotipo no móvil de la mutante DC (WS8 *flgK::aadA* Fla<sup>-</sup>) se colocaron tres alícuotas correspondientes a 3 colonias aisladas con fenotipo espectinomomicina resistente. Se seleccionó la colonia 3.

TESIS CON  
 FALLA DE CR:GEN

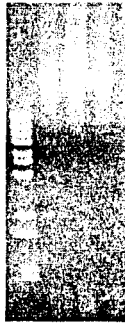


Fig 22

Material cromosómico obtenido por extracción de fenol-Cloroformo

- 1)  $\lambda$  BstE II
- 2) y 3) ADN cromosomal de dos colonias de la mutante DC
- 4) ADN cromosomal de WS8

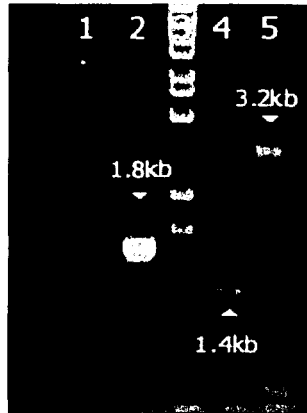


Figura 23

Gel de TE-agarosa 1% Productos de PCR

- 1) **Control negativo**  
Producto de la reacción con ADN cromosomal de WS8 con oligonucleótidos 2739 y 2740. No hay producto con los oligonucleótidos para el gen *aadA* (1.4kb)
- 2) **Control positivo**  
Producto de la reacción con ADN cromosomal de WS8 y oligonucleótidos 1213 y 1420. Se observa una banda esperada de 1.8kb.
- 3) **Marcador de Pesos Moleculares  $\lambda$  BstE II (NEB)**
- 4) Producto amplificado del ADN cromosomal de la mutante DC (WS8 *flgK::aadA*, Fla<sup>r</sup>) empleando los oligonucleótidos 2739 y 2740. Se observa una banda de 1.4kb correspondiente al cassette *aadA*
- 5) Producto amplificado del ADN cromosomal de la mutante DC (WS8 *flgK::aadA* Fla<sup>r</sup>) empleando los oligonucleótidos 1213 y 1420. Se obtuvo un producto de 3.2kb correspondiente a la región central de *flgK* 1.8kb más el cassette *aadA* 1.4kb

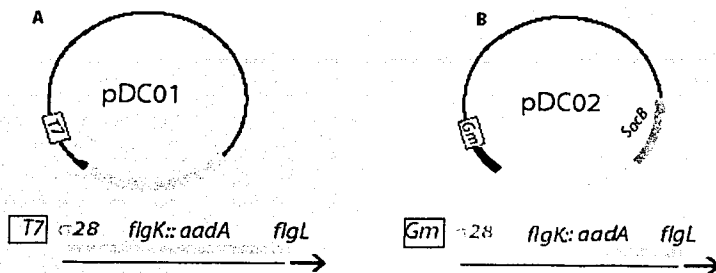
En producto del último carril confirma la interrupción de *flgK* por inserción con la secuencia *aadA*.



## Construcciones

Fig 30

Plásmidos para generar la mutante DC (*flgK*<sup>-</sup>)

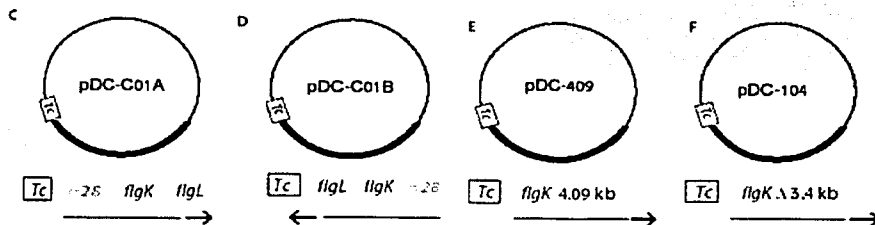


**A)** pDC01 [pBG 506A + *aadA* 1.4 kb de pWM5 Amp<sup>r</sup>/Sp<sup>r</sup>]

**B)** pDC02 [pJQ200mp18 + fragmento *SalI* 7.3 kb de pBG506A + *aadA* 1.4 kb de pWM5 Gm<sup>r</sup>/Sp<sup>r</sup>]

Fig 31

Plásmidos para ensayos de complementación



**C)** [pRK 415 fragmento *HindIII* 5.09 kb de pBG 506B, Tc<sup>r</sup>]

**D)** [pRK 415 fragmento *HindIII* 5.09 kb de pBG 506B, Tc<sup>r</sup> en la orientación opuesta]

**E)** [pRK 415 *flgK* gen silvestre; fragmento *HindIII*/*XbaI* 4.09 kb de pBG 506B, Tc<sup>r</sup>]

**F)** [pRK 415 *flgK*  $\Delta$  2.4 kb *HindIII*/*BamHI* 1.04 kb obtenido por PCR de pBG 506A, Tc<sup>r</sup>]

TRABAJOS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 9.1 HAP1 de *R. sphaeroides* características físico-químicas y estructurales

*flgK* de *Rhodobacter sphaeroides* posee una secuencia de 4,094 pb (número de acceso genebank : AF317649 [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) que codifica para la proteína HAP 1

A partir de la secuencia de aminoácidos se realizó una búsqueda en diferentes bases de datos para identificar *in silico* algunas características del producto de *flgK*, se muestran a continuación:

Características físico-químicas de FlgK (HAP1)

Numero de aminoácidos: 1363

Masa Molecular aprox. : 133,154.5 Da.

(punto isoeléctrico teórico) pI: 4.45

**Composición de aminoácidos:**

Ala (A) 265 19.4%	Arg (R) 65 4.8%	Asn (N) 21 1.5%	Asp (D) 67 4.9%	Cys (C) 0 0.0%
Gln (Q) 55 4.0%	Glu (E) 54 4.0%	Gly (G) 193 14.2%	His (H) 9 0.7%	Ile (I) 33 2.4%
Leu (L) 162 11.9%	Lys (K) 1 0.1%	Met (M) 14 1.0%	Phe (F) 32 2.3%	Pro (P) 56 4.1%
Ser (S) 103 7.6%	Thr (T) 124 9.1%	Trp (W) 3 0.2%	Tyr (Y) 16 1.2%	Val (V) 90 6.6%
Asx (B) 0 0.0%	Glx (Z) 0 0.0%	Xaa (X) 0 0.0%		

Numero total de residuos cargados negativamente (Asp + Glu): 121

Numero total de residuos cargados positivamente (Arg + Lys): 66

Composición atómica

Carbono	C	5768
Hidrogeno	H	9358
Nitrógeno	N	1656
Oxígeno	O	1925
Sulfuro	S	14

Formula: C5768H9358N1656O1925S14

Numero total de átomos: 18721

FALLA LE ORIGEN



Coefficientes de extinción; obtenidos en las siguientes condiciones:  
 6.0 M Clorhidrato de guanidina.  
 0.02 M Amortiguador de fosfatos  
 pH 6.5

Coefficientes de extinción en unidades de  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

	276	278	279	280	282
	nm	nm	nm	nm	nm
coef. ext	39400	39200	38500	37550	36000
Abs 0.1% (=1 g/l)	0.296	0.294	0.289	0.282	0.270

Inicio amino-terminal (metionina)

Vida media estimada en horas : 30 horas ( reticulocitos mamíferos, *in vitro*).

>20 horas (levaduras, *in vivo*).>10 horas (*Escherichia coli*, *in vivo*)

Índice de inestabilidad : 30.41 (estable)

Hidrofobicidad general (GRAVY): 0.265, Índice alifático: 94.39

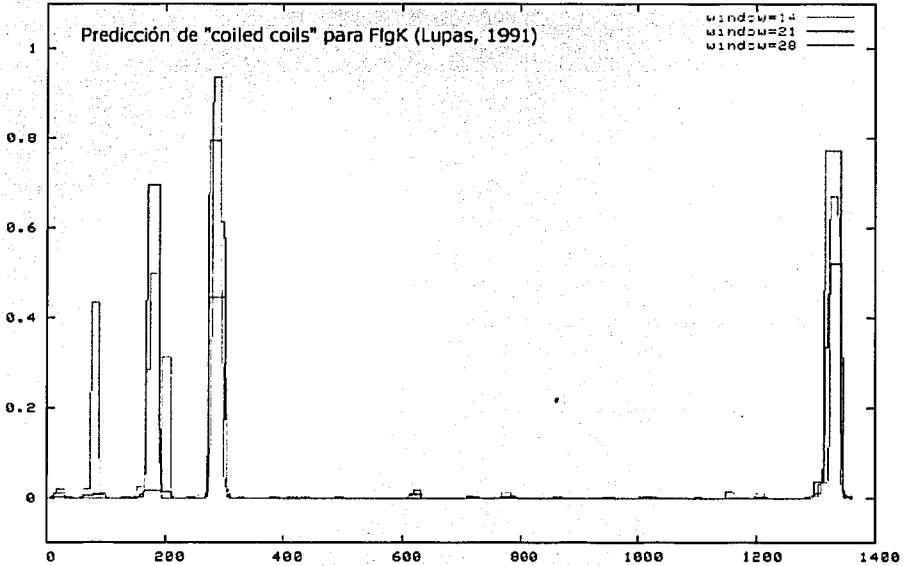


Fig 32

Resultados del análisis de coiled coils con Pair coiling score (<http://nightingale.lcs.mit.edu/cgi-bin/score>)

### 9.3 Alineamiento múltiple

Como primera aproximación para estudiar a la secuencia de FlgK<sub>RS</sub> se realizó una búsqueda en el BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/Blast>) con los siguientes parámetros

Matriz: BLOSUM62  
Penalidad de Gap : Existencia: 11, Extensión: 1  
Numero de Hits to DB: 818,125,266  
Numero de Secuencias: 1242147  
Numero de extensiones: 31970989  
Numero de extensiones exitosas: 82754  
Números de secuencias mejores que 10.0: 315  
Longitud de búsqueda : 1363  
Tamaño de base de datos: 395,475,034  
Tamaño efectivo de la búsqueda : 1228  
Tamaño efectivo de la base de datos: 227,785,189

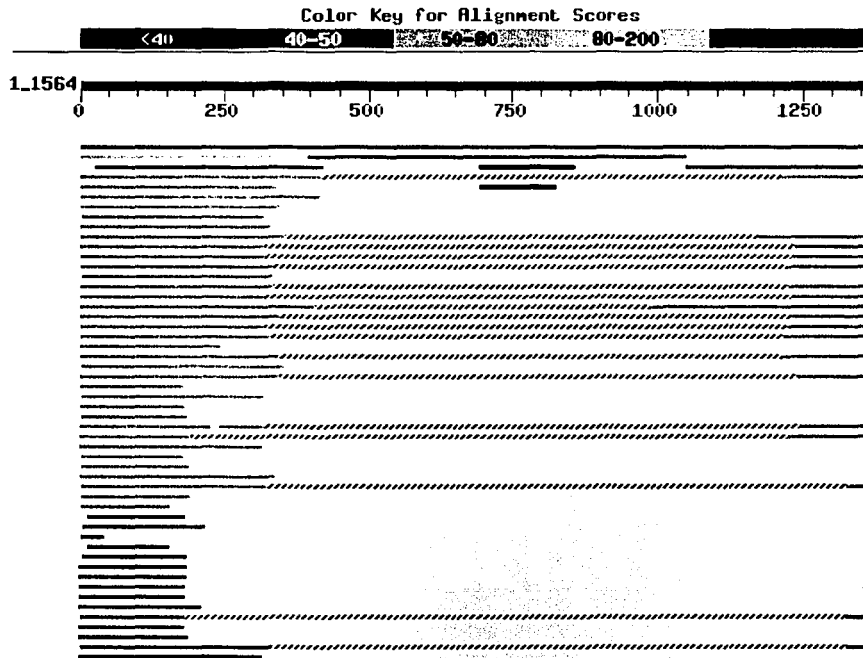


Fig 33 resultado de alineamiento múltiple empleando BLAST

Es notable que la región central de *Rhodobacter sphaeroides* posee muy poca similitud con otras proteínas y en la tabla de búsqueda del BLAST las secuencias que tienen algún parecido con dicha región poseen valores inferiores al 40% .

Un alineamiento en el Blast ([www.ncbi.nih.gov/Blast](http://www.ncbi.nih.gov/Blast)) (Ver figura 33) y posteriormente se realizó un alineamiento múltiple de la secuencia de la proteína FigK de *R. sphaeroides* contra otras 18 secuencias homólogas de otras bacterias disponibles en el genbank así como contra otras proteínas axiales de su misma especie. Se utilizó el programa Clustal X (v1.81) con los siguientes parámetros de alineamiento: Matriz Blosum 64, con una apertura a gap 0-100, extensión de penalización de 0-100 (0.20) y un retardo en la divergencia de 30%. (Ver Apéndice de Alineamientos)

#### 9.4 Región central de FigK

A partir de los alineamientos realizados se decidió hacer una búsqueda intensiva sobre la región central de la secuencia de aminoácidos de FigK la cual aparentemente no tiene similitud con otras proteínas. Sólo se lograron identificar dos sitios de extensión limitada a la región carboxilo terminal similar en un 25% a la flagelina de *Acidoborax avenae* y otra similar al sitio de degradación de ATP en transportadores ABC vegetales, pero éste último puede deberse a un artificio estadístico. El resto de la secuencia no posee ninguna similitud con otras proteínas en particular una región de 800 aminoácidos entre los residuos 240 y 1263 ( Ver Apéndice Alineamientos)

A partir de los datos mostrados en el alineamiento múltiple de FigK <sub>RS</sub> con otras proteínas HAP's de otras 18 especies se identificaron regiones conservadas con *Salmonella typhimurium* y otras HAP's y se realizó un análisis de residuos hidrofóbicos para la identificación de regiones formadoras de estructuras del tipo "coiled coils" (Lupas et al 1991), (Ver figura 32). Con estos criterios de delimitaron tres regiones de la secuencia: la región amino terminal, la región carboxilo terminal y finalmente una región central que es el motivo de estudio de este trabajo

Para la caracterización de la región central se decidió generar una mutante en *flgK* en *Rhodobacter sphaeroides* WS8-N y posteriormente someterla a ensayos de complementación con una construcción que lleva al gen *flgK* con una remoción de 800 aminoácidos en la región central, como se menciona en la sección de materiales y métodos.

#### 9.5 Caracterización de la mutante *flgK::aadA*

La mutante interrumpida se aisló de cultivos selectivos (Medio Sistorm espectinomycin 50µg/ml, Sigma-Aldrich) con una frecuencia del 0.15% (150/1000 colonias). Una muestra de 5µl de cultivo de bacterias en suspensión crecidos heterotróficamente, cosechados en fase estacionaria, con una densidad óptica de 0.8 a 550nm (visible), fue colocada en placas de agar suave (0.3%) para identificar su motilidad.

Las mutantes se cultivaron a 30°C en condiciones aeróbicas sin luz durante 5 días. La motilidad de las células libres fue evaluada por observación directa de cultivos crecidos aeróbica y anaeróbicamente. Se empleó un microscopio Olympus BH-2 objetivos 10x, 20x y 40x en campo oscuro iluminado con un filamento de mercurio. Una alcuota de 10µl de los cultivos en suspensión fueron colocadas en un portaobjetos (Fisher opticals) y las células fueron grabadas empleando un equipo de captura CCD IRIS (Sony) y una videograbadora digital (DCR-TRV340 Sony). Las imágenes fueron digitalizadas empleando el programa Imovie© (Apple computers) para su análisis posterior.

Para identificar el fenotipo flagelar se crecieron cultivos heterotróficos en suspensión y fueron colocados en gradillas recubiertas de Formvar®. Las muestras fueron teñidas negativamente con una solución de acetato de uranio 1% y observadas en un equipo de microscopía electrónica de transmisión JEM-1200EXII (Jeol, Tokyo, Japón).

La mutante WS8 *flgK::aadA*, resultó tener un fenotipo no motil y carente de filamento (Fla<sup>-</sup>). En las placas de nado no desarrolla el halo característico que presenta la cepa silvestre. Tampoco se registró nado activo en las observaciones al microscopio óptico. En las micrografías electrónicas los filamentos están ausentes y sólo se pueden observar estructuras similares al gancho.

## 9.6 Ensayos de complementación

Los ensayos de complementación se realizaron según en protocolo descrito en la sección de materiales y métodos. Estos ensayos permitieron identificar, como primera aproximación, la funcionalidad del gen *flgK*. Las construcciones pDC-C01A/B fueron movilizadas en la mutante DC (WS8 *flgK:: aadA Fla<sup>-</sup>*) por medio de un plásmido de expresión para *Rhodobacter sphaeroides* pRK-415 (Keen et al 1988) en una cepa de conjugación S-17-1. Las células exconjugantes fueron aisladas por doble selección en medio Sistro (Sux) sólido adicionado con espectinomicina 50µg/ml, tetraciclina 1µg/ml (Sigma-Aldrich) con una frecuencia del 0.25% ( 259/1000 colonias) para la mutante conjugada con la construcción pDC-C01A y 0.37% (378/1000 colonias) para la construcción pDC-C01B. La motilidad de las exconjugantes fue verificada por observación directa en el microscopio óptico (equipo Olympus BH-2 / CCD IRIS Sony), a partir de cultivos en suspensión en fase temprana (0.4 DO<sub>550nm</sub>) crecidos fotoheterotróficamente.

## 9.7 Reestablecimiento de la motilidad en la cepa interrumpida DC (WS8 *flgK::aadA. Fla<sup>-</sup>*)

Las células exconjugantes aisladas del ensayo de complementación con las construcciones pDC-C01A/B fueron observadas en el microscopio óptico, en ambos casos se pudo registrar movilidad activa, pese a que el número de células móviles de las cepas complementadas con las construcciones pDC-C01A y B era inferior a las células de la cepa silvestre, crecidas en las mismas condiciones y cosechadas a la misma densidad óptica.

Este efecto posiblemente se deba a la capacidad de la mutante DC (WS8 *flgK::aadA*, Fla<sup>-</sup>) para procesar el transcrito generado a partir del plásmido pRK415. Este fenómeno podría tener una explicación en el bajo número de copias que se pueden producir de pRK415 a partir de la maquinaria de replicación de *Rhodobacter sphaeroides*. También podría depender de la fase de crecimiento tanto para presentar nado activo (hay que recordar que la transcripción de los genes flagelares está relacionada, entre otros factores, con la fase de crecimiento) así como con la rapidez de duplicación del plásmido transferido.

Para corroborar la actividad de complementación del plásmido, se colocaron en placas de agar suave (0.3%) alícuotas de 3 $\mu$ l de cultivos en suspensión crecidos fotoheterotróficamente, así como en condiciones aeróbicas. (DO<sub>550nm</sub> 0.6 y cultivos o/n). Las placas de nado fueron cultivadas durante cinco días a 30°C. Posteriormente fueron fotografiadas y digitalizadas.

En ambos casos las cepas mutantes DC complementadas con las construcciones pDC01A y B, mostraron el halo característico de las cepas móviles (Harsey 1994, Belas 1997, Ben-Jacobs 2000) al igual en la cepa silvestre WS8 (figura 34)

Se cosecharon células de las cepas exconjugantes de cultivos en suspensión crecidos fotoheterotróficamente y en condiciones aeróbicas (crecimiento en medio Sistorm a 30°C, agitación vigorosa a 250 rpm durante 8hr y otro cultivo toda noche) las células resultantes fueron lavadas con una solución 100 mM de Tris-HCl pH 8.0 y se analizaron al microscopio electrónico por medio de una tinción negativa con una solución de acetato de uranilo 1%. Las fotografías obtenidas en el microscopio electrónico muestran filamentos, por lo que la síntesis de HAP1 debe estar activa en el citoplasma de la mutante DC (WS8 *flgK::aadA* Fla<sup>-</sup>) complementada con los plásmidos pDC-CO1A/B. Al mismo tiempo, debe ser exportada hacia el exterior de la bacteria y es capaz de incorporarse a la estructura del filamento. Estos datos muestran que la mutación a nivel de *flgK* puede recuperar el fenotipo motil con las construcciones pDC-CO1A/B y por lo tanto la extensión de su secuencia (4.09kb) es necesaria para observar movilidad activa similar a la encontrada en el fenotipo silvestre.

### **9.8 Ensayos de complementación con las construcciones pDC-409 y pDC-104(*flgK* $\Delta$ 3.04kb)**

Otras dos construcciones fueron generadas a partir de dos productos de PCR. La primera construcción pDC-409 es un derivado de una construcción de pTZ-19R clonado en los sitios *Hind*III y *Xba*I y reclonado en el plásmido de movilidad pRK415 utilizando los mismo sitios. Esta construcción contiene la secuencia silvestre de 4.09 Kb en orientación del promotor de tetraciclina y transformada en la cepa de conjugación S-17.1.

La construcción pDC-104 ( $\Delta$  3.04kb) es un derivado de pTZ-19R reclonado en el plásmido pRK415 empleando los mismos sitios de restricción *HindIII* y *XbaI* utilizados en la construcción pDC-409. Esta construcción contiene un producto truncado de *flgK* de 1.04kb que carece de la región central de baja similitud. La secuencia del producto truncado alinea de mejor manera con las otras 18 secuencias homólogas para HAP 1 de otras bacterias. Las construcciones fueron transferidas como se indica en la sección de materiales y métodos.

La construcción pDC-409 fue capaz de complementar a la mutante DC (WS8 *flgK::aadA*. Fla<sup>-</sup>) cuyo fenotipo resultante es similar al de la cepa silvestre WS8 como lo indicaron las observaciones en el microscopio óptico de cultivos en suspensión de éstas células, mismos que fueron empleados para someterlos a ensayos de nado y para su observación al microscopio electrónico donde se pudo confirmar la presencia de flagelos con filamentos ensamblados (Ver figura 34 y 35)

La construcción pDC-104 no fue capaz de reestablecer la motilidad ni tampoco el ensamblaje del filamento. Su fenotipo como lo indican los ensayos de nado en agar suave (0.3%) y observaciones al microscopio óptico y electrónico, es similar al de la mutante DC (WS8 *flgK::aadA*. Fla<sup>-</sup>), (Ver figura 34 y 35).

Esto sugiere que la región central podría ser un componente indispensable para el ensamblaje del flagelo de *Rhodobacter sphaeroides*, a pesar de que no contiene en su secuencia algunos de los motivos relacionados con el ensamblaje de las proteínas axiales, y aparentemente no se comporta de manera similar a las mutantes de otras proteínas axiales con tamaños mínimos en la región central (Kuwajima 1988).

## 9.9

### Placas de nado

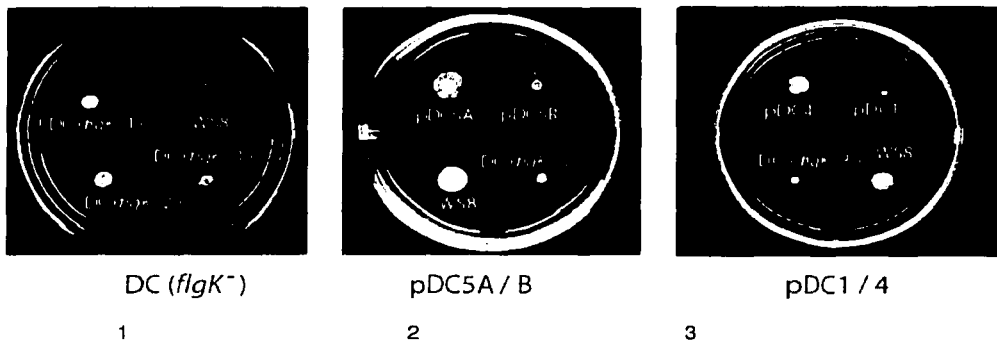
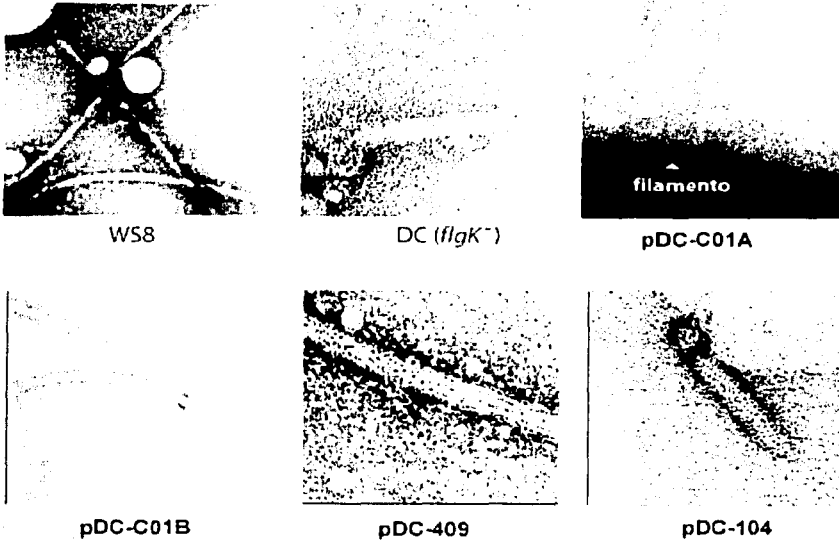


Figura 34  
Placas de nado. En el primer panel se observan cultivos de mutantes seleccionadas (DC WS8 *flgK::aadA* Fla<sup>-</sup>) en el segundo panel la mutantes complementadas con las construcciones pDC-C01A y B (equivalentes a pDC5A/B, por razones de espacio). En el tercer panel se observan las complementación de la mutante DC con las construcciones pDC-409 y pDC-104 (equivalente a pDC4 y pDC1, por razones de espacio)

## Micrografías electrónicas



Plásmidos	Fenotipo DC ( <i>flgK</i> <sup>-</sup> )	Estructuras presentes
pDC-C01A	Mot +	gancho, filamento, HAP's
pDC-C01B	Mot +	"
pDC-409	Mot +	"
pDC-104	Mot -	gancho

Figura 35  
Fenotipo resultante de la complementación de la mutante DC con las diferentes construcciones diseñadas

### 9.10 Patrón de secreción de flagelina monomérica (FlIC)

Se ha mostrado que en mutantes de las proteínas HAP's la secreción de factores de virulencia así como de monómeros de flagelina aumentó considerablemente (Komoriya et al 1999). Se realizó un ensayo tipo Western para identificar la presencia de flagelina monomérica en el medio. Como se puede apreciar, La cantidad de flagelina en estado monomérico aumenta de manera directa con la fase de crecimiento, a diferencia de la que se encuentra en la cepa silvestre, (Ver figura 36)

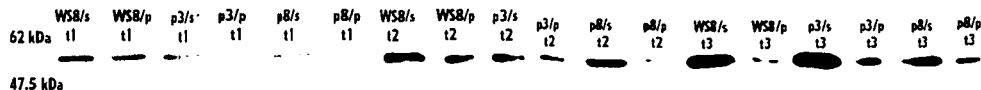


Figura 36

Inmunoreplica tipo Western donde se muestran durante 12h el perfil de secreción de flagelina en dos mutantes DC (p3 y p8) y la cepa WSB (t= 3hr de incubación a 30°C en agitación vigorosa) Las muestras están divididas por pastillas (subíndice "p") y sobre nadantes ("s") en extraídas en su respectivo tiempo.

## 10.- DISCUSION

### 10.1 Región central de la secuencia de FigK de *Rhodobacter sphaeroides*.

A partir de los resultados obtenidos en los experimentos de complementación podemos hacer algunas consideraciones al respecto de la secuencia analizada. FigK de 1363 aminoácidos es una secuencia notablemente grande en comparación con las secuencias de otras proteínas homólogas, es decir, es 2.4 veces más grande en promedio que las secuencias reportadas en las bases de datos y casi tres veces (2.7) mayor a la secuencia reportada en *Salmonella typhimurium*.

Como lo demuestra un alineamiento múltiple (ver Apéndice alineamientos), la región central de FigK no comparte residuos conservados con otras 18 secuencias homólogas. Estas secuencias no conservadas se distribuyen en tres regiones, una de los residuos 265 a 548, (283aa), otra de 600 a 698 (98aa) y finalmente una última de 774 a 1263 (489aa). Las regiones intermedias sólo tienen secuencias conservadas con un índice promedio de similitud inferior al 20%, dando un total de 870 aminoácidos que no son similares con otras secuencias homólogas u otras proteínas de otras bases de datos, excepto quizás con la flagelina de *Acidovorax avenae* con un índice de similitud muy bajo, inferior al 25%.



Un alineamiento entre la flagelina de *Acidovorax avenae* y FlgK de *Rhodobacter sphaeroides* no denota grandes regiones conservadas como las que claramente se observan entre otras HAP's homólogas en sus sitios terminales, sino que presenta una serie de "cajas" o regiones con mayor similitud hacia la región amino terminal de FlgK de *R. sphaeroides*, en particular una región de los residuos 185 a 284 que presentan mayor similitud con otras secuencias conservadas de otras HAP's.

Cabe puntualizar que la secuencia de *Acidovorax avenae* sólo alinea en la región central y a partir del residuo 184 de FlgK de *R. sphaeroides* y no en las regiones terminales. Este podría ser un dato interesante, considerando que muchas proteínas axiales poseen ciertos dominios estructurales en el extremo amino terminal que aparentemente son necesarios para su exportación (Homma et al 1990, Ohnishi et al 1994, Mullin et al 1994). En el caso de *Acidovorax avenae* podrían hallarse en la región que se superpone entre los aminoácidos 185 y 284 de la secuencia de FlgK de *R. sphaeroides*. Otra característica interesante de esta proteína es que se encuentra asociada a mecanismos de invasividad en algunas gramíneas de importancia económica, entre ellas el arroz, trigo y avena (Che et al 2000).

Los resultados que ofrecen los ensayos de complementación hacen suponer que la región central en la secuencia de FlgK (HAP1) de *R. sphaeroides* debe poseer características más complejas que las esperadas, debido a que la construcción pDC-104 no es capaz de restablecer un fenotipo motil, ni de ensamblar el filamento. Pese a que la secuencia posee "islas" o regiones que no tienen una secuencia homóloga con otras proteínas, esta región podría ser indispensable tanto para el nado como para el ensamblaje del filamento, evidencia que indica que el tamaño de la secuencia en la región central no es irrelevante como en el caso de la flagelina de *Salmonella typhimurim* donde los monómeros pueden tener un tamaño inferior y aun pueden generar un fenotipo funcional (Kuwajima 1988). Quizás este fenómeno indique que entre las especies flageladas pueda existir un perfil polimórfico que podría estar relacionado con la patogenicidad (Macnab 1996). En el caso de HAP1 de *R. sphaeroides*, esta región central podría tener alguna asociación con algunos epítomos antigénicos. Sin embargo, suponiendo que existiera un nivel de polimorfismo en la región central de FlgK<sub>RS</sub>, cuando se comparan las secuencias del genoma de *Rhodobacter sphaeroides* en la cepa 2.4.1 (<http://mmg.uth.tmc.edu/sphaeroides/index2.html>) con la secuencia reportada en nuestro laboratorio, realizada con la cepa WS8-N, no presentan diferencias. Las diferencias entre una y otra cepa hubieran podido sugerir una alta tasa de cambio en esa región lo que podría conferirle un carácter polimórfico, razón de su considerable tamaño. Sin embargo ambas secuencias son idénticas.

Los ensayos de complementación con la construcción pDC-104 (*flgK* Δ 3.04Kb) muestran que la mutante DC si bien no es capaz de restablecer su motilidad, ni la capacidad de formar flagelo, esto se podría deber a otros factores. El primero es que la secuencia contenida en la construcción no haya sido capaz de traducirse, aun que las células exconjugantes presenten un fenotipo tetraciclina resistente.

Otros factores son: que el producto codificado en la construcción si sea traducido, pero degradado, El último factor a descartar es que el dominio central posea algún motivo, o grupo de motivos estructurales que le permita ser reconocido por el aparato de exportación y aunque la proteína se encuentre en el citoplasma, el filamento no pueda ser armado.

Aun falta por caracterizar como FigK, debido a su gran tamaño, puede ser procesada para su exportación y que regiones de su secuencia podrían estar involucradas en la exportación de la misma proteína, ya que no han sido encontradas en el genoma de *R. sphaeroides* las proteínas chaperonas FlIT y FlGN, que en *S. typhimurium* están involucradas en el plegamiento y exportación de HAP 1 (Bennett *et al* 2001).

## 10.2 FigK (HAP1) y su interacción con otras proteínas axiales

La biogénesis del flagelo está altamente regulada, su tamaño aproximado es de 20µm, en el caso de *S. typhimurim*. El flagelo de *R. sphaeroides*, presenta las estructuras básicas caracterizadas en los flagelos de bacterias entéricas: cuerpo basal, gancho y filamento. Entre el cuerpo basal y el filamento se encuentra una interfase compuesta con múltiples copias de las proteínas asociadas al gancho o HAP'. Las HAP's de *R. sphaeroides* son visibles al microscopio electrónico y se puede apreciar un ensanchamiento que no es común en flagelos aislados de bacterias entéricas (West & Dreyfus, 1997). Para su ensamblaje las proteínas flagelares tienen que ser liberadas del citoplasma de forma ordenada, la secreción de los monómeros de flagelina (FlIC), los del gancho (FigE) y las HAP's, tienen la misma vía de exportación: El aparato de exportación del flagelo (Kutsukake 1997). La longitud de la estructura que precede al ensamblaje del filamento, el gancho, está regulada por la proteína FliK. En mutantes de *fliK* se generan polímeros de gancho de diferentes longitudes, denominados poliganchos, que en *R. sphaeroides* también han sido caracterizados (González-Pedrajo *et al* 1997). La reconstrucción de los ganchos *in vitro* sugiere, como ocurre con el filamento, que éstos monómeros se polimerizan en la región distal (Hirano *et al* 1994). Las mutantes poliganchos son no móviles (Homma *et al* 1984), debido a que no existe un acoplamiento entre las HAP's y por lo tanto la polimerización de FlIC es muy pobre o inexistente. Posiblemente existe una interacción entre FliK y HAP's para su exportación, por medio de otras proteínas como FlhB, y FliK que forman parte del aparato de exportación. (Minamino & Macnab 1999). Por otra parte se ha reportado que la proteína encargada exportación de flagelina (FlIC) interacciona con la proteína Flil en forma dependiente de ATP con la proteína Flil (Silva-Herzog & Dreyfus 1999, Fan & Macnab 2001).

Cepas revertantes de *fliK*, son capaces de ensamblar al filamento, indicando que el control de la longitud tanto del gancho como del filamento correspondan a dos funciones separadas (Suzuki & Iino 1981, Jones 1991); hasta hoy la función de FliK no ha sido bien caracterizada.

Las proteínas del gancho son exportadas por la vía flagelo específica (Homma *et al* 1990) y no son exportadas de células flageladas, lo que presume que la exportación de estas proteínas se encuentra regulada y no ocurre a menos que el gancho este incompleto.

En mutantes de FliD (HAP2), aparentemente las proteínas del gancho son exportadas continuamente, pero no en mutantes de FlgK (HAP1) o FliC (flagelina) donde su exportación está controlada (Homa & Iino, 1985).

HAP1 y HAP3 son incapaces de ensamblarse en grandes polímeros *in vitro*, no importando si ambas proteínas se encuentran en altas concentraciones, lo que sugiere que son los mismos monómeros de estas proteínas los que autorregulan su acoplamiento (Ikeda, 1989, Jones 1990). Recientemente algunos experimentos demuestran que existen interacciones específicas entre los monómeros de HAP's. Bajo ciertas condiciones de fuerza iónica HAP3 se polimeriza formando agregados filamentosos flexibles. El diámetro de estos filamentos es de aproximadamente 100 Å. La polimerización se favorece con un incremento en la aparición de estructuras  $\beta$  en contraste con las halladas en estado monomérico, la aparición de estos agregados se facilita con la adición de flagelina, por medio de interacciones aun no conocidas con exactitud. El complejo formado no es estable, por lo que se puede suponer que la flagelina cataliza la formación de agregados filamentosos  $\beta$ -amiloides de HAP3, sin que esté involucrada en la estructura final (Furukawa *et al* 2002).

Sin embargo, la formación de estos filamentos no es comparable con la hallada en las uniones HAP's - filamento que posee un diámetro de por lo menos 150 Å. Las regiones terminales de HAP3 poseen héptadas repetidas de aminoácidos hidrofóbicos que forman  $\alpha$ -hélices y "coiled coils". Aunque la flagelina no es incorporada en los filamentos formados por HAP3, sí promueve su polimerización. Se propone que los extremos carboxilo terminales de la flagelina podrían estar involucrados en modular el comportamiento de la agregación de HAP3. Es altamente probable que las regiones terminales de la flagelina apunten hacia las regiones terminales del flagelo e interaccionen con múltiples subunidades de HAP3. Por su parte la interacción de HAP2 con HAP3 es más estable y parece favorecerse cooperativamente. En solución, la polimerización de estas proteínas forma un heterodímero que presenta la organización polarizada observada en los flagelos en etapa de elongación, cuando la interacción entre HAP3 (FlgL) y HAP2 (FliD) es transitoria y precede a la incorporación de flagelinas al extremo distal del filamento en formación (Imada *et al* 1998, Yonekura *et al* 2000,2001, Maki *et al* 2001).

En algunos casos los experimentos presentados por Furukawa y cols.(2002) presentan evidencia que la interacción entre proteínas axiales en solución, no es activa. Esta propiedad es importante, ya que si existiera una agregación espontánea en el citoplasma, se impediría la formación del flagelo.

Para evitar este problema se piensa que las regiones terminales de los monómeros de flagelina y del gancho se encuentran parcialmente plegados (Furukawa *et al* 2002, Makishima *et al* 2001, Macnab 1996 ). Las HAP's no poseen un péptido señal y aparentemente no parecen ser procesadas para ser exportadas (Homma *et al* 1985) excepto por la remoción de residuos de metionina en el extremo amino terminal de HAP1 y HAP2 (Homma *et al* 1990). Su alto grado de similitud con las flagelinas refuerza la idea que su exportación es común a la de los monómeros de flagelina, pero que tiene una interacción diferente con otras proteínas del aparato de exportación.

En algunas mutantes de *fliC* (flagelina), el sistema es capaz de exportar HAP's mientras que en mutantes de HAP's la exportación de monómeros de flagelina continúa, sin que sean incorporados (Homma & lino 1985).

En ensayos electroforéticos de una mutante de filamento corto, el número estimado de subunidades de HAP1 y HAP3 en *S. typhimurium* por cada flagelo es de 10 a 20 y de 10 a 40 respectivamente (Homma *et al* 1984). De la misma forma como el filamento y el gancho poseen un arreglo helicoidal, cabe suponer que el arreglo de las subunidades de las HAP's deberían poseer de dos a cuatro y de dos a ocho vueltas respectivamente; asumiendo que su torsión sea similar a la encontrada en el filamento o en el gancho.

Por la misma razón se supone que HAP1 y HAP3 poseen una función de conector y que tienen un motivo estructural que permite distinguir la geometría entre los monómeros del gancho y los de la flagelina (Ikeda *et al* 1987). A partir de esta idea, cabe suponer que existirían diferencias en la afinidad entre cada una de las estructuras ensambladas, como una característica adicional a la polaridad de su expresión genética, que podría estar reflejado en el mantenimiento en la seriación de las diversas proteínas axiales ensambladas durante la biogénesis. Un ejemplo que apoya esta interpretación: Los primeros 50 aminoácidos de las secuencias de FlgK y FlgE de *Caulobacter crescentus* muestran un 46% de identidad y un 20% de similitud (Mullin *et al*, 2001). Esta región en el extremo amino terminal, incluye la secuencia SDNIANVNT, que es una variante de la caja ANNLAN, involucrada en el ensamblaje de las proteínas axiales del flagelo de *Salmonella typhimurium* (Homma *et al* 1990).

Estas regiones pueden ser parte de un dominio estructural de reconocimiento entre FlgK y la superficie expuesta del gancho. Probablemente FlgK posea una mayor afinidad por dominios del gancho, que usualmente funcionan como sitios de reconocimiento donde se acoplan los monómeros de FlgE durante el ensamblaje del gancho. Previamente se encuentra una proteína cuya función es la de incorporar monómeros de gancho: FlgD. Entre FlgD y FlgK debe existir una competencia de afinidad por el gancho ensamblado, desplazando la afinidad del gancho por FlgD hacia FlgK en algún momento del ensamblaje, después que el gancho ha alcanzado su extensión máxima. Esto permite el acoplamiento de las HAP's con una seriación HAP1, HAP3 y posteriormente HAP2 que permite incorporar a la flagelina en su extremo distal. Otro mecanismo posible, es que exista a nivel transcripcional, una disminución en el número de copias procesadas de ARNm codificante para gancho y que la expresión de *flgK* se incremente.

Existen dos observaciones experimentales que indican que el rol de FlgD es más complejo que el imaginado: Las mutantes poliganchos de *fliK*, poseen más FlgD que mutantes de *flgK* con ganchos normales, posiblemente formando una estructura de coronación similar a FlhD. Por otro lado el extremo amino terminal posee una secuencia que le permite el acoplamiento con el gancho, mientras que el extremo carboxilo sólo puede sugerir que posee una función asociada a la elongación del gancho (Onhishi *et al* 1994, Homma *et al* 1990, Yunekura 2001). Sin embargo, esta interpretación no deja de pertenecer al terreno de la especulación.

### 10.3 Evidencias de la interacción de las HAP's con el aparato de exportación

En *S. typhimurium* existen dos clases de aparatos de exportación tipo III, uno dedicado a la biogénesis flagelar y el otro a la exportación de factores de virulencia. El flagelo es una estructura extracelular de crecimiento distal cuyos constituyentes son exportados por medio de un canal central de aproximadamente 2.5 nm de diámetro, que corresponde al tipo III (Macnab 1996) Se ha documentado que por lo menos 12 proteínas son exportadas por esta vía: FliE que es parte del cuerpo basal, FlgB, FlgC y FlgF, FlgG, proteína proximal del eje, FlgE, gancho, FlgD, una proteína que se acopla en el extremo de la estructura ensamblada del gancho, FlgK (HAP1), FlgL (HAP3), FliC, (flagelina), FliD (HAP2) y finalmente FlgM (Joys, 1985; Homma *et al.*, 1990a,b; Müller *et al.*, 1992; Ohnishi *et al.*, 1992, 1994; Hughes *et al.*, 1993). Ninguna de éstas proteínas a excepción de las HAP's sufren algún procesamiento para ser exportadas. En *S. typhimurium* FlgK (de 58kDa) forma una capa en la punta del gancho cuando este alcanza una longitud de aprox. 50 nm. FlgK, según la dinámica del aparato de exportación, pertenece al grupo I de exportación, incluyendo a las proteínas del gancho y las flagelinas.

De acuerdo con los datos mencionados antes, una mutación de *flgK* en el cromosoma de *R. sphaeroides* sin efecto en la transcripción del resto de los genes hacia su extremo 3' no debería interferir con la exportación de las otras HAP's. De la misma forma la cantidad secretada de flagelina es diferente; mutantes de HAP1 (*flgK*) y HAP3 (*flgL*) secretan una cantidad mayor de flagelina. Cuando el tamaño del gancho alcanza los 55 nm la especificidad del sustrato del aparato de exportación cambia del modo "rotor-gancho" a "flagelina-HAP's" (Kutsukake 1997), esto implica que los componentes del rotor y gancho ya no se exportan (Aldridge, 2000). Los resultados del análisis de secreción de flagelina de la mutante DC (WS8 *flgK:: aadA Fla'*) obtenidos en el laboratorio, indican que presenta el mismo patrón de secreción de flagelina monomérica no ensamblada que en *Salmonella typhimurium*, estos niveles se mantienen durante la fase inicial de crecimiento exponencial [ver sección de Resultados].

Aun no han sido bien caracterizados los mecanismos de la exportación de las proteínas constituyentes de las diferentes estructuras que componen el flagelo. Se han propuesto dos modelos para explicar el estricto orden con el que aparecen y se ensamblan. El sistema de secreción tipo III puede estar influido por el acoplamiento de chaperonas, así como de los transcritos de ARNm codificante para las proteínas involucradas (Aldridge & Hughes 2001).

Según ésta hipótesis existen dos vías por las cuales la secreción puede ocurrir: uno es el denominado el modelo de compuerta abierta y el otro de compuerta cerrada. Ambos mecanismos parten de que la estructura basal ha sido ensamblada y la membrana interna es degradada. Para que las proteínas alcancen su blanco es necesario que exista un grado de especificidad para prevenir la secreción a tiempos erróneos; algunas evidencias muestran que la secreción de sustratos en *Salmonella* requiere de traducción activa (Bonifield *et al* 2000).

A partir de esos hallazgos se ha propuesto que la especificidad del sistema de secreción puede lograrse cuando los ribosomas en traducción se acoplan en la región citoplasmática del sistema de exportación, por medio de una señal ubicada en el extremo amino o carboxilo terminal del transcrito (Aldridge, 2000)

El modelo de compuerta abierta propone que la exportación de las proteínas está mediada por chaperonas. En el caso particular para la exportación de las HAP's parece ser esta última alternativa la que está mejor sustentada. En algunos experimentos con *Salmonella typhimurium* donde se ha identificado que las proteínas FlgN y FlIT actúan como chaperonas de secreción para dos sustratos, las HAP's FigK y FlgL (Bennett et al 2001, Fraser et al 1999), (Ver figura 37), las cuales se incorporan en la parte distal del gancho. FlgN y FlIT son dos proteínas de bajo peso molecular de 15 y 14 kDa respectivamente. En mutantes de estas proteínas la exportación de las HAP's se encuentra específicamente atenuada y muestran una reducción en la incorporación de otras proteínas axiales en particular de flagelina. Se ha propuesto un mecanismo de interacción entre las HAP's y las chaperonas FlgN y FlIT, a partir de la estequiometría de su interacción en ensayos *in vitro*, donde se han encontrado complejos homodiméricos que se unen a las HAP's en una relación 2:1, (Ver figura 38)

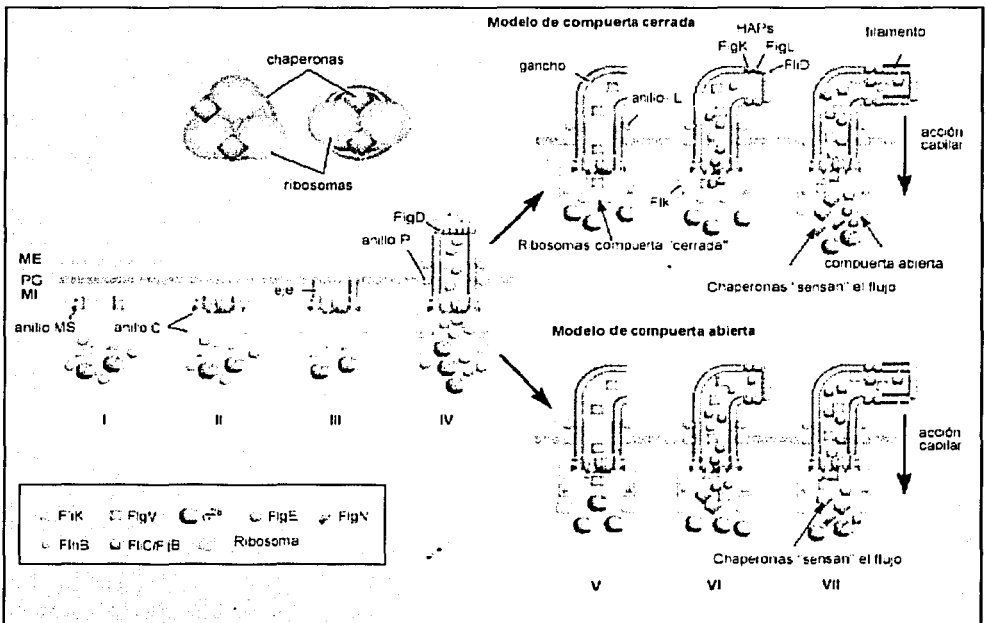


Fig 37  
Modelo de la exportación de los diferentes componentes flagelares  
Modificado de Aldridge 2000

TELIS CON  
FALLA LE ORIGEN

Como en muchas proteínas axiales las regiones carboxilo terminales de FigN y FliT contienen héptadas repetidas de aminoácidos hidrofóbicos, con una alta probabilidad de formar hélices anfipáticas en los residuos 74-114 (FigN) y 6-98 (FliT). Así mismo FigN contiene un motivo de leucina, entre los residuos 1 a 30 con una estimación del 99% para generar "coiled coils". Este motivo es responsable de la dimerización en múltiples proteínas (Vinson *et al* 1989).

Pese a que no se han encontrado complejos HAP's- chaperonas en regiones que interactúan con el sistema de exportación, este contacto debe ser indispensable, pero transitorio, por lo que la asociación de chaperonas a las secuencias nascentes de las HAP's debe lograrse en las primeras etapas de la traducción. FigN por su parte modula la traducción de un tercer sustrato de secreción FigM, que no se incorpora a la estructura flagelar, pero si regula la expresión de otros componentes filamentosos codificados en grupos de genes clase III como la flagelina y las mismas HAP's.

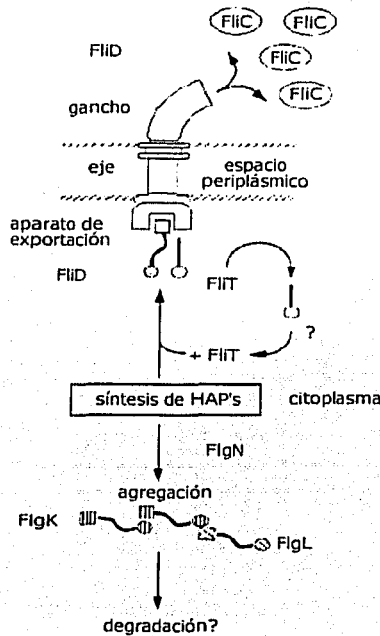


Figura 38

Modelo que ejemplifica la actividad de chaperona de FigN y FliT. Los círculos y cuadrados sombreados representan las regiones amino y carboxilo terminales ricas en hélices anfipáticas. Las cajas no sombreadas representan el dominio de interacción entre las regiones amino terminales y FliD. Modificado de Fraser *et al* 1999

## 10.4 Regulación de la expresión genética de *flgK* de *Rhodobacter sphaeroides*

En todas las especies bacterianas que poseen flagelo, existen mecanismos muy conservados tanto en la regulación transcripcional (Aldridge & Hughes 2002), como en la organización de los genes flagelares. Una jerarquización en el orden de transcripción permite un control en el orden de ensamblaje de cada una de las estructuras asociadas (Kalir *et al* 2001).

La organización de los genes flagelares en *E.coli*, *Salmonella typhimurium* y *Caulobacter crescentus* es similar a la encontrada en *Rhodobacter sphaeroides*, en particular la unidad de transcripción que codifica a las HAP's, (Ver figura 39)

A pesar de estas similitudes existen divergencias en cada especie en el control que ejercen los promotores sobre los genes flagelares. Por ejemplo, la activación de los genes flagelares en *Caulobacter crescentus*, es dependiente del ciclo celular (Mullis *et al* 2001). La transcripción comienza desde la activación de los genes clase I, cuyo activador es un regulador de respuesta llamado CrTA. Este producto es requerido para la transcripción de los genes clase II que emplean un promotor  $\sigma^{73}$ . Así como en los modelos de estudio en *Salmonella typhimurium* y en *E. coli*, los genes clase II en *Caulobacter crescentus* codifican para estructuras del eje y del motor *fliF*, *fliG*, *fliN* entre otras. En *Rhodobacter sphaeroides* la organización de los genes que constituyen tanto al eje, como al gancho y particularmente a las HAP's, pertenecen a tres unidades de transcripción diferentes. Cada una de ellas contiene aproximadamente 5 genes, sin embargo la unidad de transcripción que alberga a las HAP's solo contiene dos genes, *flgL* y *flgK*, que codifican para HAP1 y HAP3 respectivamente. Cabe puntualizar que esta unidad de transcripción posee una secuencia consenso para un promotor dependiente de un factor  $\sigma^{28}$  ubicado el extremo 5' a 53 pb del inicio de la transcripción de *flgK*, que emplea un codón de inicio TTG. Este promotor aparentemente no es funcional para activar la transcripción de los productos de las HAP's debido a que interrupciones el gen *flgI* (*flgI::Tnpho*) ubicado en el extremo 5' anterior a la secuencia consenso  $\sigma^{28}$ , tiene un efecto polar en la transcripción de *flgK* y *flgL* (González-Pedrajo 2002).

Los ensayos en placas de nado de la mutante DC complementada con los plásmidos pDC-C01A/B, indican que la regulación genética de HAP1 y HAP3 podría modularse bajo diferentes condiciones por dos factores de transcripción, un factor  $\sigma^{54}$  y factor  $\sigma^{28}$ , similar al caso en *Salmonella typhimurium* (Kutsukake & Ide 1995).

Como se puede apreciar en la sección de resultados, se observa la presencia de filamento y movilidad en las placas de nado de la mutante DC (WS8 *flgK::aadA*. Fla') complementada con las construcciones pDC-409, pDC-C01A y pDC-C01B.



El caso particularmente interesante es la complementación con la construcción **pDC-C01B**, debido a que posee una secuencia promotora poco conservada para un factor  $\sigma^{28}$ , ubicada en orientación contraria al promotor de tetraciclina (*Tc*) del vector pRK-415 en el que fue clonado. La participación de esta secuencia consenso podría tener algún efecto en la transcripción de *flgK* y *flgL* pero que posiblemente de menor importancia que la vía preferencial de transcripción desde una secuencia promotora consenso  $\sigma^{54}$  ubicada al inicio del operón *flgG* (González-Pedrajo et al 2002). También hay que considerar que el efecto observado de la complementación por pDC-C01B podría deberse a que existe un mayor número de copias presentes en la célula que alteren de manera positiva la afinidad de la maquinaria transcripcional por la secuencia consenso  $\sigma^{28}$ , por lo que no se descarta la posibilidad de expresión por medio de ese promotor.

Con estos datos se podría esbozar un orden hipotético de activación transcripcional durante la biogénesis del gancho, HAP's y filamento de *R. sphaeroides*, iniciando con la activación del complejo maestro y su efecto sobre la transcripción de los genes clase II por medio de uno de los cuatro factores  $\sigma^{54}$  (Poggio et al 2002). El efecto de este promotor en la activación de otros genes flagelares clase II, correspondientes al cuerpo basal, gancho y HAP's permanecería hasta que el factor antisigma (FlgM). Por lo tanto las proteínas expresadas clase III, flagelinas y HAP's son traducidas en mayor proporción y a su vez exportadas, debido a que la transcripción de los genes clase III es bloqueada por el factor antisigma FlgM. (K. Komoriya et al, 1999). FlgM normalmente se encuentra asociado a FliA ( $\sigma^{28}$ ), cuando éste dímero se disocia por acción de FliB, permite la liberación del factor  $\sigma^{28}$  cuyo blanco son los genes que poseen un promotor clase III. En *Salmonella typhimurium*, el arreglo de las unidades de transcripción de los genes de las HAP's es muy similar al encontrado en *R. sphaeroides*: El operón *flgB* esta regulado por la actividad de un factor  $\sigma^{54}$ , mientras que el operón de *flgK* está gobernado por un factor  $\sigma^{28}$  (FliA). Mutaciones en FliA reprimen, pero no eliminan la expresión de las HAP's mientras que mutaciones en *flgB*, ejercen un efecto polar eliminando la transcripción de *flgK*. En consecuencia la expresión de *flgK* posee una vía preferencia por medio de un promotor para un factor  $\sigma^{28}$  (Kutsukake & Ide 1995). A pesar de que esta evidencia apunta a que estos operones son activados por dos clases diferentes de promotores, uno de clase II ( $\sigma^{54}$ ) y otro de clase III ( $\sigma^{28}$ ) la contribución mayoritaria es sólo de uno: el promotor clase III activado por un factor FliA ( $\sigma^{28}$ ). Aparentemente el mecanismo inverso es el que está presente en *Rhodobacter sphaeroides*. La lógica subyacente a este mecanismo supone que deben transcribirse en una unidad policistrónica los productos que conforman al cuerpo basal, gancho y HAP's, antes de la aparición de la flagelina. Al mismo tiempo que las HAP's se transcriben *flgM* y *flgD* dando lugar a dos proteínas que modulan los pasos críticos entre el ensamblaje del gancho y el filamento. Por su lado FlgM actúa como un factor antisigma (Hughes & Mathee 1998) reprimiendo la acción de  $\sigma^{28}$ , por lo tanto la expresión de los genes clase III se inhibe. FlgD es una proteína adaptadora que funciona como plataforma para el acoplamiento de las HAP's ya que es sustituida por HAP1 cuando ésta es exportada (Onhishi et al 1994).

Quizás la interacción FigD-FigK, aun que transitoria, sea mucho más importante para determinar la polaridad del ensamblaje del filamento, ya que FigK y FigL podrían tener su origen de un mismo transcrito y el orden en el que son exportadas estas proteínas, no ha sido debidamente caracterizado. La subunidades del gancho y de la flagelina poseen patrones similares de plegamiento o "folding" en estado filamentar (Uedaira et al 1999) por lo que deben ser esos mismo estados conformacionales los que posiblemente modulen la interacción entre HAP1 con el gancho y HAP3 con el filamento.

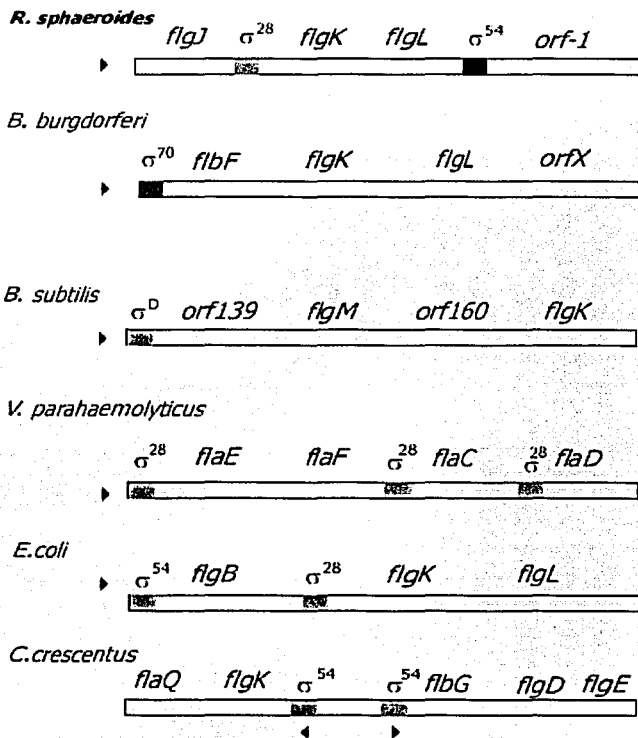


Figura 39  
 Comparación de la unidad de transcripción que codifica para flgK en diferentes especies bacterianas. Modificado de: Ge et al., 1997.



Ninguno de los cuatro factores  $\sigma^{54}$  encontrados en *R. sphaeroides* son funcionalmente intercambiables (Poggio 2002), y el papel de su especificidad podría ser un indicativo del costo biosintético que representa el ensamblaje del flagelo. Ya que *R. sphaeroides* es una bacteria que tiene la capacidad de sobrevivir en condiciones variables de carbono, nitrógeno, oxígeno y luz, sí la activación de todos los genes dependientes de un factor  $\sigma^{54}$  estuviera regulada por uno o un grupo de proteínas activadoras con la misma afinidad por sus secuencias consenso, no existiría una modulación en los diferentes procesos asociados a la transcripción de los genes involucrados. Estas evidencias hacen suponer que de existir una actividad del promotor  $\sigma^{28}$  que precede a *flgK* en *R. sphaeroides*, debe de poseer una afinidad diferencial entre ésta secuencia y FlhA, para que la transcripción desde el operón FlgG, sea mediada por un factor  $\sigma^{54}$ . En las placas de nado complementadas con la construcción pDC-C01B el desplazamiento es más lento, en comparación a las mutantes reestablecidas con las construcciones pDC-C01A y pDC-409. Esta diferencia podría sugerir que la actividad del promotor quizás no sea tan alta.

## 11 PERSPECTIVAS

### 11.1 Posible función de las HAP's en el desempeño mecánico del filamento

Una de las características funcionales que se le atribuyen a las proteínas HAP's es la de actuar como una estructura de nucleación para la unión entre el gancho y el filamento. Previamente se ha discutido que existen ciertas regiones que interactúan para mantener la polaridad del ensamblaje. De la misma forma durante el desplazamiento de la bacteria, el filamento que es una estructura con un coeficiente de rigidez de  $10^{-15}$  dinas /cm<sup>2</sup>, dos ordenes de magnitud mayor a la actina (Kuajima et al 1988, Macnab 1996), debe ser capaz de transmitir la fuerza de propulsión o torca, desde la base, hacia lo largo del filamento.

En mutantes de *flgL* que codifica para HAP3 donde hay una sustitución puntual de una cisteína por una arginina en la posición 168, afecta la movilidad, debido a que el filamento sufre de transformaciones dramáticas en el arreglo de sus subunidades. Estos cambios son inducidos por la torsión generada por la rotación del filamento (Fahrner et al 1994). Esto implica que una de las funciones de las HAP's es la de mantener estable la forma de la estructura del filamento bajo una carga de torsión que posiblemente dependa en parte de las proteínas a la que el filamento está anclado en su base.

Bajo diferentes condiciones de salinidad, pH, temperatura, solventes y cargas eléctricas, entre otras, el filamento sufre cambios en su estructura cuaternaria (Kuajima et al 1988). Los protofilamentos de una cierta forma tienen una torsión característica, (el ángulo en relación al eje helicoidal), una torsión negativa genera un filamento siniestro (transición L) mientras que la orientación contraria genera un filamento diestro (transición R) (Namba & Vondervitz 1989, Namba & Samatey et al 2001).

La predicción a partir de este modelo, es que aplicando una torsión en un sentido positivo (R) o negativo (L) el filamento debe adquirir una conformación o quiralidad en el sentido de la aplicación de la fuerza. Ya que el filamento debe someterse a un intenso movimiento los cambios conformacionales, estos no deben de ser los suficiente dramáticos como para perder su arreglo hidrodinámico. La función de las HAP's no sólo sería crítica durante el ensamblaje del filamento sino también para proveer una base rígida al filamento, permitiendo una cierta movilidad de las subunidades del gancho; esto implicaría una deformación elástica a nivel de estas proteínas (Fahrner *et al* 1994)

El eje y el gancho parecen ser capaces de mantener una unión sin la asistencia de otras proteínas. Sin embargo parece que este principio no se puede aplicar entre las proteínas del gancho y el filamento. La razón de esta diferencia no es clara, considerando que la unión del eje y el gancho debe de soportar una torsión y carga lateral en apariencia mayor que la unión entre el gancho y el filamento. (Onhishi *et al* 1994). Según los antecedentes de la biogénesis flagelar, FlgD es una proteína de coronación que se encuentra en el extremo distal del gancho en formación y su papel es análogo al de FliD (HAP2), durante la fase de elongación del filamento. Aparentemente la sustitución de FlgD por HAP1 (FlgK) y HAP3 (FlgL) se debe a que la función de las HAP's es incompatible con la realizada por FlgD.

Estudios recientes han revelado los detalles subyacentes en los cristales de flagelina. Dependiendo de su helicidad (Namba & Samatey 2001). Una fuerza de torque distribuida o localizada puede generar un cambio conformacional en el filamento. Durante el nado los motores flagelares de algunas bacterias como en el caso de *Salmonella typhimurium* cambian de dirección episódicamente, la torca resultante puede inducir transformaciones entre estos estados, de la misma forma un flagelo en movimiento sometido a una corriente puede sufrir esos cambios (Wolgemuth *et al* 2000, Hotani 1982).

Para comprender algunos de los procesos fundamentales subyacentes a este fenómeno deben considerarse numerosas variables y restricciones para el diseño de un modelo físico, entre estas el desempeño de la elasticidad del material del filamento en un fluido, la viscosidad ( $\eta$ ), y la frecuencia de rotación en uno de sus extremos ( $\omega$ ), (Ver figura 41).

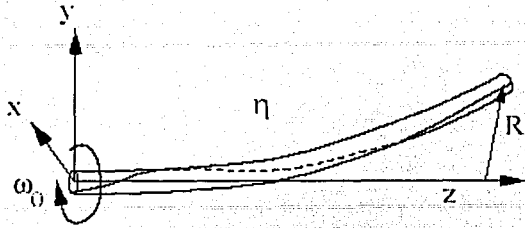


Figura 41

Un filamento elástico rota sobre su propio eje (z) que se encuentra rodeado por un fluido con una viscosidad  $\eta$  (Tomado de Wogelmuth *et al* 2000)

Este modelo relativamente sencillo pretende estudiar tres procesos: la inyección de la torsión en el extremo en rotación, la difusión de la torsión y retorcimiento. Métodos analíticos y numéricos revelan dos dinámicas de movimiento: el retorcimiento, en el cual un eje recto pero torcido rota sobre sí mismo, y el otro modelo de remolino, en el cual en el eje se comporta como un cigüeñal sobre su mismo eje de rotación de forma estacionaria, (Ver figura 42).

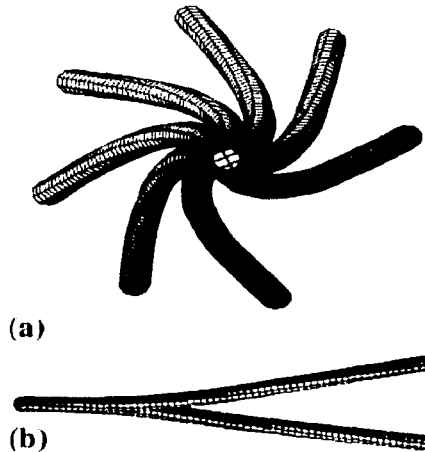


Fig 42

Representación del modelo de "remolino" en el inciso (a) se tiene una perspectiva del filamento desde su eje, en determinados estados de su desplazamiento. En el inciso (b) se tiene una perspectiva lateral en dos fases de su movimiento.

Considerando estas variables cabe hacerse algunas preguntas:

¿Qué fuerzas son necesarias para lograr este movimiento?

¿Las diferencias estructurales en la organización del flagelo procarionte de diversas especies, podría modificar el desempeño hidrodinámico en forma diferencial?

¿Qué papel juega HAP1 de *R. sphaeroides* que posee un dominio central muy grande en el mantenimiento de la estructura filamentar bajo diferentes condiciones de estrés mecánico?

Múltiples investigaciones han demostrado que el filamento adquiere diferentes conformaciones morfológicas bajo diferentes condiciones químicas y mecánicas. De la misma forma durante la rotación del flagelo éste sufre cambios conformacionales entre ellas transiciones polimórficas denominadas transiciones de quiralidad. En estas transiciones la orientación de los protofilamentos que componen el filamento flagelar se reorganizan adquiriendo una organización en un sentido u otro. Experimentos clásicos (Hotani 1982) sobre la torsión del filamento demostraron que en el flagelo de *Salmonella typhimurium* las transiciones de flagelina en estado "L" o en estado "R" (Vonderviszt et al 2001, Samatey et al 2001) las precede un cambio en la dirección de la rotación y una carga torsional que es transmitida a lo largo del filamento de forma periódica (Coomb's et al 2002). Cuando los filamentos de *Salmonella typhimurium* eran fijados por un extremo en un portaobjetos y eran sometidos a un flujo constante con una velocidad de  $1\mu\text{m/s}$  (aproximadamente una longitud de onda por segundo) de una solución de metilcelulosa, los flagelos mostraban transformaciones quirales periódicas a lo largo del filamento. El filamento con una helicidad hacia la izquierda desarrollaba un dominio en su extremo distal que se orientaba hacia la derecha. Una vez que una fracción significativa de la hélice se encuentra en un estado, el extremo distal retornaba a su orientación izquierda mientras que el dominio en orientación derecha se desplaza hacia el extremo basal desapareciendo una vez alcanzado su extremo.

Para ejemplificar claramente este fenómeno imaginemos una cuerda que está sujeta en un extremo a un motor. Cuando el motor se activa, la dirección de rotación de la cuerda es la misma que la dirección de rotación del motor. A lo largo de la cuerda se genera una fuerza de torsión que modifica la horizontal de la curva, generando una curvatura con una helicidad determinada (el ángulo generado a partir de la separación de la normal) a lo largo de la cuerda, con una longitud de onda particular. Cuando el motor cambia de dirección, la fuerza de torsión cambia el sentido de su vector, es decir, la magnitud puede ser equivalente pero modifica su dirección, cuando esta fuerza de torsión es transmitida a lo largo de la cuerda, la curvatura generada cambia de dirección, de modo de la fuerza de torque transmitida inicialmente en una dirección, se opone a la generada en la nueva orientación, (Ver figura 43). Este comportamiento es periódico, Hotani en 1982, observó que los filamentos con una orientación helicoidal izquierda (normales) pueden alternar con dos estados de orientación derecha : semienrollados o rizados, dependiendo de la forma como el filamento era adherido al portaobjetos (Hotani, 1982).

Otras evidencias más recientes han logrado determinar que las transiciones observadas por Hotani poseen una secuencia más compleja y podrían ser características de cada especie.

La secuencia observada *in vivo* normal-semienrollados-rizados-normal (Turner et al 2000) para flagelos de *E. coli* marcados fluorescentemente es típica de un solo flagelo durante un ciclo de rotación, paro y reorientación. Considerando el modelo propuesto por Wogelmuth et al 2000 y Bogel, faltaría incorporar al modelo las transiciones quirales en el filamento. Cabe señalar que estos dos modelos consideran que el filamento debe estar sujeto a una base o ángulo  $\omega_0$  a partir de donde la fuerza de arrastre o torque es transmitida hacia el resto del filamento (Coombs et al 2002). Este ángulo de anclaje podría ser la interfase de las HAP's. Un modelo posterior podría considerar que existen cambios en la configuración de dicha interfase, de la misma forma como los que ocurren a nivel de la flagelina del filamento. Sin embargo es posible que el reducido número de copias de HAP's que se han encontrado en la interfase no le permita gozar de un mayor elasticidad, por lo que la fuerza generada por las transiciones mecánicas del filamento sería amortiguada desde su base por una estructura más rígida o con transiciones más discretas.

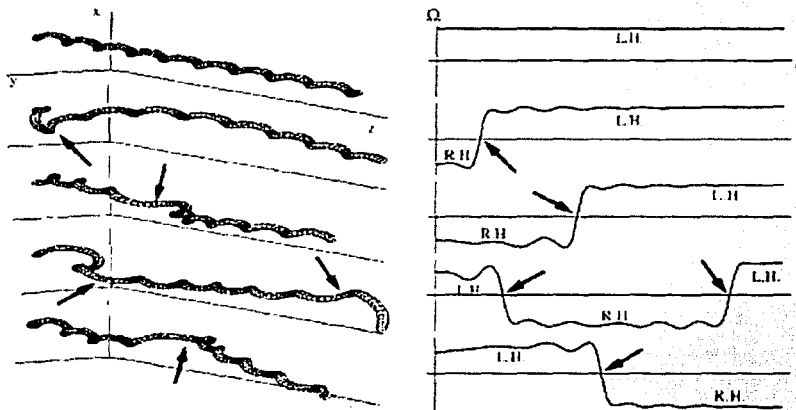


Fig 43

Grafico que muestra los cambios en la configuración del flagelo durante las transiciones polimórficas, sometidas a un flujo equivalente a su velocidad crítica

(  $U = 10\mu\text{m/s}$ ) correspondientes a una tasa de torsión ( $\Omega$ ) Tiempos de la corrida de arriba hacia abajo(  $t_0s, t_{1,7}s$ ), las flechas indican el sitio donde ocurre un cambio en la quiralidad de los filamentos a lo largo de su eje. Tomado de Coombs et al 2002.

## 11.2 HAP's ¿Moduladores del estrés mecánico?

Existen muy pocas aproximaciones físico-matemáticas que puedan caracterizar la función del flagelo y particularmente de HAP1 así como de HAP3, de forma



dinámica. Las HAP's tienen múltiples funciones en diferentes estadios de la biogénesis flagelar.

La primera de ellas y la más evidente es la de generar una conexión entre diferentes tipos de proteínas axiales (gancho y filamento). Otra función, aún perteneciente al terreno especulativo, es la de transmisión de la torca (o fuerza de arrastre) hacia el extremo distal del filamento, así como de modulador del estrés mecánico generado por los cambios en la dirección de rotación (sea la inversión del sentido de rotación como en los modelos de *S. typhimurium* o en el freno de *R. sphaeroides*) o en las transiciones morfológicas del filamento. En la diversas especies donde se ha caracterizado el flagelo, se pueden encontrar divergencias en los mecanismos de desplazamiento. El papel que debe jugar las HAPs debe ser menos pasivo de lo evidenciado en las últimas investigaciones, y podría decirse aventuradamente que su participación durante la activación del motor flagelar es el de funcionar como un soporte mecánico para la transición quiral de la flagelina.

Cabe señalar reiteradamente que HAP1 de *R. sphaeroides*, es la única proteína flagelar hasta ahora reportada que posee una secuencia de mayor extensión que sus proteínas homólogas y que su dominio central podría contener funciones regulatorias para su exportación, plegamiento y ensamblaje que serían particulares de ésta especie.

Aun existen varios fenómenos poco comprendido en cuanto a la eficiencia del flagelo como nanomotor, sobre todo los detalles mecánicos y termodinámicos de su comportamiento como sistema de propulsión y autoensamblaje, por lo que el estudio de las proteínas axiales podría contribuir a comprender de forma más precisa los mecanismos subyacentes de su organización e implicaciones en la motilidad bacteriana.

En el futuro se pretende obtener información suficiente que nos permita elucidar la función de HAP. Por medio de escisiones sucesivas a lo largo del dominio central de HAP1, se pretenden contestar diversas cuestiones al respecto de esta proteína entre ellas: ¿Cuál es la frontera del dominio central de HAP1?, ¿Qué función tiene HAP1 en el nado de *R. sphaeroides*?, ¿Qué mecanismos de exportación están involucrados en la exportación de HAP1?, ¿Qué chaperonas modulan su plegamiento?, debido a que no se han identificado en el genoma de *R. sphaeroides* 2.4.1 los genes homólogos a *flgN* y *fliT*, codificantes para chaperonas de HAP1 y HAP3 encontradas en *S. typhimurium*. Además, ya que es una proteína muy grande (2.4 veces) en comparación a la media de las proteínas axiales en otros flagelos, ¿Cómo se organizan los dominios de reconocimiento con otras proteínas axiales?, ¿Cuál es su estequiometría durante el ensamblaje?, ¿Cómo está modulada su expresión genética, entre múltiples intereses que motivan al equipo de investigación donde se desarrollo este trabajo.

## 12.- CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo y el análisis y discusión de los mismos, se pueden considerar las siguientes ideas

*flgK*, posee un inusual tamaño, 4,092pb, que codifica para una proteína aproximadamente 3 veces mayor a las proteínas con funciones similares en otras bacterias.

La región central de FlgK posee alrededor de 800 amino ácidos que no tienen similitud con otras proteínas flagelares con funciones asociadas

Los ensayos de complementación de la mutante DC (*flgK::aadA,Fla<sup>-</sup>*) con los plásmidos **pDC-C01A/B**, **pDC-104** y **pDC-401**, sugieren que la región central de FlgK es indispensable para la organización y ensamblaje del filamento, así como del desempeño del nado de *R. sphaeroides*.

La complementación con la construcción **pDC-C01B** muestra que la secuencia consenso para un promotor  $\sigma^{28}$  es en apariencia funcional y puede estar involucrado en la transcripción de *flgK* (HAP1) y posiblemente de *flgL* (HAP3). Este resultado sugiere que estos genes podrían formar parte de una unidad transcripcional.

## APENDICE TÉCNICO

### Cepas y plásmidos

#### Cepas:

GM 33 dam<sup>r</sup> cepa carente de metilasas  
JM103 derivado por restricción de JM101 *hsdR4 Δ(lac-pro) F' traD36 proAB*  
JM109 *recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thiΔ(lac-proAB)*  
S17-1 *recA endA thi hsdR RP4-2Tc::Mu::Tn7*. Cepa de conjugación, *kpir* factores de movilización en el cromosoma (Penfold & Pemberton, 1992)

#### Plásmidos:

pBG-506 A subclona (*Sall* 5,09kbs con las secuencias de *flgJ*, *flgK* y una secuencia parcial de *flgL*).

pBG-506 B subclona pBG-506 pero en la orientación contraria.

pTZ-19R vector de clonación Derivado de pUC Ap<sup>r</sup> (Farmacia)  
pJQ200mp18 vector de conjugación por reemplazo alélico (Quandt & Hynes 1993)

#### Construcciones generadas en éste trabajo:

pDC-01 [pBG 506-A + *aadA* 1.4 kb de pWM5 Amp<sup>r</sup>/ Sp<sup>r</sup>]

subclona *Sall* 7.3kbs con las secuencias de *flgJ*, *flgK::aadA* y una secuencia parcial de *flgL*

pDC-02 [pJQ200mp18 +fragmento *Sall* 7.3 kbs de pBG506-A +*aadA* 1.4 kbs de pWM5 Gm<sup>r</sup> Sp<sup>r</sup>]

pDC-C01A [pRK415 fragmento HindIII 5,09 kbs de pBG 506-B Tcr<sup>r</sup>]

pDC-C01B [pRK 415 fragmento HindIII 5,09 kbs de pBG 506-B Tcr<sup>r</sup> en la orientación opuesta.]

pDC-409 [pRK 415 *flgK* (gen silvestre) fragmento HindIII/KpnI 4,09 kbs de pBG 506B Tcr<sup>r</sup>]

pDC-104 [pRK 415 *flgK Δ* 3.04 kb fragmento mutante HindIII/BamHI 1,04 kbs obtenido por PCR de pBG506A]

## Soluciones de uso frecuente y utilizadas en este trabajo:

Proporciones de reactivos para un volumen final de 1l.

### 20x SSC

NaCl - 175.3 g  
Citrato de Sodio ·2H<sub>2</sub>O - 88.2 g  
Ajustar pH a 7.0 con NaOH

### 0.5 M EDTA, pH 8.0 Ácido Etilen-diamino-tetra acético

(EDTA)·2H<sub>2</sub>O - 186.1 g  
NaOH ~20 g  
Ajustar pH a 8.0 con NaOH  
Agregar el EDTA hasta que el pH de la solución se de 8.0

### 1 M Tris-Cl

Tris base - 121.1 g  
Ajustar pH con HCl

### TE, pH 7.4

1 M Tris-Cl, pH 7.4 10 ml  
0.5 M EDTA, pH 8.0 2 ml

### 10% SDS

Dodecil sulfato de sodio (SDS) - 100 g  
Ajustar pH a 7.2 con HCl

### Soluciones para Electroforesis de TE-agarosa

TAE 1x 40 mM Tris acetate 50x Tris base 242 g  
1 mM EDTA Acido acético glacial 57.1 ml  
0.5 M EDTA, pH 8.0 100 ml

### Mezcla de carga 6x 0.25%

azul de bromofenol 25 mg  
Xylene-cyanol FF 25 mg  
Orange G 25mg

## Medios del Cultivo

### LB (Luria-Bertani)

Triptona 10 g  
Extracto de levadura 5 g  
NaCl 10 g  
*Autoclave*

### LB agar

Triptona 10 g  
Extracto de levadura 5 g  
NaCl 10 g

Agar: para 1.5% LB agar 15 g

para 0.7% LB agar 7 g

*Autoclave*

### Placas de nado (swarms)

Triptona 1%  
Extracto de levadura 1%  
NaCl 0.7%  
Agar: 0.3% LB agar  
*Autoclave*

**Medio SUX**  
(Sistorm W.R. 1962)

10x 1L

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	34.8g
/ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	27.2g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.0g
NH <sub>4</sub> Cl	1.95g
Acido succínico	40.0g
Acido L-glutámico	1.0g
Acido L-aspartico	0.4g
NaCl	5.0g
Acido nitrilo-acético	2.0g

MgSO <sub>4</sub> 1H <sub>2</sub> O	3.0g
/ MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	2.44g

CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.334g
FeSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.20g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.002g

Elementos traza	1.0ml
Vitaminas	1.0ml

**Elementos traza 1000x para solución 10X medio SUX**

EDTA	1.765g
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10.95g (0.038M)
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5.0g (0.018M)
MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.54g (0.009M)
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.392g (1.5mM)
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.248g (0.9mM)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.114g (1.8mM)

**Vitaminas 1000x para solución 10X medio SUX**

Acido nicotínico	1.0g
Tiamina HCL	0.5g
Biotina	0.010g

**Reactivos para SDS-PAGE (Electroforesis de proteínas)**

**Componentes por litro**

30% archilamida

30% Acrilamida 300 g

**0.8% bis-acrilamida**

**solución madre (N,N'-metileno-bis-acrilamida)**

**2.5x solución de separador**

1.875 M Tris- Cl Tris base 227.1 g

0.25% SDS SDS 2.5 g

pH 8.9 *Ajustar pH a 8.9 con HCl*

**5x solución de condensación**

0.3 M Tris base 36.3 g

0.5% SDS SDS 5 g

pH 6.7 *Ajustar pH a 6.7 con ácido fosfórico*

**5x solución de electroforesis**

0.5 M Tris base 60.6 g

1.92 M glicina 144.1 g

0.5% SDS SDS 5 g

*pH final debe ser 8.8*

TESIS CON  
FOLIO DE ORIGEN

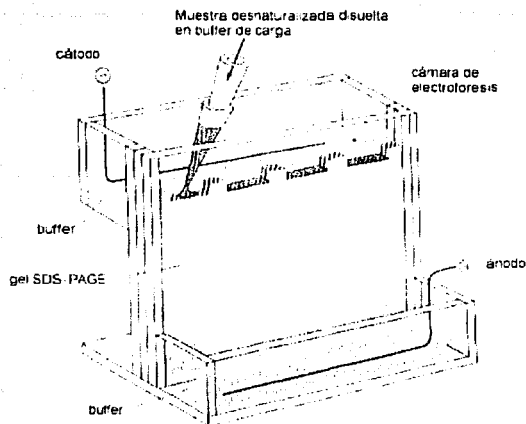


Figura 31  
Esquema de cámara de electroforesis de geles SDS-PAGE

### Precipitación de proteínas por medio de Metanol-Cloroformo

1. Aforar a 100  $\mu$ l muestra, con MQ
2. Añadir 400  $\mu$ l metanol
3. Vortex
4. Añadir 100  $\mu$ l cloroformo
5. Vortex
6. Añadir 300  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
7. Vortex
8. Centrifugar 1' a 14,000 g
9. Remover fase acuosa
10. Añadir 400  $\mu$ l metanol
11. Vortex
12. Centrifugar 5' a 14,000 g
13. Remover metanol, tanto como sea posible
14. Secar al vacío.

### Determinación espectrofotométrica de la concentración de ácidos nucleicos

(Relación de concentración-absorbancia a 260 nm según Ausubel, F.M. et al., eds.1999)

#### Una unidad a 260nm concentración( $\mu$ g/ml)

ADN doble cadena	50
AND cadena sencilla	33
RNA	40
Oligonucleotidos	20-30

### Metodología para la transformación de células por el método con CaCl<sub>2</sub> (Sambrook et al 2000)

Poner un precultivo toda la noche de 2 a 3ml. de LB ( antibiótico si lo requiere)  
 Inocular 10 ml. con 0.1 ml (1/100 del vol. a inocular) del precultivo  
 Crecer a 37°C hasta D.O: 0.5 a 550nm (o 600)  
 Poner en hielo 5'  
 Centrifugar a 6000 rpm 5'  
 Resuspender en 1/2 del vol. original (5ml) repetir paso 2 con una solución de CaCl<sub>2</sub> 100mM  
 Poner en hielo 30'  
 Centrifugar a 6000 rpm 5'  
 Resuspender c/0.66 ml de CaCl<sub>2</sub> 100mM  
 Dividir en alícuotas de 200  $\mu$ l de células (3)  
 Agregar plásmido/ cósmido DNA  
 Hielo 1 hr. (24 hrs max)  
 Dar un pulso o choque de calor a 42°C durante 2'  
 Poner en hielo de 5 a 3'  
 Agregar 0.8 ml de LB  
 Dejar a 37°C 45' a 1 hr. sin agitar  
 Plaquear

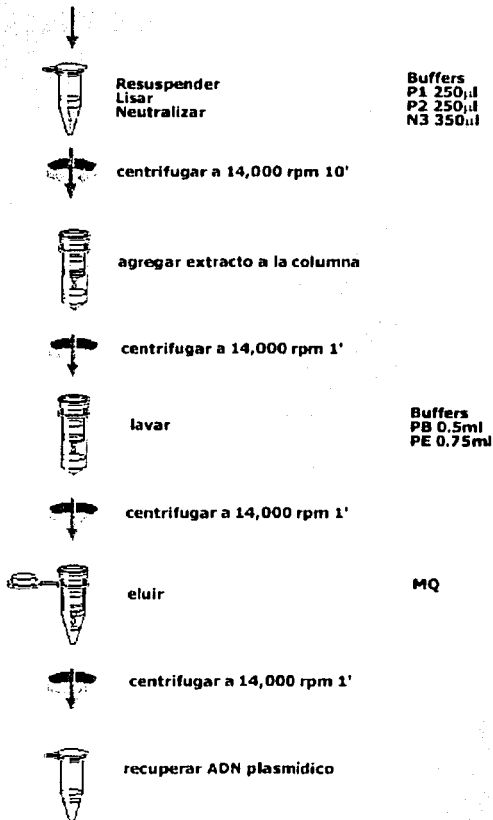
Los protocolos a continuación descritos se pueden consultar con mayor detalle con el proveedor [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

### Purificación de ADN plasmídico (Minispin qiaquick kit) [Fig 32]

Método de purificación de ADN plasmídico (Qiagene mini spin kit)

Método de purificación de lisis alcalina

cultivo crecido toda una noche



### **Extracción de DNA de gel de agarosa (Gel extraction kit Qiagen)**

Cortar el fragmento de DNA del gel de agarosa con un escalpelo, minimizando la cantidad de agarosa cortada

Pesar el trozo de gel en un tubo eppendor y agregar 3 volúmenes de QG para 1 volumen de gel (100 mg ~ 100 µl).

Incubar a 50°C 10' hasta que el trozo este completamente disuelto, vortexear cada 3 minutos durante la Incubación.

Después de que el gel está disuelto completamente revisar el pH se mantenga en 7.5

Añadir un volumen de isopropanol

Colocar en un columna QIAquick spin, centrifugar por 1'

Eliminar *eluido* y colocar la columna de QIAquick al tubo de recolección (2ml de capacidad)

Añadir 0.5 ml de Buffer QG a la columna de QIAquick, centrifugar 1'

Lavar con 0.75 ml de Buffer PE en la columna de QIAquick, centrifugar 1'

Eliminar el *eluido* y centrifugar 1'

NOTA: todas las centrifugaciones se realizan a 13,000 rpm (~17,900 x g).

Eluir con 50ml de MQ



## Bibliografia

Adler, J. (1979). "The behavior of bacteria: on the mechanism of sensory transduction in bacterial chemotaxis." Johns Hopkins Med J **144**(4): 121-6.

Adler, J., M. F. Goy, et al. (1979). "On the mechanism of sensory transduction in bacterial chemotaxis." Soc Gen Physiol Ser **33**: 123-37.

Aizawa, S. (1999). "[Poison needles and tails of Salmonella typhimurium: pathogen export apparatus and flagellar motor]." Tanpakushitsu Kakusan Koso **44**(1): 1-7.

Aizawa, S. I. (1996). "Flagellar assembly in Salmonella typhimurium." Mol Microbiol **19**(1): 1-5.

Aizawa, S. I. and T. Kubori (1998). "Bacterial flagellation and cell division." Genes Cells **3**(10): 625-34.

Aldridge, P. and K. T. Hughes (2001). "How and when are substrates selected for type III secretion?" Trends Microbiol **9**(5): 209-14.

Aldridge, P. and K. T. Hughes (2002). "Regulation of flagellar assembly." Curr Opin Microbiol **5**(2): 160-5.

Armitage, J. P. and R. M. Macnab (1987). "Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of Rhodobacter sphaeroides." J Bacteriol **169**(2): 514-8.

Armitage, J. P., T. P. Pitta, et al. (1999). "Transformations in flagellar structure of Rhodobacter sphaeroides and possible relationship to changes in swimming speed." J Bacteriol **181**(16): 4825-33.

Atsumi, T. (2001). "An ultrasonic motor model for bacterial flagellar motors." J Theor Biol **213**(1): 31-51.

Ballado, T., A. Campos, et al. (1996). "Flagellar genes from Rhodobacter sphaeroides are homologous to genes of the fliF operon of Salmonella typhimurium and to the type-III secretion system." Gene **170**(1): 69-72.

Barak, R., M. Welch, et al. (1992). "Acetyladenylate or its derivative acetylates the chemotaxis protein CheY in vitro and increases its activity at the flagellar switch." Biochemistry **31**(41): 10099-107.

Bellenger, K., X. Ma, et al. (2002). "A CheW homologue is required for Myxococcus

Benitah, J. P., R. Ranjan, et al. (1997). "Molecular motions within the pore of voltage-dependent sodium channels." Biophys J **73**(2): 603-13.

Bennett, J. C., J. Thomas, et al. (2001). "Substrate complexes and domain organization of the Salmonella flagellar export chaperones FigN and FliT." Mol Microbiol **39**(3): 781-91.

- Bennett, J. C., J. Thomas, et al. (2001). "Substrate complexes and domain organization of the Salmonella flagellar export chaperones FigN and Flit." Mol Microbiol **39**(3): 781-91.
- Berg, H. C. (1995). "Torque generation by the flagellar rotary motor." Biophys J **68**(4 Suppl): 163S-166S; discussion 166S-167S.
- Berg, H. C. and L. Turner (1993). "Torque generated by the flagellar motor of Escherichia coli." Biophys J **65**(5): 2201-16.
- Berry, R. M. and H. C. Berg (1999). "Torque generated by the flagellar motor of Escherichia coli while driven backward." Biophys J **76**(1 Pt 1): 580-7.
- Berry, R. M. and J. P. Armitage (2000). "Response kinetics of tethered Rhodobacter sphaeroides to changes in light intensity." Biophys J **78**(3): 1207-15.
- Bonifield, H. R., S. Yamaguchi, et al. (2000). "The flagellar hook protein, FigE, of Salmonella enterica serovar typhimurium is posttranscriptionally regulated in response to the stage of flagellar assembly." J Bacteriol **182**(14): 4044-50.
- Borkovich, K. A. and M. I. Simon (1990). "The dynamics of protein phosphorylation in bacterial chemotaxis." Cell **63**(6): 1339-48.
- Braun, T. F. and D. F. Blair (2001). "Targeted disulfide cross-linking of the MotB protein of Escherichia coli: evidence for two H(+) channels in the stator Complex." Biochemistry **40**(43): 13051-9.
- Braun, T. F., S. Poulson, et al. (1999). "Function of proline residues of MotA in torque generation by the flagellar motor of Escherichia coli." J Bacteriol **181**(11): 3542-51.
- Bray, D., M. D. Levin, et al. (1998). "Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity." Nature **393**(6680): 85-8.
- Bren, A. and M. Eisenbach (1998). "The N terminus of the flagellar switch protein, FliM, is the binding domain for the chemotactic response regulator, CheY." J Mol Biol **278**(3): 507-14.
- Bren, A. and M. Eisenbach (2001). "Changing the direction of flagellar rotation in bacteria by modulating the ratio between the rotational states of the switch protein FliM." J Mol Biol **312**(4): 699-709.
- Bren, A., M. Welch, et al. (1996). "Signal termination in bacterial chemotaxis: CheZ mediates dephosphorylation of free rather than switch-bound CheY." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(19): 10090-3.

Burkart, M., A. Toguchi, et al. (1998). "The chemotaxis system, but not chemotaxis, is essential for swarming motility in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2568-73.

Calladine, C. R. (1982). "Construction of bacterial flagellar filaments, and aspects of their conversion to different helical forms." Symp Soc Exp Biol **35**: 33-51.

Charles W. Wolgemuth, Thomas R. Powers, and Raymond E. Goldstein  
Che, F. S., Y. Nakajima, et al. (2000). "Flagellin from an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* induces a resistance response in cultured rice cells." J Biol Chem **275**(41): 32347-56.

Chilcott, G. S. and K. T. Hughes (2000). "Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*." Microbiol Mol Biol Rev **64**(4): 694-708.

Coombs, D., G. Huber, et al. (2002). "Periodic chirality transformations propagating on bacterial flagella." Phys Rev Lett **89**(11): 118102.

Dean, G. E., S. I. Aizawa, et al. (1983). "flaAll (motC, cheV) of *Salmonella typhimurium* is a structural gene involved in energization and switching of the flagellar motor." J Bacteriol **154**(1): 84-91.

DeRosier, D. J. (1998). "The turn of the screw: the bacterial flagellar motor." Cell **93**(1): 17-20.

Donato, G. M. and T. H. Kawula (1998). "Enhanced binding of altered H-NS protein to flagellar rotor protein Flg causes increased flagellar rotational speed and hypermotility in *Escherichia coli*." J Biol Chem **273**(37): 24030-6.

Dreyfus, G., A. W. Williams, et al. (1993). "Genetic and biochemical analysis of *Salmonella typhimurium* Flil, a flagellar protein related to the catalytic subunit of the FOF1 ATPase and to virulence proteins of mammalian and plant pathogens." J Bacteriol **175**(10): 3131-8.

Eisenbach, M. (1996). "Control of bacterial chemotaxis." Mol Microbiol **20**(5): 903-10.

Eisenbach, M. and S. R. Caplan (1998). "Bacterial chemotaxis: unsolved mystery of the flagellar switch." Curr Biol **8**(13): R444-6.

Eisenbach, M. and S. R. Caplan (1998). "Bacterial chemotaxis: unsolved mystery of the flagellar switch." Curr Biol **8**(13): R444-6.

Eisenbach, M., A. Wolf, et al. (1990). "Pausing, switching and speed fluctuation of the bacterial flagellar motor and their relation to motility and chemotaxis." J Mol Biol **211**(3): 551-63.

Fahrner, K. A., S. M. Block, et al. (1994). "A mutant hook-associated protein (HAP3) facilitates torsionally induced transformations of the flagellar filament of *Escherichia coli*." J Mol Biol **238**(2): 173-86.

Fan, F., K. Ohnishi, et al. (1997). "The FliP and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*, putative components of the type III flagellar export apparatus, are located in the flagellar basal body." Mol Microbiol **26**(5): 1035-46.

Fraser, G. M., J. C. Bennett, et al. (1999). "Substrate-specific binding of hook-associated proteins by FlgN and FliT, putative chaperones for flagellum assembly." Mol Microbiol **32**(3): 569-80.

Fraser, G. M., J. C. Bennett, et al. (1999). "Substrate-specific binding of hook-associated proteins by FlgN and FliT, putative chaperones for flagellum assembly." Mol Microbiol **32**(3): 569-80.

Furukawa, Y., K. Imada, et al. (2002). "Interactions between bacterial flagellar axial proteins in their monomeric state in solution." J Mol Biol **318**(3): 889-900.

Garcia, N., A. Campos, et al. (1998). "The flagellar switch genes *fliM* and *fliN* of *Rhodobacter sphaeroides* are contained in a large flagellar gene cluster." J Bacteriol **180**(15): 3978-82.

Ge, Y., I. G. Old, et al. (1997). "The *flgK* motility operon of *Borrelia burgdorferi* is initiated by a sigma 70-like promoter." Microbiology **143** ( Pt 5): 1681-90.

Gonzalez-Pedrajo, B., G. M. Fraser, et al. (2002). "Molecular dissection of *Salmonella* FliH, a regulator of the ATPase FliI and the type III flagellar protein export pathway." Mol Microbiol **45**(4): 967-82.

Gonzalez-Pedrajo, B., T. Ballado, et al. (1997). "Structural and genetic analysis of a mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 deficient in hook length control." J Bacteriol **179**(21): 6581-8.

Harrison, D. M., H. L. Packer, et al. (1994). "Swimming speed and chemokinetic response of *Rhodobacter sphaeroides* investigated by natural manipulation of the membrane potential." FEBS Lett **348**(1): 37-40.

Harrison, D. M., H. L. Packer, et al. (1994). "Swimming speed and chemokinetic response of *Rhodobacter sphaeroides* investigated by natural manipulation of the membrane potential." FEBS Lett **348**(1): 37-40.

Harshey, R. M. (1994). "Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria." Mol Microbiol **13**(3): 389-94.

Harshey, R. M. and A. Toguchi (1996). "Spinning tails: homologies among bacterial flagellar systems." Trends Microbiol **4**(6): 226-31.

Harshey, R. M. and T. Matsuyama (1994). "Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(18): 8631-5.

Helmann, J. D. and M. J. Chamberlin (1988). "Structure and function of bacterial sigma factors." Annu Rev Biochem **57**: 839-72.

Hirano, T., S. Yamaguchi, et al. (1994). "Roles of FliK and FliB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **176**(17): 5439-49.

Hirano, T., T. Minamino, et al. (2001). "The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase." J Mol Biol **312**(2): 359-69.

Homma, M. and T. Iino (1985). "Excretion of unassembled hook-associated proteins by *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **164**(3): 1370-2.

Homma, M. and T. Iino (1985). "Locations of hook-associated proteins in flagellar structures of *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **162**(1): 183-9.

Homma, M., D. J. DeRosier, et al. (1990). "Flagellar hook and hook-associated proteins of *Salmonella typhimurium* and their relationship to other axial components of the flagellum." J Mol Biol **213**(4): 819-32.

Homma, M., H. Fujita, et al. (1984). "Excretion of unassembled flagellin by *Salmonella typhimurium* mutants deficient in hook-associated proteins." J Bacteriol **159**(3): 1056-9.

Homma, M., K. Kutsukake, et al. (1984). "Hook-associated proteins essential for flagellar filament formation in *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **157**(1): 100-8.

Hotani, H. (1982). "Micro-video study of moving bacterial flagellar filaments. III. Cyclic transformation induced by mechanical force." J Mol Biol **156**(4): 791-806.

Hughes, K. T. and K. Mathee (1998). "The anti-sigma factors." Annu Rev Microbiol **52**: 231-86.

Hughes, M. P. and H. Morgan (1999). "Measurement of bacterial flagellar thrust by negative dielectrophoresis." Biotechnol Prog **15**(2): 245-9.

Hughes, M. P. and H. Morgan (1999). "Measurement of bacterial flagellar thrust by negative dielectrophoresis." Biotechnol Prog **15**(2): 245-9.

Ide, N., T. Ikebe, et al. (1999). "Reevaluation of the promoter structure of the class 3 flagellar operons of *Escherichia coli* and *Salmonella*." Genes Genet Syst **74**(3): 113-6.

Ikeda, T., K. Oosawa, et al. (1996). "Self-assembly of the filament capping protein, FliD, of bacterial flagella into an annular structure." J Mol Biol **259**(4): 679-86.

- Ikeda, T., R. Kamiya, et al. (1983). "Excretion of flagellin by a short-flagella mutant of *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **153**(1): 506-10.
- Ikeda, T., S. Asakura, et al. (1989). "Total reconstitution of *Salmonella* flagellar filaments from hook and purified flagellin and hook-associated proteins in vitro." J Mol Biol **209**(1): 109-14.
- Imada, K., F. Vonderviszt, et al. (1998). "Assembly characteristics of flagellar cap protein HAP2 of *Salmonella*: decamer and pentamer in the pH-sensitive equilibrium." J Mol Biol **277**(4): 883-91.
- Imada, K., F. Vonderviszt, et al. (1998). "Assembly characteristics of flagellar cap protein HAP2 of *Salmonella*: decamer and pentamer in the pH-sensitive equilibrium." J Mol Biol **277**(4): 883-91.
- Jones, C. J. and R. M. Macnab (1990). "Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*: analysis with temperature-sensitive mutants." J Bacteriol **172**(3): 1327-39.
- Jones, C. J. and S. Aizawa (1991). "Genetic control of the bacterial flagellar regulon." Curr Opin Genet Dev **1**(3): 319-23.
- Jones, C. J., R. M. Macnab, et al. (1990). "Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*." J Mol Biol **212**(2): 377-87.
- Joys, T. M. (1991). "Epitope mapping in *Salmonella* flagellar protein." SAAS Bull Biochem Biotechnol **4**: 56-9.
- Kagawa, H., H. Morishita, et al. (1981). "Reconstitution in vitro of flagellar filaments onto hook structures attached to bacterial cells." J Mol Biol **153**(2): 465-70.
- Karlinsey, J. E., H. C. Tsui, et al. (1998). "Flk couples flgM translation to flagellar ring assembly in *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **180**(20): 5384-97.
- Karlinsey, J. E., S. Tanaka, et al. (2000). "Completion of the hook-basal body complex of the *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and flhC transcription." Mol Microbiol **37**(5): 1220-31.
- Katayama, E., T. Shiraishi, et al. (1996). "Geometry of the flagellar motor in the cytoplasmic membrane of *Salmonella typhimurium* as determined by stereophotogrammetry of quick-freeze deep-etch replica images." J Mol Biol **255**(3): 458-75.
- Kato, S., M. Okamoto, et al. (1984). "Polymorphic transition of the flagellar polyhook from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*." J Mol Biol **173**(4): 463-76.

Kawagishi, I., M. Homma, et al. (1996). "Characterization of the flagellar hook length control protein fliK of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*." J Bacteriol **178**(10): 2954-9.

Kawagishi, I., V. Muller, et al. (1992). "Subdivision of flagellar region III of the *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* chromosomes and identification of two additional flagellar genes." J Gen Microbiol **138 ( Pt 6)**: 1051-65.

Kehry, M. R., T. G. Doak, et al. (1984). "Stimulus-induced changes in methyltransferase activity during chemotaxis in *Escherichia coli*." J Biol Chem **259**(19): 11828-35.

Khan, I. H., T. S. Reese, et al. (1992). "The cytoplasmic component of the bacterial flagellar motor." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 5956-60.

Khan, S., R. Zhao, et al. (1998). "Architectural features of the *Salmonella typhimurium* flagellar motor switch revealed by disrupted C-rings." J Struct Biol **122**(3): 311-9.

Kihara, M., G. U. Miller, et al. (2000). "Deletion analysis of the flagellar switch protein FliG of *Salmonella*." J Bacteriol **182**(11): 3022-8.

Kim, Y. K. and L. L. McCarter (2000). "Analysis of the polar flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*." J Bacteriol **182**(13): 3693-704.

Komoriya, K., N. Shibano, et al. (1999). "Flagellar proteins and type III-exported virulence factors are the predominant proteins secreted into the culture media of *Salmonella typhimurium*." Mol Microbiol **34**(4): 767-79.

Kubori, T., M. Okumura, et al. (1997). "Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **24**(2): 399-410.

Kubori, T., S. Yamaguchi, et al. (1997). "Assembly of the switch complex onto the MS ring complex of *Salmonella typhimurium* does not require any other flagellar proteins." J Bacteriol **179**(3): 813-7.

Kutsukake, K. (1994). "Excretion of the anti-sigma factor through a flagellar substructure couples flagellar gene expression with flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*." Mol Gen Genet **243**(6): 605-12.

Kutsukake, K. (1997). "Hook-length control of the export-switching machinery involves a double-locked gate in *Salmonella typhimurium* flagellar morphogenesis." J Bacteriol **179**(4): 1268-73.



Kutsukake, K. and H. Doi (1994). "Nucleotide sequence of the flgD gene of *Salmonella typhimurium* which is essential for flagellar hook formation." *Biochim Biophys Acta* 1218(3): 443-6.

Kutsukake, K. and N. Ide (1995). "Transcriptional analysis of the flgK and flhD operons of *Salmonella typhimurium* which encode flagellar hook-associated proteins." *Mol Gen Genet* 247(3): 275-81.

Kutsukake, K. and T. Iino (1994). "Role of the FliA-FlgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* 176(12): 3598-605.

Kutsukake, K., T. Minamino, et al. (1994). "Isolation and characterization of FliK-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* 176(24): 7625-9.

Kutsukake, K., Y. Ohya, et al. (1990). "Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* 172(2): 741-7.

Kuwajima, G. (1988). "Construction of a minimum-size functional flagellin of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 170(7): 3305-9.

Lloyd, S. A. and D. F. Blair (1997). "Charged residues of the rotor protein FliG essential for torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*." *J Mol Biol* 266(4): 733-44.

Lloyd, S. A., H. Tang, et al. (1996). "Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: evidence of a direct role for FliG but not for FliM or FliN." *J Bacteriol* 178(1): 223-31.

Macnab, R. M. and J. S. Parkinson (1991). "Genetic analysis of the bacterial flagellum." *Trends Genet* 7(6): 196-200.

Magariyama, Y., S. Sugiyama, et al. (1995). "Simultaneous measurement of bacterial flagellar rotation rate and swimming speed." *Biophys J* 69(5): 2154-62.

Magariyama, Y., S. Sugiyama, et al. (2001). "Bacterial swimming speed and rotation rate of bundled flagella." *FEMS Microbiol Lett* 199(1): 125-9.

Maki, S., F. Vonderviszt, et al. (1998). "Plugging interactions of HAP2 pentamer into the distal end of flagellar filament revealed by electron microscopy." *J Mol Biol* 277(4): 771-7.

Malakooti, J., B. Ely, et al. (1994). "Molecular characterization, nucleotide sequence, and expression of the flhO, flhP, flhQ, and flhR genes of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 176(1): 189-97.

Manson, M. D., J. P. Armitage, et al. (1998). "Bacterial locomotion and signal transduction." J Bacteriol **180**(5): 1009-22.

Marinus, M. G. (1973). "Location of DNA methylation genes on the Escherichia coli K-12 genetic map." Mol Gen Genet **127**(1): 47-55.

Meijer, W. G. and F. R. Tabita (1992). "Isolation and characterization of the nifUSVW-rpoN gene cluster from Rhodobacter sphaeroides." J Bacteriol **174**(12): 3855-66.

Meister, M. and H. C. Berg (1987). "The stall torque of the bacterial flagellar motor." Biophys J **52**(3): 413-9.

Meister, M., G. Lowe, et al. (1987). "The proton flux through the bacterial flagellar motor." Cell **49**(5): 643-50.

Meister, M., S. R. Caplan, et al. (1989). "Dynamics of a tightly coupled mechanism for flagellar rotation. Bacterial motility, chemiosmotic coupling, protonmotive force." Biophys J **55**(5): 905-14.

Metcalf, W. W. and B. L. Wanner (1993). "Construction of new beta-glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement." Gene **129**(1): 17-25.

Minamino, T. and R. M. Macnab (1999). "Components of the Salmonella flagellar export apparatus and classification of export substrates." J Bacteriol **181**(5): 1388-94.

Minamino, T., B. Gonzalez-Pedrajo, et al. (1999). "FliK, the protein responsible for flagellar hook length control in Salmonella, is exported during hook assembly." Mol Microbiol **34**(2): 295-304.

Minamino, T., H. Doi, et al. (1999). "Substrate specificity switching of the flagellum-specific export apparatus during flagellar morphogenesis in Salmonella typhimurium." Biosci Biotechnol Biochem **63**(7): 1301-3.

Montrone, M., M. Eisenbach, et al. (1998). "Regulation of switching frequency and bias of the bacterial flagellar motor by CheY and fumarate." J Bacteriol **180**(13): 3375-80.

Morgan, D. G., C. Owen, et al. (1995). "Structure of bacterial flagellar filaments at 11 Å resolution: packing of the alpha-helices." J Mol Biol **249**(1): 88-110.

Morton-Firth, C. J. and D. Bray (1998). "Predicting temporal fluctuations in an intracellular signalling pathway." J Theor Biol **192**(1): 117-28.  
*Motors* (translated from Japanese). Oxford: Oxford

Muller, V., C. J. Jones, et al. (1992). "Characterization of the *fliE* genes of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* and identification of the FliE protein as a component of the flagellar hook-basal body complex." J Bacteriol **174**(7): 2298-304.

Mullin, D. A., N. Ohta, et al. (2001). "Organization, expression, and function of *Caulobacter crescentus* genes needed for assembly and function of the flagellar hook." Mol Genet Genomics **265**(3): 445-54.

Muramoto, K. and R. M. Macnab (1998). "Deletion analysis of MotA and MotB, components of the force-generating unit in the flagellar motor of *Salmonella*." Mol Microbiol **29**(5): 1191-202.

Muramoto, K., S. Makishima, et al. (1998). "Effect of cellular level of FliK on flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*." J Mol Biol **277**(4): 871-82.

Muramoto, K., S. Makishima, et al. (1999). "Effect of hook subunit concentration on assembly and control of length of the flagellar hook of *Salmonella*." J Bacteriol **181**(18): 5808-13.

Namba, K., I. Yamashita, et al. (1989). "Structure of the core and central channel of bacterial flagella." Nature **342**(6250): 648-54.

Namba, K., K. Yonekura, et al. (2001). "[Understanding the mechanisms of self-assembly and sub A precision switch of the bacterial flagellum based on its molecular structure]." Tanpakushitsu Kakusan Koso **46**(11 Suppl): 1568-76.

Nambu, T. and K. Kutsukake (2000). "The *Salmonella* FlgA protein, a putative periplasmic chaperone essential for flagellar P ring formation." Microbiology **146** (Pt 5): 1171-8.

Ohnishi, K., K. Kutsukake, et al. (1992). "A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*: an antisigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, sigma F." Mol Microbiol **6**(21): 3149-57.

Ohnishi, K., Y. Ohto, et al. (1994). "FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **176**(8): 2272-81.

Oosawa, K., T. Ueno, et al. (1994). "Overproduction of the bacterial flagellar switch proteins and their interactions with the MS ring complex in vitro." J Bacteriol **176**(12): 3683-91.

- 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." J Bacteriol **175**(18): 6041-5.
- Packer, H. L. and J. P. Armitage (2000). "Behavioral responses of *Rhodobacter sphaeroides* to linear gradients of the nutrients succinate and acetate." App Environ Microbiol **66**(12): 5186-91.
- Packer, H. L., H. Lawther, et al. (1997). "The *Rhodobacter sphaeroides* flagellar motor is a variable-speed rotor." FEBS Lett **409**(1): 37-40.
- Poggio, S., A. Osorio, et al. (2001). "The N terminus of FliM is essential to promote flagellar rotation in *Rhodobacter sphaeroides*." J Bacteriol **183**(10): 3142-8.
- Poggio, S., C. Aguilar, et al. (2000). "sigma(54) Promoters control expression of genes encoding the hook and basal body complex in *Rhodobacter sphaeroides*." J Bacteriol **182**(20): 5787-92.
- Poole, P. S., D. R. Sinclair, et al. (1988). "Real time computer tracking of free-swimming and tethered rotating cells." Anal Biochem **175**(1): 52-8.
- Quandt, J. and M. F. Hynes (1993). "Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria." Gene **127**(1): 15-21.
- Romagnoli, S., H. L. Packer, et al. (2002). "Tactic responses to oxygen in the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* WS8N." J Bacteriol **184**(20): 5590-8.
- Sackett, M. J., J. P. Armitage, et al. (1997). "Photoresponses of the purple nonsulfur bacteria *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodobacter sphaeroides*." J Bacteriol **179**(21): 6764-8.
- Sashida, T. & Kenjo, T. (1993). *An Introduction to Ultrasonic*
- Scharf, B. E., K. A. Fahrner, et al. (1998). "Control of direction of flagellar rotation in bacterial chemotaxis." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 201-6.
- Schmitt, C. K., S. C. Darnell, et al. (1994). "Mutation of *flgM* attenuates virulence of *Salmonella typhimurium*, and mutation of *fliA* represses the attenuated phenotype." J Bacteriol **176**(2): 368-77.
- Shah, D. S. and R. E. Sockett (1995). "Analysis of the *motA* flagellar motor gene from *Rhodobacter sphaeroides*, a bacterium with a unidirectional, stop-start flagellum." Mol Microbiol **17**(5): 961-9.

Shah, D. S., J. P. Armitage, et al. (1995). "Rhodobacter sphaeroides WS8 expresses a polypeptide that is similar to MotB of Escherichia coli." J Bacteriol **177**(10): 2929-32.

Shah, D. S., S. L. Porter, et al. (2000). "Fine tuning bacterial chemotaxis: analysis of Rhodobacter sphaeroides behaviour under aerobic and anaerobic conditions by mutation of the major chemotaxis operons and cheY genes." Embo J **19**(17): 4601-13.

Shah, D. S., T. Pehinec, et al. (2000). "The flagellar filament of Rhodobacter sphaeroides: pH-induced polymorphic transitions and analysis of the fliC gene." J Bacteriol **182**(18): 5218-24.

Silva-Herzog, E. and G. Dreyfus (1999). "Interaction of Flil, a component of the flagellar export apparatus, with flagellin and hook protein." Biochim Biophys Acta **1431**(2): 374-83.

Sockett, H., S. Yamaguchi, et al. (1992). "Molecular analysis of the flagellar switch protein FliM of Salmonella typhimurium." J Bacteriol **174**(3): 793-806.

Sockett, R. E. and J. P. Armitage (1991). "Isolation, characterization, and complementation of a paralyzed flagellar mutant of Rhodobacter sphaeroides WS8." J Bacteriol **173**(9): 2786-90.

Sockett, R. E., J. P. Armitage, et al. (1987). "Methylation-independent and methylation-dependent chemotaxis in Rhodobacter sphaeroides and Rhodospirillum rubrum." J Bacteriol **169**(12): 5808-14.

Suzuki, T. and T. Iino (1981). "Role of the flaR gene in flagellar hook formation in Salmonella spp." J Bacteriol **148**(3): 973-9.

Togashi, F., S. Yamaguchi, et al. (1997). "An extreme clockwise switch bias mutation in fliG of Salmonella typhimurium and its suppression by slow-motile mutations in motA and motB." J Bacteriol **179**(9): 2994-3003.

Toguchi, A., M. Siano, et al. (2000). "Genetics of swarming motility in Salmonella enterica serovar typhimurium: critical role for lipopolysaccharide." J Bacteriol **182**(22): 6308-21.

Toker, A. S. and R. M. Macnab (1997). "Distinct regions of bacterial flagellar switch protein FliM interact with FliG, FliN and CheY." J Mol Biol **273**(3): 623-34.

Turner, L., A. D. Samuel, et al. (1999). "Temperature dependence of switching of the bacterial flagellar motor by the protein CheY(13DK106YW)." Biophys J **77**(1): 597-603.

Uedaira, H., H. Morii, et al. (1999). "Domain organization of flagellar hook protein from *Salmonella typhimurium*." FEBS Lett **445**(1): 126-30.

Ueno, T., K. Oosawa, et al. (1992). "M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FlIF." J Mol Biol **227**(3): 672-7.

Ueno, T., K. Oosawa, et al. (1994). "Domain structures of the MS ring component protein (FlIF) of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*." J Mol Biol **236**(2): 546-55.  
University Press.

Vinson, C. R., P. B. Sigler, et al. (1989). "Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins." Science **246**(4932): 911-6.

Vonderviszt, F., K. Imada, et al. (1998). "Mechanism of self-association and filament capping by flagellar HAP2." J Mol Biol **284**(5): 1399-416.

Vonderviszt, F., P. Zavodszky, et al. (1995). "Structural organization and assembly of flagellar hook protein from *Salmonella typhimurium*." J Mol Biol **251**(4): 520-32.

Vonderviszt, F., S. Aizawa, et al. (1991). "Role of the disordered terminal regions of flagellin in filament formation and stability." J Mol Biol **221**(4): 1461-74.

West, M. A. and G. Dreyfus (1997). "Isolation and ultrastructural study of the flagellar basal body complex from *Rhodobacter sphaeroides* WS8 (wild type) and a polyhook mutant PG." Biochem Biophys Res Commun **238**(3): 733-7.

Williams, A. W., S. Yamaguchi, et al. (1996). "Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **178**(10): 2960-70.

Woese, C. R. (1994). "Microbiology in transition." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(5): 1601-3.

Wolfe, A. J., M. P. Conley, et al. (1987). "Reconstitution of signaling in bacterial chemotaxis." J Bacteriol **169**(5): 1878-85.  
xanthus fruiting body development, social gliding motility, and fibril biogenesis." J Bacteriol **184**(20): 5654-60.

Yamashita, I., F. Vonderviszt, et al. (1995). "Radial mass analysis of the flagellar filament of *Salmonella*: implications for the subunit folding." J Mol Biol **253**(4): 547-58.

Yamashita, I., K. Hasegawa, et al. (1998). "Structure and switching of bacterial flagellar filaments studied by X-ray fiber diffraction." Nat Struct Biol **5**(2): 125-32.

Yonekura, K., S. Maki-Yonekura, et al. (2002). "Growth mechanism of the bacterial flagellar filament." Res Microbiol **153**(4): 191-7.

Zhao, R., C. D. Amsler, et al. (1996). "FliG and FliM distribution in the Salmonella typhimurium cell and flagellar basal bodies." J Bacteriol **178**(1): 258-65.

Zhao, R., S. C. Schuster, et al. (1995). "Structural effects of mutations in Salmonella typhimurium flagellar switch complex." J Mol Biol **251**(3): 400-12.

Zhou, J. and D. F. Blair (1997). "Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for torque generation in the bacterial flagellar motor." J Mol Biol **273**(2): 428-39.

Zhou, J., L. L. Sharp, et al. (1998). "Function of protonatable residues in the flagellar motor of Escherichia coli: a critical role for Asp 32 of MotB." J Bacteriol **180**(10): 2729-35.

11.15 C.M.  
FALLA DE ORIGEN

## Apéndice

**Alineamientos de FlgK R. sphaeroides contra otros 18 géneros  
Predicción de estructura secundaria de FlgK ([www.psiipred.com](http://www.psiipred.com))**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**PAGINACIÓN**  
**DISCONTINUA**

	*	20	*	40										
Mesorhizol	:	--MSLSSA	ISIAO	GA	IMSTARQTSVVTR	NSASNP	VAR	:	38					
Sinorhizom	:	--MSLSSA	IAIAO	S	AFSTTAQQTATVSK	NA	SGNAD	SR	38					
Escherichi	:	----MSSL	INNAM	SG	ENAAQAA	NTASN	ESSYNVAG	TR	36					
Salmonelen	:	----MSSL	INHAM	SG	ENAAQAA	NTVSN	EN	YNVAG	TR	36				
Pseudomaer	:	----MSDL	SIGL	SG	GTSTQTW	TVTGH	NT	VKTPG	SR	36				
Borrelibur	:	--MDST	FSG	EIGKRS	FAHKDA	NTVGH	NS	ATKPG	SR	39				
Treponpall	:	--MSTF	AS	ELGKRA	YAHKQS	QTAGH	MS	SSTPG	SR	38				
Listermono	:	---MRLS	DFNTSL	SG	SAAQIANMVAQQ	NS	MNTPG	IR	37					
Listerinno	:	---MRLS	DFNTSL	SG	SAAQIANMVAQQ	NS	MNTPG	IR	37					
Campylobac	:	-MG-	IFGT	Y	TGV	G	KASEVQ	ATTCN	NS	ANATF	TR	38		
Helicopylo	:	-MGGIL	SS	NTSY	G	QAHQSM	DVTGN	NS	ASDEF	SR	39			
Yerspest	:	----MNF	RTAF	SG	QATQAH	NATSM	NS	MHTPG	SR	35				
Thermotmar	:	PDMSM	FGI	NTAL	G	HAHKL	A	NIVGH	NS	A	ASTPG	SR	40	
Bacillhald	:	MATST	FHG	E	TARRG	M	TQQA	R	TVGH	NS	A	ANTPG	TR	40
Rhodobact	:	----MSI	DIAR	SG	LSYRSA	SVTAE	NS	AN	VNTEG	VR	35			
Clostridiu	:	-MPGL	FGT	N	IGV	SG	TVNQQA	D	VTGH	NS	A	ASTDG	SR	39
Caulobac	:	--MSLN	AI	STAT	SG	MMAQTG	ERVTS	D	NS	A	VNTTG	VR	38	
Buchnera	:	----MSDI	ENSAI	SG	MNAKIM	DNT	IDK	NS	NHPNNK	TLGK	36			
Bacillusub	:	-----			MKLRVD	L	QFFAGEK	TEKAT	PKKRK	24				
					n				y	4				

	*	60	*	80									
Mesorhizol	:	RIAVVT	STAP	-----	CARSVD	Q	VA	D	:	61			
Sinorhizom	:	RMAMLG	TTPG	-----	CAQ	VS	Y	AQ	E	61			
Escherichi	:	QTTIMA	QANSTLG	-----	AGGWVGN	EVY	SG	Q	EY	A	69		
Salmonelen	:	QTTILA	QANSTLG	-----	AGGWIGN	EVY	SG	Q	EY	A	69		
Pseudomaer	:	QDAIQQ	TRIPQFS	-----	GAGYMG	S	Q	VD	R	LASD	69		
Borrelibur	:	QRVTMK	TEIPLYAPQLNRAKKOGLGQ	IV	QS	D	VK	E	79				
Treponpall	:	QRVNLD	SFEPLYRPDLSRAQLPGQIGQ	VT	GS	A	LR	Q	78				
Listermono	:	QAVDQ	TAVYGDGG	-----	LLGGKQTGY	EVK	TD	K	LT	T	72		
Listerinno	:	QAVDQ	TAVYGDGG	-----	LLGGKQTGY	EVK	TD	K	LT	A	72		
Campylobac	:	QRVVQ	T	TNGYIT	TG	-----	GVQVGT	T	AMES	V	LH	E	71
Helicopylo	:	QRVIAP	Q	AAYMYG	-----	TKNVNM	VD	EA	E	VH	E	72	
Yerspest	:	QRAEQ	S	AIGADGQ	-----	GVNAGN	GVN	DG	R	LSQ	68		
Thermotmar	:	QRPVIE	ANPPIPLT	TTLTQPSFPLQMGT	C	AR	K	T	V	LR	A	80	
Bacillhald	:	QRVNFV	Q	TQAYPGVGRNAPSIPGOVGT	VMAGS	Q	IR	A	80				
Rhodobact	:	REAVLA	Q	VPGGQIS	----	PTSAATS	SGQ	VR	ED	R	AF	G	71
Clostridiu	:	QRVDIQ	TRSPYGMPSLNSAAGPGLFGT	CAE	YS	Q	VR	S	79				
Caulobac	:	KTVSQ	SNLLSNG	-----	MGV	GVN	D	AK	K	ATH	Q	66	
Buchnera	:	RVVIENT	VQENK	-----	NSTVK	V	KE	YDNY	D	64			
Bacillusub	:	D	-----	-----						25			
					g				r				

	*	100	*	120								
Mesorhizol	:	LF	FRONL	LGALSAYS	GNALYSG	DQLD	VDV	VNG	-VDN	ASSP	:	100
Sinorhizom	:	AF	LKQNL	IGISQSSA	QSSLLSG	FEIMK	SALGG	-NDY	ESSP	:	100	
Escherichi	:	FT	TNQLRAA	QTQSSGLT	ARYEQ	SKIDN	LS---	TST	SSL	:	106	
Salmonelen	:	FT	TNQLRGA	QNSSSLT	TRYEQ	SKIDN	LA---	DKS	SSL	:	106	
Pseudomaer	:	FT	TGQLRN	NATSONSEL	NAFLGQ	DQLNS	LA---	DNT	TGV	:	106	
Borrelibur	:	LF	NTRII	EESHRLG	YWTSDKF	SEILED	YN--	EPED	QSI	:	117	
Treponpall	:	LF	DSRIVS	QTDEQGYW	STRDAY	RLLEQ	YN--	EPEDIA	V	:	116	
Listermono	:	AF	TTQYNN	QIAKQAS	ASLYQSGA	NQALN	FG--	TPGK	NTP	:	110	
Listerinno	:	AF	TTQYNN	QIAKQAS	ASLYQSGA	GOALN	FG--	TPGK	NTP	:	110	
Campylobac	:	YS	YKLG	GASTQLE	YTKYMAST	QEI	AQRFP	--DL	QNTGI	:	109	
Helicopylo	:	FV	FARYT	KRAN	YENTYDTE	FSH	KEASAY	FP--	DIDEASL	:	110	
Yerspest	:	YV	VMQEW	RANSQQ	YYDAGEQY	NAVEL	VS---	NEST	SL	:	105	
Thermotmar	:	FD	VQYRQ	VNNRYN	YWDTVLSN	HFIEQ	LA--	EPGE	DGI	:	118	
Bacillhald	:	FD	LQYRQ	HNTQNGY	WDARADA	IRME	LN--	DLDS	NGL	:	118	
Rhodobact	:	LV	AQRLR	TAEGAA	SAETLDTT	GAL	SFFL---	AGAG	SV	:	108	
Clostridiu	:	FD	YQIRD	LTTTRNG	TFKTTNNY	SEVES	FD--	ESS	SAGI	:	117	
Caulobac	:	FF	QASLN	AAESGR	ASIVAST	NSAQ	FGD-	PSG	TSF	:	105	
Buchnera	:	FL	LEEK	RKTNAE	VQDEQTK	IEQ	LKLED	LC---	EKSNIF	:	101	
Bacillusub	:	---	TRK	GQVAK	SSDVNT	AVSL	VIFLS	IAIG	PYMRDL	:	62	

	*	140	*	160										
Mesorhizol	:	ST	AIANL	QALQLYA	-TSPSN	QNLGSS	VDA	AKQ	VRSLN	:	139			
Sinorhizom	:	ST	YLSA	RNSLQ	TFA-ST	PGNAT	IATV	SDAS	DANSIS	:	139			
Escherichi	:	AT	OMQD	TSLQ	TLV-SNA	EDPAAR	QA	FGK	SEG	VNQFK	:	145		
Salmonelen	:	SG	SLOS	TSLQ	TLV-SNA	EDPAAR	QA	FGK	AEG	VNQFK	:	145		
Pseudomaer	:	SP	AMQR	SALQ	TAA-QN	PSSTE	AREA	VQA	QGF	SKTFN	:	145		
Borrelibur	:	RK	RND	ESW	DLA-NQ	PQGLA	ERKI	ER	GKSF	CBGIR	:	156		
Treponpall	:	RT	LDQ	DGW	QELS-VY	PEARA	ARQV	TRA	QT	TDAIH	:	155		
Listermono	:	SD	NLDN	TAWA	AALA-KN	PDQAT	NTTA	SS	MSI	FTDQLN	:	149		
Listerinno	:	SD	NLDN	TAWA	AALA-KN	PDQAT	NTTA	SS	MSI	FTDQLN	:	149		
Campylobac	:	LQ	LDN	NKAW	NDF	-SNP	NENAT	KIA	VKAS	QT	TESVN	:	148	
Helicopylo	:	FT	DQD	NSW	KELS-KNA	KDSAQ	KQA	QOK	TEA	THNIK	:	149		
Yerspest	:	AT	GLNN	SSL	SAAT-QL	PDS	PPMR	QQ	ESANA	ALRFN	:	144		
Thermotmar	:	RS	LDN	NAF	KEVM-SD	PSST	ASKA	EV	SRA	QV	VSQIK	:	157	
Bacillhald	:	AN	QINQ	SKL	QDLS-GD	PEDT	AVRY	VRE	QAVS	ADSFN	:	157		
Rhodobact	:	PE	ALTG	DAL	NGLG-AT	PRD	GALR	QV	AAG	QT	FASSFT	:	147	
Clostridiu	:	SAS	IT	SAI	QNYTN	ASSAT	P	TSIKS	NSNA	Q	TNQLN	:	157	
Caulobac	:	FT	VDDV	AAF	SSAQ-DD	PSS	LLR	TQ	TR	LD	DFLSGSS	:	144	
Buchnera	:	SQ	LDN	QA	EEDI-VL	AKKN	VFNEN	Q	KKLS	N	VFAIK	:	140	
Bacillusub	:	LS	FLET	TES	LTMK	LES	NVHT	LF	VSI	KDM	GM	LAPIL	:	102

THIS CAN  
 FALLA LE ORIGEN

	*	180	*	200
Mesorhizol	:	EGSKATQDFRTQTDGQIDTAVKDIENSLLGQFQDANQAVIS	:	179
Sinorhizom	:	KTSAAVQDLRLDSDKKAIEEVANIRLLAQFETANNAVKQ	:	179
Escherichi	:	TTDQYTRDQDKQVNIAGASVDQANNYAKQASINDDQSR	:	185
Salmonelen	:	TTDQYTRDQDKQVNIAGSSVAQANNYAKQHANNDDQSR	:	185
Pseudomaer	:	TLYDQIDKQNSLINQQLGALTSQVANNLSQSWAEYNDATAK	:	185
Borrelibur	:	NRFHSEIRIYIMANDEIKITTDDEANNYIRNANNKQSK	:	196
Treponpall	:	HQYRGI VGI R D M L N A D I E A T V E Q V N D L L A K A Q I E Q V K	:	195
Listermono	:	QLHSGEKELETTIAADTDAAIQDINSLIKKQGSFNKAGN	:	189
Listerinno	:	QLHSGEKELETTIAADTDAAIQDINSLIKKQGSFNKAGN	:	189
Campylobac	:	NTFATIDDKIQKKVND DIKNTVDEARIGEEATFNKQVYG	:	188
Helicopylo	:	DTRERTTTLQHKASEELKSVIKEVNSLGSQAEFNKRKE	:	189
Yerspest	:	NVNNFIVQKKSIGQQRDITVKEINSLTRSADYNQQLK	:	184
Thermotmar	:	DLYGRIEQLREDIDAEIVQRVSEINQMIKRADFNKTRT	:	197
Bacillhald	:	EQYMLEQVRDDYGNEIGVVTDHINSLLSQNEFNQAQRK	:	197
Rhodobact	:	TVASGAGLRDEVTGLAGQTAVEASQTLRQAEFNGRVTG	:	187
Clostridiu	:	NIYTOITKLGKGDVQLGINDDIISVNSMLDKVDSFNQQLIT	:	197
Caulobac	:	RITASIKLKGKADTRIAADVGRVNDLLSQDADATDITR	:	184
Buchnera	:	DFDKKIKFLEKDIKDSVINNLKKVINSLIDEIHDITIDTR	:	180
Bacillusub	:	LVALVAGVVSNYMQVGLFSAEVNQPKLEKIDFNKGFKRI	:	142

n n

	*	220	*	240
Mesorhizol	:	GT--RSGTDVSDALDQRTAATKKIADYFPISTF-----	:	210
Sinorhizom	:	AT--AAGTDAALDREKIKKQVSELVGFSTV-----	:	210
Escherichi	:	LTGVGAGASPNLIDQRTQVSELNQIVGYEVS-----	:	218
Salmonelen	:	MTGVGAGASPNLIDQRTQVSELNKIVGYEVS-----	:	218
Pseudomaer	:	AK--SAGAVPNDLIDARDEAVRKLSEMVGVTAV-----	:	216
Borrelibur	:	SQ--AMKDNPNDEMEARLLWKEKLGNISSVIE-----	:	227
Treponpall	:	SK--AMGDNPNDELDRRETIVESLAHREIVRVD-----	:	226
Listermono	:	AG----SNPPNDELNQRDQITSTMAGYAGISVS-----	:	218
Listerinno	:	AG----SNPPNDELNQRDQITSTMAGYAGISVS-----	:	218
Campylobac	:	QEALP-TEHANEIRRRDEIELTSLKLVSAVASKNEINQD	:	227
Helicopylo	:	VENNKSLKHANEIRKREFEFHIRELGGNVFKSSIKTH	:	229
Yerspest	:	NR--SDGNNINDLIDKQELQIKKLSGLIETQVN-----	:	215
Thermotmar	:	SM--MLNSPPNDELIDEREIRREDELSNLANINYTEAEDGQI	:	235
Bacillhald	:	VE--PSGYVTNDIYEQRRYDQISAITPIEVQRVKSGGN	:	235
Rhodobact	:	AQ----QSALNPELDERERITGELSRITGVQASFDALGRT	:	223
Clostridiu	:	VK--QAGKEPNDEISRLSDQISEKFGINVDSSPDFDG	:	235
Caulobac	:	AK--VAGADATGAENVQSSINDEL SKLNVQVIS-----	:	215
Buchnera	:	FPVLKFPNRVGLIEQRIRVDEINGLIGIKVI-----	:	213
Bacillusub	:	YS-----MRAIVEIKSILKIVVVG-----	:	162

1 rd 6

19115 CON  
FALLA DE ORIGEN

	*	260	*	280	
Mesorhizol	:	-----	:	-----	-
Sinorhizom	:	-----	:	-----	-
Escherichi	:	-----	:	-----	-
Salmonelen	:	-----	:	-----	-
Pseudomaer	:	-----	:	-----	-
Borrelibur	:	-----	:	-----	-
Treponpall	:	-----	:	-----	-
Listermono	:	-----	:	-----	-
Listerinno	:	-----	:	-----	-
Campylobac	:	NRLD-----	:	-----	231
Helicopylo	:	SLTD-----	:	-----	233
Yerspest	:	-----	:	-----	-
Thermotmar	:	TLRIGNQIVLNGSTYRELRALERPYGKGYHELFGVNS---	:	-----	272
Bacillhald	:	P-----	:	-----	236
Rhodobact	:	TVTIGSAPGGPLLLLEGTAASTLGVAEAGGLVLEVTRAGAT	:	-----	263
Clostridiu	:	EDVS-----	:	-----	239
Caulobac	:	-----	:	-----	-
Buchnera	:	-----	:	-----	-
Bacillusub	:	-----	:	-----	-

	*	300	*	320	
Mesorhizol	:	-----	:	-----	-
Sinorhizom	:	-----	:	-----	-
Escherichi	:	-----	:	-----	-
Salmonelen	:	-----	:	-----	-
Pseudomaer	:	-----	:	-----	-
Borrelibur	:	-----	:	-----	-
Treponpall	:	-----	:	-----	-
Listermono	:	-----	:	-----	-
Listerinno	:	-----	:	-----	-
Campylobac	:	-----	:	-----	-
Helicopylo	:	-----	:	-----	-
Yerspest	:	-----	:	-----	-
Thermotmar	:	-----	:	-----	-
Bacillhald	:	-----	:	-----	-
Rhodobact	:	LQSRQITGGSLQGYASALSAVDNAAAELDALARQLVAEMN	:	-----	303
Clostridiu	:	-----	:	-----	-
Caulobac	:	-----	:	-----	-
Buchnera	:	-----	:	-----	-
Bacillusub	:	-----	:	-----	-

	*	340	*	360	
Mesorhizol	:	-----	:	-----	:
Sinorhizom	:	-----	:	-----	:
Escherichi	:	-----	:	-----	:
Salmonelen	:	-----	:	-----	:
Pseudomaer	:	-----	:	-----	:
Borrelibur	:	-----	:	-----	:
Treponpall	:	-----	:	-----	:
Listermono	:	-----	:	-----	:
Listerinno	:	-----	:	-----	:
Campylobac	:	-----	:	-----	:
Helicopylo	:	-----	:	-----	:
Yerspest	:	-----	:	-----	:
Thermotmar	:	-----	:	-----	:
Bacillhald	:	-----	:	-----	:
Rhodobact	:	TVHAQGIDQSGARGGDLFALEGWQVAADAGNRGTGGASV	:		343
Clostridiu	:	-----	:	-----	:
Caulobac	:	-----	:	-----	:
Buchnera	:	-----	:	-----	:
Bacillusub	:	-----	:	-----	:

	*	380	*	400	
Mesorhizol	:	-----	:	-----	:
Sinorhizom	:	-----	:	-----	:
Escherichi	:	-----	:	-----	:
Salmonelen	:	-----	:	-----	:
Pseudomaer	:	-----	:	-----	:
Borrelibur	:	-----	:	-----	:
Treponpall	:	-----	:	-----	:
Listermono	:	-----	:	-----	:
Listerinno	:	-----	:	-----	:
Campylobac	:	-----	:	-----	:
Helicopylo	:	-----	:	-----	:
Yerspest	:	-----	:	-----	:
Thermotmar	:	-----	:	QLILSDGKLKAL	284
Bacillhald	:	-----	:	-----	:
Rhodobact	:	AFDTATAPGPLTLLHDAAAGLWHAYDAGGTLGSGAETLA	:		383
Clostridiu	:	-----	:	-----	:
Caulobac	:	-----	:	-----	:
Buchnera	:	-----	:	-----	:
Bacillusub	:	-----	:	-----	:

MISS CON  
 FALLA LE ORIGEN

	*	420	*	440			
Mesorhizol	:	-----TRGDNDMVT	TTTGD	TTT	FETIP-----	: 232	
Sinorhizom	:	-----TRANNDTV	YTS	GT	VTFETLP-----	: 232	
Escherichi	:	-----VQDGGTYN	TMAN	YS	TVQGS-----	: 239	
Salmonelen	:	-----VQDGGTYN	TMAN	YT	TVQGS-----	: 239	
Pseudomaer	:	-----TQDDNSVS	FIGS	QP	TVGN-----	: 237	
Borrelibur	:	-----NKQDPNEF	IHA	E	RHYQGS-----	: 248	
Treponpall	:	-----VRDEDESY	IHS	A	LETVQK-----	: 247	
Listermono	:	-----AHPNNPDVYDVTI	GR	S	TVQG-----	: 239	
Listerinno	:	-----AHPNNPDVYDVTI	GR	S	TVQG-----	: 239	
Campylobac	:	-----TTITDPGHQYN	SI	E	FSVLDGI-----	: 254	
Helicopylo	:	-----KDSADFDESYN	NIGH	FN	VDGS-----	: 257	
Yerspest	:	-----QAEDGTYR	SVK	Q	QPIVNGA-----	: 236	
Thermotmar	:	IDLRDSSIVKYM	MRKL	DEFV	FFITDSLNI	VHRDGFESNGVT : 324	
Bacillhald	:	-----NPVAEGAVTVTLKGT	IT	V	ANGAD-----	: 260	
Rhodobact	:	LTGLTLQMTGA	AMDG	RRLT	SPRO	RAEDMRFL	LLTDTRQI : 423
Clostridiu	:	-----VLDKVGNVNPT	VKSV	ENDM	NRFS-----	: 264	
Caulobac	:	-----PRTLGGIV	RST	E	LNIFAGDG-----	: 236	
Buchnera	:	-----KDHDNYK	NLNN	IS	VDNNK-----	: 234	
Bacillusub	:	-----FAAFAL	LWLHY	GE	LRP-----	: 180	

g

	*	460	*	480			
Mesorhizol	:	-----				: -	
Sinorhizom	:	-----				: -	
Escherichi	:	-----				: -	
Salmonelen	:	-----				: -	
Pseudomaer	:	-----				: -	
Borrelibur	:	-----				: -	
Treponpall	:	-----				: -	
Listermono	:	-----				: -	
Listerinno	:	-----				: -	
Campylobac	:	-----				: -	
Helicopylo	:	-----				: -	
Yerspest	:	-----				: -	
Thermotmar	:	TNLNFFK	KIEAF	SDD	PSIFRIKGNR	KLEMGPYHTV : 359	
Bacillhald	:	-----				: -	
Rhodobact	:	AAAAPYIV	SAAS	GNAG	SAQAS	FVPVTSTL	PATGSLGGLLT : 463
Clostridiu	:	-----				: -	
Caulobac	:	-----				: -	
Buchnera	:	-----				: -	
Bacillusub	:	-----				: -	

	*	500	*	520	
Mesorhizol	:	-----	:	-----	:
Sinorhizom	:	-----	:	-----	:
Escherichi	:	-----	:	-----	:
Salmonelen	:	-----	:	-----	:
Pseudomaer	:	-----	:	-----	:
Borrelibur	:	-----	:	-----	:
Treponpall	:	-----	:	-----	:
Listermono	:	-----	:	-----	:
Listerinno	:	-----	:	-----	:
Campylobac	:	-----	:	-----	:
Helicopylo	:	-----	:	-----	:
Yerspest	:	-----	:	-----	:
Thermotmar	:	-----	:	-----	:
Bacillhald	:	-----	:	-----	:
Rhodobact	:	DAGGADAATLIRAGVVGHI	:	PAGTGSVTLASLGSQSQQEFL	:
Clostridiu	:	-----	:	-----	:
Caulobac	:	-----	:	-----	:
Buchnera	:	-----	:	-----	:
Bacillusub	:	-----	:	-----	:

503

	*	540	*	560	
Mesorhizol	:	-----	:	-----	:
Sinorhizom	:	-----	:	-----	:
Escherichi	:	-----	:	-----	:
Salmonelen	:	-----	:	-----	:
Pseudomaer	:	-----	:	-----	:
Borrelibur	:	-----	:	-----	:
Treponpall	:	-----	:	-----	:
Listermono	:	-----	:	-----	:
Listerinno	:	-----	:	-----	:
Campylobac	:	-----	:	-----	:
Helicopylo	:	-----	:	-----	:
Yerspest	:	-----	:	-----	:
Thermotmar	:	-----	:	-----	:
Bacillhald	:	-----	:	-----	:
Rhodobact	:	LSDPAAAGATTLSF	:	SIGGTVHVSFDLSALGATDPATLAAAL	:
Clostridiu	:	-----	:	-----	:
Caulobac	:	-----	:	-----	:
Buchnera	:	-----	:	-----	:
Bacillusub	:	-----	:	-----	:

543

TEXIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



	*	580	*	600	
Mesorhizol	:	-----RTVSFTPAAGYAAGAPGNTIYIDNVPVSAGSGG	:		265
Sinorhizom	:	-----REVTFAPKSAYDATVTGNGIFIDGVPLAAGSGA	:		265
Escherichi	:	-----TARQLAAVPSSADPSRRTTVAYVDGTAGNIEIPE	:		272
Salmonelen	:	-----TARQLAAVPSSADPRTTVAYVDEAAGNIEIPE	:		272
Pseudomaer	:	-----TVSTLSVVPGLDDPTRYQVQLTLGDS--TQNV	:		268
Borrelibur	:	-----IANEFKLEATNGPTRTRWNILWANND-----	:	K	275
Treponpall	:	-----SYKTLGLVSGTTPEGYVSVVWKDSGD-----	:	R	274
Listermono	:	-----DETTEITSTRTATGFEFVSDGQK-----	:		262
Listerinno	:	-----DETTEITSTRTATGFEFVSDGQK-----	:		262
Campylobac	:	-----NFHPLKL-DYDDKNKSYSIYYETPDEKVRDLT	:		285
Helicopylo	:	-----IFHPLVVKESENKGGLNQVYFQSDDFKLTNIT	:		289
Yerspest	:	-----VAAELAVDTSSVDTKITLHFSGATQG-----	:	M	263
Thermotmar	:	---TGLHSANSQAEIEGRRFNSNDVVLSFDGGSSNVLNIS	:		396
Bacillhald	:	---KYALQQFEVTKTENS LGDEYVSGISISNGTDTVNLNV	:		297
Rhodobact	:	NAGAVSTGGQTLAELGVTASGSTGRFTLMLGQGD FDAGAS	:		583
Clostridiu	:	-----YIDAVVKGDTGSKNGAGEE IYSYEV DYYKLG	:		297
Caulobac	:	-----AAKVTYQTSATATGFLT VQLANGSDY PVP	:		265
Buchnera	:	-----KQNLIALTSTSDERYISVGYVDTNDKVAKKIE	:		266
Bacillusub	:	-----LLTPEEALSFVSKLTLWMGLSG-----	:		202

	*	620	*	640	
Mesorhizol	:	NTTASGCKKAGLQLR-----	:		280
Sinorhizom	:	D TSAQCKKAGLQLR-----	:		280
Escherichi	:	KLLNTCSIFGGITFR-----	:		287
Salmonelen	:	KLLNTCSIFGGITFR-----	:		287
Pseudomaer	:	RLVSGCQGGGLAYR-----	:		283
Borrelibur	:	AYLKTCKKIGSLNIR-----	:		290
Treponpall	:	AHFSGCKKAAALIELR-----	:		289
Listermono	:	LNMPECSIIASVRVN-----	:		277
Listerinno	:	LNMPECSIIASVRVN-----	:		277
Campylobac	:	AKISGCGGGAQDLRGRN-----	:		303
Helicopylo	:	DKLNOCKKAGALENV-----	:		303
Yerspest	:	NMSCGCGGINDYE-----	:		278
Thermotmar	:	AGTTICDVGSWNLLG-----	:		412
Bacillhald	:	QELPQCGKGLAEAFG-----	:		313
Rhodobact	:	VTGSACTVAGSPTAAEPAGGTIQIITRDGRHIAGAALTAE	:		623
Clostridiu	:	KASSDNRKLNINMTES-----	:		314
Caulobac	:	LNISSCEIRGLDVR-----	:		280
Buchnera	:	DMIPTATEGALPKFR-----	:		281
Bacillusub	:	---AC---ALPILAG-----	:		211

g

TESIS CON  
 FALLA LE ORIGEN

	*	660	*	680	
Mesorhizol	:	-----	:	-----	:
Sinorhizom	:	-----	:	-----	:
Escherichi	:	-----	:	-----	:
Salmonelen	:	-----	:	-----	:
Pseudomaer	:	-----	:	-----	:
Borrelibur	:	-----	:	-----	:
Treponpall	:	-----	:	-----	:
Listermono	:	-----	:	-----	:
Listerinno	:	-----	:	-----	:
Campylobac	:	-----	:	-----	:
Helicopylo	:	-----	:	-----	:
Yerspest	:	-----	:	-----	:
Thermotmar	:	-----	:	-----	:
Bacillhald	:	-----	:	-----	:
Rhodobact	:	EAALLL	:	TEANGFLPGAVYDASTLNGAGGTGFRGTGIAGAI	:
Clostridiu	:	-----	:	-----	:
Caulobac	:	-----	:	-----	:
Buchnera	:	-----	:	-----	:
Bacillusub	:	-----	:	-----	:

663

	*	700	*	720	
Mesorhizol	:	-----	:	-----	:
Sinorhizom	:	-----	:	-----	:
Escherichi	:	-----	:	-----	:
Salmonelen	:	-----	:	-----	:
Pseudomaer	:	-----	:	-----	:
Borrelibur	:	-----	:	-----	:
Treponpall	:	-----	:	-----	:
Listermono	:	-----	:	-----	:
Listerinno	:	-----	:	-----	:
Campylobac	:	-----	:	-----YS	:
Helicopylo	:	-----	:	-----YN	:
Yerspest	:	-----	:	-----	:
Thermotmar	:	-----	:	-----	:
Bacillhald	:	-----	:	-----	:
Rhodobact	:	LPGERVLSLHPADPVAGSSG	:	LLPPASALPSLTLEAAGGLP	:
Clostridiu	:	-----	:	-----	:
Caulobac	:	-----	:	-----	:
Buchnera	:	-----	:	-----	:
Bacillusub	:	-----	:	-----	:

305

305

703

	*	740	*	760				
Mesorhizol	:	-----	DGVASTMQSQI	DETARGLITAF	FAETAPA-----	: 308		
Sinorhizom	:	-----	DDIAPTFFQSQI	DEMARGLVTLF	KEGG-----	: 306		
Escherichi	:	-----	SQDLQTRNTI	GQLALAF	AEAFNTQHKAGFDAN	: 320		
Salmonelen	:	-----	SQDLQTRNTI	GQLALAF	ADAFNAQHTKGYDAD	: 320		
Pseudomaer	:	-----	DTVLDSYK	GQLALTFAD	TVNKQLGQGLDLA	: 316		
Borrelibur	:	-----	DEEIKNEINE	NNIAANI	IEIVNEIHEAGRMD	: 323		
Treponpall	:	-----	DTDVRDELRK	DTMAMNFVD	LVNNVHRNAMGLN	: 322		
Listermono	:	-----	QNEIKSYQEK	ETFSNGLAKAL	DDIQVKNVNKT	: 310		
Listerinno	:	-----	QNEIKSYQEK	ETFSNGLAKAL	DDIQVKNVNKT	: 310		
Campylobac	:		KSEKGYEDG	IIQGYMDSI	DTFAKTMINETNNLYASSAKSS	: 345		
Helicopylo	:		DGSNGTLKGLQDY	IDL	DSFARGLIESTNAIYAQSASHH	: 345		
Yerspest	:	-----	LTTLKKLQDST	QEMAKTVADK	FNDQLGKG----	: 307		
Thermotmar	:	--	TSLKVGTHAGGYR	LY	FEDSTGSLRNLFLSLGDSLSQM	: 450		
Bacillhald	:	-----	YYQDPTDIDN	SEVNGIY	PKMLAELNVMVRTFVEAL	: 348		
Rhodobact	:		LPVQLPAGASAA	EMAQ	INAFGAGIEAEARTGV	TI	EAPAD	: 743
Clostridiu	:	---	QAKEIEQARV	LMTDKNGIAL	SSADGKTKLDGTASSYN	: 351		
Caulobac	:	-----	NIDLVLNSD	Q	GEFTSRATEEINRAANAASSVP	: 313		
Buchnera	:	-----	REELTNTRNK	IGQLI	INFADSINSYHAIGYDMF	: 314		
Bacillusub	:	-----	LDYLYQRF	DY	EKNIKMSKQDIKDEYKSEGD--	: 242		

	*	780	*	800		
Mesorhizol	:	-----				: -
Sinorhizom	:	-----				: -
Escherichi	:		GDAGEDFF	-----		: 328
Salmonelen	:		GNKKGKDF	-----		: 328
Pseudomaer	:		GKAGANLFGD	INDP	-----	: 330
Borrelibur	:		KKNGRSFF	SQELKLTDDR	GRYDT	: 346
Treponpall	:		GKTGLDFF	KEQYF	INNVDGNFDR	: 345
Listermono	:		MDDLQKIN	-----		: 318
Listerinno	:		MDDLQKIN	-----		: 318
Campylobac	:		VTSDYLSG	-----		: 353
Helicopylo	:		IEGEPVE	-----		: 352
Yerspest	:	-----				: -
Thermotmar	:		GFDTETKGYIT	IKESDLSGLSSG	-----	: 473
Bacillhald	:		NSAHRIGY	-----		: 356
Rhodobact	:		GTLTFALT	GTNLS	PVRISGAVAGGRMDALALAVNAVSAAT	: 783
Clostridiu	:		FSDLSLFK	PVGGDINGE	QTVQDKIN	: 376
Caulobac	:		APTSLTGR	TGLDAQAAL	TG	: 333
Buchnera	:		GHLGRQIFN	-----		: 323
Bacillusub	:	-----				: -

TELIS CON  
 FALLA LE ORIGEN

	*	820	*	840	
Mesorhizol	:	-----	:	-----	:-
Sinorhizom	:	-----	:	-----	:-
Escherichi	:	-----	:	-----	:-
Salmonelen	:	-----	:	-----	:-
Pseudomaer	:	-----	:	-----	:-
Borrelibur	:	-----	:	-----	:-
Treponpall	:	-----	:	-----	:-
Listermono	:	-----	:	-----	:-
Listerinno	:	-----	:	-----	:-
Campylobac	:	-----	:	-----	:-
Helicopylo	:	-----	:	-----	:-
Yerspest	:	-----	:	-----	:-
Thermotmar	:	-----	:	-----	:-
Bacillhald	:	-----	:	-----	:-
Rhodobact	:	GVRAELSPDGARLLL	:	VQDGGADIGIVGLRHTAGAAVTLQ	823
Clostridiu	:	-----	:	-----	:-
Caulobac	:	-----	:	-----	:-
Buchnera	:	-----	:	-----	:-
Bacillusub	:	-----	:	-----	:-

	*	860	*	880	
Mesorhizol	:	-----	:	-----	:-
Sinorhizom	:	-----	:	-----	:-
Escherichi	:	-----	:	-----	:-
Salmonelen	:	-----	:	-----	:-
Pseudomaer	:	-----	:	-----	:-
Borrelibur	:	-----	:	-----	:-
Treponpall	:	-----	:	-----	:-
Listermono	:	-----	:	-----	:-
Listerinno	:	-----	:	-----	:-
Campylobac	:	-----	:	-----	:-
Helicopylo	:	-----	:	-----	:-
Yerspest	:	-----	:	-----	:-
Thermotmar	:	-----	:	-----	:-
Bacillhald	:	-----	:	-----	:-
Rhodobact	:	TDAEGSPAGAPLTL	:	SGTADSARFTGELRLSSASGFSADLG	863
Clostridiu	:	-----	:	-----	:-
Caulobac	:	-----	:	-----	:-
Buchnera	:	-----	:	-----	:-
Bacillusub	:	-----	:	-----	:-

1985 CON  
 FALLA DE ORIGEN

	*	900	*	920	
Mesorhizol	:	-----	-----	-----	:-
Sinorhizom	:	-----	-----	-----	:-
Escherichi	:	-----	-----	-----	:-
Salmonelen	:	-----	-----	-----	:-
Pseudomaer	:	-----	-----	-----	:-
Borrelibur	:	-----	-----	-----	:-
Treponpall	:	-----	-----	-----	:-
Listermono	:	-----	-----	-----	:-
Listerinno	:	-----	-----	-----	:-
Campylobac	:	-----	-----	-----	:-
Helicopylo	:	-----	-----	-----	:-
Yerspest	:	-----	-----	-----	:-
Thermotmar	:	-----	-----	-----	:-
Bacillhald	:	-----	-----	-----	:-
Rhodobact	:	GVRQDAAVDPMSGGLVSRGVSGAGGVQTYGFTYDPAFDGA			903
Clostridiu	:	-----	-----	-----	:-
Caulobac	:	-----	-----	-----	:-
Buchnera	:	-----	-----	-----	:-
Bacillusub	:	-----	-----	-----	:-

	*	940	*	960	
Mesorhizol	:	-----	-----	-----MPNAAGLFTWSGA	321
Sinorhizom	:	-----	-----	-----LP---GLFTWSGG	316
Escherichi	:	-----	-----	-----AIGKPAVLQNTKNKGD-VAIGA	349
Salmonelen	:	-----	-----	-----SIGSPVVYSNSNNADKTVSLTA	350
Pseudomaer	:	-----	-----	-----DITALRVLAKNGNTGN-VHANL	351
Borrelibur	:	-----	-----	-----NGNGQFDSVHIFKINSTNEIFPEEKLGFYGTCLKF	380
Treponpall	:	-----	-----	-----DGDGQYDSSYIFRISGAHALDAREQVGLTGVTIL	379
Listermono	:	-----	-----	-----DALQANPNDEKLLSNRDE	336
Listerinno	:	-----	-----	-----DALQANPNDEKLLSNREE	336
Campylobac	:	-----	-----	-----LKGDIPLVNYDRTIQPGSFDIVIIY	377
Helicopylo	:	-----	-----	-----FNSDEAFKDTNYNIKNGSFDLIAY	376
Yerspest	:	-----	-----	-----	-
Thermotmar	:	-----	-----	-----VYNINVEYILEDGTRQTTETISVDLSSGVNLSNIE	507
Bacillhald	:	-----	-----	-----TLEDPLTGEVSLGGD	371
Rhodobact	:	GLSADGTFAQAGSAQYAMTVGNRTVTLDAAGVSDGAGV			943
Clostridiu	:	-----	-----	-----GYIDQMNRAKTIALAINTVSSG	399
Caulobac	:	-----	-----	-----FTGKTTIALTNASGVIQRID	354
Buchnera	:	-----	-----	-----ISQPEVIASSNRSSSKVSA	343
Bacillusub	:	-----	-----	-----PIIKS	247

TESIS CON  
 FALLA LE ORIGEN

	*	980	*	1000	
Mesorhizol	:	PAVPAAGTLVNGLAGTISINAAMDPSAGGNPTLLRDGGAN	:		361
Sinorhizom	:	-TVPAAGAVQPGLAASLVN----		PAAKANPFLLRDGGFN	351
Escherichi	:	TVTDAASAVLATDYKISFDNNQWQVTRLASNTTFTVTPDAN	:		389
Salmonelen	:	KVVDSTKVQATDYKIVFDGTDWQVTRTADNTTFTATKDDAD	:		390
Pseudomaer	:	NITDTSKLNSSDFRLDFDGTNFTARRLGDDASMQVTVSGT	:		391
Borrelibur	:	EATNSNEIVEIPYNAPDTVQDVINRINNSNAQVTARINSE	:		420
Treponpall	:	SAADG--TVEVPYAATDMVADVVARINQANAQAEVTAFLDQN	:		417
Listermono	:	LLRQLEKFPVTRSGDTLTIGGVDHPVDTLGTSTYVTDVN	:		376
Listerinno	:	LLRQLEKFPVTRSGDTLTIGGVDHAIDTLGTSTYVTDVN	:		376
Campylobac	:	DDKGDKKLTKTITIDVNTTMNDIMRQINANTDDNDNKNNSN	:		417
Helicopylo	:	NTDGKEIARKTIAITPITTMNDIIQAINANTDDNQDNNTE	:		416
Yerspest	:	--TDFTGAPGQDLFVFNPSDPNGMLQLSAITAEQLALAAH	:		345
Thermotmar	:	ASINSSSHLRAQIYADPSTGENMLVIVPDEQLNFDPSAVK	:		547
Bacillhald	:	FFVFDENKPAAGTLKVSDDILNNANNIAAARVNLDGLTDDA	:		411
Rhodobact	:	ASALAALLRAEAPAATLTGGPVAALPADGRSVSVSYEGQS	:		983
Clostridiu	:	MVNPTQSQLASDGVHSTPSPLELPIFVNSDFTKASNTTF	:		439
Caulobac	:	IDFDAGTMTVNGAAGPAFTPANFLAQLNTALGGQGAAGFS	:		394
Buchnera	:	KWLVISDAKNTNYVIYFKDKNFIVTRLSHDSTIQPKVHVE	:		383
Bacillusub	:	KIKQRQREMAMRRMMQEVPKADVIITNPTHYAIALKYDEE	:		287

	*	1020	*	1040	
Mesorhizol	:	GA-----		AYVANTTGGPSYSSLLIAYGDR	385
Sinorhizom	:	G-----		VVSNPDGNAGYTVLLDGFVTA	373
Escherichi	:	G-----		KVAFDGLELTFGTGTPAVNDSFTLKPVSDAI	420
Salmonelen	:	G-----		KLEIDGLKVTGVTGAQKNDSFLLKPVSNAI	421
Pseudomaer	:			GPYTLSEFKDANGVDQGFVSTLDQLPAAGDRFTLQPTRRGA	431
Borrelibur	:			GKLEIKAVK-EQEDENITFKIKHIEDSGSFLTKYTGILNA	459
Treponpall	:			HKLVLKATT-AHNSDNPDFVIRHVEDSGRFLAGYAGLLAA	456
Listermono	:	D-----		FSIPIFAQSSGKWILNPAITSN	399
Listerinno	:	D-----		FSIPIFTQSSGKWILNPAITSN	399
Campylobac	:			DDVDDHINASFSYDAKTGDGLFQINAKSGFKVAIEDKGTN	457
Helicopylo	:			NDFDDYFTASFNNETKK-FVIQPKNASQGLFVSMKDNGTN	455
Yerspest	:	G-----		KPAGDNSLFEELDIRKTP	365
Thermotmar	:			VLSDDDFTESNAFVRNYEVLKYKDTLENI FYGQTGFDP	587
Bacillhald	:	R-----		QOYQTLAAKDFAAIRTLLLEDDSSFKPG	440
Rhodobact	:			YTLRMTGGAVAVDGGEPGLLTAAFDATNRLVIQAAGSLDG	1023
Clostridiu	:			KPSKYFNDTTNSGKNWEDYITAGNISINPDLLGTNP SLKV	479
Caulobac	:			NNGALSINGVGLGVAIADDAATPSSKTGKGF SHYFGLNDI	434
Buchnera	:	NN-----		KTLFTFDGIECSI EGENADNDI YMIKPYSKTL	417
Bacillusub	:	K-----			288

	*	1060	*	1080	
Mesorhizol	:	LDKPMTFDPAAGISATSSVS-----	:		405
Sinorhizom	:	MDGDMAFDGATGLDATSSIM-----	:		393
Escherichi	:	VNMDVLITDEAKIAMASEE-----DAGDS-----	:		444
Salmonelen	:	VDMNVKVTNEAEIAMASESKLDPDVTGDS-----	:		451
Pseudomaer	:	SDIETTLKNASQLAFAGSARAEATTNNRGSIGAIGQPNLVD	:		471
Borrelibur	:	SGPEGAYDYKNIDTTDKLAPK-STYSISPLKNPAAWIKVA	:		498
Treponpall	:	SGAEGAFDWRADAI AALDQAGAQHAVSPIAHPAGWMELN	:		496
Listermono	:	ADNKPFLGVIAADIASLKTDKN-----	:		421
Listerinno	:	AENKPFLGVIAADIASLKTDKN-----	:		421
Campylobac	:	FAGAFSIGGFFSGTDASDMKVKDSILNDPSTVRASSNGVD	:		497
Helicopylo	:	FMGALKLNPFQGGDASNISLNKEYKKEPTAIRPWLAPIN	:		495
Yerspest	:	VTGMKNVP-----	:		373
Thermotmar	:	RPFTITINSTDIEIDPAVDTLLETLVEKINEKNTGVLADLT	:		627
Bacillhald	:	AKRAFAGDGQNALLLSEIKDIR-----	:		462
Rhodobact	:	AGLRIESGAAAFLAAADAPVSTLTGQPADPAALPASFD	:	1063	
Clostridiu	:	RANDDQYGLPSENAVNGSTDQDRAIALAKLQKVAFKIQDV	:		519
Caulobac	:	VRTSGYSPYETGLTSADLHGFTTGQMTIRLTDVEGGRIRD	:		474
Buchnera	:	EELLELLIKPNEPFAYSSTDDLNNPNRNNAI IIN-----	:		450
Bacillusub	:	MDAP-----	:		292

	*	1100	*	1120	
Mesorhizol	:	-----	:		-
Sinorhizom	:	-----	:		-
Escherichi	:	-----	:		-
Salmonelen	:	-----	:		-
Pseudomaer	:	GPSPIDPAVLQNAFGANGLPLSATVSADGKTYTMTSPLPA	:		511
Borrelibur	:	DIIDS DPSKI ASG-----	:		511
Treponpall	:	PAVLSDVYSVAAG-----	:		509
Listermono	:	-----	:		-
Listerinno	:	-----	:		-
Campylobac	:	S-----	:		498
Helicopylo	:	G-----	:		496
Yerspest	:	-----	:		-
Thermotmar	:	PHHSLVFRASSLYDFDLRMEIKGPQGFFFEAVGFVDPDGD	:		667
Bacillhald	:	-----	:		-
Rhodobact	:	IELGGTLYSLTASAGGI AVPAGFPGSAGWDGAGRLVLEVP	:	1103	
Clostridiu	:	NP-----	:		521
Caulobac	:	IPFTPPLGGTMQN MIDALNSRASGVGLYGQFSMNAKQOVS	:		514
Buchnera	:	-----	:		-
Bacillusub	:	-----	:		-

IS CON  
 FALLA DE ORIGEN

	*	1140	*	1160	
Mesorhizol	:	-----	:	-----	:
Sinorhizom	:	-----	:	-----	:
Escherichi	:	-----	:	-----	:
Salmonelen	:	-----	:	-----	:
Pseudomaer	:	GWSYVDKDGNALPGSPTLNSGTSNSVVMAYTDPGSGQTYT	:		551
Borrelibur	:	-----	:	-----	:
Treponpall	:	-----	:	-----	:
Listermono	:	-----	:	-----	:
Listerinno	:	-----	:	-----	:
Campylobac	:	-----	:	-----	:
Helicopylo	:	-----	:	-----	:
Yerspest	:	-----	:	-----	:
Thermotmar	:	PTTFDWNTSFTLVSKSDDFTTLSERFKVADILTFDRAPYD	:		707
Bacillhald	:	-----	:	-----	:
Rhodobact	:	AAAGALRVPPQAGARAAGLATEGVSVAVSQGALVLTSTTG	:		1143
Clostridiu	:	-----	:	-----	:
Caulobac	:	FTSNTNTPVTMSIVADSTERGAGGPSASQLFGIGPAERST	:		554
Buchnera	:	-----	:	-----	:
Bacillusub	:	-----	:	-----	:

	*	1180	*	1200	
Mesorhizol	:	-----	:	-----	:
Sinorhizom	:	-----	:	-----	:
Escherichi	:	-----	:	-----	:
Salmonelen	:	-----	:	-----	:
Pseudomaer	:	YEFNLS-----	:		557
Borrelibur	:	-----	:	-----	:
Treponpall	:	-----	:	-----	:
Listermono	:	-----	:	-----	:
Listerinno	:	-----	:	-----	:
Campylobac	:	-----	:	-----	:
Helicopylo	:	-----	:	-----	:
Yerspest	:	-----	:	-----	:
Thermotmar	:	EPLNIVNQFEVSS-----	:		720
Bacillhald	:	-----	:	-----	:
Rhodobact	:	APVAASAEAQALAGQRLTLTDLPEDEDLIVVMTGTGTLRLA	:		1183
Clostridiu	:	-----	:	-----	:
Caulobac	:	RGEKFFLNNTAMDQ-----	:		567
Buchnera	:	-----	:	-----	:
Bacillusub	:	-----	:	-----	:

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



	*	1220	*	1240		
Mesorhizol	:	-----		-----	:	-
Sinorhizom	:	-----		-----	:	-
Escherichi	:	-----		-----	:	-
Salmonelen	:	-----		-----	:	-
Pseudomaer	:	-----		-----	:	-
Borrelibur	:	-----		-----	:	-
Treponpall	:	-----		-----	:	-
Listermono	:	-----		-----	:	-
Listerinno	:	-----		-----	:	-
Campylobac	:	-----		-----	:	-
Helicopylo	:	-----		-----	:	-
Yerspest	:	-----		-----	:	-
Thermotmar	:	-----		-----	:	-
Bacillhald	:	-----		-----	:	-
Rhodobact	:	GSLDEAPPPPTPAAVELRV		TDAA SRQVELFDTATGHSIGS	:	1223
Clostridiu	:	-----		-----	:	-
Caulobac	:	-----		-----	:	-
Buchnera	:	-----		-----	:	-
Bacillusub	:	-----		-----	:	-

	*	1260	*	1280		
Mesorhizol	:	-----		-----	:	-
Sinorhizom	:	-----		-----	:	-
Escherichi	:	-----		-----	:	-
Salmonelen	:	-----		-----	:	-
Pseudomaer	:	-----		-----	:	-
Borrelibur	:	-----		-----	:	-
Treponpall	:	-----		-----	:	-
Listermono	:	-----		-----	:	-
Listerinno	:	-----		-----	:	-
Campylobac	:	-----		-----	:	-
Helicopylo	:	-----		-----	:	-
Yerspest	:	-----		-----	:	-
Thermotmar	:	-----		-----	:	-
Bacillhald	:	-----		-----	:	-
Rhodobact	:	RTL		GADG SVTVGGYRITLTG	:	1263
Clostridiu	:	-----		-----	:	-
Caulobac	:	-----		-----	:	-
Buchnera	:	-----		-----	:	-
Bacillusub	:	-----		-----	:	-

	*	1300	*	1320	
Mesorhizol	:	-----	DYAANSIGW	OSMRQOAS	: 423
Sinorhizom	:	-----	EFAASSIGWFEQIRSGAS		: 411
Escherichi	:	ALLDLQSNKTVGGAKS---	FNDAYASLVSDIGNKTATLK		: 487
Salmonelen	:	ALLDLQ-NSNVVGGNKT---	FNDAYATLVSDIGNKTSTLK		: 493
Pseudomaer	:	NLNALQTKPTVGGTDSGT	YNDAYGGLVERVGTTLTAQAR		: 622
Borrelibur	:	RISSFGNSQIMIGKNLT---	LNDYFANTASNAIKGOISE		: 565
Treponpall	:	AIASLRNSPVMIGNRHT---	FDEFFAEVTTAIGLKGEQAE		: 563
Listermono	:	-----	IQGTTFF-----	SFMDGIITEVATDASKSS	: 446
Listerinno	:	-----	IQGTTFF-----	SFMDGIITEVATDASKSS	: 446
Campylobac	:	QLQYKKVNFYNEGDG	TIDNLTMEEYRKLTKGASD	GCENNN	: 547
Helicopylo	:	QLQYDSVDFYNDKFDIK	PKI SEFYQFLTGKNTDAE	KSG	: 545
Yerspest	:	-----	LDDAATALVGYAITSNRNH		: 393
Thermotmar	:	LLETIQNLYTRKMLSNG	KESFYEFFGGVSEGVEAETAS		: 796
Bacillhald	:	-----	LNFGTASTFSNYRGMGRAAVETSEAV		: 491
Rhodobact	:	EILDRLVALASGDPATG	QGGYGADYMLQTRGTQAKAAA		: 1303
Clostridiu	:	LVKDTDTGVNTIKSDPD	GVTVDDYLKSFVNTGIDNQSAS		: 572
Caulobac	:	AGESTATFGVAGSAASV	TMTVARYAADFGGSARKAATAE		: 642
Buchnera	:	-----	KFYNNVLVDHKETLDQAYQKFSQS	SHKNALE	: 483
Bacillusub	:	-----	YIYAKGVDHLA		: 303

	*	1340	*	1360	
Mesorhizol	:	TAADAKEALAQRSSEALS	SNATG	MSL	LDLHTYQ : 463
Sinorhizom	:	TADDNKAALLARTQEALG	SVTC	LSL	LDL QSYK : 451
Escherichi	:	TSSATQGNVVTQLSNQQQ	SISG	YGN	QRF QYYL : 527
Salmonelen	:	TSSTTQANVVKQLYKQQQ	SVSG	YGN	QRY QYYL : 533
Pseudomaer	:	ASADASQTVLKQAQDSR	DSLSC	AAN	IQF QYYS : 662
Borrelibur	:	ITKESQSQILKDLTDLR	MSISG	LAN	IEF QAFI : 605
Treponpall	:	RSMQMHAAILKELTDMR	DATSG	LAD	IKF HGYN : 603
Listermono	:	ATATADTQALSSLTESK	SLEG	MTN	MOY SYVV : 486
Listerinno	:	ATSTADTQALNSLSESK	SLEG	MTN	MOY SYVV : 486
Campylobac	:	VVNSSNETLYNSVYSEY	QSKSG	LAA	IQY SSYG : 587
Helicopylo	:	RILDTKQSMLETIKKEQL	SISQ	MVN	IKF SGYA : 585
Yerspest	:	SELENAENTLNQATRYH	ESFSG	AMN	MEY RAYQ : 433
Thermotmar	:	NLKNNTTEILRQEIDNAR	EEVK	MAN	IEY HAFS : 836
Bacillhald	:	SKRDSYEVLRDNVQFER	NSVSO	MTL	IQF HAYN : 531
Rhodobact	:	GRVSSATAALEVAERAS	AAAV	AAR	IEQ QAYQ : 1343
Clostridiu	:	EGVKGSNNVLSQIKQTRE	ATSG	MTN	IQYSHGYQ : 612
Caulobac	:	SRKEAAAASVSEVDSQR	QSEEG	ELIN	TTY QAFN : 682
Buchnera	:	EEVPFKRNMIGILENKK	MSIS	ND	EQYAE NYE ECYL : 522
Bacillusub	:	LKIRKIAKEHDVMMVENR	PLARALY	QVEIDQAVP	EFFK : 343

v 2e 5



Mesorhizol	: A SARM	MKTVDD	MLTA	NAVG----	: 484
Sinorhizom	: A SAKL	STVDA	MASI	EAVR----	: 472
Escherichi	: A NAQV	QTANA	FDAL	NIR-----	: 547
Salmonelen	: A NAQV	QTANA	FDAL	NIR-----	: 553
Pseudomaer	: A SAQV	QVAR	SFDTL	GAFR----	: 683
Borrelibur	: A ASKF	TVSVE	IDTV	NKMGV---	: 627
Treponpall	: A SARF	AAVNE	LDTV	NRMGV---	: 625
Listermono	: A NTKA	NTVND	MKAL	AML-----	: 506
Listerinno	: A NTKA	NTVND	MKAL	AML-----	: 506
Campylobac	: A AAKI	STVDO	LDTL	GLKS----	: 608
Helicopylo	: A NAKV	TAIDR	IDTL	GIKQ----	: 606
Yerspest	: A SNMKV	ATGDK	FSDL	ALV-----	: 453
Thermotmar	: A AAKV	TAVDO	IQTV	NMVG----	: 857
Bacillhald	: A AARN	TQIDE	LDRI	NGMGIVGR	: 556
Rhodobact	: A SSQV	SVAQT	FETL	NAL-----	: 1363
Clostridiu	: A SAKI	STVDO	LDV	NNLKR---	: 634
Caulobac	: A SARL	QATKD	FDV	NGILG----	: 703
Buchnera	: A NVKV	QTAEN	LNEI	ERYS----	: 543
Bacillusub	: V LAEI	AYVYK	TQKVY	-----	: 360

a

6

FALLA LE ORIGEN

















Legend:

	= helix	Conf: 	= confidence of prediction
	= strand	Pred: predicted secondary structure	
	= coil	AA: target sequence	

TEJIS CON  
FALLA LE ORIGEN