



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE
MUTANTES FLAGELARES DE *Rhodobacter sphaeroides*:
COMPARACION DE LAS TECNICAS DE
MUTAGENESIS AL AZAR VS. MUTAGENESIS
DIRIGIDA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

NIDIA GUADALUPE ARECHIGA CEBALLOS



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJIA

2004



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA 11
MEXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Aislamiento y caracterización de mutantes flagelares de Rhodobacter sphaeroides: Comparación de las técnicas de mutagénesis al azar vs. mutagénesis dirigida"

realizado por Nidia Guadalupe Aréchiga Ceballos

con número de cuenta 09753519-9 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Rosa Laura Camarena Mejía.

Rosa Laura Camarena

Propietario Dra. Carmen Gómez Eichelmann.

Carmen Gómez Eichelmann

Propietario Dr. Saúl Cano Colín.

Saúl Cano Colín

Suplente Dr. Enrique Arturo Cantoral Uriza.

Enrique Arturo Cantoral Uriza

Suplente Dr. Luis Felipe Jiménez García.

Luis Felipe Jiménez García

Consejo Departamental de
Biología

Juan Manuel Rodríguez Cháv
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Cháv

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIA
DE BIOLOGÍA

Parte de los reactivos y materiales empleados en este trabajo fueron adquiridos gracias al donativo de la DGAPA IN222103-3

DEDICATORIA

*A Soco y Juan José por estar siempre
detrás de cada paso que doy y nunca
dejar de apoyarme en todas mis
decisiones, aunque no siempre sean
las mejores.*

*Familias: Aréchiga Ceballos, Aréchiga
Pazarán, Aréchiga Ramírez, Figueroa
Aréchiga, Jiménez Ceballos y a las
chicas Zapata Cervantes, Galván
Zapata y Juárez Zapata por siempre
estar ahí y confiar en mí sobre todo
en los momentos en los que yo misma
dejé de hacerlo.*

*A la memoria de Lulú, Conchita
Nidia y José Luis cuyo ejemplo
ha sido una fuerza inspiradora
en mi vida, gracias por seguir
conmigo.*

AGRADECIMIENTOS

A Laura Camarena por su infinita paciencia, por ser todo lo que uno puede esperar de una directora de tesis y hasta más, por aguantarme tanto, pero sobre todo por haberme contagiado de su vocación de investigadora y su amor por la Biología Molecular.

A mis sinodales: Dra Carmen Gómez E., Dr. Saúl Cano C., Dr. Luis Felipe Jiménez, Dr. Enrique Cantoral U., por haber empleado parte de su valioso tiempo en la revisión de esta tesis y por sus comentarios tan alentadores y constructivos sobre la misma, es un honor para mí que ustedes hayan dado el visto bueno a este trabajo.

A Aurora Osorio por haber sido una verdadera hada madrina durante mi estancia en el laboratorio, gracias por la asesoría y la cooperación.

A la Sra. Julia por realizar con tanto cariño el trabajo base de toda investigación.

A Rulo Rojas, tu sabes que sin tu ayuda no lo hubiera logrado, la parte estética de esta tesis te la debo a ti, todo lo que aprendí contigo me ha servido y me servirá para siempre. ¡Mil gracias!

A mis compañeros de laboratorio: Úrsula, Naika, Carlos y Sebastián por compartir sus conocimientos conmigo y por su cooperación en mi trabajo experimental, pocas veces se encuentran equipos de trabajo tan agradables.

A mis amigos por orden de aparición: Christel, Tania, Carla, Pili, Vero, Fernanda, Fede, Arturo, Mel, Gritzia, Aldo, Rita, Nessim, Sarahid, Selene, Juan Miguel, Nash, Rosa, Tony, Ivonne, Rosario, Tatjana, Daniel, Janet, Bernardo, Juanita y Victorin por ser los mejores, por aguantarme y quererme tanto.

A todos con los que hice equipo en Ciencias por los momentos que han dejado recuerdos divinos de mi paso por la UNAM, aprendí mucho con ustedes.

A Priscila y Miguel Ángel Tenorio, Alma Ángeles y Carlos Guevara por su amistad, su confianza y por tenerme en tan alto concepto.

A toda la gente que de alguna manera contribuyó para la realización de esta tesis, a los que siempre han confiado en mí, y a los que nunca lo han hecho, aún más, porque así me obligan a mejorar.

¡GRACIAS!

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Quimiotaxis	4
El flagelo	10
Estructura general del flagelo	11
Filamento	12
El gancho	14
Control de la longitud del gancho y exportación	15
Cuerpo basal	18
Motor	20
Regulación de la expresión genética de los genes flagelares	21
Ensamblaje del flagelo	23
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	24
ANTECEDENTES	30
OBJETIVOS	32
MATERIALES Y MÉTODOS	33
Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	33
Prueba de nado en agar suave en medio mínimo	35
Purificación de plásmido en pequeña escala de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	35
Extracción de DNA cromosomal	36
Electroporación	36
Protocolo de hibridación tipo Southern Blot	37
Protocolo de extracción de fragmentos de DNA de gel de agarosa	41
Extracción de fragmentos de DNA de gel de agarosa de bajo punto de fusión	42
Purificación de plásmidos en pequeña escala ("mini-preps) de <i>Escherichia coli</i>	43
Purificación de plásmidos por columna	44
Purificación de cadena sencilla para secuenciación	45
Transformación con Cloruro de Calcio	46
Conjugación triparental	47
Conjugación biparental	47
Determinación de la β -Glucuronidasa (GUS)	48
Determinación de proteína	49
RESULTADOS	50
Mutagénesis al azar	50
Identificación de los sitios de inserción del <i>Tn_{phoA}</i>	51
Clonación de los fragmentos que llevaban <i>Tn_{phoA}</i> así como un fragmento de DNA cromosomal adyacente	55
Caracterización de las clonas p15Bam y p18Bam	56
Secuenciación del DNA adyacente al transposón	58
Mutagénesis dirigida por genética reversa	63

Construcción de la mutante <i>flhB::uid-aadA</i>	63
Complementación de la cepa NA-I	68
Determinación del nivel de expresión del gen <i>flhB</i>	70
DISCUSIÓN	72
La proteína FlgE	75
La proteína FlhB	77
CONCLUSIONES	79
PERSPECTIVAS	80
REFERENCIAS	81
Apéndice 1. Proteínas involucradas en la formación del flagelo, movilidad y quimiotaxis	92
Apéndice 2. Autoridad de las especies citadas	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La quimiotaxis permite a las bacterias encontrar el ambiente más favorable para el crecimiento	4
Figura 2. Estructura de los receptores quimiotácticos	6
Figura 3. Esquema de la localización y estequiometría del complejo de proteínas durante la transducción de señales quimiotácticas en bacterias	7
Figura 4. Diagrama esquemático del patrón de nado y la imagen en campo oscuro de una bacteria nadando y bamboleándose	8
Figura 5. Elementos del circuito y ruta de señalización quimiotáctica en <i>E. coli</i>	9
Figura 6. Estructura general del flagelo	11
Figura 7. Estructura del filamento	13
Figura 8. Esquema de las proteínas flagelares del aparato de Exportación	17
Figura 9. Imagen de microscopía del complejo cuerpo basal-gancho	19
Figura 10. Ruta morfo genética del flagelo de <i>Salmonella</i>	24
Figura 11. Arreglo flagelar y mecanismo de nado de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Sinorhizobium meliloti</i>	26
Figura 12. Loci de quimiotaxis de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	28
Figura 13. DNA cromosomal de las mutantes no nadadoras digerido con la enzima <i>SaI</i>	51
Figura 14. Mapa del transposón <i>Tnp_{hoA}</i>	52
Figura 15. Southern Blot del DNA de las mutantes no nadadoras digerido con la enzima <i>SaI</i>	52
Figura 16. Southern Blot del DNA de las mutantes no nadadoras digerido con las enzimas <i>SaI</i> y <i>BamHI</i>	54
Figura 17. Digestiones del plásmido p15Bam	56
Figura 18. Digestiones del plásmido p18Bam	57
Figura 19. Secuencia de la mutante #15	59
Figura 20. Análisis Blast de la secuencia de la mutante #15	60
Figura 21. Secuencia de la mutante #18	61
Figura 22. Análisis Blast de la secuencia de la mutante #18	62
Figura 23. Complementación de la mutante #18 con <i>flgEF</i>	63
Figura 24. Cassette <i>uidA-aadA</i>	64
Figura 25. DNA cromosomal de WS8 y el cósmido c140 digeridos con la enzima <i>SstI</i>	65
Figura 26. Southern Blot empleando la sonda que contiene el inicio de <i>flhB</i>	65
Figura 27. Esquema de la región que contiene los genes <i>flhP</i> , <i>flhO</i> , <i>flhR</i> , <i>flhB</i> y un fragmento río abajo	66
Figura 28. Plásmido pTZ19R <i>flhB</i> digerido con la enzima <i>StuI</i>	67
Figura 29. Posibles orientaciones del cassette <i>uidA-aadA</i>	67
Figura 30. Gel de las posibles orientaciones del cassette <i>uidA-aadA</i>	67
Figura 31. Complementación de la mutación en el gen <i>flhB</i> digerido con la enzima <i>StuI</i>	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Jerarquía de los operones que codifican las proteínas quimiotácticas en <i>E.coli</i>	22
Tabla 2. Genes Duplicados relacionados con la biosíntesis del flagelo y la quimiotaxis de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	29
Tabla 3. Cálculo de los pesos moleculares de los fragmentos <i>SaI</i> que hibridaron con la sonda del transposón <i>Tnp_hoA</i>	53
Tabla 4. Pesos moleculares del DNA cromosomal que hibrida con la sonda que contiene el inicio de <i>flbB</i>	65
Tabla 5. Actividad específica de β -glucuronidasa	71
Tabla 6. Resumen de ventajas y desventajas de las técnicas de mutagénesis empleadas	74

ABREVIATURAS EMPLEADAS

<i>aadA</i>	aminoglicósido-3:adeniltransferasa
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
C	Citosina
CCW	en dirección contraria a las manecillas del reloj
Co	Cobalto
CW	en sentido de las manecillas del reloj
Da	daltones
dCTP	desoxycitidina 5'-trifosfato
D.O.	densidad óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fla	flagelada
G	Guanina
Gm	gentamicina
GUS	β -glucuronidasa
HBB	gancho-cuerpo basal
kb	kilobases
Kan	kanamicina
MCP	Proteínas quimiotácticasceptoras de metilo
MUG	4 Metil umbeliferona β D-glucuronidasa
Nal	ácido nalidíxico
Ni	Níquel
Tc	tetraciclina
Rf	migración relativa
rpm	revoluciones por minuto
<i>R. sphaeroides</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
SA-AP	estreptavidina fosfatasa alcalina
SacB	Levansacarosa
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>S. meliloti</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
Spc	espectinomomicina
<i>uidA</i>	gen reportero que codifica para la β -glucuronidasa

RESUMEN

En este trabajo se compararon dos estrategias para obtener mutantes en genes flagelares de *Rhodobacter sphaeroides*: la mutagénesis al azar y la mutagénesis dirigida por genética reversa y se evaluaron las ventajas y desventajas del empleo de ambas para caracterizar el regulón flagelar en esta bacteria.

El estudio de las mutaciones al azar se realizó a partir de la cepa NGI (*fliM::uidA-aadA/pRK415-fliMN⁺*) que presenta el fenotipo Mot⁺, GUS⁺ la cual se mutó empleando el transposón *TnpbaA* que se inserta al azar en el cromosoma de *R. sphaeroides*. De las mutantes se seleccionaron 8 cepas que presentaron el fenotipo Fla⁻, GUS⁺, Tc^R, Kan^R, Mot⁻, ninguna de éstas nadaba en agar semisólido (swarm). De cada una se purificó el pRK415 *fliMN⁺* para descartar la posibilidad de que se hubiera integrado en el cromosoma, el tamaño del plásmido fue comprobado digiriéndolo con la enzima *SaI*. Para identificar los sitios de inserción del transposón, se realizó una hibridación tipo Southern Blot del DNA cromosomal de las mutantes, digerido con la enzima *BamHI* empleando como sonda el fragmento *SaI-DraI* de 1.4 kb, proveniente del *TnpbaA* marcado con biotina 14-dCTP. El tamaño del DNA adyacente al sitio de inserción se calculó a partir de los datos de migración relativa de cada una de las bandas del marcador de peso molecular, extrapolando los valores de migración relativa de cada una de las bandas de hibridación. Se seleccionaron dos mutantes: la #15 de 6,025 pb y la #18 de 6,309 pb las cuales se purificaron y clonaron en el vector pTZ19R. Las clonas obtenidas se secuenciaron utilizando para la #15 el "primer universal" y para la #18 un primer diseñado a partir de la secuencia del *TnpbaA*. Ambas secuencias se analizaron con el programa BLAST-P del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

La secuencia de la mutante 15 corresponde a una proteína de 505 aminoácidos que posiblemente posee actividad de cinasa, hasta el momento no se cuenta con elementos suficientes que permitan correlacionar la función de esta proteína con el fenotipo observado.

La secuencia de la mutante 18 corresponde a la proteína del gancho del flagelo (FlgE), la cual ya había sido descrita previamente por Ballado *et al.*, (2001) dado que el gancho forma parte de la estructura del flagelo, es de esperarse que el fenotipo de esta mutante sea Fla⁻ y por consiguiente sea incapaz de nadar.

Para la mutagénesis dirigida por genética reversa se eligió el gen *flbB*, del cual ya se conocía la secuencia que nos permitiría insertar el cassette *uidA-aadA* en la región codificadora

de dicho gen. El cassette *uidA-aadA* ejerce un efecto polar río abajo del sitio de inserción. Para obtener la mutante se procedió a clonar el gen *flhB* completo a partir del cósmido c140 en el plásmido pTZ19R. La clona obtenida se sometió a una digestión con la enzima *StuI* que se sabe tiene un sitio de corte en la región codificadora de *flhB* y así el producto lineal se ligó al cassette *uidA-aadA*. Mediante un análisis de los fragmentos obtenidos por restricción del DNA, se seleccionó una clona en la que el inserto quedó en el sentido de transcripción del gen, posteriormente el alelo *flhB::uidA-aadA* se purificó y clonó en el vector suicida pJQ200 (que es incapaz de replicarse en *R. sphaeroides*), con el cual se llevó a cabo el reemplazamiento del alelo nativo mediante la doble recombinación con el cromosoma. La selección de transconjugantes se realizó seleccionando el fenotipo Nal^R , Sac^R , Spc^R , Gm^S . Se comprobó que ninguna de ellas fuera capaz de nadar y se seleccionó una a la que llamamos NA-I. Para la complementación de la mutación se emplearon dos plásmidos que llevaban un fragmento *SstI* de *flhB*⁺. En pRS207 el gen *flhB* se encuentra en el sentido del promotor del plásmido, mientras que en pRS208 está en orientación contraria, por lo que su expresión depende de la presencia de un promotor presente en este fragmento. En ambos casos la mutante recuperó su capacidad de nado, lo que indicó que el único gen afectado fue *flhB*, el cual parece llevar su propio promotor.

INTRODUCCIÓN

Llamamos movimiento al cambio en la posición u orientación de la célula con respecto a su ambiente, actividad que podemos encontrar ampliamente distribuida entre todos los seres vivos incluyendo a las bacterias.

Para que el movimiento bacteriano sea posible, es necesario que se cumplan tres requisitos: la posibilidad de que la célula detecte un estímulo del medio ambiente, que sea capaz de responder a éste y que posea una estructura que efectúe esta respuesta. La mayoría de las bacterias se mueven gracias a una especie de apéndice conocido como flagelo.

Existen muchos ejemplos de especies bacterianas que se desplazan a través del medio ambiente que las rodea en respuesta a una variedad de estímulos, en la que se ve involucrado un complejo sistema de receptores acoplados a un sistema de transducción de señales que le permiten a la célula detectar y responder al estímulo.

Durante años se han estudiado los flagelos de varias especies de bacterias de importancia médica y se ha discutido sobre su implicación en la virulencia de esas especies, la visión de los científicos sobre la función del flagelo se ha visto enriquecida con el estudio de especies no patógenas, como simbiotes o bacterias de vida libre, ampliando el conocimiento sobre la variedad de agentes químicos metabolizables por las células, diferentes estrategias de vida y sobre la evolución de las especies.

Rhodobacter sphaeroides es un modelo con características muy particulares para el estudio de los genes involucrados en la estructura y funcionamiento del flagelo, como las de poseer un único flagelo cuya ubicación subpolar y estructura son un rasgo distintivo de la especie, su conducta de nado, la presencia de varias copias de algunos genes necesarios para sensar, regular y adaptar su respuesta, así como la ecología de la especie.

QUIMIOTAXIS

Se conoce como quimiotaxis a la respuesta que presentan algunas células y organismos para alejarse o acercarse, específicamente, a determinados estímulos químicos. La quimiotaxis permite a las bacterias encontrar el ambiente que les provea condiciones favorables para el crecimiento. Esta respuesta es claramente una ventaja selectiva para las bacterias que son capaces de llevarla a cabo, ya que los microorganismos pueden alejarse de condiciones desfavorables y/o ubicarse en una región favorable para el crecimiento. Una bacteria que nade en el sentido de la más alta concentración de atrayente a la más baja, puede de pronto detener su movimiento y reorientarse en una dirección al azar, si el nuevo sentido no es favorable, puede reorientarse tanto como sea necesario hasta encontrar el mejor ambiente. (Fig. 1) (Adler, 1966).

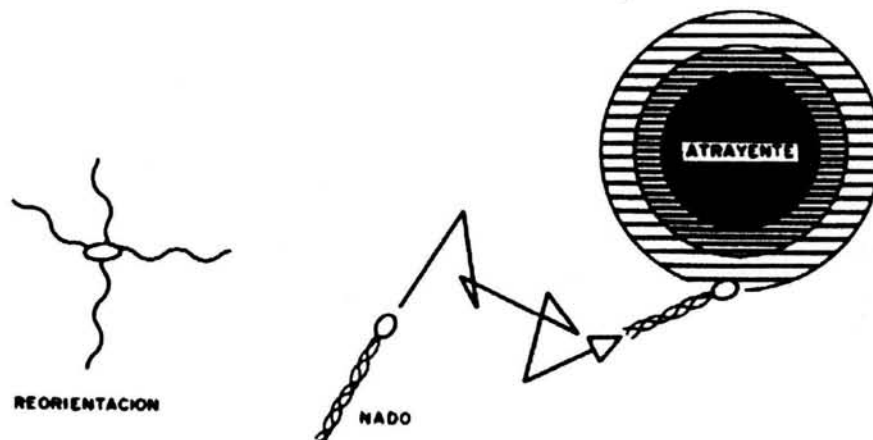


Figura 1. La Quimiotaxis permite a las bacterias encontrar el ambiente más favorable para el crecimiento. Con la presencia de atrayentes la célula aumenta el tiempo que pasa en nado y disminuye el número de reorientaciones, favoreciendo el avance hacia el atrayente (Modificado de Armitage, 1992).

Es evidente que el sistema quimiosensorial tiene un origen ancestral y está presente en todos los géneros de eubacterias estudiados y también arqueas (Alex y Simon, 1994); por ello, se puede esperar que un sistema con tan larga historia evolutiva, se haya ido adaptando en los diferentes subgrupos bacterianos, de la misma manera en que éstas se han adaptado a los diferentes nichos ambientales.

Comúnmente las células se desplazan mediante un apéndice móvil denominado flagelo, éste es un filamento helicoidal semirígido con capacidad de rotar. Durante la respuesta quimiotáctica, una red de proteínas citoplasmáticas controlan la rotación del flagelo, y por ende, el movimiento de la célula (Stock y Surette, 1996).

Escherichia coli fue de las primeras especies en las que se empezó a estudiar la quimiotaxis debido a los conocimientos que ya se tenían sobre la bioquímica y la genética de esta especie, los cuales fueron de gran ayuda para ir generando explicaciones sobre esta respuesta. Las cepas de *E. coli* son móviles debido a la presencia de varios flagelos distribuidos alrededor de la célula. El control de la rotación de los mismos es un requisito indispensable en la respuesta quimiotáctica. En esta bacteria, se observa quimiotaxis hacia compuestos como: oxígeno, galactosa, glucosa, ácido aspártico, treonina, serina, dipéptidos, etc.; mientras que la leucina y los iones de Ni^{+2} y Co^{+2} actúan como repelentes (Blair, 1995).

En general, *E. coli* percibe los diversos estímulos quimiotácticos a través de receptores localizados en la membrana plasmática. La unión del ligando al receptor provoca un cambio conformacional en el receptor, que tiene por consecuencia la regulación de la actividad de una red de proteínas involucradas en la traducción de la señal.

Los receptores quimiotácticos tienen dos dominios hidrofóbicos que atraviesan la membrana, una región periplásmica en donde unen al efector, y una región citoplasmática en donde interactúan con el sistema de proteínas involucradas en la transducción de la señal y en la adaptación (Fig. 2) (Stock y Surette, 1996).

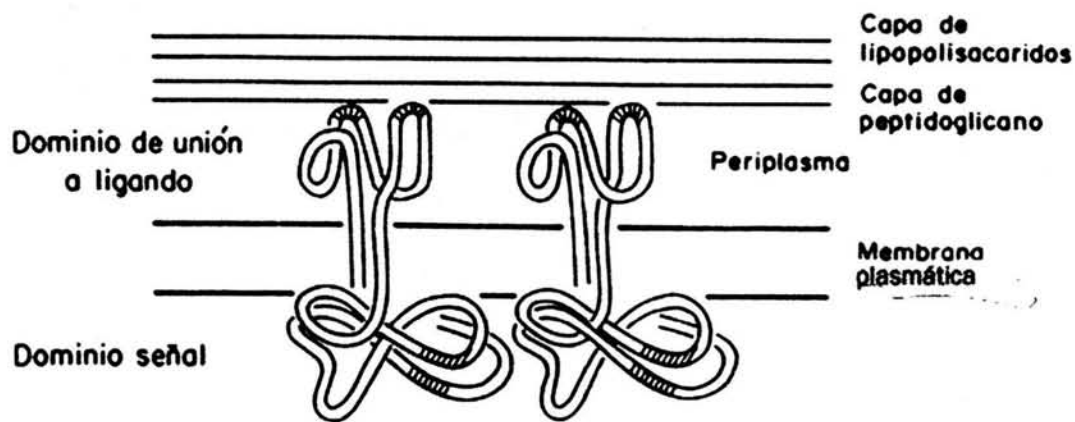


Figura 2. Estructura de los receptores quimiotácticos.

Se han identificado cuatro receptores quimiotácticos comunes para *E. coli* y *Salmonella enterica*: Tar, Tsr, Trg y Aer. El receptor Tap es único para *E. coli* y Tcp para *S. enterica*. La abundancia de los receptores específicos varía, ya que Tsr y Tar son muy abundantes en relación al resto de los receptores (Bren y Eisenbach, 2000). El receptor Tar media la respuesta quimiotáctica hacia aspartato y maltosa; Tsr a serina; Trg a ribosa y galactosa; Tap a dipéptidos y Aer registra cambios en el potencial redox, probablemente a través del grupo FAD que interactúa con una región específica del receptor (Greer-Phillips *et al.*, 2003).

Los receptores quimiotácticos son homodímeros estables, que interaccionan con la proteína citoplasmática CheA, a través de la proteína CheW.

Durante mucho tiempo se consideró que la estequiometría del complejo consistía de un receptor dimérico, dos moléculas de CheW, y un dímero de

CheA. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que, en presencia de CheA y CheW, los receptores forman agregados localizados en los polos de la bacteria, los cuales pueden representar las formas funcionales de señalización del receptor.

En estos agregados, la unidad estaría representada por tres dímeros del receptor, acoplados a un dímero de CheA (Stock y Surette, 1996; Li y Hazelbauer, 2004 (Fig. 3).

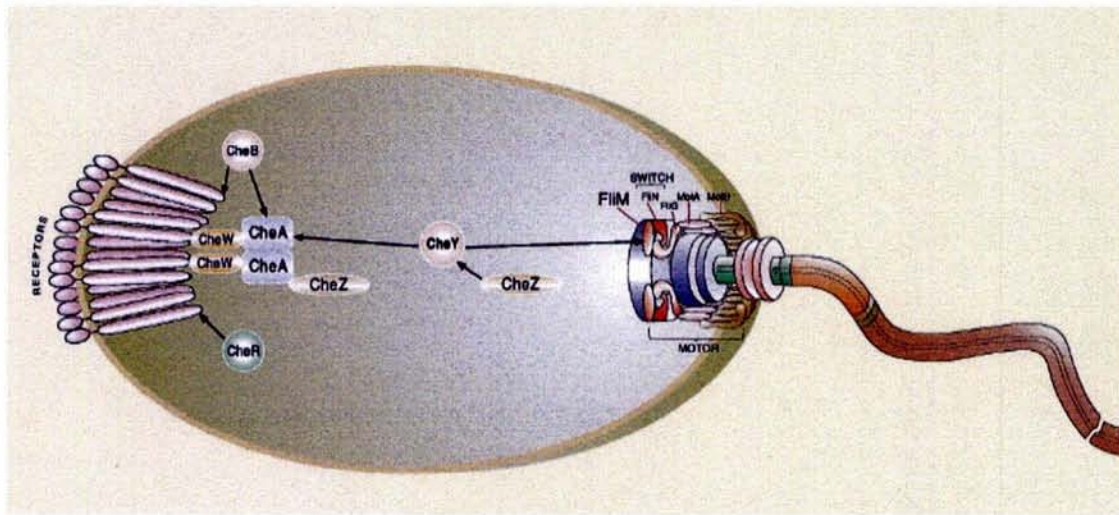


Figura 3. Esquema simplificado de la localización y estequiometría del complejo de proteínas durante la transducción de señales quimiotácticas en bacterias. Las flechas negras indican las interacciones reguladas. El receptor es esquematizado por un agregado de éstos. El modelo no se presenta a escala. Tomado de Bren y Eisenbach, 2000.

La presencia de ligando en el receptor controla la actividad de CheA, la cual es una cinasa que fosforila a las proteínas CheY y CheB. La proteína CheY en su forma fosforilada, CheY-P, es capaz de interactuar con el motor flagelar y modificar la rotación del flagelo. CheB-P determina el estado de metilación del receptor, lo cual da lugar a la respuesta de adaptación (Bren y Eisenbach, 2000).

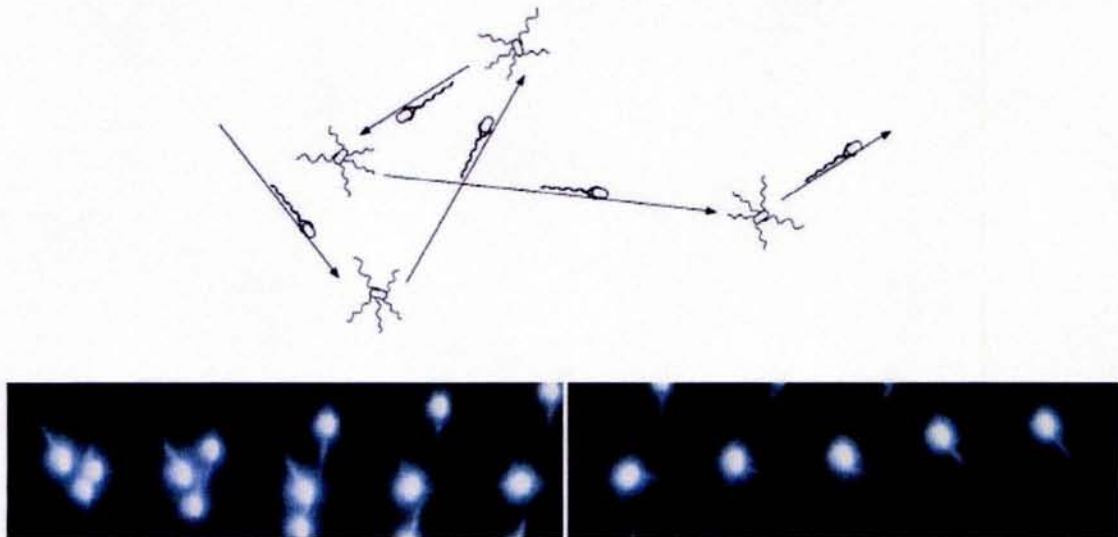


Figura 4. Diagrama esquemático del patrón de nado y la imagen en campo oscuro de una bacteria nadando y bamboleándose. Los filamentos flagelares forman una trenza durante el nado recto, pero la trenza se disgrega durante la rotación en reversa de los motores, lo que produce el bamboleo de las células. Tomado de Namba y Vondersviszt, 1997.

En *E. coli*, la rotación del flagelo es bidireccional, la rotación en dirección contraria a las manecillas del reloj (CCW) provoca que los flagelos se agrupen en una trenza cuya rotación impulsa el cuerpo de la bacteria en una trayectoria lineal; cuando uno o más flagelos rotan en dirección de las manecillas del reloj (CW), la trenza se desagrega y el movimiento descoordinado de cada uno de los flagelos provoca un movimiento de bamboleo del cuerpo celular, durante el cual no ocurre desplazamiento. Posteriormente, se reforma la trenza flagelar, y la bacteria retoma el nado en una nueva dirección elegida al azar (Fig.4). La proteína CheY en su forma fosforilada, CheY-P, se une a los componentes citoplasmáticos del flagelo y promueve la rotación en el sentido CW (Macnab, 1996).

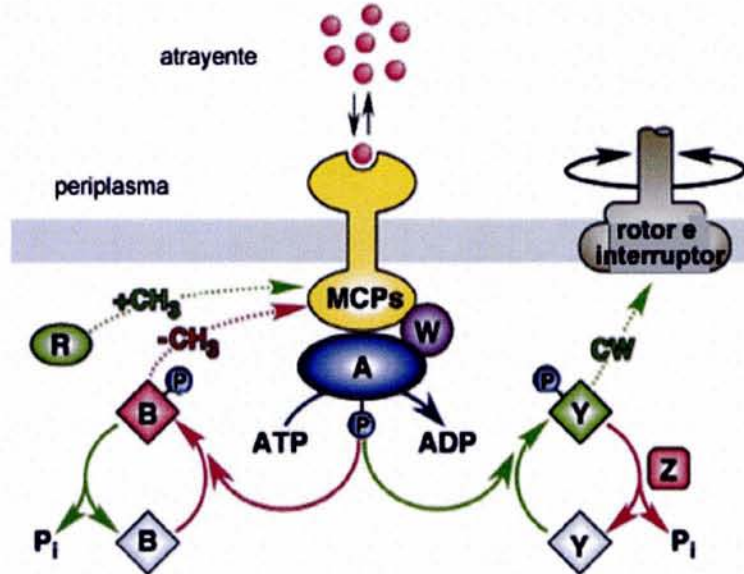


Figura 5. Elementos del circuito y lógica de la señalización de la ruta quimiotáctica en *E. coli*. En verde se presentan los componentes y reacciones que aumentan la rotación flagelar CW y en rojo los elementos que incrementan la rotación CCW. Las proteínas Che citoplásmicas se designan como A, B, R, Y y W. En gris se presentan los estados inactivos de CheY y CheB antes de la fosforilación. Modificado de Parkinson, 2003.

En presencia de un atrayente, el receptor sufre un cambio conformacional y provoca la inhibición de la actividad de cinasa de la proteína CheA, la consecuente disminución en la concentración intracelular de CheY-P, provoca que la bacteria nade durante más tiempo en dirección del atrayente (flagelos rotando en dirección CCW). La proteína CheY-P es desfosforilada por CheZ, lo que garantiza la corta duración de los eventos de bamboleo (0.2s), cuya función es lograr la reorientación de la célula (Stock y Surette, 1996) (Fig. 5).

La dirección de nado cambia rápidamente en respuesta a la adición o a la eliminación de un quimioefector, pero gradualmente regresa a su conducta original aún en presencia de la señal. Esta adaptación involucra la metilación reversible de residuos de glutamato, presentes en el dominio citoplásmico de los receptores quimiotácticos. El receptor metilado activa a la cinasa CheA, mientras que la desmetilación del receptor provoca su inhibición. La presencia de un atrayente unido al receptor inhibe la actividad de CheA, sin embargo, la posterior

metilación del mismo mediada por CheR, reactiva la actividad de CheA (Stock y Surette, 1996). La metilación del receptor es la razón por la cual estas proteínas son denominadas también como MCP, por sus siglas en inglés methyl-accepting chemotaxis proteins.

EL FLAGELO

El flagelo es uno de los pocos motores biológicos con capacidad de rotar, su síntesis y operación es, en términos energéticos, muy costosa. La energía que permite la rotación del flagelo es la fuerza protón-motriz, y se calcula que la rotación del flagelo requiere aproximadamente de 1,200 protones por revolución (Macnab, 1996).

Entre las diferentes bacterias, los flagelos varían en número y ubicación, éstos pueden originarse de varios puntos distribuidos al azar alrededor del cuerpo celular en un patrón conocido como peritrico; lofotrico, si los flagelos emergen de un solo polo y anfotrico, si los flagelos emergen a partir de ambos polos. En el caso de las bacterias monoflageladas éste puede ubicarse polar o subpolarmente.

También se han descrito otras formas de motilidad como el deslizamiento, observado en *Myxococcus xanthus*, o el desplazamiento mediado por el pili Tipo IV observado en *Pseudomonas aeruginosa* (Macnab y DeRosier, 1988; Macnab, 1996).

ESTRUCTURA GENERAL DEL FLAGELO

El flagelo bacteriano está compuesto por el filamento, el gancho, y el cuerpo basal, éste último se encuentra embebido en la membrana plasmática e interactúa con un complejo citoplasmático que contiene el interruptor y el aparato de exportación (Fig. 6).

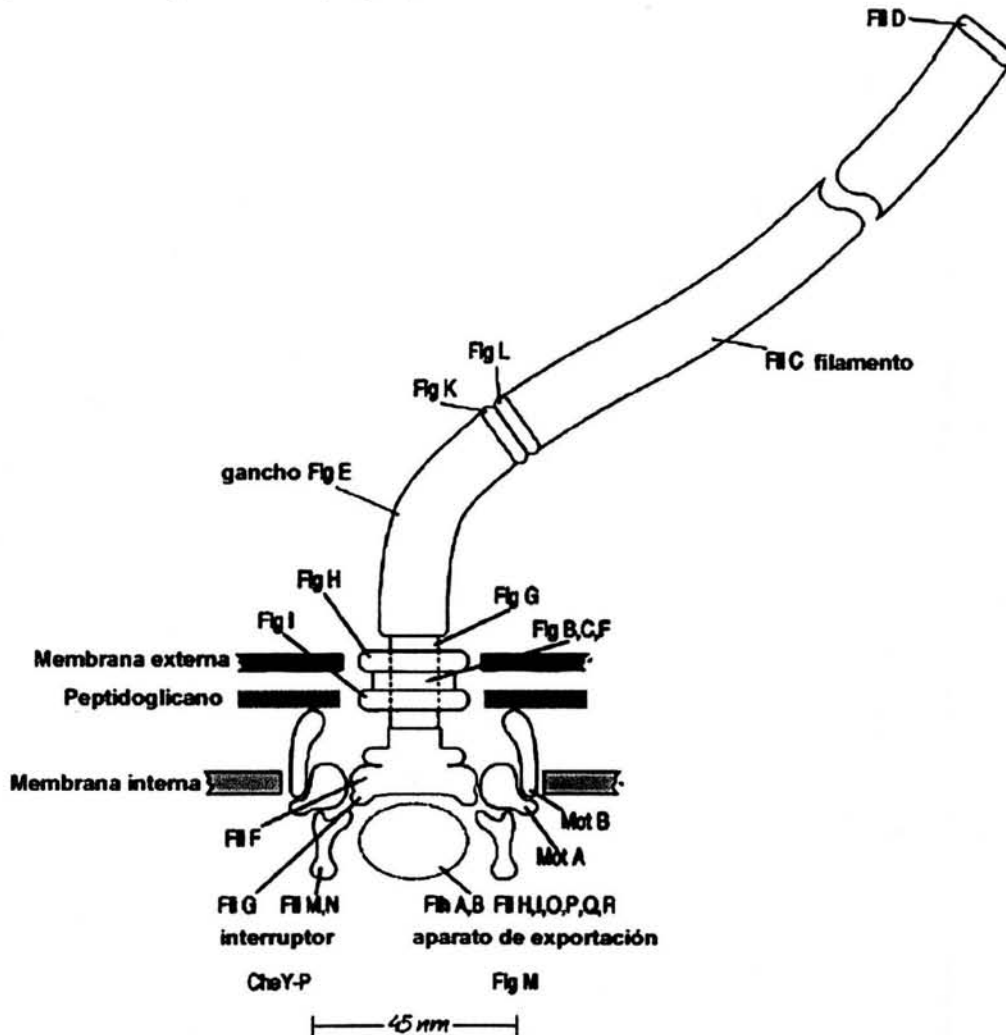


Figura 6. Estructura general del flagelo. Modificada de Berg, 2003.

En la pared de peptidoglicanos se ubica el anillo P, mientras que en la membrana externa se ubica el anillo L, una parte del cuerpo basal conocida como eje (rod) atraviesa estos anillos. En la parte distal del eje, se ensamblan secuencialmente el gancho y el filamento, las cuales son las dos estructuras extracelulares del flagelo.

Las proteínas MotA y MotB son proteínas de membrana que se ensamblan alrededor del cuerpo basal, y conforman el canal que conduce los protones al interior de la célula, se asume que estas proteínas, ayudan a la transformación de la energía electroquímica en energía mecánica (Macnab, 1996).

FILAMENTO

El filamento es una delgada estructura cilíndrica, que posee forma helicoidal, y por lo tanto cuando rota funciona como propela. El filamento representa hasta un 95% de la masa total del flagelo y está compuesto por subunidades de una proteína denominada flagelina (FliC).

El filamento es una hélice de mano izquierda cuya rotación en contra de las manecillas del reloj ejerce una fuerza sobre el medio que resulta en la propulsión del cuerpo celular. Su longitud varía entre 5 y 10 μ con un diámetro exterior de 20nm, su diámetro es constante y uniforme para cada especie (Macnab, 1996).

El filamento puede estar constituido por un solo tipo o varios tipos, de una sola proteína globular de tres dominios llamada flagelina (FliC) cuyo peso molecular varía entre especies desde 25,000 a 69,000 daltones. Su composición química es característica: abundancia de aminoácidos neutros y ácidos, ausencia de triptofano y cisteína y escasez de aminoácidos básicos.

Esta proteína presenta zonas de alta homología entre distintas especies bacterianas, especialmente en los extremos amino y carboxilo terminales, mientras que la parte central es variable. Se ha demostrado que los segmentos terminales de la secuencia de la flagelina son necesarios para la exportación y el ensamblaje del filamento, mientras que las partes variables son dispensables (Macnab, 1996; Namba y Vonderviszt, 1997).

Los monómeros de flagelina están arreglados en una red cilíndrica con simetría pseudo-hexagonal, que contiene 5.5 monómeros por vuelta de la hélice, cada subunidad se encuentra inclinada 45° con relación al eje de simetría del filamento. Este arreglo resulta en la formación de 11 fibrillas longitudinales que forman una estructura hueca (Fig. 7).

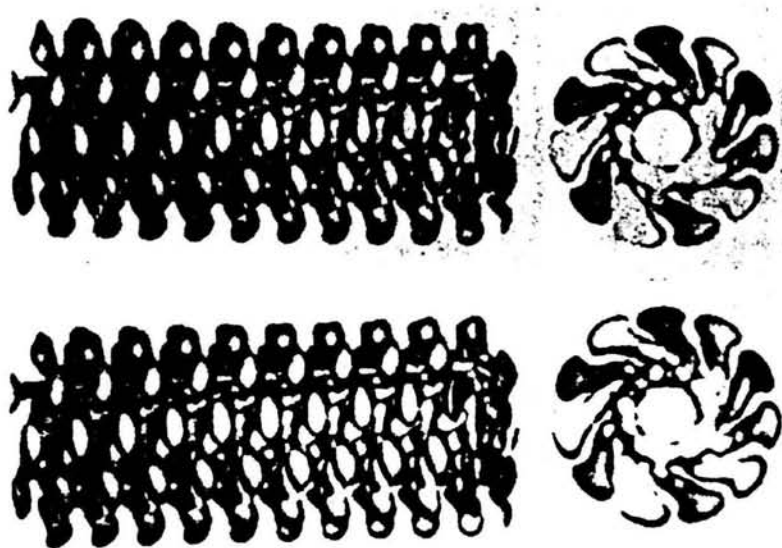


Figura 7. Imagen tridimensional de la estructura de un filamento recto de *Salmonella enterica* determinada por difracción de rayos X en 1991 por, Jones y Aizawa. Imagen derecha: esquema de un corte transversal del filamento, mostrando los dominios de la flagelina que forman la estructura.

Las interacciones entre las subunidades varían dependiendo de la conformación que adquiere el monómero de flagelina, el cual puede polimerizar en una fibrilla corta o larga. El número de fibrillas en cada conformación

determina la longitud de onda y la amplitud de la hélice (Namba y Vonderviszt, 1997). Recientemente se ha observado que varias de estas conformaciones se presentan durante el desplazamiento de la bacteria en medio líquido (Berg, 2003).

EL GANCHO

El filamento se conecta al cuerpo basal a través del gancho que funciona como un adaptador flexible que permite que el torque generado por el motor sea transmitido al filamento (Berg, 2003).

El gancho se compone de 120-130 subunidades polimerizadas de una sola proteína llamada FlgE.

Tridimensionalmente el gancho es similar al filamento, una macrohélice que se ordena en una red cilíndrica de 11 fibrillas con simetría pseudo hexagonal, pero su longitud de onda es mucho más corta que la del filamento (25 nm contra 130 nm). A diferencia del filamento, el gancho es más bien una estructura flexible, mucho menos rígida que el filamento, característica necesaria para la transmisión del torque, y es tan corto que solamente genera media vuelta de hélice resultando en su característica apariencia curva (Macnab, 1996).

La flagelina y FlgE no comparten mucha similitud a nivel de secuencia primaria, pero ambas tienen la habilidad de autoensamblarse (Moore y Kaplan, 1989; LeBlanc *et al.*, 1999).

En *S. enterica* se observó que FlgE está ausente en el citoplasma hasta que el eje del cuerpo basal está totalmente ensamblado. Dado que el mensajero de *flgE* sí está presente en estos estadios, estos resultados sugieren que la expresión de FlgE se encuentra regulada por el estado de ensamblaje del flagelo a nivel post-transcripcional (Bonifield *et al.*, 2000).

Para que el gancho pueda cumplir con sus funciones es necesario que tenga una longitud bien definida, un gancho corto puede no generar un ángulo suficiente para permitir la formación de la trenza; mientras que un gancho largo no permitiría la transmisión eficiente del torque (Macnab, 2003).

La longitud media del gancho se ha establecido para diferentes especies bacterianas variando desde 55 nm para el gancho de *S. enterica* (Hirano *et al.*, 1994), 69 nm para *Treponema phagedenis* (Limberger *et al.*, 1994), y más de 105 nm para *Campylobacter coli* (Power *et al.*, 1992). La longitud del gancho de *R. sphaeroides* es de aproximadamente 100 nm (González-Pedrajo *et al.*, 1997). A partir de estas observaciones se ha considerado que un gancho de mayor tamaño podría ayudar a las bacterias monoflageladas a soportar un mayor torque necesario para la motilidad.

En especies con un solo flagelo como *Rhodobacter sphaeroides* el gancho es una estructura recta, lo cual coincide con la idea de que la función del gancho curvo es favorecer el ordenamiento de los múltiples flagelos en una gran trenza móvil (González-Pedrajo, *et al.*, 1997). A la fecha se desconoce si en esta bacteria, el gancho recto es un requisito indispensable para la correcta transmisión del torque; sin embargo, existe evidencia que correlaciona el nado eficiente con la conformación recta (Ballado *et al.*, 2001).

CONTROL DE LA LONGITUD DEL GANCHO Y EXPORTACIÓN

La longitud del gancho está determinada por la proteína FliK. Se desconoce el mecanismo por el cual FliK controla el tamaño de esta estructura. Sin embargo, se ha propuesto que FliK contribuye al cambio de especificidad del

aparato de exportación flagelar hacia los substratos tipo III, i.e. flagelina (Bonifield *et al.*, 2000).

Para la polimerización del gancho se requiere de la proteína FlgD, ésta se ensambla en la punta del eje y facilita el ensamblaje de las subunidades de la proteína FlgE (Ohnishi *et al.*, 1994). Entre el gancho y el filamento existen dos proteínas (HAP1 y HAP3) que acoplan las estructuras del gancho y del filamento. Cuando el gancho termina de ser ensamblado, FlgD es reemplazada por la primera proteína asociada al gancho, HAP1, también denominada FlgK, posteriormente se ensambla HAP3, o FlgL (Macnab, 2003). Estudios de las interacciones de estas proteínas en solución, demostraron que la flagelina se asocia con HAP3, pero no con HAP2. Mientras que HAP3 también es capaz de asociarse con HAP2, lo cual indica que existe solamente una forma de ensamblaje de estas proteínas controlada, principalmente, por las afinidades entre pares de proteínas (Furukawa *et al.*, 2002).

HAP3 además de funcionar como proteína adaptadora, parece tener un papel en controlar o restringir las transiciones polimórficas del filamento generadas durante el nado. Esta idea surgió al observar que durante la rotación, el filamento de una mutante puntual en HAP3 adquiere una conformación recta, esto implica que la respuesta del filamento a la torsión, depende de cómo se encuentre anclado en la base (Fahrner *et al.*, 1994).

La proteína asociada al gancho HAP2, también llamada proteína de coronamiento, se encuentra en la parte distal del filamento y es necesaria para la correcta estructuración de los monómeros de flagelina en el filamento mismo. Las mutaciones en el gen que codifica para esta proteína provocan que el filamento no pueda ser ensamblado, y que continuamente se estén exportando monómeros de flagelina al medio de cultivo (Homma *et al.*, 1984).

La mayoría de las proteínas axiales que componen el flagelo son exportadas a través de un aparato de exportación específico. El aparato de exportación es miembro de la superfamilia tipo III que es ampliamente utilizado para la secreción de factores de virulencia en las bacterias patógenas (Macnab, 2003). A la fecha, se han identificado como parte de este sistema a seis proteínas integrales de membrana FlhA, FlhB, FliQ, FliP, FliO, FliR y a tres proteínas clasificadas como citoplasmáticas: FliH, FliI y FliJ (Bonifield, 2000; Hirano *et al.*, 2003). Las primeras se ubicarían en una zona especializada de la membrana dentro del cuerpo basal; mientras que las proteínas citoplasmáticas, se asociarían con las proteínas membranales, una vez localizadas (Fig. 8).

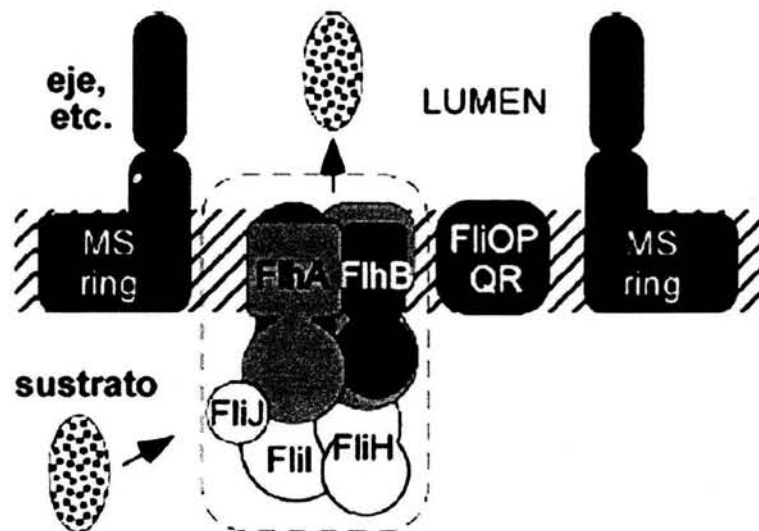


Figura 8. Esquema de las proteínas flagelares del aparato de exportación . Se cree que se encuentran localizadas en un poro del complejo de proteínas integrales de la membrana en el anillo MS del cuerpo basal. Modificado de Zhuk *et al.*, 2002.

Sin embargo, recientemente se observó que la proteína FliI (la cual posee actividad ATPasa necesaria para la translocación de los sustratos de exportación) se asocia periféricamente a la membrana interna, aún en ausencia de los componentes del aparato de exportación (Auvray *et al.*, 2002). La proteína

FliH también se asocia a la membrana interna, e interactúa con FliI modulando negativamente la actividad de hidrólisis de ATP de FliI, se ha sugerido que los substratos de exportación serían los responsables de vencer esta inhibición (Macnab, 2002; Minamino *et al.*, 2003; Fraser *et al.* 2003; Claret *et al.*, 2003).

Los substratos de exportación se han agrupado en dos clases: la clase tipo eje-gancho y la clase tipo flagelina. La primera clase comprende a la proteína FliE, a las proteínas del eje, FlgB, FlgC, FlgF, FlgG y FlgE; la segunda clase incluye a las proteínas FlgK, FlgL y flagelina. Las subunidades de flagelina no son exportadas hasta que el gancho acaba de ser ensamblado, por lo tanto, se considera que la exportación es un proceso ordenado en el cual existen dos estadios. En un primer momento, se exportan los substratos tipo eje-gancho, y posteriormente mediante un mecanismo desconocido, pero que involucra a la proteína FliK y FlhB, la especificidad del aparato de exportación cambia, y da inicio la exportación de los substratos tipo flagelina (Hirano *et al.*, 2003).

CUERPO BASAL

Esta es una estructura compleja embebida en la membrana citoplasmática que ancla al filamento y al gancho a la célula. A diferencia del gancho y del filamento, éste tiene simetría cilíndrica. El cuerpo basal es parte fundamental del motor flagelar y es la primera estructura del flagelo que rota acoplado el movimiento transmembranal de iones a la rotación del filamento, también está involucrada en el ensamblaje de la estructura completa y algunos de sus componentes controlan la dirección de la rotación flagelar (Aizawa, 2000).

El cuerpo basal consta de un eje y 4 anillos unidos al filamento, que interaccionan con varias capas de la envoltura celular (Fig. 9).

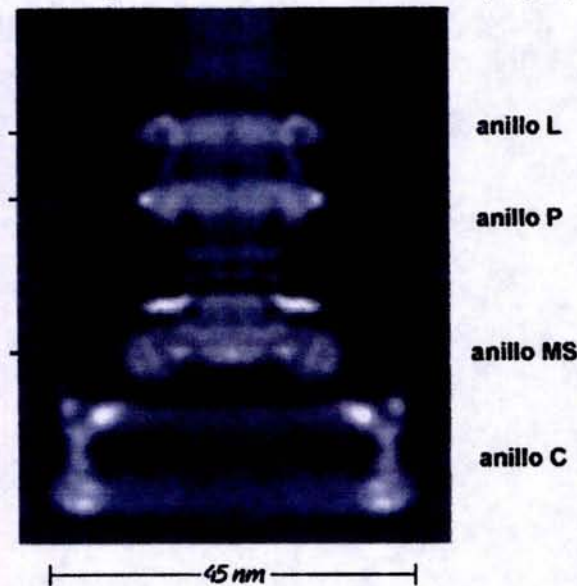


Figura 9. Imagen de microscopía electrónica del complejo gancho-cuerpo basal de *Salmonella*. Modificado de Francis *et al.*, 1994.

El anillo L está ubicado en la capa de lipopolisacáridos de la membrana externa; el anillo P, en la capa de peptidoglicanos. Se cree que estos anillos forman una estructura cilíndrica que funciona como “forro” permitiendo a la estructura del eje rotar libremente evitando la fricción, dicha función de “forro” mantiene al eje en su lugar y le permite penetrar la pared celular. Los anillos S y M se encuentran dentro de la membrana citoplasmática, se sabe que ambos son producto de un solo gen que codifica para la proteína FliF. Se ha propuesto que la parte citoplasmática del anillo MS interacciona con la proteína FliG, la cual forma parte del complejo del interruptor. Adicionalmente, existe evidencia que indica que el anillo MS interacciona con el aparato de exportación, o con algunos de sus componentes (Aizawa, 2000; Macnab, 2002,).

El eje se forma sobre el anillo MS y mediante el análisis de las imágenes en 3D (reconstruidas a partir de diferentes tomas en el microscopio electrónico), se

piensa que el eje se inserta en una concavidad presente en el anillo MS (Francis *et al.*, 1994). El eje está formado por las proteínas FlgB, FlgC, FlgF y FlgG (Kubori *et al.*, 1992). Recientemente se observó que la proteína FliE interactúa con FlgB, y por lo tanto se considera que FliE es un adaptador entre el anillo MS y el eje (Minamino *et al.*, 2000). Dado que el eje se encuentra normalmente cubierto por las proteínas que forman los anillos M y L, a la fecha se desconoce si posee simetría helicoidal, lo cual es relevante dado que sólo un acoplamiento adecuado permitiría la transmisión eficiente de la fuerza de rotación.

MOTOR

Basándose en análisis genéticos de mutantes con fenotipos paralizados, esto es, células con flagelos pero incapaces de rotarlos, se sabe que hay cinco proteínas responsables de la generación del torque en el motor flagelar: MotA, MotB, FliG, FliM y FliN. MotA y MotB son proteínas que atraviesan la membrana citoplasmática y forman un complejo. El complejo MotA/MotB es directamente responsable de conducir los protones al interior de la célula, y participa junto con FliG en la generación de torque (Blair y Berg, 1991).

Dado que MotB está anclado a la capa de peptidoglicanos, el complejo MotA/MotB representa el estator del motor flagelar (Blair *et al.*, 1991).

FliM y FliN no parecen estar involucradas en la generación de torque; sin embargo, se requieren para dar estabilidad a FliG dentro del motor (Kubori *et al.*, 1997; Lloyd *et al.*, 1996).

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE LOS GENES FLAGELARES.

El regulón flagelar de *E. coli* consiste de 40 genes distribuidos en 14 operones, éstos se agrupan en tres clases que se transcriben en orden jerárquico. En primer lugar se encuentran los genes de expresión temprana (clase I) agrupados en el operón maestro compuesto por *flhD* y *flhC*.

FlhD y *FlhC* son activadores transcripcionales específicos de los genes flagelares de clase II. En este nivel de la jerarquía (clase II), están incluidos los genes necesarios para el ensamblaje de las estructuras tempranas del flagelo (i.e. complejo gancho-cuerpo basal en inglés: hook-basal body HBB) y *fliA* que codifica para el factor σ^{28} , este último, indispensable para la expresión de los genes de clase III. En la clase III se encuentran los genes cuyos productos están involucrados en la morfogénesis tardía del flagelo, así como los genes que codifican para las proteínas del sistema quimiotáctico (Tabla 1).

El gen *flgM* se expresa dentro de la clase II de la jerarquía. La proteína FlgM actúa como un antagonista de FliA (σ^{28}) uniéndose a éste evitando la transcripción de los genes de clase III, por lo que a FlgM se le considera un factor anti- σ que inhibe la acción de FliA. El mecanismo por el cual σ^{28} se libera de la acción inhibitoria de FlgM, está relacionado con un punto de control que acopla la morfogénesis del flagelo con la regulación de la expresión genética; este mecanismo implica que una vez formada la estructura del cuerpo basal y del gancho, hay un cambio en la especificidad de los sustratos que son exportados; de esta forma, FlgM empieza a ser exportado y σ^{28} inicia la transcripción de los genes de clase III (Tabla 1). En caso de que exista alguna mutación que impida la formación del cuerpo basal-gancho, los genes de clase III no se expresan, lo que

representa un importante ahorro energético para la bacteria (Ohnishi *et al.*, 1992; Hughes *et al.*, 1993; Gillen y Hughes, 1991).

Tabla 1. Jerarquía de los operones que codifican las proteínas quimiotácticas en *E.coli*

CLASE I	CLASE II	CLASE III
<i>flhDC</i>	<i>flg</i> <u>AMN</u>	<i>fliC</i>
	<i>flg</i> BCDEFGHIJK <u>L</u>	<i>motAB cheAW</i>
	<i>flhBAE</i>	<i>tar tap cheRBYZ</i>
	<i>fli</i> <u>AZY</u>	<i>aer</i>
	<i>fli</i> <u>DST</u>	<i>trg</i>
	<i>fliE</i>	<i>tsr</i>
	<i>fli</i> FGHIJK	
	<i>fli</i> LMNOPQR	

Los genes que se encuentran subrayados forman parte de operones activados por FlhDC, pero tienen promotores adicionales activados por FliA. Tomada de Berg, 2003.

FlhD y FlhC actúan como heterotetrámeros uniéndose a la región reguladora de los promotores de clase II (Claret y Hughes, 2002). Las mutantes en *flhC* o *flhD* presentan fenotipo Fla⁻ (sin flagelo) (Prüß y Matsumara, 1996). Este fenotipo es el más común dentro de las mutantes y aparece incluso espontáneamente, debido a lo metabólicamente costoso que resulta para la célula la síntesis del flagelo.

Las mutantes paralizadas (Mot⁻) no presentan defectos morfológicos, pero los flagelos no rotan. En ocasiones esto se debe a la carencia de MotA y MotB o a mutaciones en los genes del interruptor *fliG*, *fliM* o *fliN*.

Las mutantes en los genes que codifican para las proteínas Che poseen flagelo y puede rotar pero presentan alteraciones en la detección o transducción

de la señal quimiotáctica al flagelo, lo que las hace insensibles a la presencia de atrayentes o repelentes (Macnab, 1996).

ENSAMBLAJE DEL FLAGELO

El ensamblaje del flagelo se lleva a cabo en forma secuencial, y como se mencionó en la sección anterior, la expresión de los genes flagelares se encuentra acoplada a la morfogénesis.

El anillo MS es la primera estructura en ser ensamblada y ancla el flagelo a la membrana citoplasmática. Se calcula que aproximadamente 26 monómeros de FliF se ensamblan para formar este anillo, en el centro, el poro central de la estructura alberga a los componentes membranales del aparato de exportación flagelar. El anillo MS interactúa con el eje, del lado periplásmico; y con el anillo C en el citoplasma.

El anillo C se compone de 3 proteínas: FliG, FliM y FliN; este anillo se localiza en la parte citoplasmática del anillo MS. La proteína FliG interactúa directamente con FliF en una estequiometría 1:1. El anillo C está directamente relacionado con el funcionamiento del motor flagelar, tanto en la generación de torque, así como en el cambio de dirección de la rotación flagelar controlada por el sistema quimiotáctico (Kubori *et al.*, 1997; Lux *et al.*, 2000; Marykwas *et al.*, 1996; Oosawa *et al.*, 1994).

El eje se forma sobre el anillo MS y está conformado por las proteínas FlgB, FlgC y FlgF (eje proximal) y FlgG (eje distal). Los anillos P y L (formados por las proteínas FlgI y FlgH, respectivamente) no requieren del ensamblaje previo de ningún componente flagelar. Después del ensamblaje de estas estructuras se construye el gancho y por último el filamento (Macnab, 2003).

En la figura 10 se presenta el proceso completo de ensamblaje de los elementos que conforman el flagelo.

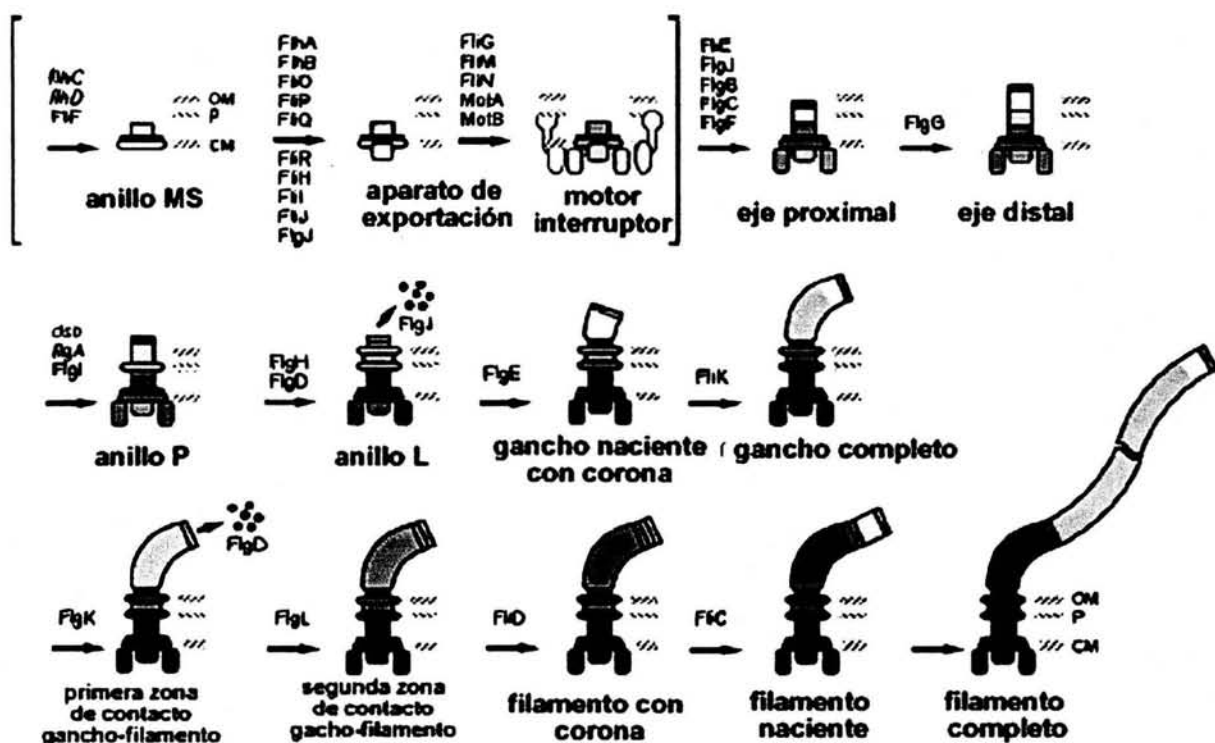


Figura 10. Ruta morfogénica del flagelo de *Salmonella*. Entre paréntesis se indican las estructuras que son ensambladas antes de que se emplee el sistema de exportación tipo III. Modificado de Macnab, 1996.

Rhodobacter sphaeroides

R. sphaeroides es una bacteria Gram-negativa fotosintética que pertenece al subgrupo de las α -proteobacterias, el cual se caracteriza por poseer un genoma con alto contenido de G+C (alrededor del 60%) e incluye especies como *Agrobacterium tumefaciens*, *Azospirillum brasilense*, *Caulobacter crescentus* y *Sinorhizobium meliloti*. La mayoría de estas bacterias muestran una gran flexibilidad metabólica (Armitage y Schmitt, 1997).

Las células de *R. sphaeroides* presentan alta variabilidad morfológica, especialmente en medios con nutrientes complejos, su morfología es uniforme en medios con presencia de sales minerales. Se pueden encontrar células ovoides o esféricas de unas 0.7-4.0 μm de diámetro (Imhoff, 1989).

Los cultivos de esta bacteria en condiciones anaerobias expuestos a la luz son pardos o cafés, en los cultivos aeróbicos las células son rojizas. La coloración café se debe a la acumulación de pigmentos fotosintéticos, entre los cuales se encuentran bacteriofita *a* y carotenoides de la serie esferoidena (Imhoff, 1989). *R. sphaeroides* crece preferentemente de forma fotoheterotrófica bajo condiciones anaerobias en presencia de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y donadores de electrones (Imhoff, 1989).

Fotoautotróficamente crece lentamente en presencia de hidrógeno molecular o sulfito como donador de electrones. Un buen crecimiento se presenta en condiciones aeróbicas en la oscuridad utilizando ácidos orgánicos como fuentes de carbono. El metabolismo fermentativo anaeróbico en oscuridad en presencia de piruvato y azúcar permite solo un crecimiento marginal. Algunas cepas son capaces de desnitrificar bajo condiciones anaeróbicas en la oscuridad. El crecimiento ocurre en un intervalo de pH 6.0 a 8.5 (el óptimo es pH 7.0) y a temperatura entre 30-34°C (Imhoff, 1989).

En cultivos jóvenes, las células son móviles debido a la presencia de un flagelo subpolar (Armitage *et al.*, 1999).

R. sphaeroides rota su flagelo en una sola dirección a favor de las manecillas del reloj CW (Armitage y Macnab, 1987). Aunque Packer y Armitage en 1993, describieron algunas variantes CCW en ningún caso se observó que los motores cambiaran el sentido de la rotación hacia la dirección CW. La rotación CW del flagelo provoca el desplazamiento de la bacteria siguiendo una trayectoria lineal (Fig.11).

Estos desplazamientos son interrumpidos por breves episodios de paro en los cuales la bacteria deja de nadar y el filamento flagelar se relaja de la forma helicoidal normal (amplitud pequeña, longitud de onda larga) utilizada para la propulsión, a la forma enrollada (gran amplitud, longitud de onda corta). El movimiento Browniano reorienta a la bacteria la cual reanuda su desplazamiento en una nueva trayectoria (Armitage y Macnab, 1987).

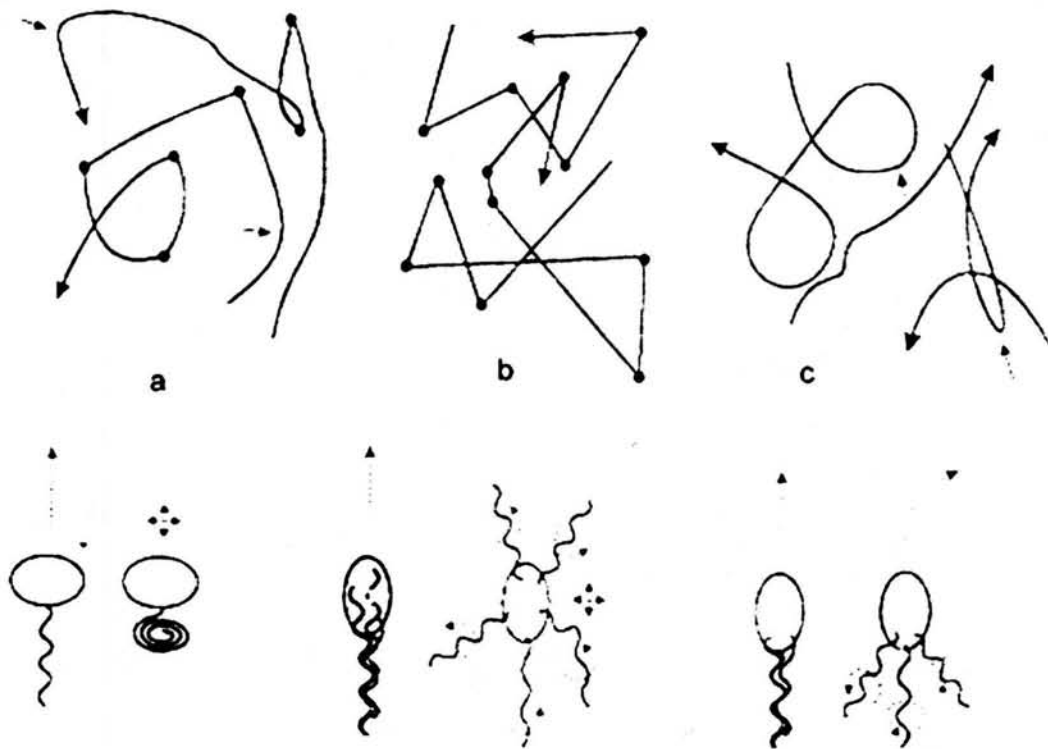


Figura 11. Arreglo flagelar y mecanismo de nado de a) *Rhodobacter sphaeroides*, b) *Escherichia coli* c) *Sinorhizobium meliloti*. *R. sphaeroides* tiene un motor unidireccional que puede parar y cambiar de velocidad periódicamente. Cuando el motor se detiene el flagelo se relaja y la rotación lenta es la que reorienta a la célula. *E. coli* nada recto cuando los flagelos están en CCW y se agregan en una trenza, periódicamente cambia a CW y la trenza se disgrega, la célula se bambolea y se reorienta. La dirección de nado también cambia sin paradas cuando la velocidad varía. *S. meliloti* tiene flagelos que sólo pueden rotar en CW, la velocidad individual de cada motor puede variar y esto provoca que los filamentos se separen y la célula gire (ver las flechas) el flagelo nunca se detiene ni cambia de dirección. Todos los mecanismos resultan en un patrón de nado tridimensional y azaroso. Tomado de Armitage y Schmitt, 1997.

La velocidad de nado de *R. sphaeroides* es mucho más rápida que la de *E. coli* que tiende a hacerlo $\sim 20\mu\text{m s}^{-1}$ mientras que *R. sphaeroides* alcanza velocidades de $35\mu\text{m s}^{-1}$ (Armitage y Schmitt, 1997) y a diferencia de las bacterias entéricas, puede cambiar la velocidad durante el nado (Armitage *et al.*, 1999).

En esta especie además de las alteraciones espontáneas en la velocidad, también hay incrementos dependientes de estímulos, estos incrementos pueden ser de hasta el 25%. El aumento en la velocidad se ha observado cuando se adicionan un limitado número de estímulos químicos, entre ellos: ácidos orgánicos y iones de potasio. El incremento de la velocidad es mantenido por más de 10 minutos y la velocidad regresa a los niveles pre-estímulo después de que éste ha sido aparentemente metabolizado y las concentraciones han disminuido por debajo del nivel crítico (Brown *et al.*, 1993).

En *R. sphaeroides* y muchas otras α -Proteobacterias (como *Sinorhizobium meliloti*) existen varias copias de los genes quimiotácticos. En *R. sphaeroides*, estas copias se encuentran distribuidas a lo largo del genoma, en al menos cinco posibles unidades transcripcionales (Fig. 12).

El análisis del genoma completo de *R. sphaeroides*, reveló la presencia de cuatro genes homólogos a *cheA*, tres a *cheB*, tres a *cheR*, tres a *cheW*, seis a *cheY* y alrededor de 13 genes que potencialmente codifican para proteínas del tipo MCP. Sin embargo, no fue posible identificar un gen homólogo a la fosfatasa CheZ.

Por otro lado, se identificó un conjunto de genes flagelares duplicados que potencialmente podrían estar involucrados en la biogénesis del flagelo (Mackenzie *et al.*, 2001). El conjunto de genes flagelares reiterados se muestra en la Tabla 2.

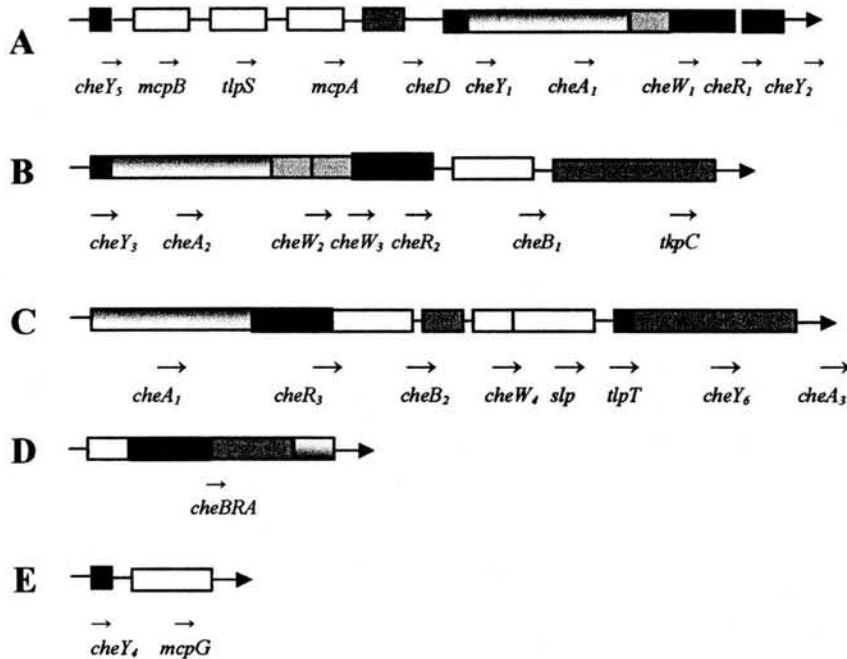


Fig. 12 Loci de quimiotaxis de *Rhodospirillum rubrum*. **A.** El primer operón de quimiotaxis (*cheOp*₁) descrito por Ward *et al.*, 1995 **B.** El segundo operón de quimiotaxis (*cheOp*₂) descrito por Hamblin *et al.*, 1997 **C.** El tercer locus de quimiotaxis (*cheOp*₃) **D.** El locus *cheBRA* **E.** El locus *mcp* descrito por Shah *et al.*, 2000 y Wadhams *et al.*, 2000. Se sabe que además de éstos existen otras *mcp*'s y otro homólogo de *tlp* en un loci no relacionado.

S. meliloti tiene dos copias de los genes *cheY*, la evidencia experimental sugiere, que CheY1 funciona como un basurero de fosfatos, mientras que CheY2 se une al motor y provoca la disminución de la rotación del flagelo (Scharf y Schmitt, 2002). A partir de estos hallazgos se consideró que alguna o algunas de las proteínas CheY de *R. sphaeroides*, pudieran funcionar como basurero de fosfatos (Armitage, 1999). Sin embargo, recientemente se demostró que *in vitro* las seis proteínas CheYs son capaces de unirse a la proteína FliM (Ferre *et al.*, 2004), indicando que la rotación del motor puede estar controlada no sólo por la unión de estas proteínas, sino por algún evento posterior que involucra un segundo evento de señalización.

Los estudios sugieren que el mínimo requerimiento para la quimiotaxis normal en *R. sphaeroides* son todas las proteínas codificadas por el segundo y el tercer loci mostrados en la figura 12, además de *cheY*₄. Se ha postulado que las

múltiples proteínas quimiosensoras no son redundantes y más bien cada una de ellas tiene un papel individual posiblemente interactuando de distinta manera con otros componentes de la ruta quimiotáctica (Porter *et al.*, 2002).

Tabla 2. Genes Duplicados relacionados con la Biosíntesis del Flagelo y la Quimiotaxis de *Rhodobacter sphaeroides*

GENE	COPIAS	FUNCION	% IDEN	% SIM	P	PUNTAJE	CONTIG (ORF NO.)
Biosíntesis del Flagelo							
<i>flgB</i>	2	Proteína del cuerpo basal	31	49	2.00E-04	45	109(4),138(45)
<i>flgC</i>	2	Prot. eje del cuerpo basal	28	43	4.00E-04	44	109(5),138(46)
<i>flgE</i>	2	Proteína del gancho flagelar	24	54	3.00E-27	124	124(21),138(48)
<i>flgF</i>	2	Prot. del eje proximal del cuerpo basal	30	42	1.00E-04	39	109(8),138(49)
<i>flgG</i>	2	Prot. eje del cuerpo basal	42	63	2.00E-52	206	109(9),138(50)
<i>flgH</i>	2	Prot. del anillo L del cuerpo basal	30	45	2.00E-14	80	109(12),138(51)
<i>flgI</i>	2	Proteína del anillo P	39	54	2.00E-34	147	124(24),138(48)
<i>fliI</i>	2	ATP sintetasa específica del flagelo	36	50	8.00E-60	232	162(80),109(32)
<i>fliF</i>	2	Prot. anillo M basal	29	42	3.00E-23	110	162(77),124(1)
<i>fliN</i>	2	Proteína del interruptor del motor flagelar	35	58	4.00E-05	46	102(18),124(35)
<i>fliP</i>	2	Biogénesis del flagelo	41	67	2.00E-26	120	102(20),124(5)
<i>fliQ</i>	2	Biogénesis y exportación del flagelo	47	66	3.00E-11	66	102(21),109(7)
<i>fliR</i>	2	Biogénesis	33	46	1.00E-20	101	102(22),109(23)
<i>fliA</i>	2	Ensamblaje	36	55	6.00E-95	350	162(20),109(22)
<i>fliB</i>	2	Ensamblaje	42	57	1.00E-20	101	102(230),109(24)
QUIMIOTAXIS							
<i>cheA</i>	4	Histidin cinasa quimiotáctica	34	47	4.00E-77	290	174(36),121(38)
<i>cheB</i>	3	MCP-glutamato metilesterasa	40	52	9.00E-56	218	118(33),42(2)
<i>cheR</i>	3	MCP-glutamato metiltransferasa	35	52	2.00E-33	143	118(28),48(6)
<i>cheW</i>	3	proteína quimiotáctica de andamiaje, regulador positivo de CheA	33	55	9.00E-13	73	123(31),131(30)
<i>cheY</i>	6	Reguladora de la respuesta quimiotáctica	69	82	1.00E-42	172	118(27),48(4)
<i>tlp</i>	4	Proteína tipo transductora	24	39	5.00E-26	120	194(73),182(97)
<i>mcp</i>	7	Proteína quimiorreceptora	42	62	3.00E-67	257	194(125),16(30),173(9),141(48),17(5)

Modificada del original elaborado por Madhu Choudhary en: <http://mmg.uth.tmc.edu/sphaeroides>.

ANTECEDENTES

En un trabajo realizado previamente (García *et al.*, 2001) se reportó la presencia de un gen homólogo a *fliI* en *R. sphaeroides*. Este gen se localiza en un fragmento *EcoRI* de 5.3 kb flanqueado por dos marcos de lectura abierta que mostraron homología con *fliH* y *fliJ* de bacterias entéricas. En uno de los extremos del fragmento se identificó el extremo 5' del gen *fliM*. Posteriormente, mediante hibridación se identificó la región codificadora completa de *fliM* en un fragmento *SalI* de 4.6 kb. La secuencia de este fragmento permitió identificar a los genes *fliN*, *fliO* y parte de *fliP*. Posteriormente, se identificaron los genes *fliQ*, *fliR* y *fliB*.

Los codones de inicio de *fliL*, *fliM* y *fliN* se localizaron sobrelapados con el codón de paro del marco de lectura abierta del gen predecesor, lo cual sugiere que pertenecen a la misma unidad transcripcional.

El gen *fliM* se interrumpió mediante la inserción de un cassette que llevaba los genes *uidA-aadA*; *uidA*, es un gen reportero el cual codifica para la enzima β -glucuronidasa (GUS), y el gen *aadA*, codifica para la aminoglicósido-3:adeniltransferasa, la cual confiere resistencia a espectinomicina (Spc^R) (Metcalf *et al.*, 1993). Por un evento de doble recombinación, el alelo silvestre del cromosoma de *R. sphaeroides* se reemplazó por el alelo *fliM::uidA-aadA*. La cepa resultante se denominó NG1 (García *et al.*, 1998).

La cepa NG1 es incapaz de nadar. Sin embargo, puede ser complementada con el plásmido pRK415 *fliMN*⁺. La cepa complementada expresa un alto nivel de β -glucuronidasa (GUS), de forma dependiente del promotor del gen *fliM* (García *et al.*, 1998).

La cepa NG1/pRK415 *fliMN*⁺ se mutó utilizando el transposón *TnpbaA* (el cual se inserta al azar en el cromosoma y plásmido de la bacteria) y se seleccionaron aquellas mutantes incapaces de nadar y con fenotipo GUS⁺ o GUS⁻.

En este trabajo se eligieron algunas de estas cepas mutantes para determinar el sitio de inserción del transposón y correlacionar éste con su fenotipo.

Por otro lado, se mutó el gen *flhB* siguiendo una estrategia de genética reversa. Se evaluaron los resultados de ambas técnicas y se discuten las ventajas y desventajas de las mismas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar mutantes en genes flagelares de *Rhodobacter sphaeroides* obtenidas por las técnicas de mutagénesis al azar y mutagénesis dirigida para caracterizar el regulón flagelar en esta bacteria.

OBJETIVOS PARTICULARES

Mutagénesis al azar:

*Identificar los sitios de inserción del transposón *Tnp_{hoA}* y correlacionar éste con su fenotipo.

Mutagénesis dirigida:

*Aislamiento y caracterización de una cepa mutante en el gen *flhB*.

*Determinar el fenotipo de las cepas que llevan la mutación *flhB::uidA-aadA*.

*Dado que se sabe que el cassette '*uidA-aadA* ejerce un efecto polar sobre la expresión de los genes río abajo de la inserción, se determinará si la cepa mutante *flhB::uidA-aadA* puede ser complementada únicamente con *flhB*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Cepas de *Escherichia coli*:

JM103: $\Delta(lac-pro)$, *thi*, *strA*, *supE*, *endA*, *sbcB*, *hsdR*/ F' *traD36*, *proAB*⁺, *lacI*^q, *lacZ* Δ M15.

XL1-Blue: *recA1*, *endA1*, *gyrA46*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*/ F':: Tn10, *proAB*⁺, *lacI*^q, *lacZ* Δ M15

S17-1: Pro⁻, Res⁻, *recA*, plásmido integrado RP4-Tc::Mu-Kn::Tn7

Cepas de *Rhodobacter sphaeroides*:

WS8: cepa silvestre con resistencia espontánea a ácido nalidíxico.

Las cepas de *E. coli* se crecieron a 37 °C en medio sólido, o en medio líquido en agitación continua a 250 rpm. Las cepas de *R. sphaeroides* se crecieron a 30 °C en medio sólido, o en agitación a 250 rpm bajo condiciones de obscuridad.

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

Luria: 1% de bactotripton, 0.5% de extracto de levadura y 1% de cloruro de sodio. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 min. a 121 °C y 15 lb de presión.

Medio mínimo de succinato (Sistrom, 1960): A concentración 10X:

200 mM KH₂PO₄; 37.8 mM NH₄SO₄, 340 mM ácido succínico; 6.7 mM L-glutámico; 2.5 mM L-aspártico; 85 mM NaCl; 10.4 mM ácido nitriloacético; 12 mM MgSO₄·7H₂O; 2.3 mM CaCl₂; 0.07 mM sulfato ferroso; 1.6 mM molibdato de amonio; 1 ml de solución de elementos traza 10X (4.7 mM EDTA; 38 mM ZnSO₄·7H₂O; 18 mM sulfato ferroso; 9 mM MnSO₄·7H₂O; 1.5 mM

CuSO₄·5H₂O; 1.8 mM ácido bórico); se ajustó el pH a 7.0 con KOH y se esterilizó por autoclave. Finalmente se agregó 1 ml/l de una solución madre de vitaminas (Para 100 ml de solución madre: 1 g. de ácido nicotínico, 0.5 g. de tiamina y 0.01 g. de biotina).

Medio para nado. (Armstrong y Adler, 1967): 0.3% bactotripton, 0.3% extracto de levadura y 0.3% de agar bacteriológico. Se esterilizó por autoclave 20 minutos, a 15 lb y 121°C.

Antibióticos. Cuando se requirió se utilizaron las siguientes concentraciones de antibióticos para la selección de las clonas de interés.

Para *E. coli*:

ampicilina 100µg/ml; tetraciclina 25µg/ml; kanamicina 50µg/ml; estreptomina 100µg/ml y espectinomicina 50µg/ml.

Para *R. sphaeroides*:

ácido nalidíxico 25µg/ml; tetraciclina 1µg/ml; espectinomicina 50µg/ml.

MÉTODOS

Prueba de nado en agar suave en medio mínimo

0.14mg de Bacto-agar se añadieron a 25ml de agua se esterilizó y se le agregaron 25 ml de medio Sistro 2X. Al enfriarse se le añadieron 5µl de vitaminas y en caso necesario algún antibiótico.

Se vació en dos cajas de Petri y se esperó a que gelificara.

Purificación de plásmido en pequeña escala de *R. sphaeroides*

Un cultivo de toda la noche se centrifugó en un vial de 1.5 ml a máxima velocidad durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se centrifugaron 1.5 ml mas del cultivo en el mismo tubo. El botón celular se resuspendió y se añadieron 300µl de STET (STET: 8% sacarosa, 5% tritón, 50mM EDTA pH 8, 50mM Tris-HCl pH 8). Se añadieron 27µl de lisozima (10µg/ml en agua) y se mezclaron 2 segundos. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente.

En un vaso con agua hirviendo se incubó 45 segundos y se centrifugó 20 minutos.

El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se le añadieron 400µl de isopropanol, se incubó en hielo 20 minutos y se centrifugó 20 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante cuidando que no se desprendiera el precipitado, se añadieron 400µl de etanol al 70%, se invirtió el tubo 2 ó 3 veces. Se eliminó el etanol y se dejó secando al aire el tubo 5 min. Se secó en un evaporador (savant) 10 minutos y se resuspendió totalmente en el volumen adecuado de agua, en el caso necesario se dejó a 65°C de 5 a 10 minutos para resuspender.

Extracción de DNA cromosomal (Sambrook *et al.*, 1989)

Se centrifugaron 10ml de un cultivo de toda la noche a 4,000rpm durante 7 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 1.5ml de buffer TE, se añadieron 90µl de SDS al 10% más 20µl de proteinasa K (10 mg/ml).

Se incubó toda la noche a 37°C.

Al siguiente día se le añadió 1 volumen de fenol:cloroformo 1:1, se mezcló por inversión hasta que se formó una emulsión y se centrifugó 7 min, a máxima velocidad. Se colectó la fase acuosa y se pasó un tubo limpio, Se repitió. En algunos casos se realizó una tercera extracción con 1 volumen de cloroformo y se centrifugó igual, se colectó la fase acuosa y se pasó a un tubo limpio.

Se añadió 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y se mezcló por inversión, se añadió 1 volumen de isopropanol y se mezcló, en ocasiones se dejó incubando toda la noche a -20°C o las hebras de DNA se colectaron en el momento en una varilla de vidrio. Se lavaron con etanol al 70%. Las hebras se dejaron secar al aire libre y una vez bien secas se resuspendieron en el volumen de agua bidestilada y desionizada necesario.

Electroporación (Sharma y Schimke, 1996)

Las celdas para electroporar se colocaron en hielo previamente. Se tomó 1ml de medio Luria sin antibióticos y se colocó en un tubo estéril.

Se tomaron 1.5 o 2µl de la ligasa o plásmido de interés y se mezclaron con las células competentes (células condicionadas fisiológicamente para la captación de DNA), se pasaron a la celda y se electroporaron a 1.8Kv R= 180-200 Ω. Al finalizar el pulso se mezclaron repetidamente con el medio Luria y se pasaron a un tubo. Se dejaron recuperando las células de 30 min a 1 hora a 37°C en agitación. Se pasaron a un vial estéril y se centrifugaron a 6,000 rpm, 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en el líquido que quedó en el tubo. Se

sembró en el medio selectivo con los antibióticos necesarios. Las cajas se incubaron a 37°C.

Protocolo de hibridación tipo Southern Blot (Southern, 1975)

Se corrió un gel de agarosa al 1% con las muestras de DNA cromosomal digerido con distintas enzimas. Después de correr el gel se tiñó con bromuro de etidio y se sacó una fotografía.

Desnaturalizar

Después de tomar la foto se incubó el gel en 5 volúmenes de HCl 0.25mM en agitación suave hasta que el azul de bromofenol se tornó amarillo pero no más de 15 minutos.

Se incubó el gel en 5 volúmenes de NaCl 1.5M, NaOH 0.5M por 20 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave. Después se repitió este lavado.

Neutralizar

Se incubó el gel en 5 volúmenes de Tris 1.0M (pH 7.5) NaCl 1.5M 20 minutos a temperatura ambiente en agitación suave. Se repitió este paso con solución fresca para verificar la neutralización se prueba el pH, de no ser de 8.5 o menor se repitió de nuevo.

Transferencia del gel

Se cortó una pieza de membrana de nylon del mismo tamaño del gel, se remojó en agua desionizada.

SSC 20X Solución Stock

Para 1000ml:

	Concentración final	
NaCl	3M	175.3g
Na ₃ citrato × H ₂ O	0.3M	88.2g

Se disolvieron en 800 ml de H₂O bidestilada y desionizada, se ajustó el pH a 7.0 con HCl 1M y se aforó en 1 litro.

Se ensambló parcialmente el aparato Possi Blot (Stratagene) y se cubrió la plataforma con papel filtro (3MM) saturado con SSC 10X, se eliminaron todas las burbujas de aire. Se colocó la membrana de nylon hidratada en SSC 10X, y sobre ésta se invirtió el gel y se colocó otro papel filtro saturado en SSC 10X, asegurándose de que no quedaron burbujas de aire. Se colocó una segunda hoja de papel Whatman 3MM encima y una esponja impregnada de SSC 10X.

Se encendió la fuente de presión a 75mmHg durante 30 minutos.

Una vez transferido el DNA se dejó la membrana dentro de un fólter de papel filtro, durante 2 horas a 80°C para que se fijara el DNA en la membrana. El gel se tiñó de nuevo en bromuro de etidio para comprobar que se transfirió totalmente el DNA.

Prehibridación

Se utilizó la siguiente solución:

Para 50ml. de solución

	Concentración final	
Formamida 100%	50% (v/v)	25ml
SSPE 20X	6X	15ml
(SSPE: NaCl 3M, NaH ₂ PO ₄ H ₂ O 0.2M, Na ₂ EDTA, 0.02, pH 7.4)		
Denhart's 50X	5X	5ml
(Denhart's 100X : Ficoll 400 (10g), Polivinilpirrolidona (10 g) BSA (10 g) en 500ml, guardar en alícuotas de 25ml)		
SDS10%	1%	5ml

Se utilizaron 20µl de DNA de timo por cada ml de solución prehibridadora. Se hirvió previamente durante 10 minutos, se centrifugó un toque a 4° y se incubó en hielo durante 10 minutos.

Se calentó la solución prehibridadora a 42°C y se mezcló bien con el DNA de timo, se pasó la membrana de nylon a una bolsa de hibridación se colocó la mezcla en la bolsa tratando de que no quedaran burbujas. Se selló la bolsa y se incubó a 42°C mínimo durante 4 horas.

Hibridación

Se utilizó una solución de hibridación que para 50 ml contiene:

	Concentración final	
Sulfato de dextrán	10%	5g
Formamida 100%	50%	25ml
20X SSPE	6X	15ml
Solución Denhardt´s 50X	5X	5ml
SDS 10%	1%	5ml

La sonda del *TnpbaA* se marcó utilizando biotina-14-dCTP y un kit de marcaje por cebadores al azar (Invitrogen). La sonda se desnaturalizó en agua hirviendo junto con el DNA de timo durante 10 minutos.

Inmediatamente se transfirió a hielo y se centrifugó el DNA de timo a 4°C se incubó 10 minutos en hielo. Se cambió la solución prehibridadora por la solución hibridadora, el DNA de timo y la sonda marcada. Se incubó a 42°C toda la noche.

Lavado de la membrana

Se lavó dos veces con SSC5X y SDS 0.5% a 65°C durante 5 minutos.

Se lavó una vez con SSC 0.1X y SDS 0.1% a 50°C una hora.

Se lavó con 2ml/cm² de SSC 2X a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Unión del conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina SA-AP

Se lavó dos veces la membrana durante 1 minuto con TBS- (Para 1 litro: NaCl 8 g, KCl 0.2g, Tris base 3 g) TWEEN 20 y se colocó en un recipiente con tapa.

Se requirió de una solución bloqueadora, para 1ml:

Se pesaron .03g de BSA por cada ml de TBS-TWEEN 20, dejando que se disolviera por 2 o tres horas. Se filtró y guardó a 4°C.

Se precalentó la solución bloqueadora a 65°C y se vació en el recipiente, se incubó a 65°C durante una hora en agitación suave.

5 minutos antes de sacar la membrana se preparó el conjugado SA-AP (streptavidina-fosfatasa alcalina):

5µl de SA-AP en 5ml de TBS TWEEN 20 se filtraron.

Por otro lado una vez que pasó la hora de bloqueo de la membrana a 65°C se retiró la solución bloqueadora y la membrana se pasó a una bolsa de hibridación junto con la dilución del conjugado. Se selló la bolsa y se agitó manualmente durante 10 minutos. Posteriormente se lavó 15 minutos con TBS TWEEN 20 seguido de un lavado por una hora.

Se lavó con Buffer de lavado final el cual se describe a continuación:

Para 500ml

	Concentración final	
Tris base	100mM	6.05 g
NaCl	100mM	2.925g
MgCl ₂ •6H ₂ O	50mM	10.2g

Se disolvieron los reactivos en 400ml de agua destilada y desionizada, se ajustó pH a 9.5 con HCl 4N y se aforó a 500ml.

Se lavó la membrana con esta solución durante 15 minutos.

Agente de Detección

Se removió la membrana de la bolsa y se colocó en un acetato, se evitó que se secase, se añadió 1ml de solución de detección (0.01ml/cm²) lumi-PHOS530 (Gibco-BRL). Se esperaron 5 minutos y se colocó en un cassette oscuro. La membrana se expuso sobre una placa de rayos X durante 5 minutos.

Protocolo de Extracción de fragmentos de DNA de Gel de Agarosa

QIAEX II KIT (Hamaguchi y Geiduschek, 1962; Volgestein y Gillispie, 1979)

La extracción y purificación de fragmentos de DNA utilizando este estuche de reactivos, se basa en la solubilización de la agarosa y la absorción selectiva y cuantitativa de los ácidos nucleicos de partículas de gel de sílice del QIAEX II en presencia de una alta concentración de sales. La elución del DNA se llevó a cabo con una solución de salinidad baja como un buffer Tris o agua.

Para purificar DNA a partir de un gel de agarosa al 0.1% se corrieron las muestras de DNA digerido, junto con un marcador de peso molecular, y con luz UV de longitud de onda larga se cortaron las secciones del gel que contenían los fragmentos con el peso molecular deseado.

Se equilibraron los viales, se colocaron los fragmentos de gel, se pesaron y se añadieron 3 volúmenes de Buffer de Solubilización QX1 que contiene un indicador de pH, cuando se requirió, se añadieron 2 volúmenes de agua (para fragmentos de más de 4Kb). QIAEX II se resuspendió mezclando vigorosamente durante 30 segundos y se añadieron a cada tubo 10 µl. Se incubaron los tubos a 50°C 10 min mezclando cada 2 min, cuando el color no era amarillo, se añadió acetato de sodio 3M pH 5.0 (10µl).

Se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente 14 krpm, se retiró el sobrenadante y se centrifugaron brevemente (aprox. 1 min), se añadieron 500µl de Buffer QX1. Se repitió este paso. Se resuspendió en 500µl de Buffer PE y se centrifugó un minuto. Se repitió y se tiró el sobrenadante. Se dejó secar el precipitado al aire libre hasta que se puso blanco y se resuspendió en 20µl de agua bidestilada y desionizada, se incubó 10 minutos a 42°C, se centrifugó un minuto, se tomó el sobrenadante y se pasó a un tubo limpio.

Extracción de Fragmentos de DNA de gel de Agarosa de bajo punto de fusión

Para preparar 10ml de agarosa al 1.2%, se pesaron 0.12 g de agarosa y con esta se sellaron las esquinas de la cámara donde se vació la agarosa de bajo punto de fusión.

Se preparó un gel al 0.8% de agarosa de bajo punto de fusión, se pesaron 0.12gr de agarosa en 15ml de buffer TBE (Tris/borato/EDTA). Se taró el matraz y se fundió la agarosa tratando de que no se perdiera mucho volumen, una vez que estuvo tibia se volvió a pesar y se añadió agua bidestilada y desionizada hasta completar el volumen. Se vació en la cámara y se esperó a que gelificara a 4°C de 2 a 3 horas.

Se cargó el gel con las muestras de DNA digerido con las enzimas necesarias junto con un marcador de pesos moleculares.

Se cortaron las bandas del tamaño necesario utilizando luz UV longitud de onda larga y se colocaron los fragmentos en viales.

Se fundieron los fragmentos a 65°C durante 10 minutos, se calculó el volumen de agarosa fundida y se añadió 1/10 de NaCl 5M, se mezclaron bien y se incubaron 5 minutos a 65°C.

Se saturó fenol con NaCl, para ello se mezclaron vigorosamente 100µl de NaCl 5M con 400µl de agua y 500µl de fenol, se centrifugaron 1 minuto y se retiró la fase acuosa.

Se incubó la agarosa fundida 5 minutos a 37°C, se añadieron al tubo 2/3 del volumen de fenol saturado e inmediatamente se agitó en vortex 30 segundos rápido para que no gelificara, se centrifugó 5 minutos a temperatura ambiente a 14 krpm. Se pasó la fase acuosa a un tubo limpio, al fenol restante se añadieron 45µl de buffer TE o agua y 5µl de NaCl 5M. Se mezclaron.

Se centrifugó, y se recuperó la fase acuosa, se mezclaron ambas fases acuosas y se les añadió 1 volumen de fenol /cloroformo (1:1) vortex 15 segundos y se centrifugó 2 minutos. Se pasó la fase acuosa a un tubo limpio, se añadió 1µl de tRNA y 1 volumen de isopropanol. Se dejó precipitando toda la noche a -20°C.

Al otro día se centrifugaron los tubos 15 minutos a 4°C, se retiró todo el isopropanol cuidando de no llevarse el botón, se lavó con etanol al 70% y se secó en el savant durante 10 minutos. Se resuspendió en el volumen necesario de agua.

Purificación de plásmidos en pequeña escala (“mini-preps” hervidos) de *Escherichia coli* (Holmes y Quingley, 1981)

A partir de 3 ml de un cultivo de toda la noche, se tomaron 1.5ml y se pasaron a un vial, se centrifugaron 4 minutos a 14 krpm a temperatura ambiente, se decantó el sobrenadante y se resuspendió en lo que queda en el tubo, se agregaron 300µl de STET (8% sacarosa, 5% tritón, 50mM EDTA pH 8.0, 50mM Tris-HCl pH 8.0) y 30µl de lisozima (10mg/ml) se mezcló 2 segundos. Se hirvió 45 segundos y se centrifugó 20 minutos a 14 krpm a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 400µl de isopropanol, se dejó precipitando en hielo 20 minutos, y se centrifugó 20 minutos a 4°C. Se decantó el

sobrenadante y se lavó el precipitado con 400µl de etanol al 70%, se invirtió el tubo 4 o 5 veces y se decantó el etanol. Se secó el precipitado en el savant 15 minutos, se resuspendió en el volumen de agua necesario.

Purificación de plásmidos por columna (QUIAGEN KIT)

Este método permite aislar plásmidos de manera rápida basada en la selectividad de las resinas QUIAGEN que permite aislar formas ultrapuras superenrolladas de plásmidos de DNA en pocas horas, los plásmidos o cósmidos aislados de esta forma pueden ser utilizados en aplicaciones tales como transfección, secuenciación manual o automática y modificaciones enzimáticas.

El procedimiento se basa en el método de lisis alcalina optimizada (Birboim y Doly 1979); se ha condensado en tres pasos y utiliza una resina de intercambio iónico la cual posee una superficie hidrofílica con grupos DEAE que producen una alta densidad de cargas positivas en la superficie de la resina, esto aunado a la presencia de un poro grande permite una separación selectiva de plásmidos ultrapuros de otros tipos de ácidos nucleicos mediante pH y la concentración de cloruro de sodio adecuados sin necesidad de utilizar fenol, cloroformo, bromuro de etidio o cloruro de cesio.

La purificación de plásmidos se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante, que se describen brevemente: partiendo de un cultivo de 30 ml de toda la noche se concentraron las células y se resuspendió el botón celular en 4 ml de buffer P1 con RNAsa A 10mg/ml, se le adicionaron 4 ml de buffer de lisis P2 que contiene NaOH-SDS. Se incubó durante 5 minutos y se procedió a neutralizar con 4 ml de buffer P3 que contiene acetato ácido de potasio, se mezcló por inversión y se incubó a 4° C durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugó por media hora y el sobrenadante que se recuperó se precipitó con

isopropanol. El sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió en 500µl de buffer TE, se agregaron 500µl de QBT, en ese momento se tomó una alícuota de 20µl y se corrió un gel para cuantificar el DNA que se tenía. Se colocó el sobrenadante en una columna QUIAGEN P20 equilibrada con 1ml de QBT y se pasó el sobrenadante por la columna, se repitió dos veces y se procedió a lavar la columna con Buffer de lavado QC cuatro veces, después de esto se eluyó con 0.8ml de buffer QF y se dejó precipitando en 0.7 volúmenes de isopropanol, se retiró el sobrenadante y el botón se lavó con etanol al 70%, se resuspendió en el volumen de agua necesario.

Purificación de cadena sencilla para secuenciación (Schreir y Cortese, 1979)

A partir de un cultivo de 3ml de toda la noche se tomaron 200 µl y se inoculó un matraz de 10ml de cultivo, se incubó a 37°C hasta que alcanzó la fase exponencial ($D.O_{550} = 0.5$) En este punto se colocaron 2 ml de este cultivo con 7µl del fago "helper" M13KO7 (este fago permite la formación de la cadena sencilla) y se incubó durante una hora a 37°C. De este cultivo se tomaron 200µl y se inocularon 6ml de Luria con kanamicina (70µg/ml) (porque el fago es Kan^r), se dejó incubando toda la noche. Al día siguiente se dividió el cultivo en cuatro tubos y se centrifugaron durante 5 minutos, el sobrenadante de estos tubos se pasó a otros 4 tubos limpios, y estos se centrifugaron de nuevo 5 minutos, el sobrenadante de los segundos tubos se pasó a 4 tubos nuevos y se centrifugó nuevamente 5 min. Se transfirieron 1.2ml de cada sobrenadante a un tubo limpio y se les añadieron 250µl de PEG 6000-NaCl (20% PEG-NaCl 2.5M) a cada uno de ellos. Se mezclaron bien, y se incubaron por media hora a temperatura ambiente y después se centrifugaron durante 15 minutos. Se decantó todo el sobrenadante, y el botón se resuspendió en el volumen de agua necesario. Se

extrajo con fenol equilibrado con Tris•HCl (pH 8.0), se centrifugó por 5 minutos. Se recuperó la fase acuosa se le añadió un volumen de fenol:cloroformo, se mezcló y se volvió a centrifugar, se recuperó, la fase acuosa se extrajo con 1 volumen de cloroformo. A la fase acuosa una vez recuperada en un tubo limpio, se le añadieron 1/10 de volumen de acetato de sodio y dos volúmenes de etanol al 100%, se incubó en hielo seco y se centrifugó a 4°C, se resuspendió en el volumen de agua necesario.

Transformación con Cloruro de Calcio (Cohen *et al.*, 1972)

De un cultivo de toda la noche se tomaron 0.2ml y se inoculó un matraz con 10ml de medio de cultivo, se incubó hasta que alcanzó la fase exponencial (D.O. = 0.5 a 550nm) y se incubó el matraz en hielo durante 10 minutos, posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 4 krpm a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió en lo que queda en el tubo. Se le agregaron 5ml de CaCl₂ 100mM y se incubó durante 20 minutos en hielo. Después de esto se centrifugó, se decantó y se resuspendió en lo que quedaba en el tubo, se agregaron 0.66ml de CaCl₂, se incubó una hora en hielo, después se tomaron 200µl de células y se pasaron a un vial con el plásmido deseado (no más de 20µl), se incubó en hielo durante media hora y posteriormente se dio el choque térmico a 42°C durante 2 minutos, se dejó reposar en hielo y se agregaron 0.8ml de Luria, se incubó a 37°C durante 45 minutos para que se expresara la resistencia al antibiótico, se centrifugó, se decantó y se resuspendió en lo que queda en el tubo. Se sembró en los medios con los antibióticos necesarios.

Conjugación triparental (Donohue y Kaplan, 1991)

Los sistemas de transformación tradicionales no son aplicables a *R. sphaeroides*, por lo que uno de los métodos para transferir genes es la conjugación triparental que consiste en poner en contacto directo a las cepas donadoras y a la receptora y que por conjugación pasen el DNA de un plásmido a otra. Este procedimiento se lleva a cabo en la presencia de una cepa que contiene un plásmido ayudador que contiene los genes involucrados en el mecanismo de transferencia.

Se crecieron la cepa que llevaba el plásmido que se deseaba transferir, la cepa JM103 que llevaba el plásmido ayudador pRK2013 y la cepa de *R. sphaeroides* hasta fase exponencial. Se tomó 1ml de cada cultivo y se lavó dos veces con Luria sin antibióticos, se juntaron las tres cepas en un sólo tubo y se centrifugó a 6 krpm por 4 minutos. Se decantó el sobrenadante tratando de que quedaran aprox. 50µl para resuspender. Esto se colocó en un filtro de nitrocelulosa estéril sobre una caja de medio Luria. La caja se incubó durante 6 horas a 30°C. Transcurrido este tiempo se transfirió el filtro de nitrocelulosa a un vial con 0.5 ml de Luria y se mezcló hasta despegar las células del filtro, se retiró la nitrocelulosa. Se tomaron 100µl y se sembraron en un medio con los antibióticos necesarios. Se incubó a 30°C por 4 días.

Conjugación biparental (Donohue y Kaplan, 1991)

Se crecieron la cepa donadora hasta fase exponencial y a la cepa de *R. sphaeroides* hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0.6. En este punto se tomó 1ml de cada una y se lavó dos veces con medio Luria sin antibióticos y se resuspendió en el mismo medio, se juntaron y centrifugaron, se decantó el medio y se resuspendió en lo que quedaba, (aprox. 50µl) se pasó a un filtro de nitrocelulosa

en una caja de medio sin antibiótico. Se incubó a 30°C durante 6 horas. Después de este tiempo se pasó la nitrocelulosa a un vial con 0.5ml de Luria y se mezcló hasta despegar bien las células. Se sembró en medio selectivo y se incubó por 4 días a 30°C.

Determinación de la β - GLUCURONIDASA (GUS)

Este método se adaptó para *R. sphaeroides* a partir de un protocolo diseñado para plantas de tabaco (Jefferson, 1986).

Para este protocolo se requirieron los siguientes reactivos:

Buffer de Extracción para 10ml

Na ₂ HPO ₄ pH 7 100mM	5ml
β -mercaptoetanol	7 μ l
EDTA 0.5 M pH 8	200 μ l
Tritón al 10%	100 μ l

Aforar a 10 ml

Buffer de Ensayo

3.52 mg de MUG (4 Metil umbeliferona β D-glucuronidasa) en 10ml de Buffer de Extracción.

Se crecieron las cepas hasta fase exponencial D.O. 0.5 -0.6 a 550nm, se centrifugaron 1.5 ml del cultivo 3 minutos a 6 krpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió de nuevo en 1.5 ml de cultivo, se volvió a centrifugar, se retiró el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 400 μ l de Buffer de Extracción.

Los extractos se congelaron a -70° C y se guardaron hasta que se utilizaron, o inmediatamente se sonicaron 2 veces 10 segundos esperando un minuto entre cada pulso, se centrifugó a 14 krpm durante 5 min a 4°C, se tomó el sobrenadante el cual se mantuvo en hielo. Por otro lado se incubaron 320 μ l de

Buffer de Ensayo a 37°C durante 5 min y después se mezclaron con 80µl del extracto. Se incubó a 37°C, y se paró la reacción a los 10, 20 y 30 minutos, para lo cual, se tomaron 100µl de la reacción y se mezclaron con 900µl de NaCO₃ 0.2M y 1ml de agua bidestilada y desionizada.

Las muestras se cuantificaron en un fluorómetro a 356 nm de excitación y 455 nm de emisión. Para determinar la cantidad de 4-metil-umbeliferona (MU) presente en la reacción, las lecturas de fluorescencia se extrapolaron sobre una curva patrón, en la cual se utilizaron concentraciones conocidas de MU. La cantidad de β-glucuronidasa se expresó como nmoles de MU formado/min/mg de proteína.

Determinación de proteína

Con el reactivo comercial Bradford de BioRad diluido 1:5 en agua bidestilada y desionizada, se tomaron 5ml y se mezclaron con 20µl de células. Para calibrar se utilizaron 5ml de reactivo y como control 50µl de BSA con reactivo. Se incubaron 10 minutos y se leyeron en el espectro con luz visible a 595 λ (nm).

RESULTADOS

MUTAGÉNESIS AL AZAR

Como se mencionó previamente en la sección de antecedentes, la cepa NG1/pRK415 *fliMN*⁺ se mutó utilizando el transposón *TnphaA*, y se seleccionaron las cepas que mostraron fenotipo Mot⁻ (incapaces de nadar) GUS⁺ o GUS⁻.

Las cepas que mostraron fenotipo GUS⁻ probablemente se encontraban afectadas en algún gen relacionado con la expresión de los genes flagelares de clase II (ya que en la cepa NG1, el gen reportero se encuentra bajo control del promotor del gen *fliM*). En este caso, decidimos analizar 8 cepas que tenían fenotipo GUS⁺ y por ello podíamos hipotetizar que su incapacidad para nadar estaría causada por una mutación en cualquier gene flagelar pero que no afectara la expresión general de los genes de clase II.

Se comprobó que las ocho cepas seleccionadas no nadaran en medio semi-sólido (swarm) utilizando a la cepa WS8 como control (datos no mostrados). Por otro lado, se purificó el plásmido de estas cepas para comprobar que éste no estuviera integrado al DNA cromosomal, o hubiese sufrido alguna delección que afectara a los genes *fliM* y/o *fliN* (lo cual explicaría el defecto en el nado, independientemente de la inserción del transposón).

Una vez que se verificó la presencia del plásmido, éste se analizó por restricción con el fin de determinar que el inserto (*fliMN*) no había sufrido cambios drásticos (como delecciones) con respecto al plásmido original. Dado que en ninguna de las preparaciones de plásmido observamos cambios con respecto al silvestre (datos no mostrados), se prosiguió a identificar el sitio de inserción del transposón *TnphaA*.

Identificación de los sitios de inserción del *TnphoA*

Para identificar los sitios de inserción del transposón, era necesario clonar un fragmento de DNA el cual contuviera un segmento del transposón, así como el DNA cromosomal adyacente al mismo. Con este propósito, se extrajo el DNA cromosomal de las 8 mutantes seleccionadas y se procedió a digerir los ácidos nucleicos de cada una, con la enzima de restricción *SalI*. Los productos de las digestiones se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, utilizando como marcador de peso molecular el DNA del bacteriófago λ digerido con la enzima *Hind* III.

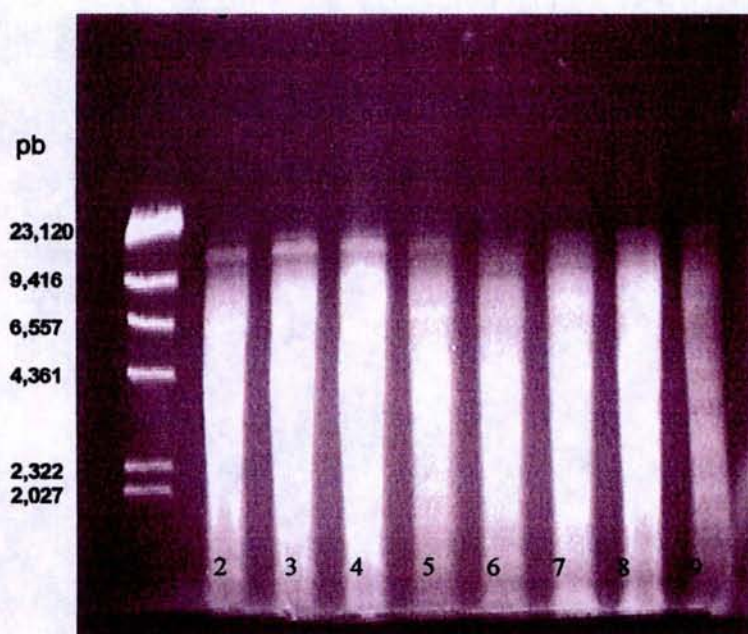


Figura 13. DNA cromosomal de las mutantes no nadadoras digeridos con la enzima *SalI*. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular DNA de λ digerido con la enzima *Hind* III. Sigüientes carriles DNA de las cepas: 1, 3, 10, 14, 15, 18, 19 y 23

Una vez realizada la electroforesis el gel se fotografió (Fig. 13) junto con una regla fluorescente que permite posteriormente, calcular el tamaño de las bandas de hibridación. El gel se transfirió a una membrana de nylon siguiendo el protocolo de hibridación tipo Southern Blot descrito en Materiales y Métodos.

La sonda que se utilizó para hibridar la membrana fue un fragmento *SaI*-*DraI* de 1.4 kb proveniente del transposón *TnphoA* marcado con biotina-14-dCTP. En la figura 14, se muestra el mapa del transposón *TnphoA*, y se indican las posiciones de los sitios *SaI* y *DraI*.

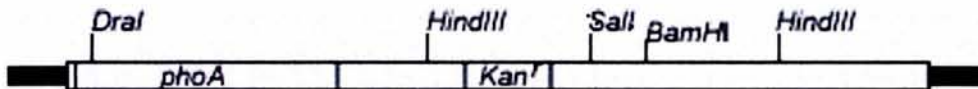


Figura 14. Mapa del transposón *TnphoA*. Se indican los sitios de restricción *DraI* y *SaI* correspondiente al fragmento de 1.4 kb que se empleó como sonda marcada con Biotina 14-dCTP.

En la figura 15, se muestra el resultado de la hibridación. Aunque algunas muestras son poco visibles en la figura, en la placa si fue posible detectar las bandas de las muestras de los extremos, de tal suerte que a partir de este experimento se calcularon los tamaños de los fragmentos *SaI* que llevan el transposón en cada una de las cepas.

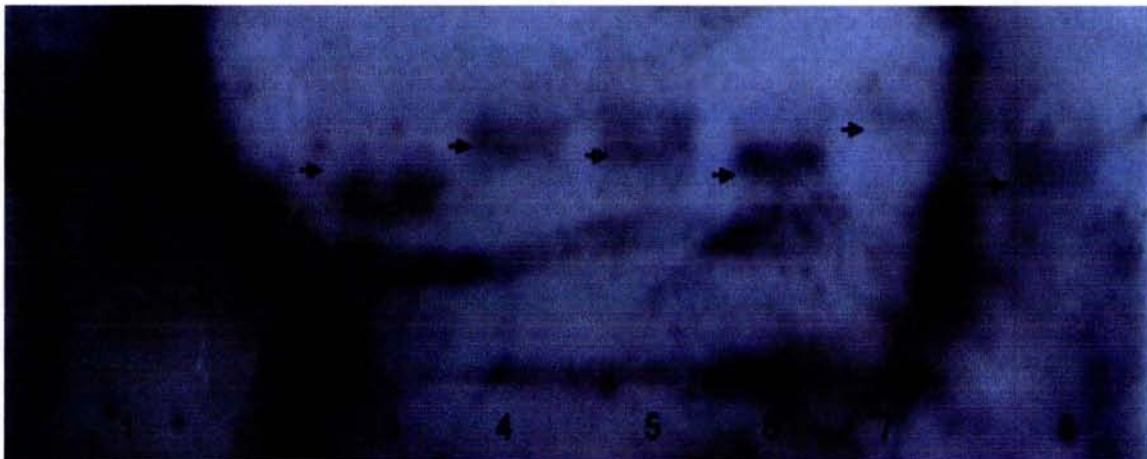


Figura 15. Southern Blot del DNA cromosomal de las mutantes no nadadoras digeridos con la enzima *SaI*. Carriles 1-8: DNA de las cepas: 1,3, 10,14,15,18,19 y 23 respectivamente utilizando la sonda del transposón *TnphoA*.

El tamaño de los fragmentos se calculó a partir de los datos de migración relativa (Rf) para cada una de las bandas, con respecto a la migración relativa de las bandas del marcador de peso molecular, en este caso λ *Hind*III. Para ello, se graficaron en el eje de las abscisas el \log_{10} de los pares de bases de los fragmentos de λ *Hind*III, y en el de las ordenadas los valores de migración relativa (Rf) para cada uno de ellos, posteriormente, se extrapolaron los valores de migración relativa (Rf) de cada una de las bandas de hibridación, y se determinó su tamaño aproximado. Como se observa en la tabla 3, los pesos moleculares de los fragmentos fueron, en todos los casos, cercanos o mayores a 10 kb. Decidimos realizar un nuevo ensayo de hibridación con la sonda del *TnpbaA*, pero ahora, digiriendo el DNA cromosomal con la enzima *Bam*HI, esto con el fin de determinar si con esta enzima los tamaños de los fragmentos eran menores, lo cual facilitaría la posterior clonación de los mismos. Además, se repitió la digestión con *Sa*I, para las cepas 1 y 3, las cuales mostraron los resultados menos confiables en este experimento.

Tabla 3. Cálculo de los pesos moleculares de los fragmentos *Sa*I que hibridaron con la sonda del transposón *TnpbaA*.

CEPA	DIST. (cm.)	RF	LOG ₁₀ pb	pb
3	3.8	0.48	3.79	6,237
10	3.2	0.41	3.99	9,772
14	2.9	0.36	4.08	12,022
15	2.9	0.36	4.05	11,220
18	3.1	0.38	4.04	10,964
19	2.8	0.35	4.21	15,848
23	3.1	0.38	4.04	10,964

En la figura 16 se observa el resultado de la hibridación al utilizar la enzima *Bam*HI para digerir el DNA cromosomal de las cepas mutantes. Los tamaños de cada uno de los fragmentos se calcularon como se describió en el experimento anterior.

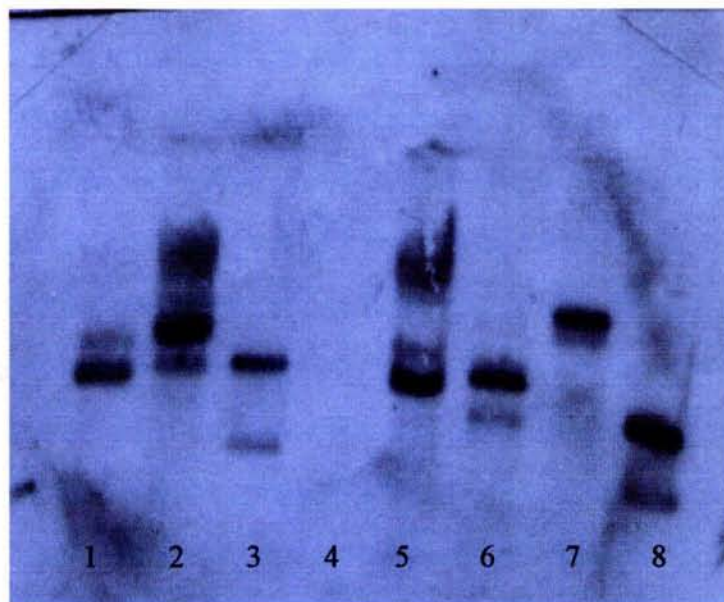


Figura 16. Southern Blot del DNA de las cepas no nadadoras Carril 1 y 2 DNA de las cepas 1 y 3 digeridas con *Sal*I, carriles siguientes cepas 10, 14, 15, 18, 19 y 23 digeridas con *Bam*HI. utilizando como sonda el *TnphoA* marcado.

En esta figura, podemos observar que el transposón se insertó una sola vez en el genoma de estas cepas, dado que sólo hay una banda intensa en cada uno de los carriles (correspondiente al DNA del transposón). Las bandas tenues probablemente corresponden a hibridación inespecífica debida a las suaves condiciones de lavado. Se eligieron dos mutantes que presentaron bandas de un tamaño no mayor a 8 kb. Las mutantes seleccionadas fueron: la #15 (carril 5) cuya banda de hibridación mostró un tamaño correspondiente a 6,025 pb y la mutante #18 (carril 6) cuya banda fue de 6,309 pb.

Clonación de los fragmentos que llevaban *TnphoA* así como un fragmento de DNA cromosomal adyacente

Una vez calculado el tamaño del fragmento de DNA que se deseaba clonar, se procedió a digerir el DNA cromosomal de las cepas 15 y 18 con la enzima *Bam*HI. Posteriormente, los productos de las digestiones se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, y se cortaron los segmentos del gel correspondientes a los pesos moleculares de entre 4 kb y 8 kb.

El DNA se recuperó siguiendo el protocolo descrito en la sección de Materiales y Métodos.

Una vez purificado el DNA cromosomal del tamaño apropiado, éste se mezcló con el plásmido pTZ19R, el cual previamente había sido digerido con la enzima *Bam*HI y tratado con fosfatasa alcalina; a esta mezcla se le adicionó la enzima DNA ligasa obtenida del bacteriófago T4 y se incubó toda la noche a 16°C. Las mezclas de reacción se transformaron en la cepa XL1Blue, y se seleccionaron las clonas resistentes a ampicilina (resistencia del plásmido) y kanamicina (resistencia del transposón). Una colonia para cada una de las transformaciones, correspondientes al DNA proveniente de las cepas 15 y 18, se purificó y conservó para su posterior caracterización. Los plásmidos, provenientes de estas cepas se denominaron p15Bam y p18Bam, respectivamente.

Caracterización de las clonas p15Bam y p18Bam

Con el fin de determinar la orientación de los insertos presentes en las clonas p15Bam y p18Bam, el DNA plasmídico con el fragmento clonado se digirió con las enzimas *Dra*I, *Bam*HI y *Hind*III.

La figura 17a muestra el patrón de digestión del plásmido p15Bam. La digestión con *Bam*HI (carril 4) muestra claramente dos fragmentos, uno de aproximadamente 3 kb correspondiente al vector pTZ19R, y el otro de aproximadamente 7 kb correspondiente al inserto. Con *Hind*III (carril 6), se observaron dos bandas de un tamaño muy similar correspondientes a 5 kb. Dado que el fragmento clonado correspondiente al transposón tenía un tamaño de 4.3 kb, se pudo deducir que el DNA adyacente al transposón tenía un tamaño aproximado de 2.7 kb; además, gracias a la digestión *Hind*III, se determinó que el inserto presentaba la orientación que se muestra en la figura 17 b, por lo cual, este plásmido sería posteriormente secuenciado utilizando el “primer universal”, el cual se diseñó con base en la secuencia nucleotídica compartida para la región de policlonación de M13, pUC, y otros plásmidos.

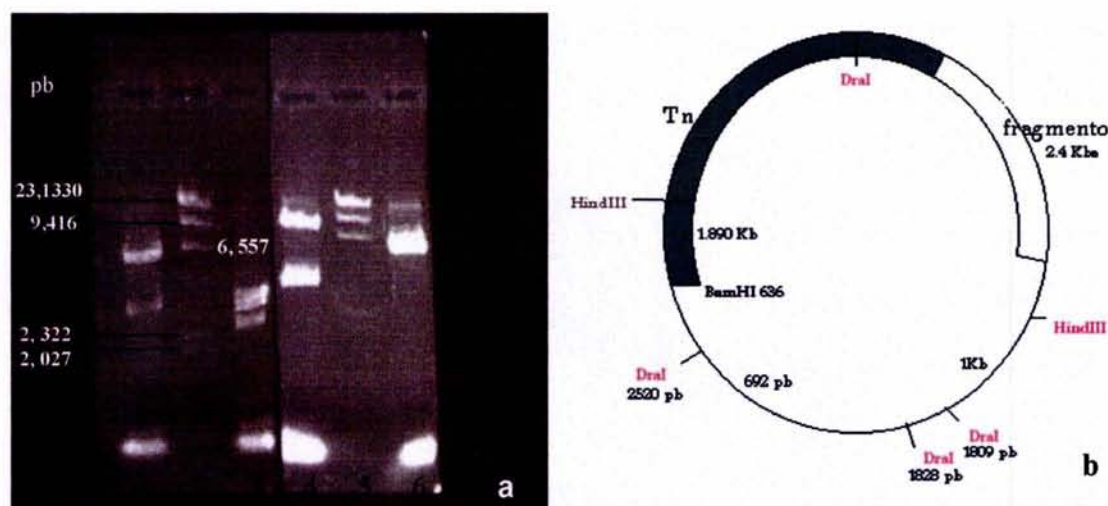


Figura 17. a) Digestiones del plásmido p15Bam. Carriles 2 y 5 marcador de peso molecular λ digerido con *Hind*III. Carril 1, digerido con *Dra*I; 2, *Dra*I-*Hind*III; 4, *Bam*HI; 6, *Hind*III. b) Mapa del p15Bam se indican los sitios de restricción de las enzimas empleadas.

Por otro lado, el plásmido p18Bam se digirió con la enzima *DraI* y se obtuvieron fragmentos de 6 kb y 3 kb, además de dos muy pequeños de 692 pb y 300 pb (los cuales no se observan en el gel, pero son predichos a partir de la secuencia nucleotídica del plásmido pTZ19R); con *HindIII*, se obtuvieron dos fragmentos, uno de 7.8 kb, y el otro de 2 kb (Fig.18a). De acuerdo a estas digestiones, el mapa de la clona p18Bam, se esquematiza en la figura 18b.

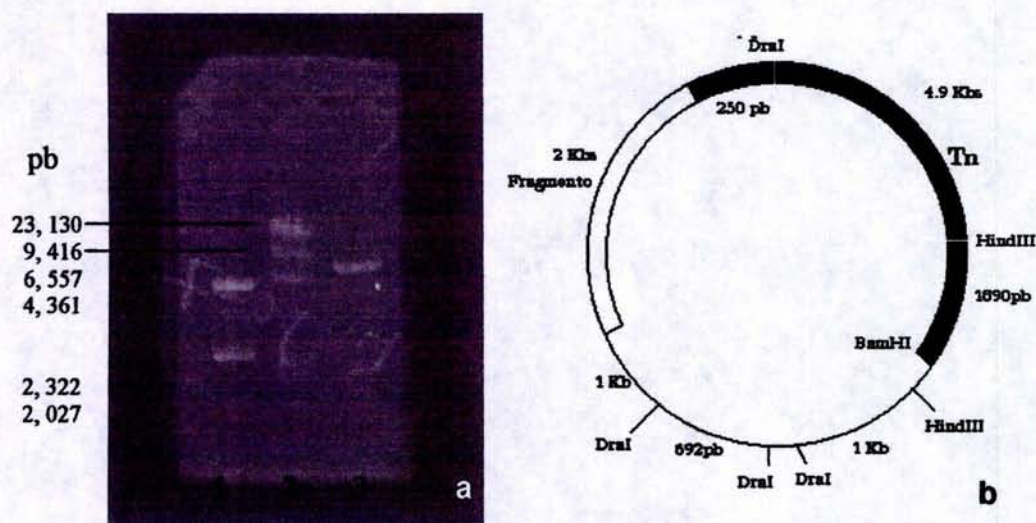


Figura 18. a) Digestiones del plásmido p18Bam, carril 1 digerido con *DraI*; 2, marcador de peso molecular λ digerido con *HindIII*; 3, p18Bam digerido con *HindIII*. b) Mapa del plásmido p18Bam en donde se muestran los sitios de corte de las enzimas empleadas.

El plásmido p18Bam se digirió de nuevo con *HindIII*, para eliminar el fragmento de 1.8 kb correspondiente al transposón (Fig. 18b). El fragmento de 7.8 kb obtenido de la digestión *HindIII*, se purificó, se religó, y se transformó en células de *E. coli*. Se seleccionaron las clonas resistentes a ampicilina. El plásmido resultante se comprobó por restricción.

Secuenciación del DNA adyacente al transposón

El inserto del plásmido p15Bam se envió a secuenciar utilizando el "primer universal", mientras que el inserto del plásmido p18Bam se secuenció con un "primer" diseñado en base a la secuencia del transposón, este cebador alinea con el extremo del *Tnp_{hoA}* que se localiza adyacente al DNA cromosomal en p18Bam (Fig. 18b).

Como se puede observar en las figuras 19 y 21, la calidad de la secuencia de p15Bam fue superior a aquella obtenida para p18Bam posiblemente debido a la menor calidad del DNA de ésta última. Sin embargo, para p18Bam fue posible obtener un segmento de secuencia de aproximadamente 70 bases sin incertidumbres, el cual se utilizó para su posterior análisis.

Ambas secuencias se analizaron con el programa "Codon Preference" el cual analiza el porcentaje de GC en la tercera posición de los codones para los tres posibles marcos de lectura; posteriormente, la secuencia de aminoácidos correspondiente al marco que presentó el mas alto valor de %GC, se comparó con la base de datos swissprot y el programa BLASTP del Centro Nacional de Información Biotecnológica.

La secuencia de la mutante #15 (Fig. 19) reveló una alta similitud con otras proteínas identificadas en otras especies bacterianas (Fig. 20). Mientras que en el genoma completo de *R. sphaeroides*, nuestro fragmento de secuencia nos permitió identificar el gen que codifica para el polipéptido RSP0470, el cual corresponde a una proteína de 505 aminoácidos. La proteína RSP0470, forma parte de dos diferentes COGs (COG, siglas de: "Cluster of Orthologous Groups"), COG2187 y COG0645. El primero, es un conjunto de proteínas conservadas en bacterias con función desconocida, mientras el segundo, agrupa varias proteínas a las que se predice pudieran poseer actividad de cinasa.

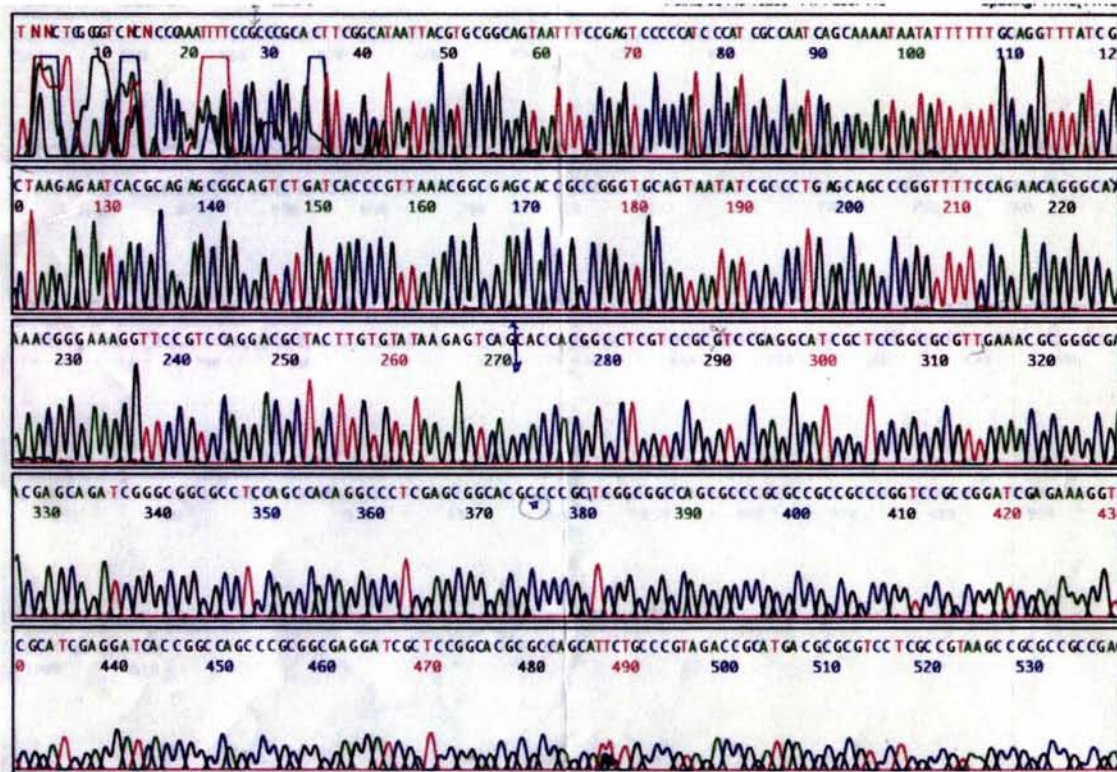
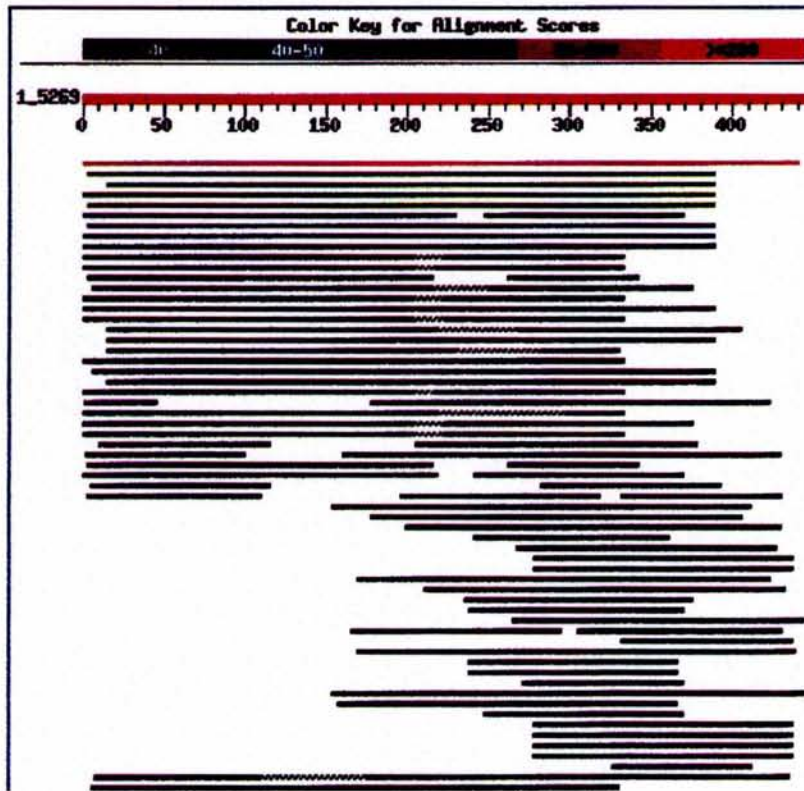


Figura 19. Secuencia de la mutante 15, utilizando el "primer universal".

La región cromosomal en la que se encuentra RSP0470 sugiere que podría formar un operón junto con el gen que codifica para la proteína RSP0469, la cual también es una proteína conservada, que predice una posible deshidrogenasa (COG0579). Divergente a este putativo operón, se localiza el operón *ubiDX*, el cual está involucrado en la síntesis de ubiquinona. Y del lado opuesto y también divergente, se encuentra un posible operón de tres genes, uno de los cuales predice una fosfolipasa.

Dada la poca información que existe sobre la proteína RSP0470, en este punto es imposible predecir su posible función en relación con la formación del flagelo, o con la quimiotaxis.



Sequences producing significant alignments:		Score (bits)	E Value
gi 22960052 ref ZP_00007696.1	COG0645: Predicted kinase [R...	134	4e-31
gi 22966052 ref ZP_00013649.1	COG0645: Predicted kinase [R...	64	4e-10
gi 13475505 ref NP_107069.1	hypothetical protein [Mesorhiz...	59	1e-08
gi 16125172 ref NP_419736.1	conserved hypothetical protein...	57	6e-08
gi 21218720 ref NP_624499.1	conserved hypothetical protein...	57	6e-08
gi 23013906 ref ZP_00053755.1	COG0645: Predicted kinase [M...	47	5e-05
gi 27381182 ref NP_772711.1	blr6071 [Bradyrhizobium japoni...	47	8e-05
gi 21673660 ref NP_661725.1	conserved hypothetical protein...	38	9e-05
gi 22961421 ref ZP_00009027.1	COG0645: Predicted kinase [R...	46	1e-04
gi 16331632 ref NP_442360.1	unknown protein [Synechocystis...	33	1e-04
gi 23470831 ref ZP_00126163.1	COG0645: Predicted kinase [P...	39	1e-04
gi 26991368 ref NP_746793.1	conserved hypothetical protein...	39	2e-04
gi 32044032 ref ZP_00141133.1	COG0645: Predicted kinase [P...	37	3e-04
gi 22297822 ref NP_681069.1	ORF_ID:t110278-hypothetical pr...	37	3e-04
gi 15599895 ref NP_253389.1	conserved hypothetical protein...	37	4e-04
gi 28868196 ref NP_790815.1	conserved hypothetical protein...	35	0.001
gi 23057893 ref ZP_00083020.1	COG0645: Predicted kinase [P...	34	0.002

Figura 20. Análisis Blast de la secuencia de la mutante #15. El análisis reveló que es similar a otras proteínas hipotéticas presentes en diferentes especies de bacterias.

La secuencia de p18Bam, corresponde a la proteína del gancho del flagelo llamada FlgE; la cual ya había sido descrita previamente por: Ballado, *et al* (2001). En la figura 21 se observa la secuencia obtenida y en la figura 22 se presenta el resultado del análisis de similitud.

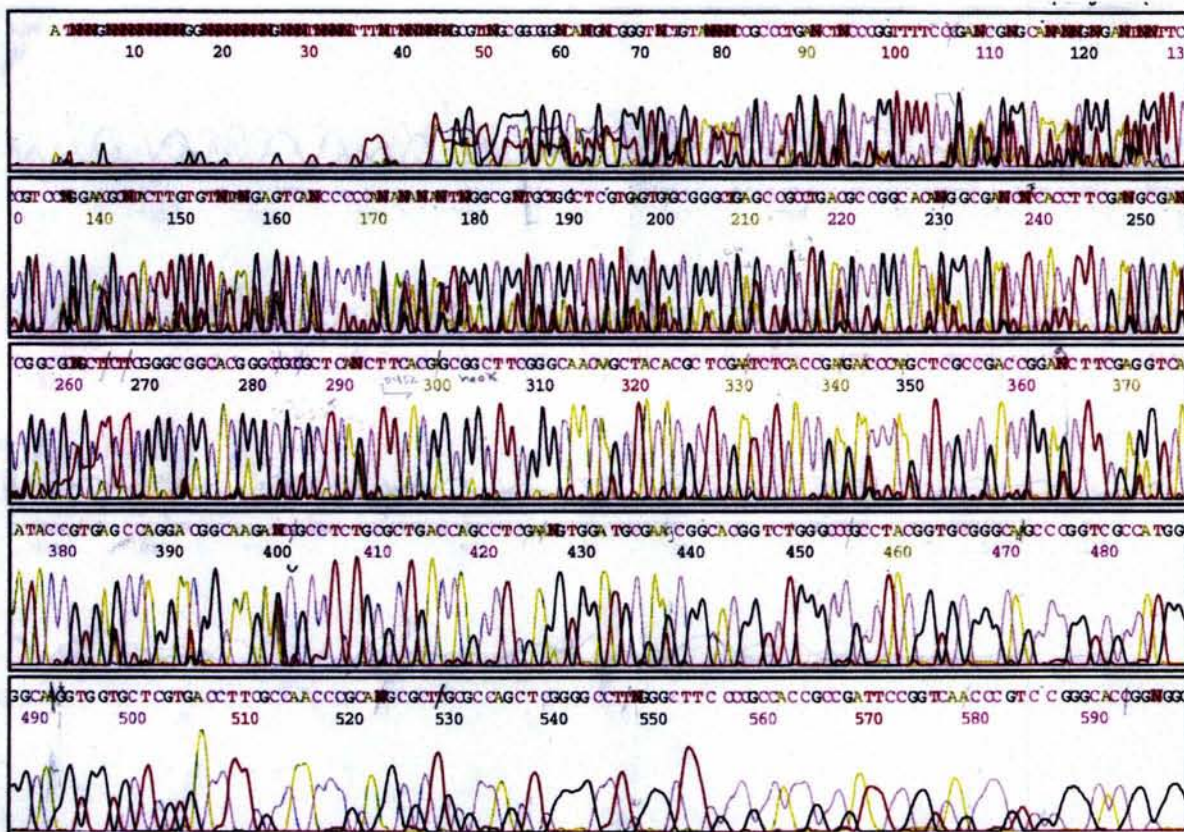


Figura 21. Secuencia de la mutante #18 para la que se empleo un "primer" diseñado a partir de la secuencia del *TnphoA*.

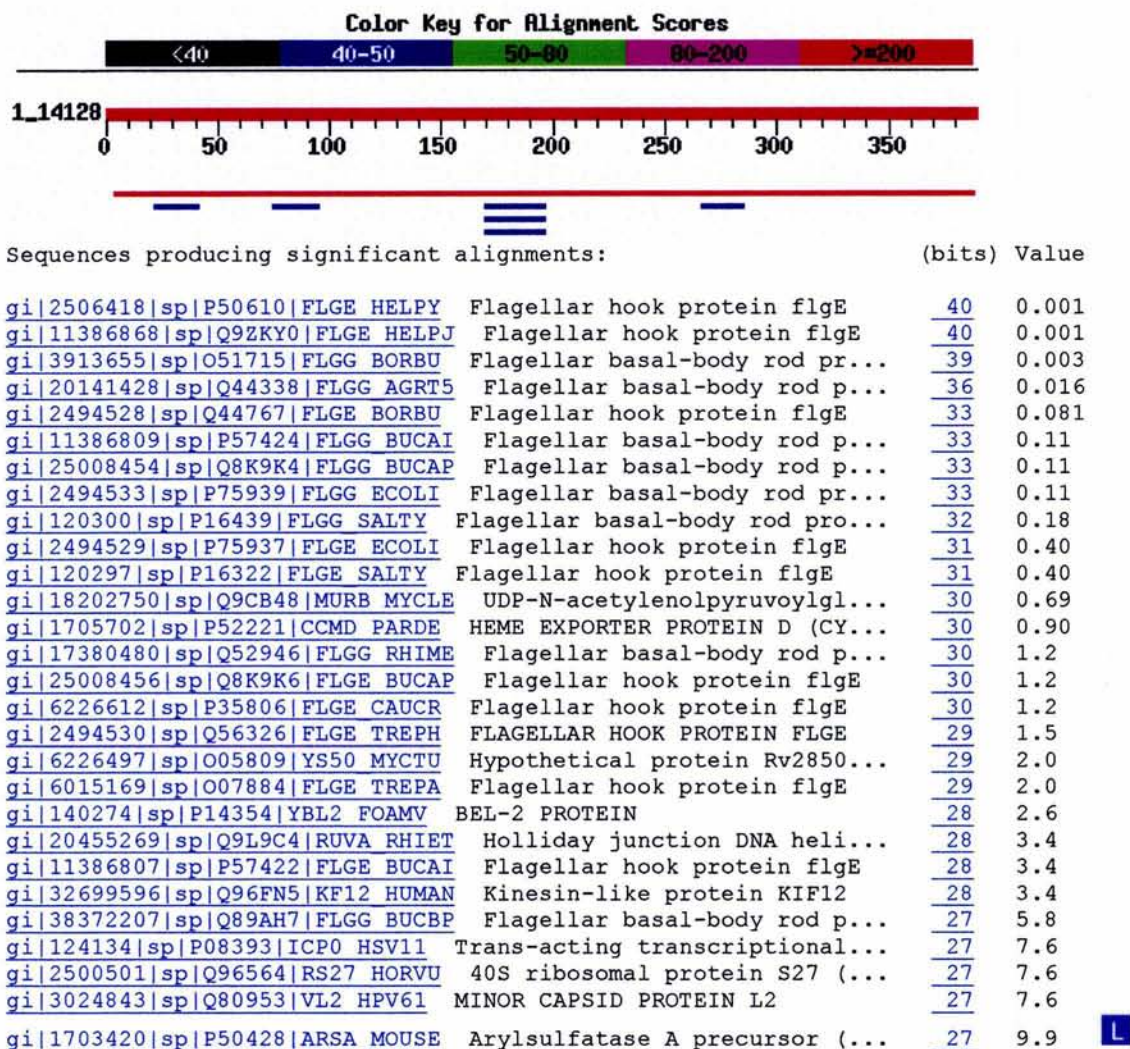


Figura 22. Resultado del análisis BLAST de la secuencia #18 que corresponde a la proteína FlgE que corresponde a la proteína del gancho del flagelo.

Dado que en el laboratorio se contaba con una plásmido que lleva los genes *flgEF* completos, se llevó a cabo la complementación de la mutante 18. Como se puede observar en la figura 23, la mutante 18 recupera la capacidad de desplazarse en medio semisolido en presencia de este plásmido. Asimismo, una alícuota del cultivo de estas células, observada bajo el microscopio, demostró que la cepa 18 complementada, era capaz de nadar activamente.

Este resultado sugiere que el único gen afectado en la mutante 18 corresponde al gen *flgE* (aunque quizás también *flgF*, ver discusión).

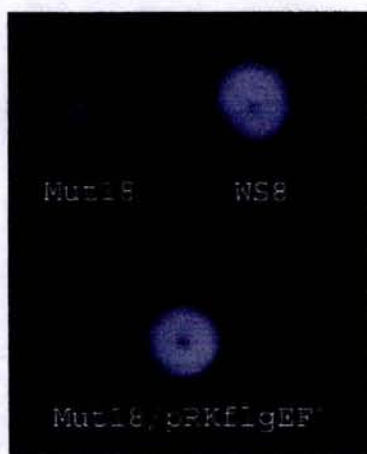


Figura 23. Complementación de la mutante 18 con el plásmido pRKflgEF, como control positivo la cepa WS8 y control negativo la mutante 18.

MUTAGÉNESIS DIRIGIDA POR GENÉTICA REVERSA

Construcción de la mutante *flhB::uidA-aadA*

La mutagénesis del gen *flhB* en la cepa WS8 se realizó por genética reversa. Para ello, se introdujo el cassette '*uidA-aadA* en la región codificadora de *flhB*. El cassette '*uidA-aadA* (Fig. 24) lleva el gen reportero '*uidA*, el cual codifica para la enzima β -glucuronidasa pero carece de promotor, y el gen *aadA*, que codifica para la enzima aminoglucósido-3-adeniltransferasa, la cual es responsable de conferir a las bacterias resistencia a espectinomicina (Spc^R). Finalmente, cabe mencionar, que el gen *aadA* se encuentra flanqueado por terminadores transcripcionales obtenidos del genoma del bacteriófago T7 (Metcalf y Wanner,

1993), estos provocan un efecto polar sobre la expresión de los genes ubicados río abajo del gen *aadA*.

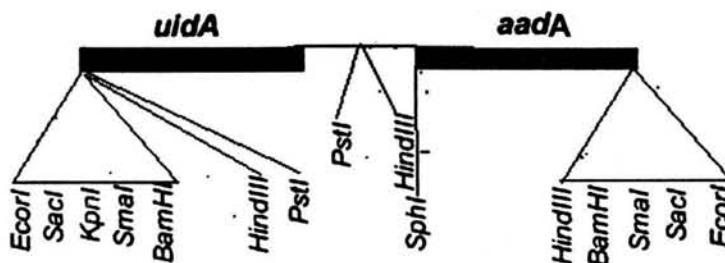


Figura 24. Cassette *uidA-aadA*. *uidA* codifica para la enzima β -glucuronidasa y *aadA* para la resistencia a espectinomicina. Se indican los sitios de restricción relevantes. Tomado de Metcalf y Wanner, 1993.

El primer paso para alcanzar nuestro objetivo, consistió en obtener una clona que llevara el gen *flhB*⁺ completo (dado que la clona con la que contábamos en el laboratorio, llevaba el gen *flhB* truncado) (García *et al.*, 1998). Para ello, se digirió el DNA cromosomal de la cepa silvestre WS8 y el cósmido c140 con la enzima *SstI*. El cósmido c140 lleva clonada una región de genes flagelares, cercana al gen *flhK* (González-Pedrajo *et al.*, 1997). Con estas digestiones se realizó una hibridación tipo Southern utilizando como sonda un fragmento de DNA que incluye el inicio del gen *flhB*.

En la figura 25 se observa el DNA cromosomal de la cepa silvestre WS8 junto con el DNA del cósmido c140 ambos digeridos con *SstI*. La hibridación reveló un fragmento *SstI* de 3.2 kb, el cual es similar en ambas muestras (fig. 26).

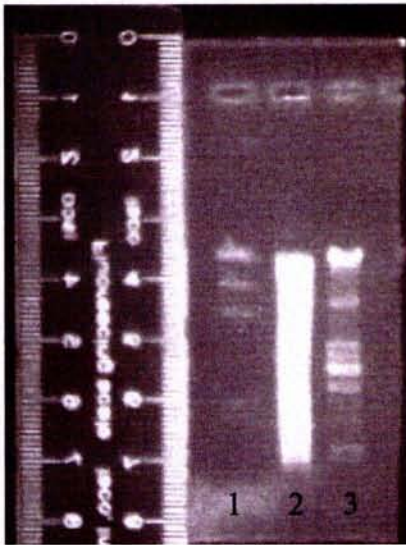


Figura 25. DNA cromosomal de la Cepa WS8 (carril 2) y del cósmido c140 (carril 3) digeridos con la enzima *SstI*. Carril 1: marcador de peso molecular, DNA de λ digerido con *HindIII*.

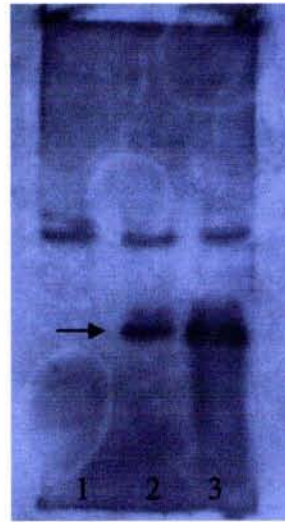


Figura 26. Southern blot del DNA de WS8 (carril 2) y de c140 (carril 3) digeridos con *SstI* utilizando como sonda un producto de PCR que contiene el inicio de *flhB*.

El tamaño de los fragmentos observados en la hibridación se calculó de acuerdo a la migración relativa de éstos (Tabla 4). El resultado de la hibridación nos indica que el fragmento que contiene el gen *flhB*, se encuentra presente en el cósmido c140, y por ello, procedimos a clonar *flhB* a partir de una preparación de c140.

Tabla 4. Pesos moleculares del DNA cromosomal que hibrida con la sonda *flhB*

DNA	DIST. (CM.)	RF	PM LOG ₁₀	PM pb
WS8	5.3	.6309	3.5	3.162
c140	"	"	"	"

Mediante el análisis de restricción del cósmido c140 y el análisis de la secuencia de DNA previamente publicada para los genes *fliPQR* (García *et al.*, 1998), dedujimos, que el fragmento *SstI* de 3.2 kb que lleva completo el gen *flhB*, podía ser reducido en tamaño, a 2.5 kb, mediante restricción con la enzima *SaII*, la cual tiene un sitio de corte dentro del gen *fliP* (fig. 27).

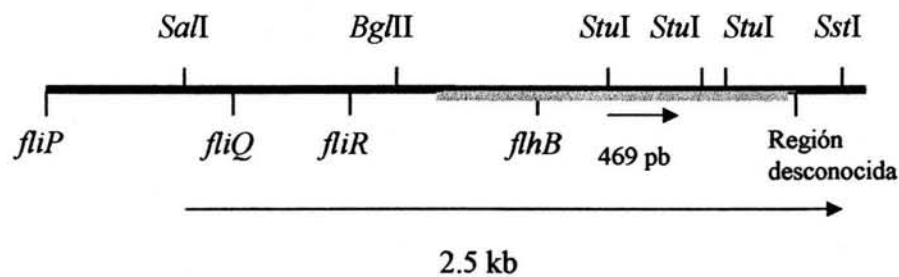


Figura 27. Esquema de la región que contiene a los genes *fliP*, *fliQ*, *fliR*, *flhB* y una región río abajo de función desconocida. En gris se muestra el marco de lectura de *flhB* y se indica el sitio de corte de las enzimas *SaII*, *BglII*, *StuI* y *SstI*.

El fragmento de 2.5 kb *SaII-SstI* proveniente del cósmido c140, se clonó en el plásmido pTZ19R. La secuencia de este fragmento reveló la presencia del gen completo *flhB* (datos no mostrados). Este plásmido se digirió con la enzima *StuI* (Fig. 28) la cual nos permite remover un fragmento de 480 pb dentro de la región codificadora de *flhB*. El producto lineal de 5 kb se purificó y posteriormente se ligó al cassette '*uidA-aadA*. La reacción de ligasa se electroporó en la cepa JM103, y las colonias se seleccionaron por su resistencia a ampicilina y espectinomicina.

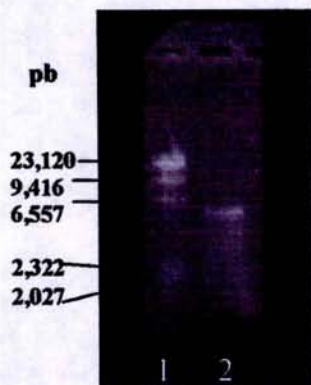


Figura 28. Carril 2:
Plásmido pTZ19R
flhB digerido con la
enzima *StuI*.

Con el fin de determinar la orientación del cassette *uidA-aadA*, se eligieron ocho de las colonias resultantes para llevar a cabo la purificación de plásmido en pequeña escala; cuatro de estos plásmidos se digirieron con la enzima *PstI*. Esta enzima se eligió, ya que el cassette *uidA-aadA* presenta dos sitios de corte: uno al principio de *uidA* y el otro, 2 kb río abajo, justo donde inicia *aadA* (Fig. 24).

En la figura 29, se pueden observar los patrones de restricción de las dos posibles orientaciones del inserto *uidA-aadA*. En los carriles 2 y 5 se pueden observar las dos posibles orientaciones del cassette (Fig.30).

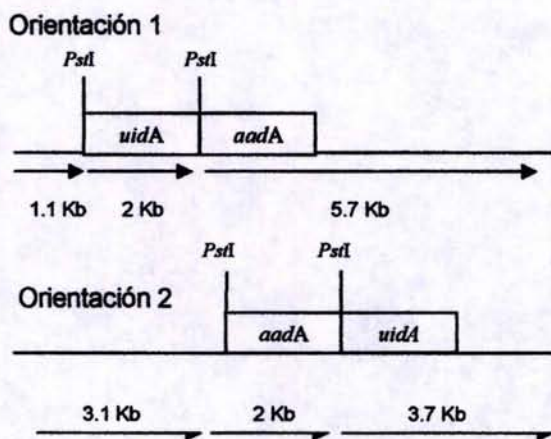


Figura 29. Posibles orientaciones del
cassette *uidA-aadA*.

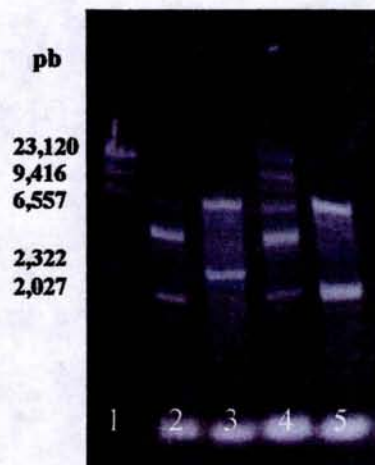


Figura 30. Posibles orientaciones
del cassette *uidA-aadA*. Carriles
1: marcador de peso molecular;
2 :orientación 2; 3 y 4 digestiones
parciales, 5: orientación 1.

De acuerdo al esquema de la figura 29 esperábamos un fragmento de 5.7 kb, (el cual incluye el vector), un fragmento de 2 kb y otro de 1.1 kb. En la orientación contraria se esperaba un fragmento de 3.7 kb, 3.1 kb y 2 kb.

El plásmido seleccionado, se purificó y se digirió con la enzima *SaI-SsI*, el fragmento de 6.5 kb el cual representa el alelo *flhB::uidA-aadA*, se purificó y clonó en el plásmido pJQ200.

El plásmido pJQ200 es un vector sin capacidad para replicarse en *R. sphaeroides*, por lo cual puede ser utilizado como plásmido suicida en esta bacteria; esto es, en caso de que el plásmido lleve clonado un alelo mutante de un gen cromosomal, éste remplazará la copia cromosomal mediante un evento de doble recombinación. El plásmido pJQ200, contiene además el gen *sacB* de *Bacillus subtilis* y en presencia de sacarosa, su expresión resulta letal en bacterias Gram⁻ facilitando así la contraselección del vector (Quandt y Hynes, 1993).

Mediante una conjugación triparental, el plásmido pJQ200 que llevaba clonado el alelo *flhB::uidA-aadA* se transfirió a la cepa silvestre de *R. sphaeroides* (la cual es resistente a ácido nalidíxico). Se seleccionaron las transconjugantes Nal^{R} Sac^{R} , Spc^{R} , Gm^{S} .

Una vez purificadas, las colonias seleccionadas se crecieron hasta fase exponencial media y una alícuota se observó al microscopio óptico. Ninguna de las tres colonias seleccionadas fue capaz de nadar. Una de estas cepas se denominó NA-I.

Complementación de la cepa NA-I

Para determinar si el único gen afectado en la cepa NA-I corresponde al gen *flhB* los plásmidos pRS207 y pRS208 se introdujeron a la cepa NA-I. En

Para determinar si el único gen afectado en la cepa NA-I corresponde al gen *flhB* los plásmidos pRS207 y pRS208 se introdujeron a la cepa NA-I. En estos plásmidos el fragmento *SstI* que lleva *flhB*⁺ se encuentra clonado en el plásmido pRK415. En el caso de pRS207, el gen *flhB* es transcrito a partir de un promotor presente en el vector, mientras que en el plásmido pRS208, el gen *flhB* está clonado en la orientación contraria del promotor de pRK415 y la expresión de *flhB* sería dependiente de la presencia de algún promotor presente en el fragmento *SstI*.

Como podemos observar en la figura 31, al introducir cualquiera de los dos plásmidos a la cepa NA-I, ésta recupera su capacidad de nado.



Figura 31. Complementación de la cepa NA-I. Con los plásmidos pRS207 y pRS208. Control positivo, la cepa WS8 y como control negativo la cepa NA-I (FlhB).

Estos resultados sugieren que en la cepa NA-I, el gen *flhB* es el único responsable del fenotipo Mot⁻ (definido éste como ausencia de motilidad).

Además sugieren que el fragmento *Sst*I puede llevar un promotor que permite la expresión del gen *flhB* y por lo tanto la complementación de la cepa NA-I por el plásmido pRS208.

Dado que existía la posibilidad de que el plásmido estuviera recombinando con el cromosoma y de esta forma dar lugar también a colonias con la capacidad de nadar, se clonó un fragmento más pequeño, esperando que por la reducción en el tamaño se redujera la posibilidad de recombinación. El fragmento *Bgl*II-*Sst*I (ver fig. 27 para localizar el sitio *Bgl*II) se clonó en pRK415 de forma que la región codificadora de *flhB* quedara opuesta al promotor presente en el plásmido; este fragmento lleva 390 pb río arriba del marco de lectura abierta de *flhB*, y 300 pb río abajo del codón de paro. Esta clona se denominó pRS210. Este plásmido, una vez introducido por conjugación a la cepa NA-I, fue capaz de complementar el fenotipo Mot⁻ (datos no mostrados). Por lo tanto queda por establecer el sitio del promotor putativo presente en este fragmento.

Determinación del nivel de expresión del gen *flhB*

En la cepa NA-I, el gen *uidA*, el cual codifica para la enzima β -glucuronidasa, se encuentra bajo el control transcripcional del promotor responsable de expresar *flhB*. La actividad específica de β -glucuronidasa se determinó para la cepa NA-I, así como para las transconjugantes NA-I/pRS207 y NA-I/pRS208. Como control positivo se utilizó la cepa WS8 que lleva el gen *uidA* bajo control del promotor flagelar *fljOp* en el plásmido pRK415 (Poggio *et al.*, 2000).

Los valores de actividad obtenidos para cada una de las construcciones examinadas fueron:

Tabla 5. Actividad específica de β -glucuronidasa

CEPA	Actividad específica
NA-I	22,893 nM/min/mg
WS8/pRK _{<i>flhOp</i>}	16,186 nM/min/mg
NA-I/pRS207	24,801 nM/min/mg
NA-I/pRS208	24,770 nM/min/mg

Los resultados en la tabla 5 demuestran que el gen *flhB* es un gen que se expresa activamente, y además, nos indican que la presencia del gen silvestre en el plásmido no altera la expresión de la copia cromosomal.

DISCUSIÓN

Las dos estrategias de mutagénesis empleadas en este trabajo presentan distintas ventajas para el estudio de la transcripción de los genes flagelares y se pueden obtener resultados muy distintos dependiendo de la estrategia que se emplee.

La mutagénesis al azar mediante la inserción del transposón *Tnp_{hoA}* es una buena estrategia para identificar mutantes defectuosas en alguna función flagelar.

Dado que el flagelo no se puede purificar en su forma activa, esta estrategia es útil para determinar la función de las proteínas involucradas. La mutación de los genes que codifican estas proteínas, acompañada del análisis de las secuencias de los genes afectados, permite predecir la función y la posible localización de dichas proteínas, así como determinar el efecto de la inactivación del gen (Sockett y Armitage, 1991).

Esta metodología es útil cuando se está estudiando alguna función poco conocida, ya que permite descubrir nuevos genes y tratar de conocer sus funciones. En este caso, es importante asegurar que el transposón se encuentra en un sólo sitio del cromosoma, por lo tanto, es imprescindible llevar a cabo un análisis de complementación, para confirmar que el fenotipo se deba únicamente a la inserción del transposón en un gen en particular.

Los resultados obtenidos pueden ser muy útiles, aunque existe la posibilidad de obtener mutantes en sitios difíciles de estudiar debido a la carencia de información sobre ellos, como en el caso de la mutante #15, en la que se sabe que el gen mutagenizado corresponde a una proteína cuya función predicha es de cinasa, es decir una proteína que une grupos fosfato a residuos de aminoácidos específicos, que aún no se ha reportado que esté relacionada con

algún proceso quimiotáctico y se carece de elementos para relacionar la mutación con el fenotipo. En estos casos es necesario, como primer paso, determinar claramente la relación entre la inserción y el fenotipo, y como segundo paso se podría determinar si lo que se encuentra afectado es la expresión de los genes flagelares tempranos y/o tardíos, o si lo que se encuentra afectado es el ensamblaje del flagelo, o si el problema está a nivel de la respuesta quimiotáctica.

Alternativamente, existe la posibilidad de que el transposón se inserte en un sitio sin relación al flagelo, mientras que otra mutación (puntual) provoque el fenotipo. En estos casos la introducción de la copia silvestre del gen afectado o la interrupción del gen de forma dirigida proporcionan evidencia adicional para sustentar la idea de que el marco de lectura abierta identificado es el responsable del fenotipo observado.

Otra posibilidad al utilizar esta técnica, es el obtener cepas mutantes afectadas en genes ya clonados y secuenciados, de los cuales ya se conoce su función y que no es necesario continuar caracterizando, como fue el caso de la mutante #18.

Por otro lado, la mutagénesis dirigida se puede emplear cuando ya se tiene clonado un gen y se conoce total, o parcialmente, la secuencia del mismo pero se desconoce su regulación y/o su función. Esta estrategia permite profundizar en el estudio de los genes y su efecto sobre otras secuencias.

Para esta estrategia es de gran utilidad el empleo de cassettes que contengan genes reporteros, así como un marcador de selección como lo son los genes que codifican para resistencia a ciertos antibióticos. Dependiendo de lo que se desee investigar es posible utilizar cassettes que tengan o no un efecto polar río abajo del sitio de inserción. Un ejemplo de este tipo de cassettes es *uidA-aadA*.

El gen '*uidA* codifica para la β -glucuronidasa (GUS), la cual es una enzima sencilla de determinar tanto en ensayos colorimétricos, así como fluorométricos,

y con dicho gen es posible hacer fusiones transcripcionales. El gen que codifica para la resistencia al antibiótico se localiza río abajo de *'uidA*, por lo que la expresión del gen no interfiere con la expresión de *uidA*. (Metcalf y Wanner, 1993).

El reemplazamiento genético está mediado por la recombinación de secuencias homólogas, para que éste se lleve a cabo, se debe utilizar un vector incapaz de replicarse y que no pueda integrarse en el cromosoma bacteriano en algún sitio determinado; de manera que al seleccionar la resistencia del cassette, se seleccionan los eventos de recombinación homóloga entre el gen cromosoma y el gen clonado en el plásmido.

En la tabla 6 se resumen las ventajas y las desventajas de estas aproximaciones.

Tabla 6. Resumen de ventajas y desventajas de las técnicas de mutagénesis empleadas

TÉCNICAS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Mutagénesis al azar	Ayuda a profundizar en el estudio de funciones poco conocidas. Sirve para descubrir genes nuevos	Se corre el riesgo de obtener varios eventos de inserción en diversos sitios del cromosoma. Los resultados pueden ser difíciles de interpretar si no se cuenta con suficiente información. Se pueden obtener datos previamente reportados
Mutagénesis de intercambio alélico	Permite continuar la caracterización de un gen ya descrito y secuenciado o al menos clonado. Útil cuando se desea conocer la regulación y funciones de un gen ya secuenciado y conocer sus efectos sobre otros genes.	En ocasiones se requiere de la secuencia de al menos una parte del gen que se desea interrumpir. Se requiere de un vector que sea incapaz de replicarse en el cromosoma bacteriano

La proteína FlgE

El flagelo de *Rhodobacter sphaeroides* presenta características únicas en su estructura que lo distinguen del resto de bacterias: un abultamiento en la región de las proteínas asociadas al gancho (HAPs) y el gancho recto (Sockett y Armitage, 1991; West y Dreyfus, 1997). Este tipo de gancho no se ha observado en otras bacterias monoflageladas como *Caulobacter crescentus* y *Sinorhizobium meliloti* que presentan gachos curvos (Lagenaur *et al.*, 1978; Krupski *et al.*, 1985).

FlgE es la proteína más abundante dentro del complejo gancho-cuerpo basal (HBB), de hecho 130 subunidades de la proteína FlgE conforman el gancho, en contraste a 6 subunidades de la proteína FlgB (en el eje), o 26 de FlIF (en el anillo MS) (Bonifield *et al.*, 2000; Berg, 2003).

En *R. sphaeroides* existen al menos dos genes *flgE* en el cromosoma, RSP1330 y RSP0080. La evidencia experimental ha demostrado que de estos, RSP0080 corresponde al gen funcional para la formación del gancho en *R. sphaeroides* (Ballado *et al.*, 2001). El producto de este gen predice un polipéptido de 42,660 Da. El gen RSP1330 se trata de una duplicación del gen *flgE*, el cual está ubicado en otra región del cromosoma I de esta bacteria, y se encuentra flanqueado por otras copias duplicadas de los genes flagelares. (http://genome.jgi.psf.org/draft_microbes/rhosp/rhosp.home.html)

Sin embargo, aún no existe evidencia experimental que indique que estos genes son siquiera expresados.

En el trabajo previo del laboratorio se identificó y se secuenció el gen *flgE* de *Rhodobacter sphaeroides*. Análisis moleculares revelaron que forma parte de una unidad transcripcional que incluye a los genes *flgBCDEF* (Ballado *et al.*, 2001). En dicho trabajo, se demostró que el fenotipo de una mutante en *flgE* (polar o no polar) es Fla⁻, lo cual permite inferir que la incapacidad de nado de la mutante

#18 es ocasionada por la falta de flagelo. Por otro lado, también había sido demostrado que en el caso de una mutante polar en *flgE*, ésta solo podía ser complementada con los genes *flgE* y *flgF*, mientras que una mutante no polar si podía ser complementada sólo por *flgE*, sugiriendo que la unidad transcripcional terminaba con el gen *flgF* (Ballado *et al.*, 2001). En el caso de la mutante #18, la mutante recuperó completamente la motilidad al ser complementada con los genes *flgE* y *flgF*, lo cual indica que el único defecto en esta mutante se encuentra en estos genes.

El análisis comparativo de la secuencia de *flgE* reveló una alta similitud con otras secuencias *flgE* reportadas para otras especies así como con los extremos NH₂ y COOH de *flgG* de *S. enterica*.

El N terminal de FlgE de *R. sphaeroides* presenta la secuencia **LSGL**, y **NIANXXTXXGFR** que está muy conservada en todas las proteínas FlgE conocidas. El extremo C-terminal también muestra algunos residuos altamente conservados en otras proteínas FlgE; pero también se encontró gran similitud con los extremos NH₂ y COOH de FlgG de *S. enterica* por esta razón, al mandar a comparar la secuencia de la mutante #18, ésta resultó similar no sólo a FlgE, sino también a FlgG (la cual es otra proteína del eje). Se piensa que estas secuencias son importantes para el reconocimiento de la maquinaria de exportación, o quizá para que ocurran las interacciones cuaternarias necesarias durante el proceso de ensamblaje (Homma *et al.*, 1990a; 1990b).

En contraste con FlgE de *S. enterica*, la proteína de *R. sphaeroides* presenta dos pequeñas inserciones de 7 y 6 aminoácidos localizados en los residuos 46 y 90 respectivamente, la última inserción junto con los 4 aminoácidos predecesores y los dos siguientes presenta un contenido inusual de residuos de prolina, 5.4% comparado contra 2.9% de *S. enterica*. Se ha sugerido que los residuos de prolina están involucrados en la estructura rígida de algunas proteínas. La proteína FlgE

carente de esta región, provocó la reducción del nado de *R. sphaeroides*, observado como el diámetro de un anillo de células en una caja de medio semi-sólido (swarm); además de mostrar ganchos curvos en preparaciones de microscopía electrónica. Sin embargo, queda por confirmar que la alteración en el nado, sea específicamente ocasionada por la curvatura del gancho producida por la proteína FlgE mutante (Ballado *et al.*, 2001).

La proteína FlhB

FlhB es una proteína integral de membrana que se ha propuesto forma parte del aparato de exportación flagelar. En *Salmonella enterica*, *flhB* forma parte del operón cuyos genes son requeridos para la formación del aparato de exportación flagelar (Macnab, 2003). Este gen codifica para un polipéptido altamente hidrofóbico de aproximadamente 42,322 Da que presenta varios segmentos que se expanden a través de la membrana lo que sugiere que FlhB sea parte integral de la misma. (Minamino *et al.*, 1994).

Se ha visto que la proteína FliK controla la longitud del gancho. Se piensa que en el momento apropiado, FliK envía una señal a FlhB para cambiar la especificidad del aparato de exportación de sustratos tipo gancho (en los que se incluyen los del eje) a sustrato tipo filamento (Williams *et al.*, 1996; Kutsukake, 1997).

En el cromosoma de *R. sphaeroides* río abajo del gen *flhB* existe una región de aproximadamente 600 pb, en la cual se predicen dos posibles marcos de lectura abierta (ORFs) los cuales se encuentran en la misma orientación que *flhB*. Inmediatamente abajo de *flhB*, se predice la existencia de un ORF de 254

aminoácidos, el cual no es similar a ninguna otra proteína reportada a la fecha (http://genome.jgi.psf.org/draft_microbes/rhosp/rhosp.home.html).

La mutación aislada en este trabajo *flhB::uidA-aadA*, ejercería un efecto polar sobre cualquier posible gen ubicado río abajo de la inserción. El hecho de que la mutante NA-I haya sido complementada con el plásmido pRS210 (el cual sólo lleva *flhB*) sugiere que este ORF, en caso de ser un gen funcional, no es transcrito junto con *flhB*. Alternativamente, este gen podría ser transcrito junto con *flhB*, sin embargo, su ausencia podría estar no relacionada con la movilidad de la bacteria. Dada la falta de similitud de este ORF incluso al ser comparado con los genomas secuenciados de otros microorganismos filogenéticamente relacionados, consideramos factible que este ORF no represente un gen funcional.

CONCLUSIONES

Se compararon dos estrategias de mutagénesis distintas para el estudio de la regulación de la expresión de genes flagelares y se evaluaron las ventajas y desventajas del empleo de éstas en la caracterización del regulón flagelar de *Rhodobacter sphaeroides*.

Se comprobó la utilidad del empleo de elementos transponibles y genes reporteros en los experimentos de mutagénesis.

Mediante el empleo de la técnica de mutagénesis al azar fue posible indentificar dos genes. En el primer caso el gen identificado codifica para una proteína cuya función es posiblemente de cinasa y que no ha sido previamente reportada en ningún estudio sobre quimiotaxis o regulación en *Rhodobacter sphaeroides*. Debido a la carencia de información sobre la función de dicha proteína no nos fue posible correlacionar la mutación con el fenotipo observado.

En el segundo caso de mutagénesis al azar identificó un gen que codifica para la proteína estructural del gancho FlgE, previamente descrita para la especie por lo que la mutación presenta el fenotipo que corrobora su función.

La región río abajo de *flhB* de aproximadamente 600 pb probablemente no forma parte de la misma unidad transcripcional.

Los resultados sugieren que *flhB* se expresa como un mensajero monocistrónico (lo que no descarta la posibilidad de que también se exprese como parte del operón *flzOPQRflhB*).

PERSPECTIVAS

La profundización en el estudio del gancho de *Rhodobacter sphaeroides* podrá brindar información importante para el entendimiento de la importancia de la forma recta de esta estructura y sus implicaciones.

Complementar la mutación del gen cuya actividad predicha es de cinasa comprobar que sea la única responsable del fenotipo observado para tratar de identificar si se trata de una proteína involucrada en quimiotaxis o en el proceso de síntesis y ensamblaje del flagelo.

REFERENCIAS

- Adler, J., 1966. *Chemotaxis in bacteria*. Science, 153: 708-715
- Aizawa, S.-I., C. Harwood, y R. Kadner. 2000. *Signaling components in bacterial locomotion and sensory reception*. Journal of Bacteriology, 182 (6): 1459-1471
- Alex, L. A. y M. I. Simon. 1994. *Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes*. Trends in Genetics, 10: 133-138
- Armitage, J. P. 1992. *Bacterial motility and chemotaxis*. Science Progress, 76: 451-477
- Armitage, J.P. 1999. *Bacterial tactic responses* Advances in Microbial Physiology, 41: 229-289
- Armitage, J. P. y R. Macnab. 1987. *Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of Rhodobacter sphaeroides*. Journal of Bacteriology, 169 (2): 514-518
- Armitage, J. P. y R. Schmitt. 1997. *Bacterial chemotaxis: Rhodobacter sphaeroides and Sinorhizobium meliloti - variations on a theme?* Microbiology, 143: 3671-3658.
- Armitage, J. P., T.P. Pitta, M. A.-S. Vigeant, H.L. Packer y R.M. Ford. 1999. *Transformations in flagellar structure of Rhodobacter sphaeroides relationship to changes in swimming speed*. Journal of Bacteriology, 181(16): 4825-4833
- Armstrong, J.B y J. Adler. 1967. *Genetics of motility in Escherichia coli* Genetics, 56(3): 363-373
- Auvray, F., A.J. Ozin, L. Claret, C. Hughes. 2002. *Intrinsic membrane targeting of the flagellar export ATPase FliI: interaction with acidic phospholipids and FliH*. Journal of Molecular Biology, 318(4): 941-950

- Ballado, T., L. Camarena, B. González-Pedrajo, E. Silva-Herzog y G. Dreyfus. 2001. *The hook gene FlgE is expressed from the flgBCDEF operon in Rhodobacter sphaeroides. Study of an flgE mutant.* Journal of Bacteriology, 183: 1680-1687
- Berg, H. C. 2003. *The rotatory motor of bacterial flagella.* Annual Review of Biochemistry, 72: 19-54
- Birboim, H.C. y J. Doly. 1979. *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.* Nucleic Acids Research, (7): 1513-1522
- Blair, D.F. 1995. *How bacteria sense and swim* Annual Review of Microbiology, 49: 489-522
- Blair, D.F. y H.C. Berg. 1991. *Mutations in the MotA protein of Escherichia coli reveal domains critical for proton conduction* Journal of Molecular Biology, 221: 1433-1442
- Blair, D.F., D.K. Kim y H.C. Berg. 1991. *Mutant MotB proteins in Escherichia coli* Journal of Bacteriology, 173: 4049-4055
- Bonifield, H. R., S. Yamaguchi, K. T. Hughes. 2000. *The flagellar hook protein FlgE, of Salmonella enterica serovar Typhimurium is posttranscriptionally regulated in response to the stage of flagellar assembly.* Journal of Bacteriology, 182 (4): 4044-4050
- Bren, A. y M. Eisenbach. 2000. *How signals are heard during bacterial chemotaxis protein-protein interactions in sensory signal propagation.* Journal of Bacteriology, 182(24): 6865-6873
- Brown, S., P.S. Poole, W. Jeziorska y J.P. Armitage. 1993. *Chemokinesis in Rhodobacter sphaeroides is the result of a long term increase in the rate of flagellar rotation.* Biochemical and Biophysics Acta, 1141: 309-312
- Claret, L. y C. Hughes. 2002. *Interaction of the atypical prokaryotic transcription activator FlhD2C2 with early promoters of the flagellar gene hierarchy.* Journal of Molecular Biology, 321(2): 185-199

Claret, L., S.R. Calder, M. Higgins y C. Hughes. 2003. *Oligomerization and activation of the FliI ATPase central to bacterial flagellum assembly*. *Molecular Microbiology*, 48(5): 1349-1355

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

Donohue, T.J. y S. Kaplan. 1991. *Genetics techniques in Rhodospirillaceae*. *Methods in Enzymology*, 204: 459-485.

Fahmer K.A., S.M. Block, S. Krishnaswamy, J.S. Parkinson y H.C. Berg. 1994. *A mutant hook-associated protein (HAP3) facilitates torsionally induced transformations of the flagellar filament of Escherichia coli* *Journal of Molecular Biology*, 238(2): 173-186

Ferre, A., J. De la Mora, T. Ballado, L. Camarena y G. Dreyfus. 2004. *Biochemical study of multiple CheY response regulators of the chemotactic pathway of Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, 186 (15):5172-5277

Francis, N.R., G.E. Sosinsky, D. Thomas y D.J. DeRosier. 1994. *Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex*. *Journal of Molecular Biology*, 235(4): 1261-1270

Fraser, G. M., B. González-Pedrajo, J.R. Tame y R. Macnab. 2003 *Interactions of FliJ with the Salmonella Type III Flagellar Export Apparatus* *Journal of Bacteriology*. 185(18): 5546-5554
186(15): 5172-5177

Furukawa, Y., K. Imada, F. Vonderviszt, H. Matsunami, K. Sano, K. Kutsukake y K. Namba. 2002. *Interactions between bacterial flagellar axial proteins in their monomeric state in solution*. *Journal of Molecular Biology*, 318(3): 889-900

- García, N., A. Campos, A. Osorio, S. Poggio, B. González-Pedrajo, L. Camarena y G. Dreyfus. 1998. *The flagellar switch genes flhM and flhN of Rhodobacter sphaeroides are contained in a large flagellar gene cluster.* Journal of Bacteriology, 180 (15): 3978-3982
- Gillen, K.L. y K.T. Hughes. 1991. *Molecular characterization of flgM, a gene encoding a negative regulator of flagellin synthesis in Salmonella typhimurium.* Journal of Bacteriology, 173(20): 6453-6459
- González- Pedrajo, B., T. Ballado, A. Campos, R. E. Sockett, L. Camarena y G. Dreyfus. 1997. *Structural and genetic analysis of a mutant of Rhodobacter sphaeroides WS8 deficient in hook length control.* Journal of Bacteriology, 179 (21): 6581-6588
- Greer-Phillips S.E., G. Alexandre, B.L. Taylor y I.B. Zhulin. 2003. *Aer and Tsr guide Escherichia coli in spatial gradients of oxidizable substrates.* Microbiology, 149(9): 2661-2667
- Hamaguchi, K. y E.P. Geiduschek. 1962. *The effect of electrolytes and the stability of deoxyribonucleate helix.* JACS, 84: 1329-1337.
- Hamblin, P.A., B. A. Maguire, R. N. Grishanin y J.P. Armitage. 1997. *Evidence for two chemosensory pathways in Rhodobacter sphaeroides.* Molecular Microbiology, 26(5): 1083-1096
- Hirano, T., S. Yamaguchi, K. Oosawa y S.I. Aizawa. 1994. *Roles of FlhK and FlhB in determination of flagellar hook length in Salmonella typhimurium.* Journal of Bacteriology, 176: 5439-5449
- Hirano, T., T. Minamino, K. Namba y R. Macnab. 2003. *Substrate specificity classes and the recognition signal for Salmonella Type III flagellar export.* 2003 Journal of Bacteriology, 185(8): 2485-2492
- Holmes, D.S. y M. Quingley. 1981. *A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids.* Analytical Biochemistry, 114:193-197

Homma, M., H. Fujita, S. Yamaguchi y T. Iino. 1984. *Excretion of unassembled flagellin by Salmonella typhimurium mutants deficient in the hook-associated proteins.* Journal of Bacteriology, 159: 1056-1059

Homma, M., D.J. DeRosier y R. M. Macnab. 1990(a). *Flagellar hook and hook associated proteins in Salmonella typhimurium and their relationships to other axial components of the flagellum.* Journal of Molecular Biology, 213: 819-832

Homma, M., K. Kutsukake, M. Hasebe, T. Iino R.M. Macnab. 1990(b). *FlgB, FlgC, FlgF y FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of Salmonella typhimurium.* Journal of Molecular Biology, 211: 465-477

Hughes, K.T., K.L. Gillen, M.J. Semon y J.E. Karlinsey. 1993. *Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator.* Science, 262(5137): 1277-1280

Imhoff, J. 1989. *Genus Rhodobacter* p.1668-1672 *En.* J.C. Holdt (ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Vol III Williams y Wilkins. Baltimore

Jefferson, R.A., S. M. Burgess y D. Hirsh. 1986. *β -glucuronidase from Escherichia coli as a gene-fusion marker* Proceedings of the National Academy of Science, USA.

Jones, C.J. y S.I. Aizawa. 1991. *The Bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and function.* Advances in Microbial Physiology, 212: 377-387

Krupski, G., R. Götz, K. Ober, E. Pleier y R. Schmitt. 1985. *Structure of complex flagellar filaments in Rhizobium meliloti* Journal of Bacteriology, 162(1): 361-366

Kubori, T., N. Shimamoto, S. Yamaguchi, K. Namba y S. Aizawa. 1992. *Morphological pathway of flagellar assembly in Salmonella typhimurium* Journal of Molecular Biology, 226(2): 433-446

- Kubori, T., S. Yamaguchi y S. Aizawa. 1997. *Assembly of the switch complex onto the MS ring complex of Salmonella typhimurium does not require any other flagellar proteins.* Journal of Bacteriology, 179(3):813-817
- Kutsukake, K. 1997. *Hook-length control of the export-switching machinery involves a double-locked Gate in Salmonella typhimurium flagellar morphogenesis.* Journal of Bacteriology, 179: 1268-1273
- Lagenaur, C., M. DeMartini y N. Agabian. 1978. *Isolation and characterization of Caulobacter crescentus flagellar hooks.* Journal of Bacteriology, 136(2): 795-798
- LeBlanc, H., A.S. Lang y J.T. Beatty. 1999. *Transcript cleavage, attenuation and an internal promoter in Rhodobacter capsulatus puc operon.* Journal of Bacteriology, 181: 4955-4960
- Li, M. y G.L. Hazelbauer. 2004. *Cellular stoichiometry of the components of the chemotaxis signaling complex.* Journal of Bacteriology, 186(12): 3687-3694
- Limberger, J. R., L.L. Slivenski y W.A. Samsonoff. 1994. *Genetic and biochemical analysis of the flagellar hook of Treponema phagedenis.* Journal of Bacteriology, 176: 3631-3637
- Lloyd, S.A., H. Tang, X. Wang, S. Billings y D.F. Blair. 1996. *Torque generation in the flagellar motor of Escherichia coli : evidence of a direct role for FliG but not for FliN or FliM* Journal of Bacteriology, 178(1): 223-231
- Lux, A.L., N. Kar y S. Khan. 2000. *Overproduced Salmonella typhimurium flagellar motor switch complexes* Journal of Molecular Biology, 298(4): 577-583
- Mackenzie, C., M. Choudhary, F. W. Larimer, P.F. Predki, S. Stilwagen, J. P. Armitage, R.D. barber, T. J. Donohue, J. P. Hosler, J. E. Newman, J. P. Shapleigh, R. E. Sockett, J. Zeilstra-Ryalls y S. Kaplan. 2001. *The home stretch, a first analysis of the nearly complemented genome of Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 Photosynthesis Research, 70: 19-41

Macnab, R.M. 2002. *The bacterial flagellum of Salmonella: Motor organelle and type III protein export apparatus*. En: Abstracts of Xth International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Paris, Francia.

Macnab, R.M. 2003. *How bacteria assemble flagella*. Annual Review of Microbiology, 57:77-100

Macnab, R.M. y D. J. DeRosier. 1988. *Bacterial flagellar structure and function*. Canadian Journal of Microbiology, 34:442-451

Macnab, R.M. 1996. *Flagella and motility*. P.123-145 En: F. C. Neidhart, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik; W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Riley, M. Schaechter, y H.E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella celular and molecular biology*. 2da. Ed. ASM Press, Washington, D.C.

Marykwas, D.L., S.A. Schmidt y H.C. Berg. 1996. *Interacting components of the flagellar motor of Escherichia coli revealed by the two-hybrid system in yeast*. Journal of Molecular Biology, 256(3): 567-576

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

Minamino, T., T. Iino y K. Kutsukake. 1994. *Molecular characterization of the Salmonella typhimurium flhB operon and its products*. Journal of Bacteriology, 176(24): 7630-7637

Minamino, T., R. Chu, S. Yamaguchi y R.M. Macnab. 2000. *Role of FliJ in flagellar protein export in Salmonella* Journal of Bacteriology, 182(15): 4207-4215

Minamino, T., B. González –Pedrajo, M. Kihara, K. Namba, R. M. Macnab. 2003. *The ATPase FliI can interact with the Type III flagellar protein export apparatus in the absence of its regulator FliH*. Journal of Bacteriology, 185(13): 3983-3988

- Moore, M.D. y S. Kaplan. 1989. *Construction of TnpA gene fusions in Rhodobacter sphaeroides isolation and characterization of a respiratory mutant unable to utilize dimethyl sulfoxide as a terminal electron acceptor during anaerobic growth in the dark on glucose.* Journal of Bacteriology, 171: 4385-4394
- Namba, K. y F. Vonderviszt. 1997. *Molecular architecture of bacterial flagellum.* Quarterly Reviews of Biophysics, 30(1): 1-65
- Ohnishi, K., K. Kutsukake, H. Suzuki y T. Lino. 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.* Molecular Microbiology, 48(4): 1043-1057
- Ohnishi, K., Y. Ohto, S. Aizawa, R.M. Macnab y T. Lino. 1994. *FlgD scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in Salmonella typhimurium* Journal of Bacteriology, 176(8): 2272-2281
- Oosawa, K., T. Ueno y S.I. Aizawa. 1994. *Overproduction of the bacterial flagellar switch proteins and their interactions with the MS ring complex in vitro.* Journal of Bacteriology, 176: 3683-3691
- Packer, H. L., y J. P. Armitage. 1993. *The unidirectional flagellar motor of Rhodobacter sphaeroides WS8 can rotate either clockwise or counterclockwise: characterization of the flagellum under both conditions by antibody decoration.* Journal of Bacteriology, 175: 6041-6045
- Parkinson, J.S. 2003. *Bacterial chemotaxis: A new player in response regulator dephosphorylation.* Journal of Bacteriology, 185 (5): 1492-1494
- Poggio, S., C. Aguilar, A. Osorio, B. González-Pedrajo, G. Dreyfus y L. Camarena. 2000. *σ^{54} Promoters control expression of genes encoding the hook and basal body complex in Rhodobacter sphaeroides* Journal of Bacteriology, 182 (20): 5787-5792
- Porter, S.L., A. V. Warren, A. C. Martin y J.P. Armitage. 2002. *The Third Chemotaxis locus of Rhodobacter sphaeroides is essential for chemotaxis.* Molecular Microbiology, 46 (4): 1081-1094

Power, M.E., R.A. Alm, y T.J. Trust. 1992. *Biochemical and antigenic properties of Campylobacter flagellar hook protein.* Journal of Bacteriology, 174: 3874-3833

Prüß, M.B. y P. Matsumara. 1996. *A regulator of the flagellar regulon of Escherichia coli, flhD, also affects cell division* Journal of Bacteriology, 178(3): 668-674

Quandt, J. y M.F. Hynes. 1993. *Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram Negative Bacteria* Gene, 127 (1): 15-21

Sambrook, J. Fritsch E.F. y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual* 2da. Ed. Cold Spring Harbor , New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Shah, D.S.H., L. Porter, A.C. Martin, P.A. Hamblin y J.P. Armitage. 2000. *Fine tuning bacterial chemotaxis: analysis of Rhodobacter sphaeroides behavior under aerobic and anaerobic conditions by mutation of the major chemotaxis operons and cheY genes.* EMBO Journal, 199: 4601-4613

Scharf, B. y R. Schmitt. 2002. *Sensory transduction to the flagellar motor of Sinorhizobium meliloti* Journal of Molecular Microbiology Biotechnology, 3: 183-186

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

Sharma, R.C. y R.T. Schimke. 1996. *Preparation of electrocompetent E. coli using salt-free growth medium.* Biotechniques, 20 (1): 42-44

Sistrom, W.R. 1960. *A requirement for sodium in the growth of Rhodospseudomonas sphaeroides.* Journal of General Microbiology, 22: 778-785

Socketk, E.R. y J.P. Armitage. 1991. *Isolation, characterization, and complementation of a paralyzed flagellar mutant of Rhodobacter sphaeroides WS8.* Journal of Bacteriology, 173(9): 2768-2790

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

Stock, J.B. y M. Surette. 1996. *Chemotaxis* P. 1103-1129 En: F. C. Neidhart, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik; W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Riley, M. Schaechter, y H.E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella* celular and molecular biology. 2da. Ed. ASM Press, Washington, D.C.

Volgestein, B y D. Gillispie. 1979. *Preparative and analytical purification of DNA from agarose.* Proceedings of the Natural Academy of Science, 76: 615-619

Wadhams, G. H., A. C. Martin y J.P. Armitage. 2000. *Identification of a methyl-accepting chemotaxis protein in Rhodobacter sphaeroides.* Molecular Microbiology, 36(6): 1222-1233

Ward, M.J., A.W. Bell, P.A. Hamblin, H.L. Paker y J.P. Armitage 1995. *Identification of a chemotaxis operon with 2 cheY genes in Rhodobacter sphaeroides.* Molecular Microbiology, 17: 357-366

West, M.A. y G. Dreyfus. 1997. *Isolation and ultrastructural study of the flagellar basal body complex from Rhodobacter sphaeroides WS8 (wild type) and polyhook mutant PG.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 238 (3): 733-737

Williams, A.W., S. Yamaguchi, F. Togashi, SI Aisawa, I. Kawagishi y R. Macnab. 1996. *Mutations in flhK and flhB affecting flagellar hook and filament assembly in Salmonella typhimurium* Journal of Bacteriology, 178 (10): 2960-2970

Zhuk, K., B. González-Pedrajo y R. Macnab. 2002. *Interactions among membrane and soluble components of the flagellar export apparatus of Salmonella .* Biochemistry, 41: 9516-9524

PÁGINAS ELECTRÓNICAS

<http://mmg.uth.tmc.edu/sphaeroides/>

http://genome.jgi.psf.org/draft_microbes/rhosp/rhosp.home.html

<http://www.dsmz.de/bactonom/genera2.htm>,

<http://www.cme.msu.edu/bergeys>

APÉNDICE 1.

Proteínas involucradas en la formación del flagelo, movilidad y quimiotaxis.

PROTEÍNA	FUNCIÓN	CLASE
Proteínas del Flagelo		
FlhC	Regulador maestro de los genes de clase 2	1
FlhD	Regulador maestro de los genes de clase 2	1
FlhA	Exportación de proteínas	2
FlhB	Control de la longitud del gancho, ensamblaje	2
FlhE	Desconocida	2
FlgA	Ensamblaje del anillo P	2
FlgB	Eje proximal	2
FlgC	Eje proximal	2
FlgD	Ensamblaje del gancho	2
FlgE	Proteína del gancho	2
FlgF	Eje proximal	2
FlgG	Eje distal	2
FlgH	Anillo L	2
FlgI	Anillo P	2
FlgJ	Muramidasa, proteína de coronamiento del eje	2
FliA	Factor σ para los operones clase 3	2
FliE	Se propone como adaptador entre el eje y el anillo MS	2
FliF	Anillo MS	2
FliG	Componente del rotor, generación de torque, interactúa con MS	2
FliH	Exportación de proteínas, regulador negativo de FliI	2
FliI	ATPasa, exportación flagelar tipo III	2
FliJ	Chaperona general	2
FliK	Control de la longitud del gancho	2
FliL	Desconocida	2
FliM	Anillo C, sitio de unión de CheY-P	2
FliN	Componente del anillo C, complejo rotor/interruptor	2
FliO	Exportación	2
FliP	Exportación	2
FliQ	Exportación	2
FliR	Exportación	2
FliS	Chaperona específica de FliC	2
FliT	Chaperona específica de FliD	2
FlgK	Unión del gancho-filamento en el gancho	3
FlgL	Unión del gancho-filamento en el filamento	3
FlgM	Factor anti- σ	3
FlgN	Chaperona específica de FlgK y FlgL	3
FliC	Proteína del filamento (flagelina)	3
FliD	Proteína de coronamiento del filamento	3

Proteínas de	Quimiotaxis	
CheA	Cinasa de CheY y CheB	3
CheB	Quimiorreceptor metilesterasa	3
CheR	Quimiorreceptor metiltransferasa	3
CheW	Regulador positivo de CheA	3
CheY	Regulador del interruptor	3
CheZ	Fosfatasa de CheY	3
Proteínas de	Motilidad	
MotA	Rotación del motor	3
MotB	Rotación del motor	3
Aer	Proteína MCP de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i>	3
Tar	Proteína MCP de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> (aspartato)	3
Tap	Proteína MCP de <i>E. coli</i> (péptidos)	3
Tcp	Proteína MCP de <i>Salmonella</i>	3
TlpA	Proteína tipo MCP de <i>R. sphaeroides</i>	3
TlpC	Proteína tipo MCP de <i>R. sphaeroides</i>	3
Trg	Proteína MCP de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> (serina y ribosa)	3
Tsr	Proteína MCP de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i>	3

Modificada de Berg, 2003; Macnab, 1996 y Macnab 2003.

APÉNDICE 2.

Autoridad de las especies citadas

ESPECIE	AUTORES
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	(van Niel, 1944) Imhoff <i>et al.</i> 1984
<i>Escherichia coli</i>	(Migula, 1895) Castellani y Chalmers 1919
<i>Salmonella enterica</i>	(Loeffler, 1892) Castellani y Chalmers 1919
<i>Myxococcus xanthus</i>	Beebe, 1941
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(<i>Baterium aeruginosum</i> Schroeter, 1872) Migula, 1900
<i>Treponema phagedenis</i>	Smibert, 1984
<i>Campylobacter coli</i>	(Doyle, 1948) Veron y Chatelin 1973
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	(Smith y Townsend 1907) Conn, 1942 sinónimo heterotípico de <i>Rhizobium radiobacter</i>
<i>Azospirillum brasilense</i>	Tarrand <i>et al.</i> 1979
<i>Caulobacter crescentus</i>	Poindexter, 1964 sinónimo heterotípico de <i>Caulobacter vibroides</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	(Dangeard, 1929) DeLajudie <i>et al.</i> 1994 sinónimo de <i>Ensifer meliloti</i>

Fuentes: <http://www.dsmz.de/bactonom/genera2.htm>, <http://www.cme.msu.edu/bergeys>