



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA
MUTANTE EN EL GEN *fliL* de *Rhodobacter*
sphaeroides"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

FERNANDO SUASTE OLMOS



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LAURA CAMARENA MEJIA

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



2005

m. 340015

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA 14
MEXICO

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

NOMBRE: Fernando Suaste Olmos
FECHA: 18-ENERO-2005
FIRMA: [Firma]

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 una mutante en el gen *fliL* de *Rhodobacter sphaeroides*"

realizado por Fernando Suaste Olmos

con número de cuenta 9429103-4 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Laura Camarena Mejía

[Firma]

Propietario

Dra. María del Carmen Gómez Eichelmann

[Firma]

Propietario

Dr. Georges Dreyfus Cortes

[Firma]

Suplente

Dra. Bertha González-Pedrajo

[Firma]

Suplente

Dr. Saúl Cano Colín

[Firma]

Consejo Departamental de Biología

[Firma]

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mis padres Fernando Suaste Pérez y Ma. Concepción Olmos Mireles, a mis hermanas, Victoria Suaste, Sandra Suaste, Esperanza Suaste y Fabiola Suaste, por su esfuerzo y sacrificio sin el cual no hubiera podido concluir con esta meta.

A Norma Romero por su cariño y compromiso que siempre me ha demostrado, a ti que siempre me has motivado para alcanzar lo mas alto, gracias por estar conmigo en cada momento, mil gracias.

A mis pequeños diablos Rodrigo, David, y Rosario que son la luz de mi casa.

A la familia Suaste Pérez por llenar mi vida de recuerdos gratos

A la memoria de Alejandro Suaste Hurtado... quien dejo plasmada su sonrisa en nuestros corazones, hasta pronto.

Agradecimientos

A la Dra. Laura Camarena Mejía por su valiosa guía y amistad durante la realización de este trabajo. Por la confianza depositada en mí a lo largo de este tiempo, cada resultado obtenido ha sido realmente fascinante. Ahora que he podido aclarar la idea, no dejo de sentirme un afortunado, gracias.

A mis sinodales: Dra. Carmen Gómez, Dra. Berta González-Pedraja, Dr. Geoges Dreyfus y Dr. Saúl Colín por su tiempo para revisar este trabajo, ha sido una experiencia extraordinaria conocer a personas tan profesionales.

A Sebastián Poggio por su amistad y apoyo académico que en todo momento me ha brindado, por todos los comentarios que han sembrado en mí una constante sed de perfeccionamiento.

A Aurora Osorio por compartirme sus conocimientos, y por ese increíble ángel que la vida le ha regalado.

A la señora Julia por su ejemplo de dedicación y disciplina.

A mis compañeros de laboratorio Julieta Peña, Abigail y Salvador Fabela por el cariño y apoyo moral que en todo momento me brindaron. Las horas en el laboratorio nunca hubieran sido lo mismo.

A mis compañeros de carrera: Hugo, Diana, Armando, Luis, Araceli, Denis, Mauricio, Chino por hacer mi vida en la universidad simplemente maravillosa.

A mis amigos Alejandro García y Fernando Vences por abrir un espacio en su corazón, en donde se, estoy presente.

A la señora María Perales, al señor Jesús Romero y a toda su familia, por ser un ejemplo de sencillez y humildad, por abrirme las puertas de su hogar, es algo que nunca olvidare.

A Guadalupe Romero, Sandy, Edit por esas noches de plática tan amena, por sus comentarios que siempre me motivaron para nunca darme por vencido.

A mis compañeros del equipo ABC: Mayito, Guillo, Pedro, Jr., Flaco, Mauricio por su incondicional apoyo, por su forma de ver la vida y por vivir el básquetbol con la misma intensidad con que yo lo siento.

A mis amigas del equipo Zaetas: Lety, Kari, Lala, Blanquis, Naye, May, Mary y a Gill por brindarme su amistad y sus consejos en los momentos adecuados, gracias.

A mi cuñado Leonardo Soto por la solidaridad que siempre ha tenido con mi familia, gracias.

A todos los que hicieron posible este sueño... Gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	
Estructura y funcionamiento del flagelo bacteriano	2
El filamento	3
El gancho	5
El cuerpo basal	5
Quimiotaxis	7
Regulación de la expresión genética del flagelo y biogénesis	11
Secuencia de ensamblaje del flagelo	14
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	15
Antecedentes particulares	17
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	
Cepas bacterianas y plásmidos	24
Oligonucleótidos	25
Medio y condiciones de cultivo	25
Transformación de <i>E. coli</i> por el método de cloruro de calcio	26
Electroporación	26
Conjugación biparental	27
Conjugación triparental	27
Amplificación de ADN por PCR	28
Digestión del ADN con enzimas de restricción	29
Desfosforilación del ADN	29
Ligación de secuencias específicas de ADN en vectores de clonación	29
Protocolo de extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa QIAEX II Kit	30
Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa de bajo punto de fusión	31
Purificación de plásmidos por el método de minipreparaciones hervidas	32
Purificación de plásmidos QIAGEN	32
Ensayos de movilidad	32
Inmunotransferencia (Western blot)	33
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	36
RESULTADOS	
Análisis de complementación	40
Análisis genético y funcional de la cepa FS1	41
Análisis genético y funcional de la cepa FS2	43

Análisis de secuencia de los fragmentos <i>fliL</i> -up y <i>fliL</i> -down	45
Determinación del fenotipo de la cepa FS2	51
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	58
PERSPECTIVAS	58
BIBLIOGRAFÍA	59

Resumen

En el curso de la evolución, los seres vivos han ido adquiriendo una serie de estructuras y estrategias para desplazarse a fin de habitar ambientes propicios para su desarrollo y supervivencia; en bacterias, dicha estructura lo constituye un apéndice helicoidal que rota mediante un motor que se aloja en su base, el cual ha sido designado con el nombre de flagelo. Este dispositivo motriz no sólo está provisto del engranaje y energía necesarios para su funcionamiento, también está acoplado a un sistema quimiotáctico que le permite detectar las condiciones de su entorno. La estructura del flagelo, así como los mecanismos de regulación genética que permiten su formación, han sido estudiados a detalle en organismos como *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*. El flagelo estructuralmente se divide en tres partes: el cuerpo basal, el gancho y el filamento, siendo estas dos últimas las estructuras que sobresalen al exterior de la célula. La regulación genética está organizada en clases jerárquicas, lo cual a su vez permite que el flagelo se ensamble en una secuencia específica de eventos. A pesar de que se han determinado casi todas las partes que componen al flagelo, existen aún elementos que no se han caracterizado con claridad, uno de ellos es el producto de 17 kDa codificado por el gen *fliL*. La delección de este gen en especies multiflagelares no muestra fenotipo aparente; por el contrario, en bacterias monoflageladas parece ser un elemento indispensable relacionado con la movilidad de la bacteria. En el presente trabajo se realizó la delección de *fliL* en *Rhodobacter sphaeroides* una bacteria monoflagelada; los análisis genéticos y funcionales que se realizaron de dicha delección sugieren que el fenotipo de *fliL* en esta bacteria es Mot.

Introducción

Estructura y función del flagelo bacteriano.

El flagelo bacteriano ha sido una estructura ampliamente estudiada en *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, la mayor parte del conocimiento que se tiene sobre éste ha sido producto de la obtención y caracterización de mutantes en estas especies (Macnab, R. M. 1996; Macnab, R. M. 2003). El flagelo es un apéndice rígido que actúa como propela para generar el desplazamiento de las células bacterianas mediante la rotación bidireccional de un motor que se encuentra en su base.

Existen varias formas de desplazamiento en bacterias (para revisión ver: Harshey, R., 2003), dos de los mecanismos mejor estudiados en cuanto al modo de desplazamiento son: “swimming” o natación (Macnab, R. M. 1996) y “swarming” o desplazamiento en enjambre (Harshey, R. y Matsuyama, T. 1994; Harshey, R., 2003). El primero se refiere al movimiento individual de células en medios líquidos y viscosos; mientras que el nado en enjambre, también dependiente del flagelo, es un proceso complejo en el cual las bacterias se desplazan en forma coordinada sobre una superficie sólida. El “swarming” es utilizado por las bacterias entéricas durante la colonización del epitelio y en la formación de biofilms (Alison *et al.*, 1994). Uno de los organismos en los que mejor se ha estudiado este tipo de movilidad es *Proteus mirabilis*, en donde se ha observado que el proceso involucra una serie de etapas de transformación (Fraser, M. G. y Hughes, C. 1999; Harshey, R., 2003); en una primera instancia las células se encuentran en un estado vegetativo de nado libre, posteriormente mediante una serie de estímulos (peptidos, aminoácidos, N-acil-homoserin-lactonas, denominadas: AHLs) las células se agrupan y se alargan longitudinalmente,

aunado a esto, cada célula comienza un proceso de hiperflagelación y posteriormente ocurre el desplazamiento grupal. Los requerimientos esenciales para que ocurra este tipo de nado, están asociados con un incremento en la densidad celular, factores de virulencia y producción de surfactantes como lipopolisacáridos (Toguchi *et al.*, 2000).

En cuanto a su organización estructural, el flagelo puede dividirse esquemáticamente en tres partes: el filamento, el gancho y el cuerpo basal (fig. 1) (Macnab, R. M. 1996).

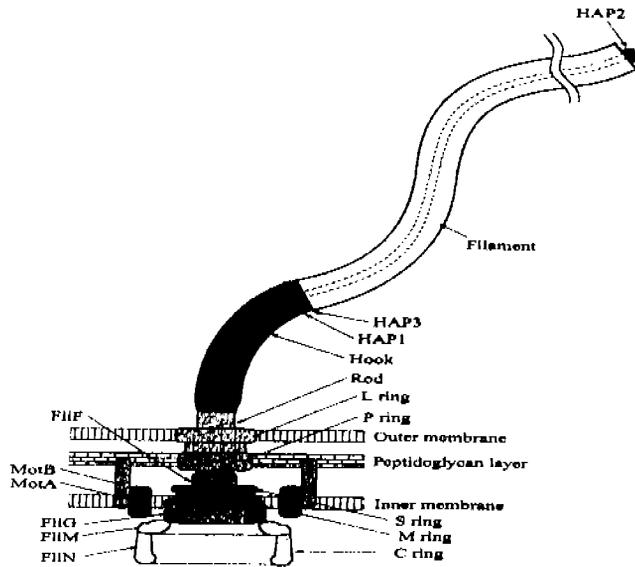


Figura 1. Esquema del flagelo bacteriano (tomado de Minamino, T, y Namba, K. 2004)

El filamento: es una estructura formada por un sólo tipo de proteína denominada flagelina (FliC), tiene una longitud promedio de 5-10 μm y un ancho de ~ 20 nm. El filamento es una hélice que varía en su conformación, dependiendo del arreglo que presentan las subunidades de flagelina agrupadas longitudinalmente en 11 fibrillas, de las

cuales se han reportado hasta 12 morfotipos, el tipo de hélice formada que comúnmente utilizan las bacterias para desplazarse es designada “mano derecha” (Kamiya *et al.*, 1979).

La disposición y número de flagelos varía entre las especies de bacterias (fig. 2), pero en general se pueden nombrar las siguientes formas: anfitricas, con flagelos en los polos; peritricas con flagelos rodeando la célula; monotricas con un solo flagelo ubicado en posición polar o subpolar; lofotricas con múltiples flagelos anclados en un polo. Los mecanismos que regulan la ubicación del flagelo se desconocen a la fecha. Sin embargo, se sabe que en *Pseudomonas putida* la ausencia de FlhF, una proteína que forma parte del operón de quimiotaxis y movilidad flagelar, provoca una localización aleatoria del flagelo y afecta la movilidad. Así mismo, se observó que la sobreexpresión de *flhF* triplica el número de flagelos (Pandza, *et al.* 2000).

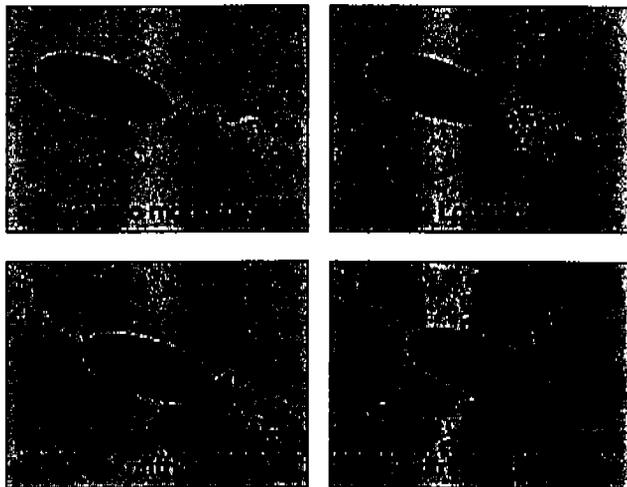


Fig. 2. Número y disposición del flagelo en la célula bacteriana.

El gancho: es un componente en forma curva que actúa de unión entre el filamento y el cuerpo basal. FlgE es la proteína que forma el gancho. Conserva el mismo arreglo de once fibrillas al igual que el filamento, sin embargo, su diámetro es un poco más grande y la rigidez de esta estructura es mucho menor afin de proveer mayor flexibilidad . Existen otras dos proteínas FlgK y FlgL, que no forman precisamente parte del gancho, sin embargo actúan de enlace entre éste y el filamento y son referidas como HAPs (hook-associated proteins).

El cuerpo basal: constituye la parte más compleja del sistema flagelar, ya que contiene el aparato de secreción tipo III necesario para la exportación de las proteínas flagelares axiales (eje, gancho y filamento).

Las partes que conforman el cuerpo basal son: una serie de cuatro anillos, los más externos son el L (FlgH) y P (FlgI), que se encuentran en la membrana externa y en la pared de peptidoglicanos respectivamente, el anillo MS se considera como uno solo debido a que los dos anillos que lo integran están formados por la misma subunidad (FliF), este anillo se encuentra ubicado en la membrana interna. Por el centro de estos anillos se proyecta una estructura conocida como el "eje", el cual forma un cilindro y está integrado por múltiples subunidades de las proteínas FlgF, FlgG, FlgB y FlgC. En la base del anillo MS se propone que se aloja un complejo multiprotéico que actúa como sistema de secreción tipo III. Por otro lado, hacia la cara citoplasmática se encuentra sobresaliendo un anillo extra en forma de campana designado "anillo C", compuesto por las proteínas FliG, FliM y FliN implicadas tanto en los procesos de generación de torque, ensamblaje flagelar, así como en controlar el cambio de dirección de la rotación del flagelo. De estas tres últimas proteínas FliG constituye el rotor del motor flagelar y se encarga de generar el torque que permite la rotación del flagelo (Lloyd *et al.*, 1996). FliM representa el

interruptor (switch) del flagelo y hace que éste pueda cambiar el sentido de su rotación. Las proteínas encargadas de acoplar la energía motriz son MotA y MotB. MotA es una proteína con cuatro dominios transmembranales, se ha sugerido que mediante estos dominios se forma un canal a través del cual se translocan los protones que proporcionan la energía de rotación (Blair, D. F. y Berg, H. C. 1990; Blair, D. F. y Berg, H. C. 1991); MotB es una proteína menos hidrofóbica que MotA, posee un largo dominio carboxilo-terminal ubicado en el espacio periplasmático y una porción amino terminal inmersa en la membrana citoplasmática; MotB interactúa con la pared de peptidoglicanos y se piensa que parte de su función es anclar a MotA y consolidar el complejo de forma estática (Chun, S. y Parkinson, J. S. 1988). Finalmente, se ha observado mediante microscopía electrónica, que el complejo MotB-MotA se encuentra organizado alrededor del anillo MS asemejando la forma de un collar de perlas (Khan *et al.*, 1988).

La maquinaria de exportación está asociada con el anillo MS, los componentes que la integran han sido determinados y divididos en dos clases (para revisión ver Macnab, R. M. 2003): solubles y asociados a membrana. Los primeros constituyen a su vez dos grupos, uno determinado por chaperonas de sustratos específicos como las proteínas FlgN, FlhS y FlhT las cuales están involucradas con la exportación de las proteínas HAPs, FliC y FliD respectivamente; el segundo grupo constituido por FliH, FliI y FliJ, están involucradas en la exportación de todas las proteínas axiales flagelares. La otra clase que conforma el aparato de exportación está integrado por proteínas inmersas en la membrana citoplasmática (FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ, FliR). Sin embargo, la forma en que se encuentran ensamblados y cómo es su mecanismo de funcionamiento aún es incierto. Se piensa que este tipo de dispositivo de exportación además de permitir la translocación de los componentes axiales, es utilizado para expulsar factores de virulencia en algunas especies bacterianas (Konkel, *et*

al., 2004). Por otra parte, mutantes en el aparato de exportación flagelar en *Pseudomonas putida* DOT-T1E son sensibles a Tolueno, sugiriendo que el aparato de exportación flagelar, pudiera transportar quizá al periplasma o a la membrana externa alguna proteína involucrada con la resistencia a tolueno (Segura *et al.*, 2001).

En este mismo sentido se observó que en *Bacillus thuringiensis*, una mutante en *flhA* es no móvil e incapaz de exportar hemolisina BL y fosfolipasa C (Ghelardi, *et al.*, 2002).

Quimiotaxis

Como se mencionó previamente en bacterias multiflageladas como *E. coli* y *S. enterica* el motor del flagelo rota bidireccionalmente y la alternancia entre los sentidos de rotación modulan la forma de desplazamiento. Cuando el motor rota en sentido contrario de las manecillas del reloj (CCW) los flagelos tienden a agruparse en un haz y como resultado ocurre un desplazamiento en línea recta (smooth swimming), si la rotación ocurre en sentido de las manecillas del reloj (CW) entonces cada flagelo tira hacia una posición diferente (dependiendo de su ubicación en la célula), esto provoca que la célula de volteretas (tumble) y cambie su dirección de nado (fig. 3). Sin embargo, este proceso es regulado por una respuesta mucho más global, relacionada con los mecanismos que le permiten a la bacteria detectar estímulos externos mediante los cuales se guía para controlar el rumbo de su trayectoria, a esta respuesta se le conoce con el nombre de quimiotaxis (para revisión ver: Blair, D. F. 1995; Armitage, J. y Schmitt, R. 1997).

Desde hace tiempo la conducta quimiotáctica fue evidenciada a través del estudio de la migración de *E. coli* en tubos capilares conteniendo una solución de galactosa. Se observó que las células inoculadas en un extremo del tubo se desplazaban conforme degradaban la galactosa, formando así un gradiente de concentración (Adler, J. 1966). En

este experimento se determinó que después de haber inoculado los capilares, las células empezaban a acumularse formando dos bandas discretas, el análisis de las mismas, llevó a la conclusión de que la formación de bandas radicaba en el aprovechamiento diferencial del nutrimento, esto es, por un lado cierta población degradaba la galactosa utilizando el oxígeno que se encontraba en el tubo, y una vez que éste se acababa, el resto de la población celular utilizaba la galactosa en condiciones de anaerobiosis; la misma conducta fue observada cuando se inoculaban las células en cajas de agar semisólido, la diferencia en este caso fue que en lugar de bandas se formaban anillos concéntricos a partir del punto de inoculación (Bundrene. O. E., y Berg, C. H. 1991).

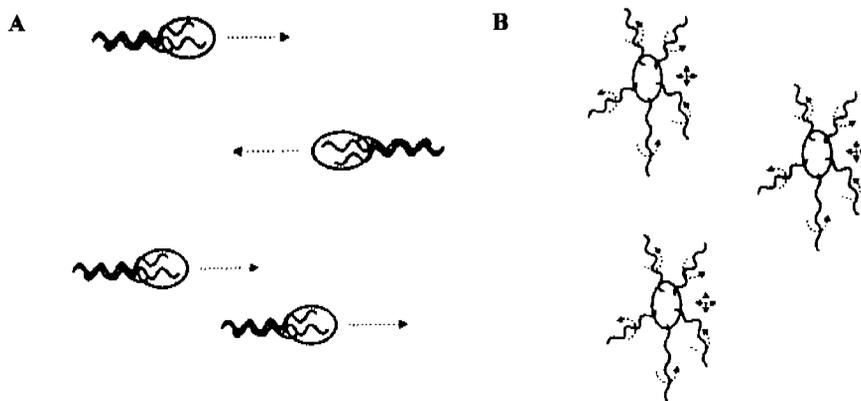


Figura 3. En "A" se ilustra la forma en que los flagelos se agrupan en un solo haz, permitiendo así, que la célula sea impulsada en una trayectoria lineal; por el contrario en "B", se puede observar el momento en que los flagelos se desagrupan, ocasionando que la bacteria de volteretas (modificado de: Armitage, J. y Schmitt, R. 1997).

Actualmente, se conoce la mayoría de las proteínas involucradas en la respuesta quimiotáctica (fig. 4), éstas se activan por una serie de estímulos externos provocados por sustancias atrayentes (serina, aspartato, maltosa, ribosa y galactosa) o repelentes (índol,

glutamina, etc.). Estas sustancias hacen contacto directa o indirectamente con los receptores quimiotácticos de la célula denominados MCPs de las siglas en inglés (Methyl-accepting Chemotaxis Proteins). En *E. coli* las MCPs son: Tsr, Tar, Trg, Tap y Aer, esta última actúa como sensor de oxígeno y modula la respuesta quimiotáctica de manera alterna (Taylor *et al.*, 1999; Burkart *et al.*, 1998).

Cada uno de estos receptores se encuentra asociado con la proteína CheA, a través de la proteína adaptadora CheW (Conley *et al.*, 1989). Cuando un atrayente se une al receptor, ocurre un cambio conformacional que es transmitido a la proteína CheA a través del dominio citoplasmático del receptor; dicho cambio provoca una disminución en la concentración de las especies fosforiladas de las proteínas CheY y CheB. Las proteínas CheY y CheB son fosforiladas por CheA, mientras que CheZ es la fosfatasa que remueve los grupos fosfato de CheY. La proteína CheY en estado fosforilado tiene afinidad por la proteína FliM localizada en la base del flagelo; la ausencia de interacción entre estas proteínas provoca que el flagelo gire en dirección contraria a las manecillas del reloj (CCW). La rotación CCW trae por consecuencia que los flagelos se arreglen en una trenza e impulsen el cuerpo celular siguiendo una trayectoria lineal (fig. 3A). En presencia de un repelente CheY es fosforilada por CheA, CheY-P se dirige hacia la base del flagelo y hace contacto con FliM, quien mediante este estímulo cambia el sentido de rotación del flagelo en dirección de las manecillas del reloj (CW), esto ocasiona el movimiento en volteretas (tumble) de la célula (fig. 3B), lo cual favorece la reorientación de la bacteria. CheY es rápidamente desfosforilada por CheZ, esto ocasiona que la duración de los eventos de reorientación sea muy corta.

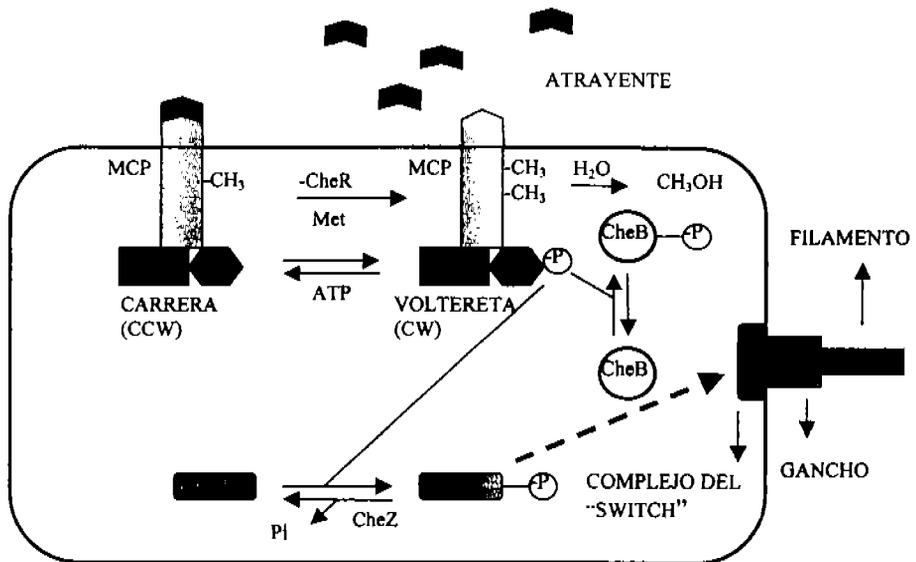


Figura 4. Esquema que ilustra el proceso de "quimiotaxis" y "adaptación" en *Escherichia coli* (Modificado de: Armitage, J., y Schmitt, R. 1997); los detalles del esquema se describen en el texto.

Se sabe que la porción amino terminal de la proteína FliM, es el blanco específico de la proteína CheY-P, mientras que la porción carboxilo terminal está involucrada con los procesos de ensamblaje (Toker *et al.*, 1996; Toker, S. A., y Macnab, R. M. 1997; Bren, A., y Eisenbach, M. 1998).

Un proceso acoplado a esta respuesta celular se conoce como adaptación (Blair, D. F. 1995); el fenómeno de adaptación se basa en los procesos de metilación y desmetilación que sufre el receptor MCP en residuos específicos de ácido glutámico pertenecientes a su dominio citoplasmático, regulados por las proteínas CheR (metiltransferasa) y CheB (metilesterasa). CheR adiciona grupos metilo al receptor; CheB remueve los grupos metilo del complejo MCP cuando se encuentra en su estado activo (CheB-P). Cuando los niveles de un atrayente son elevados, la actividad cinasa de CheA es inhibida, esto impide la fosforilación de CheB e inactiva su función; por ende, CheR incrementa el nivel de

metilación del complejo MCP. El receptor metilado activa nuevamente a CheA, lo cual restablece el nivel de CheB-P y CheY-P (fig. 4).

Regulación de la expresión genética del flagelo y biogénesis

Para la formación del flagelo se requiere al menos de la expresión de unos 50 genes, estos se encuentran agrupados en unidades transcripcionales denominadas operones que, constituyen 15 en *Escherichia coli* y 17 en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. A su vez, estos operones se expresan de manera coordinada por un par de reguladores transcripcionales, por lo cual en conjunto, constituyen un regulón flagelar (Macnab, R. M. 1992; Macnab, R. M. 1996).

Dentro de este regulón flagelar los operones se agrupan en tres clases (1, 2, 3) y se expresan siguiendo un orden jerárquico de transcripción. El operón maestro *flhDC* constituye el más alto nivel de regulación transcripcional y por tanto, el único de clase 1. Sin la expresión del operón maestro ninguno de los demás genes flagelares se puede expresar; este operón maestro es activado por una serie de estímulos externos como AMPc (Soutourina, *et al.*, 1999; Chilcott, S. G. y Hughes, T. K. 2000); el operón maestro codifica para las proteínas FlhD y FlhC las cuales forman un tetrámero que constituye un activador transcripcional para los genes de la clase 2, dependientes del factor σ^{70} (Clarent, L., y Hughes, C. 2002). Las proteínas codificadas por los genes de la clase 2 dan forma al cuerpo basal y el gancho; también codificada en la clase 2 se sintetiza la proteína FliA, la cual es un factor sigma alternativo denominado σ^{28} que activa la transcripción de los genes de la clase 3 (fig. 5).

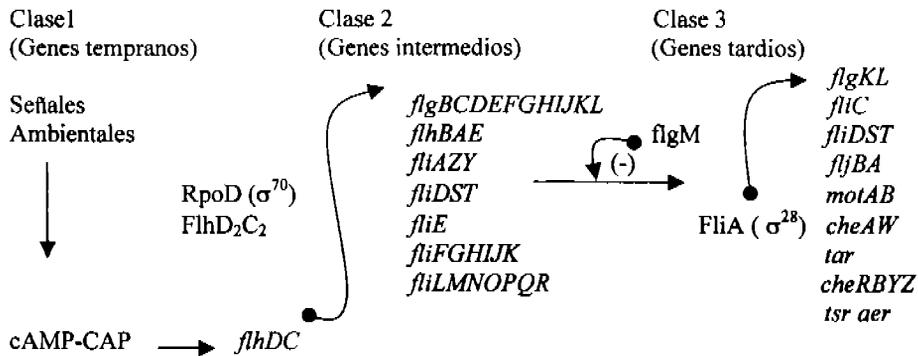


Figura 5. Orden jerárquico de transcripción de los genes flagelares; las flechas indican el orden en que se van expresando los genes flagelares, y el signo (-) indica un punto de regulación negativa.

Los genes de la clase 3 son regulados de manera negativa por un factor antisigma FlgM, el cual se une a FliA e impide que se asocie a la RNA polimerasa, inhibiendo la transcripción de los genes pertenecientes a esta clase. Estudios sobre este mecanismo de regulación (Kutsukake, K. y Iino, T. 1994) revelaron que la activación de los genes de la clase 3, requieren la liberación del factor σ^{28} de su antisigma FlgM, esto no sucede hasta que el gancho ha quedado completamente formado; el gancho alcanza una longitud promedio de ~55 nm, es entonces cuando el factor antisigma FlgM se desprende de FliA y es reconocido como sustrato por la maquinaria de exportación. Una vez exportada la proteína FlgM, σ^{28} se asocia a la RNA polimerasa y transcribe los genes de la clase 3. La relación sigma-antisigma permite a la maquinaria de secreción seleccionar el tipo de sustrato a exportar en un tiempo determinado, esto a su vez ocasiona que el flagelo se ensamble en una secuencia específica (Kutsukake, K. y Iino, T. 1994) (fig. 6). Se ha determinado que la formación del gancho no está exclusivamente controlada por la relación sigma-antisigma, para que este alcance su tamaño promedio requiere de la regulación de la proteína FliK (Patterson-Delafield, *et al.* 1973; González-Pedrajo, *et al.*, 1997); mutantes

carentes de esta proteína desarrollan ganchos más largos, fenotipo que ha sido asignado como “poligancho”, en este caso la proteína FlgM no puede ser exportada. Sin embargo, cuando se realiza una mutación en *flhB* (un componente del aparato de exportación), en el fondo genético de una mutante poligancho, la exportación del factor antisigma se activa y de este modo se sintetiza la flagelina y se ensambla el filamento. Por el contrario cuando se muta *flhB* en el fondo genético de una mutante que no forma gancho, el factor antisigma (FlgM) no es exportado; es así que la formación del gancho permite coordinar el reconocimiento de substratos que serán exportados, lo cual establece un dispositivo de doble seguridad aparato de exportación-gancho, que asegura el correcto ensamblaje del flagelo (Kutsukake *et al.* 1997).

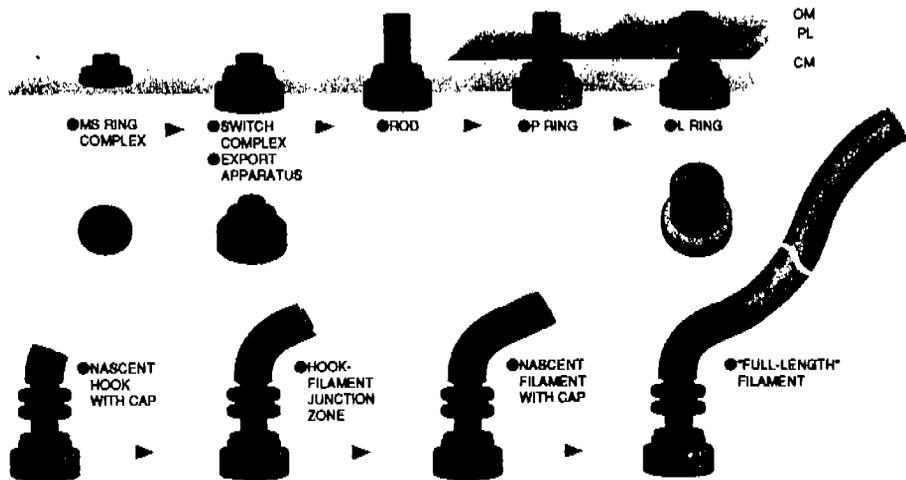


Figura 6. Secuencia de ensamblaje del flagelo; membrana externa (OM), pared celular (PL), membrana citoplasmática (MC) (modificado de Macnab, R.M., 1996).

Secuencia de ensamblaje del flagelo

El flagelo se ensambla siguiendo un esquema determinado (para revisión, ver Macnab, R. M., 2003) que da inicio con el ensamblaje del anillo MS en la membrana citoplasmática, a continuación se ensambla el complejo del "switch" y posteriormente el aparato de exportación (Kubori *et al.*, 1992; Kubori *et al.*, 1997; Kubori *et al.*, 1998). Los siguientes componentes que son incorporados a la estructura flagelar utilizan la maquinaria de secreción tipo III para su translocación, FliE es la primera subunidad en utilizar esta vía, y actúa de enlace entre el anillo MS y el eje, a continuación se ensamblan los componentes de esta última (FlgJ, FlgB, FlgC, FlgF y FlgG), en donde FlgJ constituye el andamiaje bajo el cual se ensambla el eje; FlgJ queda ubicada en posición distal respecto a la posición del anillo MS. También se ha evidenciado que la porción C-terminal de esta proteína presenta actividad muramidasa, lo cual permite que el eje atraviese la pared de peptidoglicanos (Hirano *et al.*, 2001). Al mismo tiempo se ensamblan las subunidades de los anillos P y L; posteriormente el complejo formado por FlgJ es desplazado por la proteína FlgD la cual permite que se ensamble el gancho. Una vez que el gancho ha alcanzado su longitud promedio, FlgD es desplazada y se ensamblan las proteínas que conforman la interfase entre el gancho y el filamento designadas como "HAPs" (Hook-associated- proteins) (Homma *et al.*, 1984); finalmente, la última estructura en formarse es el filamento, el cual también requiere de un andamiaje para su correcta organización, éste es organizado por la proteína FliD; la polimerización del filamento requiere de ~20, 000 subunidades de flagelina (FliC). Los componentes que se encargan de acoplar la energía motriz MotA y MotB, se ensamblan una vez que el flagelo ha sido totalmente formado, alrededor del anillo MS (Blair, D. F. y Berg, H. C. 1988).

Rhodobacter sphaeroides

Rhodobacter sphaeroides (fig. 7A) es una bacteria púrpura (tonalidad que adquieren las células en suspensión en presencia de oxígeno) no sulfurosa (debido a su baja capacidad para usar H₂S como donador de electrones), gram-negativa, de la subdivisión- α de las proteobacterias con un alto contenido de G+C en su ADN. Morfológicamente son células esféricas u ovaladas, con un diámetro aproximado de 0.7-4.0 μm (Staley *et al.*, 1989). Esta bacteria posee un único flagelo ubicado en posición subpolar que gira solo en dirección de las manecillas del reloj (CW). Para cambiar de dirección *R. sphaeroides* realiza un alto total de la rotación del flagelo, subsecuentemente a través del movimiento Browniano la célula se reorienta y cuando reinicia la rotación del flagelo, la célula se desplaza en una nueva dirección (fig. 7B) (Armitage J. P. y Macnab R. M., 1987).

Como se mencionó previamente, la dirección en la rotación del flagelo es controlada en gran medida por las proteínas del sistema quimiotáctico. En *R. sphaeroides* con la publicación casi completa de su genoma, fue posible distinguir varias copias de los genes flagelares y de quimiotaxis (Mackenzie *et al.*, 2001; Madhusudan *et al.*, 2004); esto sugiere que el proceso de quimiotaxis es altamente complejo en esta bacteria, el único componente que no se ha identificado en este sistema es el gen *cheZ*.

Respecto a su actividad metabólica *R. sphaeroides* es una bacteria fotosintética que contiene preferentemente bacterioclorofila "a" y carotenoides de la serie de los esferoidenos. A diferencia de las plantas, cianobacterias y algas que realizan fotosíntesis, no hay producción de oxígeno (anoxigénica), ya que utilizan como donadores de electrones compuestos orgánicos (H₂, H₂S, S). Un rasgo singular de esta bacteria es su versatilidad metabólica, esto es, tiene la capacidad de modificar su metabolismo dependiendo las

condiciones de crecimiento disponibles en el medio en que se encuentran (CO₂ para crecimiento autotrófico, compuestos orgánicos para crecimiento heterotrófico, y disponibilidad de luz para su crecimiento como fotoautótrofos), por esta razón pueden desarrollarse como fotoheterótrofos, fotoautótrofos y quimioheterótrofos.

En *Rhodobacter sphaeroides* la regulación genética del flagelo es poco entendida, sin embargo, estudios recientes revelaron que los genes flagelares están organizados en clases jerárquicas al igual que en *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* (Poggio *et al.*, 2000; Ballado *et al.* 2001). En este sentido, se demostró que los genes de la clase 2 que dan origen al cuerpo basal y al aparato de exportación, son expresados utilizando el factor σ^{54} , contrario a lo que ocurre en *S. enterica* y *E. coli*, en donde son regulados por el factor σ^{70} , mientras que los genes de la clase 3 son expresados por el factor σ^{28} igual que en las bacterias entéricas (Poggio *et al.*, 2000; Poggio *et al.*, 2002).

El genoma de *Rhodobacter sphaeroides* está formado por dos cromosomas circulares CI (3.0 Mbp) y CII (0.9 Mbp), de los cuales el CI es en donde se encuentran los genes flagelares (Mackenzie *et al.* 2001). Estructuralmente el flagelo de *R. sphaeroides* se diferencia del de los demás organismos, por presentar un gancho con estructura recta y no curva como ocurre en enterobacterias, además la zona de las proteínas HAPs es mucho más ensanchada (West, M. A. y Dreyfus, G. 1997; Sockett, E. R. y Armitage, J. 1991).

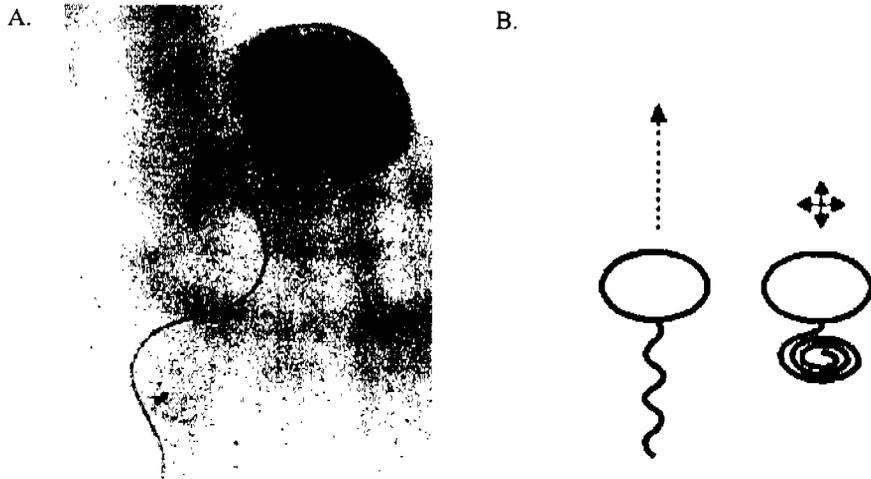


Figura 7. (A). *Rhodobacter sphaeroides*; (B) para cambiar de dirección *R. sphaeroides* realiza un alto total y retrae el filamento (tomado de Armitage, J., y Schmitt, R. 1997).

Antecedentes particulares

Como se mencionó previamente, los componentes del anillo C (FlhG, FlhM y FlhN), están involucrados en transmitir el torque y controlar los cambios de dirección del flagelo (Tang, H. y Blair, D. F. 1995; Tang, *et al.* 1995; Lloyd *et al.* 1996). El torque es la fuerza que se ejerce sobre una palanca para generar el movimiento angular, éste puede ser indirectamente calculado realizando un experimento conocido como “atamiento celular” (tethered cell), el cual consiste en adherir células mediante su flagelo a una superficie, como por ejemplo a un cubreobjetos, posteriormente se graba el movimiento de las células fijadas, utilizando una videocámara y finalmente se calculan los valores respectivos (Berg, H. C. y Turner, L. 1993).

Mutaciones severas en alguno de los componentes del anillo C derivan en células que no desarrollan flagelo (Fla⁻), mientras que cambios puntuales, permiten que el flagelo se ensamble correctamente, pero su función se ve afectada negativamente, esto es, no tienen la capacidad de rotar, a este fenotipo se le conoce como parálisis (Mot⁻). Otros componentes del sistema flagelar que están asociados con este tipo de fenotipo, son las proteínas MotA y MotB (Blair *et al.*, 1991; Garza *et al.*, 1996). La forma en que este conjunto de proteínas se encuentra relacionada para generar la rotación del flagelo aún no es clara. Sin embargo, se ha determinado que la porción carboxilo terminal de la proteína FliG es la responsable directa de la generación del torque, mientras que su región amino-terminal está involucrada con los procesos de ensamblaje (Lloyd *et al.*, 1996). FliG hace contacto directo con FliF, la subunidad que conforma el anillo MS (Kubori *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 2001), así mismo se han demostrado interacciones de FliG con las proteínas FliM y FliN (Tang *et al.*, 1996; Toker *et al.*, 1996; Marykwas *et al.*, 1996; Toker, S. A. y Macnab, R. M. 1997) y se ha propuesto un modelo del posible arreglo de estas subunidades (fig. 8B). FliM es la responsable de controlar el mecanismo de "switch", se ha establecido que su porción amino terminal regula la alternancia en el sentido de rotación del flagelo, vía la unión con la proteína del sistema quimiotáctico CheY (Bren, A., y Eisenbach, M. 1998; Toker *et al.*, 1996; Toker, S. A. y Macnab, R. M. 1997). Un evento similar también se ha observado en *R. sphaeroides* (Poggio *et al.*, 2000; Ferré *et al.*, 2004).

Respecto a las proteínas Mot, se sabe que forman un complejo aparte del sistema del interruptor o "switch" y su función se ha involucrado directamente con la conducción de protones (Blair, D. F., y Berg, H. C. 1990; Tang, *et al.*, 1996). Se ha determinado que mutaciones en FliG y FliM suprimen algunas mutaciones en MotB, siendo esta última la responsable de anclar a MotA a la pared de peptidoglicano. Aunque no existe una

interacción física como tal, se ha sugerido que existe una interacción electrostática entre los componentes del anillo C con las proteínas Mot (Garza *et al.*, 1996) (fig. 8A).

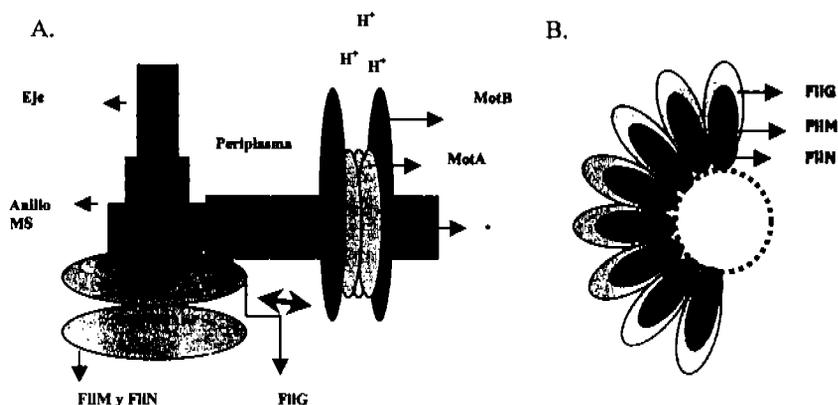


Figura 8. (A) Esquema que representa la relación funcional de los componentes del anillo C (FliG, FliM y FliN), con las proteínas MotA y MotB; (B) posible arreglo estructural de los componentes del anillo C (modificado de Garza *et al.*, 1996 y Tang *et al.*, 1996).

Dado que la mayoría de los componentes que participan con la generación del torque o bien con la rotación del flagelo se han identificado a partir del análisis de mutantes Mot, en este mismo contexto parece ser que FliL, participa en este proceso en algunas especies.

El gen *fliL*, es uno de los menos estudiados del regulón flagelar. La existencia de este gen fue descrita por vez primera por Kuo y Koshland en 1986, cuando se analizaba la secuencia del locus *flaA* de *Escherichia coli*. Se reportaron dos marcos de lectura abierta (ORF) que correspondían a *flaA1* y *flaA2*, los cuales codifican para un producto de ~38kDa y ~17kDa respectivamente (que corresponden a FliM y FliL con la nomenclatura actual). Posteriormente, esta información fue corroborada por Malakooti y colaboradores (1989).

fliL es el gen inicial del operón flagelar *fliLMNOPQR*, tanto en *Escherichia coli* como *Salmonella enterica* (Homma *et al.*, 1988; Kihara *et al.*, 1989; Kutsukake *et al.*, 1990; Malakooti *et al.*, 1994). En nuestro modelo de estudio *Rhodobacter sphaeroides*, *fliL* se encuentra en el operón *fliKLMN*; la adición de *fliK* a este operón, se desprende del análisis de la secuencia de nucleótidos de esta región, la cual revela un solapamiento de un posible sitio de unión al ribosoma de *fliL* con el codón de paro de *fliK* (García *et al.*, 1998). Además, inserciones en *fliK* ejercen un efecto polar sobre la expresión del gen *fliM* pero no sobre *fliR* (García *et al.*, 1998). Los genes que integran este operón codifican para proteínas implicadas en la formación del switch flagelar (FliM y FliN), y con el aparato de exportación (FliO, FliP, FliQ y FliR) (Minamino, T., y Macnab, R. M. 1999).

La secuencia de aminoácidos de FliL reportada para *Salmonella enterica* (Kihara *et al.*, 1989), revela una secuencia consenso "LAAC" común en lipoproteínas que son procesadas por una peptidasa tipo II. Esto sugería que FliL fuera una proteína de la membrana externa, sin embargo ensayos de micélulas y fraccionamiento celular identificaron la posición exacta de FliL en la membrana citoplasmática. Así mismo, se determinó que la secuencia consenso "LAAC" no es procesada como ocurre con FlgH una lipoproteína que sigue esta vía intermedia para obtener su madurez (Schoenhals, J. G., y Macnab, R. M. 1999).

En *E. coli* y *S. enterica* las deleciones del gen *fliL* no producen un cambio drástico cuando se ensaya su movilidad sobre cajas de agar al 0.3%, es decir, las bacterias siguen nadando y formando flagelos. Los primeros intentos por generar el fenotipo nulo de este gen resultaron en errores metodológicos como el caso de la mutante JM7623 de *E. coli* reportada por Malakooti *et al.* (1989), la cual presenta una deleción en el gen *fliL* por

inserción de un cassette de resistencia a kanamicina, dicha cepa mostró fenotipo Fla⁻ (sin flagelo). Posteriormente Raha *et al.* (1994), mediante análisis de complementación concluyó que la deleción anterior provocaba un efecto polar, esto significa que el fenotipo de *fliL* no puede ser deducido de dicha cepa. Otra cepa que tiene una deleción importante de este gen, es la SJW2295 de *S. enterica* una mutante espontánea con un corrimiento del marco de lectura en el codón 90 de *fliL*, el fenotipo observado fue Mot⁺ y Fla⁺, sin embargo, observaciones al microscopio en campo oscuro, revelaron una disminución en el número de flagelos de la mutante (SJW2295/*fliL*⁻) en comparación con la cepa silvestre (SJW1103), así como una ligera alteración en el sentido de la rotación (Yamaguchi *et al.*, 1986). Raha *et al.* (1994), realizó la deleción casi total de *fliL* conservando solo los codones 1 a 17 en la cepa EKK9 de *Escherichia coli*. El fenotipo observado de esta cepa fue muy parecido al que presenta la cepa EKK9 que es silvestre en cuanto a movilidad y quimiotaxis.

En *Caulobacter crescentus*, una bacteria con un solo flagelo, Jenal *et al.*, (1994) reportaron que la deleción del gen *fliL*, resulta en un fenotipo de parálisis (Mot⁻), también determinaron que la proteína FliL, se encuentra distribuida en toda la envoltura celular y que su inserción en la membrana citoplasmática no depende de otro componente flagelar.

Finalmente en el trabajo de Segura *et al.*, (2001) se aisló una cepa mutante en *fliL* de *Pseudomonas putida*, la cual posee un solo flagelo; la construcción de la mutante se realizó mediante la inserción de un interposon Ω -Km, resultando la cepa DOT-T1E-PS23 (*fliL*:: Ω -Km), cuyo fenotipo fue no flagelada (Fla⁻) y resistente a tolueno.

Estos resultados llevan a considerar que en organismos multiflagelares como *E. coli* y *S. enterica* parece no haber algún efecto importante derivado de la delección de este gen; por el contrario, en organismos que poseen un único flagelo como *C. crescentus* y *P. putida* la delección de *flIL* tiene un efecto evidente que se refleja en su movilidad .

Dada la disparidad de fenotipos observados en diferentes especies de bacterias con lesión en *flIL*, nos propusimos establecer si el fenotipo nulo de *flIL*, en *Rhodobacter sphaeroides* es de parálisis (Mot⁻), sin flagelo (Fla⁻) o bien, sin fenotipo aparente.

OBJETIVO GENERAL

Aislamiento y caracterización de una mutante en el gen *fliL* de *Rhodobacter sphaeroides*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar una mutante polar, reemplazando el gen *fliL* de *Rhodobacter sphaeroides* por un cassette de resistencia a kanamicina, el cual impide la transcripción de los genes ubicados río abajo.
2. Aislar una mutante no polar reemplazando el gen *fliL* de *Rhodobacter sphaeroides* por un cassette de resistencia a espectinomicina, el cual permite la transcripción de los genes ubicados río abajo.
3. Examinar mediante análisis de complementación, la polaridad de los cassettes de kanamicina y espectinomicina sobre los genes del operón *fliKLMN* de *R. sphaeroides*.
4. Determinar el fenotipo nulo de la mutante no polar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio

	GENOTIPO Y PROPIEDADES	REFERENCIA
Cepas		
<i>E. coli</i>		
JM103	$\Delta(lac-pro), thi, strA, supE, endA, sbcB, hsdR, F' traD36, proAB', lacF', Z \Delta M15$	Ausubel <i>et al.</i> , 1987.
XLI-Blue	$recA1, endA1, gyrA46, thi, hsdR17, supE44, relA1/ F': Tn10, proAB', lacF', lacZ\Delta M15$	Ausubel <i>et al.</i> , 1987.
S17-1	$thi, pro, hsdR', hsdM', recA, RP4 2-Tc:: Mu-Km:: Tn7(Tp'/Sm')$	Simon <i>et al.</i> , 1983.
<i>R. sphaeroides</i>		
WS8	cepa silvestre con resistencia espontánea a ácido nalidixico	Sockett <i>et al.</i> , 1990
WS8	$flh1 \Delta::kan$	Este trabajo
WS8	$flh1 \Delta::aad$	Este trabajo
NG1	(derivada de la cepa silvestre WS8) $flhM::uidA-aadA$	García <i>et al.</i> , 1998
SP6	$rpoN2 \Delta kan$	Poggio <i>et al.</i> , 2002
Plásmidos		
pJQ200mp18	vector suicida usado para el reemplazamiento genético en bacterias gram-negativas; oriT, oriV, <i>iraJ, sacB, Gm'</i> y sitio múltiple de clonación (MCS)	Quandt, J., y Hynes, F. 1993
pRK415	derivado del pRK404, es un plásmido movilizable, retiene el promotor <i>lac</i> , MCS derivado del pUC19, RK2 oriV, oriT, <i>lacZa, Tc'</i>	Keen <i>et al.</i> , 1988
pTZ19R	fadérido multifuncional con orígenes de replicación Π y pBR322, contiene el gen estructural <i>lacZ</i> , promotor del fago T7, sitio múltiple de clonación (MCS), <i>Amp'</i> .	Farmacia
pBG0404	derivado del pTZ19R, contiene un fragmento <i>SaII</i> de 4.6-kb, contiene a los genes <i>flhKLMNOP</i> del cromosoma de <i>R. sphaeroides</i>	González-Pedrajo <i>et al.</i> , 1997
pBG405a	derivado del pRK415, contiene un fragmento <i>SaII</i> de 4.6 kb (<i>flhKLMNOP'</i>) del cromosoma de <i>R. sphaeroides</i>	González-Pedrajo B. Tesis Doctoral, UNAM, 2000
pBG405b reversa	derivado del pRK415, contiene el fragmento <i>SaII</i> (<i>flhKLMNOP'</i>) clonado en dirección contraria al promotor del plásmido	González-Pedrajo B. Tesis Doctoral, UNAM, 2000
pRK_ <i>flhL</i>	derivado del pRK415, lleva un fragmento <i>BamHI-EcoRI</i> de 1.3 kb (<i>flhKLM</i>) del genoma de <i>R. sphaeroides</i>	Poggio, S., comunicación personal
pRS501	derivado del pRK415, lleva un fragmento <i>EcoRI</i> de 5 kb del cromosoma de <i>R. sphaeroides</i> (<i>flhJLKLM</i>).	García <i>et al.</i> , 1998; Ballado <i>et al.</i> , 1996.
pRS14	derivado del pRK415, lleva un fragmento <i>SacII</i> del cromosoma de <i>R. sphaeroides</i> (<i>flhLMN</i>)	García <i>et al.</i> , 1998
pRK_ <i>flhMN</i>	derivado del pRK415, lleva un fragmento desde el primer tercio de <i>flhL</i> hasta el sitio <i>BamHI</i> ubicado después del codón de paro de <i>flhN</i> (<i>flhLMN</i>)	Este trabajo
pRK_ <i>flhLMN</i>	derivado del pRK415, lleva un fragmento <i>BamHI</i> (<i>flhK'LMN</i>) del cromosoma de <i>R. sphaeroides</i>	Poggio, S., comunicación personal

Oligonucleótidos

fliL-up1	5' GCT CTA GAG ACA CAA CCC CAC CGT CTC C 3'
fliL-up3	5' GCG ATA TCG GAA GAC CAG CGC GCG CAA G 3'
fliL-down1	5' GCG ATA TCC CCT CCT TCA TCC TGC AGT AAG 3'
fliL-down3	5' CGG GTA CCC TGC ATC TGC ATG AGC TGG CG 3'
fliM1	5' GCA GAT CCG ACA TGT CCC CA 3'
950	5' CGG GAT CCC CTG TCC ACG CAA TAT GAC CAG 3'

Medio y condiciones de cultivo

Las cepas JM103, S17-1 y XL1-Blue de *Escherchia coli* se cultivaron aeróbicamente (agitación 300 rpm) a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) (10 g bactotripton, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl por litro).

Las cepas de *Rhodobacter sphaeroides* se cultivaron en medio mínimo de succinato (Sistrom, W. R. 1960). En condiciones heterotróficas, bajo agitación constante (300 rpm), a 30°C en la oscuridad. También se usaron cajas de nado para ensayos de movilidad añadiendo 0.3 % de Bacto-Agar.

Cuando se requirió se adicionó antibiótico en las siguientes concentraciones: para *E. coli* ampicilina 100 µg/mL, tetraciclina 25 µg/mL, kanamicina 50 µg/mL y espectinomicina 50 µg/mL. Para *R. sphaeroides*, kanamicina 25 µg/mL, tetraciclina 1 µg/mL y espectinomicina 50 µg/mL.

Métodos genéticos

Transformación de *E. coli* por el método de cloruro de calcio

Se prepara un cultivo de 10 mL de LB de la cepa deseada, cuando éste alcanza la fase exponencial ($D.O_{600} \sim 0.5$) se incuba en hielo por 10 minutos. Las células se colectan por centrifugación a 4 K rpm por 5 minutos a 4°C, se resuspende cuidadosamente en lo que queda de medio y se agregan 5 mL de $CaCl_2$ 100 mM para incubar en hielo por 20 minutos. Tras una nueva centrifugación, las células se resuspenden en 600 μ L de $CaCl_2$ 100 mM y se incuban en hielo por 1 hora. Una alícuota (200 μ L) de estas células se transfiere a un tubo de microcentrífuga y se agregan 20-50 ng de plásmido. Después de incubar en hielo por 30 minutos se da un choque térmico (42°C) por 2 minutos y se regresa al hielo por otros dos minutos. Se añaden 800 μ L de LB y se incuba a 37 °C por 20 minutos. Las células se colectan y se siembran en medio selectivo (Cohen *et al.*, 1972).

Electroporación

Las celdas para electroporar se colocan en hielo previamente. Se toma 1 ml. de medio Luria sin antibióticos y se coloca en un tubo estéril (Chassey *et al.*, 1988). Se toman 1.5 o 2 μ l de la ligasa o plásmido de interés y se mezcla con las células competentes, se pasa a la celda y se electropora a 1.8 Kv R= 180-200 Ω . Al finalizar el pulso se mezcla repetidamente con el medio Luria y se pasa a un tubo. Se dejan recuperando las células de 30 min. a 1 hora a 37°C en agitación. Se pasan a un tubo eppendorf estéril y se centrifugan a 6 K rpm, 5 minutos. Se retira el sobrenadante y se resuspende en el líquido que queda en el tubo. Se siembra en el medio selectivo con los antibióticos necesarios. Las cajas se incuban a 37°C.

Conjugación biparental

A partir de cultivos de toda la noche de las cepas de *R. sphaeroides* WS8 y *E.coli* S17-1 (que contiene el plásmido que acarrea nuestra construcción de interés), se preparan subcultivos de 10 mL de medio (Donohue, T. J. y Kaplan, S. 1991).

Se colectan las células en fase exponencial de 500 µl de cultivo. Cada paquete celular se lava en 500 µl de medio LB fresco y se resuspenden en ~50µl de LB. Las células se mezclan en un tubo, posteriormente se colocan en un filtro de nitrocelulosa (de ~1.5 x 1.5 mm, con poro de 0.45 µm) colocado previamente sobre LB sólido semiseco y se incuban a 30°C por 6 horas. Las células se lavan del filtro en un tubo de microcentrifuga con 1 mL de LB y se colectan por centrifugación para sembrarlas en medio selectivo e incubarlas a 30°C por ~3 días.

Conjugación triparental

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 de una cepa a la 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 (Donohue, T. J. y Kaplan, S. 1991).

Se crece la cepa que lleva el plásmido que se desee transferir, la cepa JM103 que lleva el plásmido ayudador pRK2013 y la cepa de *R. sphaeroides* hasta fase exponencial. Se toman 1ml de cada cultivo y se lavan dos veces con Luria sin antibióticos, se juntan las tres cepas en un solo tubo y se centrifuga a 6 K rpm por 4 minutos. Se decanta el sobrenadante tratando de que queden aproximadamente 50µl para resuspender. Esto se

coloca en un filtro de nitrocelulosa estéril sobre una caja de medio Luria. La caja se incuba durante 6 horas a 30°C. Transcurrido este tiempo se transfiere el filtro de nitrocelulosa a un tubo de microcentrífuga con 0.5 ml de Luria y se mezcla hasta despegar las células del filtro, se retira la nitrocelulosa. Se toman 100µl y se platican en un medio con los antibióticos necesarios. Se incuba a 30°C por 4 días.

Métodos de biología molecular

Amplificación de ADN por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polimerasa chain reaction)

Las reacciones se llevaron a cabo en 50 o en 100 µL de volumen total con concentraciones finales de : ~50 ng de templado (plásmido pBG0404), buffer para PCR 1X, 260 µM dNTPs, 10% DMSO (Sigma), 2 mM MgSO₄, 100 pmol de cada oligonucleótido (*forward y reverse*), 2.5 U de enzima *Taq* Platinum High Fidelity (Gibco BRL), además se adicionó dos gotas de aceite para evitar la evaporación (Mullis, K. B. y Faloona, F. A. 1987).

La mezcla se colocó en un termociclador para llevar a cabo la amplificación del ADN mediante los siguientes ciclos: el paso uno, consistió en desnaturalizar la hebra de ADN a 95°C por 1 minuto, 30 ciclos con los siguientes pasos: 94°C por 30 segundos para desnaturalizar, 55°C por 30 segundos para alinear, 68°C por 2 minutos para polimerizar y, una extensión final de 10 minutos a 68°C.

Digestión de ADN con enzimas de restricción

Se llevó a cabo usando enzimas de restricción, las cuales se adquirieron comercialmente (BioLabs y GIBCO-BRL), y se siguieron las condiciones recomendadas por el fabricante para cada enzima.

Desfosforilación del ADN

En las reacciones de desfosforilación se utilizó la enzima SAP (shrimp alkaline phosphatase; fosfatasa alcalina de camarón de USB Lab Amersham Inc.); la concentración final de la misma dependió del tipo de extremos y de la concentración de ADN (se siguieron las recomendaciones del fabricante). Las reacciones se llevaron a cabo en una solución que contiene: Tris-HCl 20 mM pH 8.0, con MgCl₂ 10 mM y 20 µg/ml de DNA en un volumen total de ~ 50 µL. Se incubó a 37°C por 1 hora. La enzima se inactivó calentándola a 65°C por 15 minutos (Chaconas, G. y Van de Sande, J. H. 1980).

Ligación de secuencias específicas de ADN en vectores de clonación

Las reacciones se llevaron a cabo ligando el vector de clonación con el inserto en una reacción de ~16 horas a 13°C en buffer de ligación, catalizada por la enzima ligasa del fago T4. Cada reacción de unión de fragmentos de ADN se preparó en un volumen total de 10 µL, con 20-40 ng del vector de clonación y del triple a diez veces de exceso molar del DNA a insertar, buffer de ligación 1X y 1 U de enzima (Bahl *et al.*, 1976).

Protocolo de extracción de fragmentos de ADN de gel de agarosa. QIAEX II KIT

La extracción y purificación de fragmentos de DNA utilizando este Kit 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 lleva a cabo con una solución de baja salinidad con buffer EB (10mM Tris-Cl, pH 8.5) o agua.

Para purificar ADN a partir de un gel de agarosa al 1% se corren las muestras de ADN digerido, junto con un marcador de peso molecular, y con luz UV de longitud de onda larga se cortan las secciones del gel que contengan los fragmentos con el peso molecular deseado.

Se taran en una balanza un tubo de microcentrifuga, se depositan en este los fragmentos de gel, se pesan y se añaden 3 volúmenes de buffer de solubilización QG que contiene un indicador de pH, si es necesario, se añaden 2 volúmenes de agua (para fragmentos de más de 4 kb); se incuban los tubos a 50°C 10 min agitando enérgicamente cada 2 min, el color debe ser amarillo, si no se añade acetato de sodio 3M pH 5.0 (10µl). Adicionar por 1 volumen de gel, 1 volumen de isoprópanol y mezclar; inmediatamente se prepara la columna de extracción, por donde se pasa el total de la mezcla que contiene el DNA. Se centrifuga por 1 minuto a 14 K rpm, el máximo de capacidad de la columna es de 800 µL, esta se monta sobre un tubo de centrifuga para que ahí se colecte el desecho de la extracción. Se descartan los residuos y se coloca la columna sobre el mismo tubo de recolección, se centrifuga por 1 minuto adicional; para lavar se adiciona buffer PE y se centrifuga por 1 min., se descartan los residuos y se centrifuga por 1 minuto adicional; se

pasa la columna a un tubo limpio y se añade Buffer de elución EB o H₂O al centro de la columna y se centrifuga 1 minuto a 14 K rpm.

Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa de bajo punto de fusión.

Se prepara un gel de agarosa al 0.8 % utilizando buffer TBE 1X, las muestras de DNA se cargan en el gel y se corre la electroforesis a 100 volts, se tiñe el gel en bromuro de etidio y las bandas deseadas se observan con una lampara de UV a longitud de onda larga (302nm); se cortan las bandas indicadas y en seguida se funden a 67-70°C durante 10 minutos, se calcula el volumen de la agarosa fundida y se añade 1/10 de volumen de NaCl 5M se mezcla bien y se deja otros 5 minutos a 70°C (Wieslander, L. 1979).

Simultáneamente se satura una solución de fenol con NaCl de la siguiente forma: en un tubo ependorf mezclar 100µL de NaCl 5M, 400µL de H₂O y 500µL de fenol; centrifugar 1 minuto. Retirar la fase acuosa, colocar el fenol a 37°C; colocar la agarosa fundida 5 minutos a 37°C; añadir al tubo con la agarosa 2/3 de volumen de fenol saturado e inmediatamente agitar vigorosamente durante 30 segundos; centrifugar 5 minutos en la microfuga a 14 K rpm y pasar la fase acuosa a un tubo limpio. Añadir al fenol restante 45µL de H₂O y 5µL de NaCl 5M, agitar en vortex 1 minuto, centrifugar 2 minutos a 14 K rpm y mezclar la fase acuosa con la anterior; añadir un volumen de fenol/cloroformo a la fase acuosa, mezclar 15 segundos y centrifugar 2 minutos; pasar la fase acuosa a un tubo limpio y repetir el paso anterior, pero solamente con cloroformo; pasar la fase acuosa a un tubo limpio y añadir un volumen de isopropanol y mantener a -20°C durante al menos 2 horas; centrifugar el DNA durante 10 min. a 14 K rpm en la microfuga. Eliminar el isopropanol y dejar secar la pastilla, resuspender en un volumen adecuado de H₂O.

Purificación de plásmidos por el método de minipreparaciones hervidas

Inocular 3 ml de medio selectivo con una colonia de *E. coli* e incubar el cultivo en agitación toda la noche a 37°C. Colectar las células de 1.5 ml de cultivo por centrifugación; el paquete celular se resuspende en lo que queda de medio después de decantar y se agregan 300 µl de STET (8% sacarosa, 5% tritón, 50 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris-HCl pH 8.0) y 30 µl de lisozima (10 mg/mL). La mezcla se agita vigorosamente por 2 segundos, se hierve 45 segundos exactamente y se centrifuga a temperatura ambiente por 12 minutos a 12 K rpm. Los plásmidos se precipitan agregando 300 µL de isopropanol al sobrenadante y centrifugando a 14 K rpm por 30 minutos en frío. La pastilla se lava con etanol al 70% y se seca al vacío durante 10 minutos. Se resuspende en 30 µl de agua y se utilizan 3 µl para analizar la muestra en un gel de agarosa al 1% (Holmes, D. S. y Quingley, M. 1981).

Purificación de plásmidos por columna QIAGEN

Este procedimiento se basa en la lisis alcalina (Birnboim, 1983), seguido de la unión de los plásmidos a la resina de intercambio aniónico de la columna QIAGEN en condiciones apropiadas de pH y de concentraciones de sales. El procedimiento se lleva acabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ensayos de movilidad

Se toma una alícuota de 5µl de cultivo en fase exponencial y se coloca en la superficie de la caja de nado, las cajas se incuban aeróbicamente en obscuridad, en una cámara de humedad a 30°C. El proceso de nado se observa como la formación de un halo a partir del punto de inoculación. El nado libre de las bacterias fue observado con un microscopio Nikon E-600 en iluminación de campo oscuro.

Inmunotransferencia (Western blot)

La técnica de inmunotransferencia (Western blot) (Towbin *et al.* 1979; Burnette, 1981) consiste en identificar una proteína específica, a partir de un lisado celular o bien, de una fracción específica, esto se realiza mediante anticuerpos, que reconocen epítopos antigénicos, los cuales son mostrados por la proteína blanco, la cual ha sido previamente desnaturalizada en un gel de SDS-poliacrilamida y posteriormente transferida a un soporte sólido.

Para la lisis celular y separación de las fracciones respectivas, se crecen cultivos a una densidad de $D.O_{600} \sim 0.5$, y se observan al microscopio, en este caso se crecieron las cepas: WS8, WS8 Δ *fliL1::aadA*, WS8 Δ *fliL1::aadA/pRK_fliL*, WS8 Δ *fliL1::aad/pRK_fliMN*, WS8 Δ *fliL1::aadA/pSR14*, NG1 y SP6. Se toma 1mL de cada muestra y se coloca en un tubo de microcentrifuga; cada tubo se mezcla agitando vigorosamente por aproximadamente 3 minutos, enseguida se centrifugan las muestras por 5 minutos a 14 K rpm, se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio, y se vuelve a centrifugar por 1 minuto el tubo donde estaba la pastilla, y se retira con punta todo el líquido. El paquete celular se resuspende en 200 μ l de Magic-mix 1X (0.5 ml Tris 2M pH6.8, 2 ml glicerol, 2ml SDS 10%; 80 μ l EDTA 0.5M, 5.3 ml H₂O, 200 μ l β -mercaptoetanol) y se guarda a -20 °C. A los tubos que contienen el sobrenadante se les añade 250 μ l de TCA (100 %) y se mezcla cuidadosamente por inversión, se incuban 15 minutos en hielo y se centrifugan a 14 K rpm a 4 °C por 5 minutos, se elimina el sobrenadante usando punta y la pastilla se centrifuga por 1 minuto adicional, se resuspende en 20 μ l de Magic-mix 1X; si la muestra se pone amarilla se le adiciona unos cuantos microlitros de Tris 1M pH 9.

Una vez que se han separado las fracciones celulares (paquete celular y sobrenadante), se corren en un gel de acrilamida al 12% con SDS a corriente constante de 20 mA. Terminada la electroforesis se realiza la transferencia de las muestras a un filtro de nitrocelulosa de la siguiente forma: se corta un filtro de nitrocelulosa y dos papeles Whatman 3MM del mismo tamaño que el del gel; el filtro de nitrocelulosa se pone en contacto con el gel, el gel y el filtro se colocan entre los papeles de Whatman y dos placas porosas, finalmente este se coloca entre dos soportes de plástico, y el dispositivo es entonces inmerso en un tanque de electroforesis (fig. 9), el cual posee dos electrodos de platino y buffer de transferencia carbonato-bicarbonato. La cámara se coloca sobre un agitador electromagnético, a fin de permitir que la mezcla del buffer permanezca homogénea mediante agitación constante. El filtro de nitrocelulosa se puso en dirección del ánodo; en seguida se hace pasar una corriente eléctrica de 250 mA, utilizando una fuente de poder, durante 1 h.

Ya que las muestras han sido transferidas al filtro de nitrocelulosa, entonces pueden usarse para pruebas de detección inmunológica, utilizando anticuerpos específicos (Western blot), la sensibilidad de este procedimiento depende en gran medida, de la posibilidad de reducir las uniones no específicas, bloqueando los posibles sitios de unión con proteínas irrelevantes.

El filtro de nitrocelulosa es colocado dentro de un recipiente e inmerso en solución de bloqueo durante toda la noche; la solución de bloqueo se preparó al 5%, diluyendo 0.75 g de leche descremada en 15 ml de buffer TBS/Twin20. Después de bloquear el filtro de nitrocelulosa, éste es lavado tres veces en agitación constante utilizando buffer TBS/Twin20; se deja un tiempo de 10 minutos para cada lavado.

Usualmente la técnica de Western blot se realiza en dos pasos, primero un anticuerpo específico no marcado es incubado con el filtro de nitrocelulosa durante 1 hora a agitación constante, en este caso se utilizó un anticuerpo dirigido contra flagelina anti-FliC a una dilución 1:100 000; el filtro es lavado 3 veces como en el paso anterior e incubado con un segundo anticuerpo anti-IgG durante 1 hora y lavado de igual forma, este último anticuerpo está acoplado con una enzima, en este trabajo se utilizó la enzima fosfatasa alcalina. En este caso se utilizó un sustrato comercial el cual emite luz al ser defosforilado (CDP-*Star* de la marca Tropix: Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro{ 1,2- dioxetane-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo{3.3.1.1^{3,7}}decan)-4-yl)-1-phenyl phosphate). EL filtro se coloca dentro de otro acetato que lo cubre por ambos lados y después se introduce en un cassette obscuro. La membrana se expone en una placa de rayos X por periodos de 1 min, 30 seg, 15 seg, 5 seg con el fin de obtener la imagen más nítida.

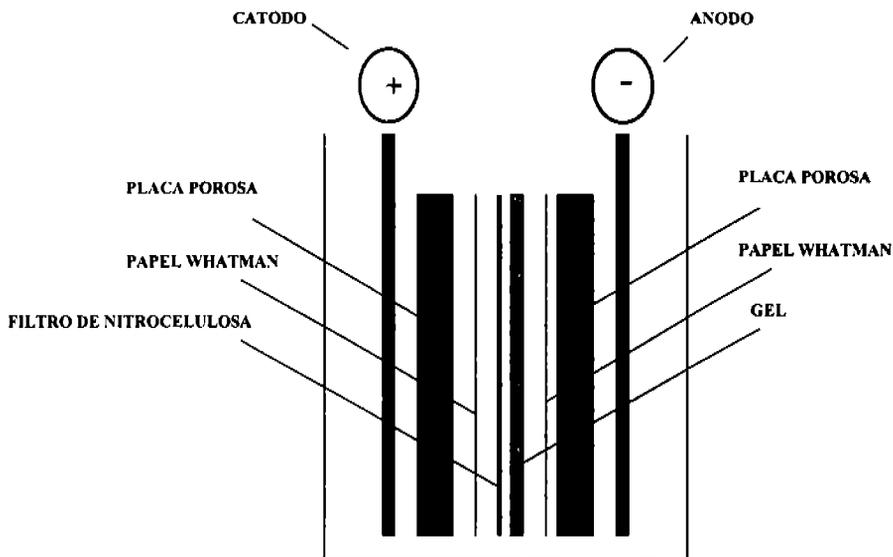


Figura 9. Orden en el que se colocan las partes que integran el dispositivo de transferencia.

Estrategia experimental

La estrategia experimental que se siguió para aislar a la mutante polar, consistió en reemplazar el alelo silvestre *fliL* de la cepa WS8 de *Rhodobacter sphaeroides* por un cassette de resistencia a kanamicina mediante un evento de doble recombinación. Para ello se siguió el esquema que se muestra en la figura 10. La construcción de la mutante no polar se realizó esencialmente siguiendo la misma estrategia que para la mutante polar, pero en este caso el cassette que se utilizó fue *aadA* el cual es un gen que codifica para la enzima aminoglicosido-3:adeniltransferasa la cual confiere resistencia a espectinomicina (Poggio *et al.*, 2001).

Inicialmente se amplificaron por PCR dos fragmentos de ~1000 pb que corresponden a la secuencias de los genes *fliK* y *fliM* que flanquean a *fliL* en el cromosoma. Para ello se diseñaron oligonucleótidos (ver materiales y métodos) con base en la secuencia reportada para los genes *fliK*, *fliL* y *fliM*. El fragmento amplificado río arriba de *fliL* inicia desde el último tercio de *fliK* y se extiende hasta los primeros 24 aminoácidos de *fliL*, mientras que el segmento río abajo incluye los últimos 7 aminoácidos de *fliL* y se extiende hasta la mitad de *fliM*. Los fragmentos amplificados fueron designados como *fliL*-up y *fliL*-down respectivamente, los cuales nos fueron útiles para llevar a cabo la recombinación homóloga mediante la cual se realizó la delección del gen *fliL*. En el caso del fragmento *fliL*-up se incluyeron en la secuencia de los oligonucleótidos los sitios de restricción *XbaI* y *EcoRV* y para *fliL*-down se introdujeron los sitios *EcoRV* y *KpnI*. Para llevar a cabo las reacciones de amplificación, se utilizó como templado el plásmido pBG0404, el cual tiene clonado un fragmento *SalI* (4.6 kb) del cromosoma de *Rhodobacter sphaeroides*, que lleva los genes *fliK'LMNOP'*.

Una vez purificados los fragmentos de PCR se digirió cada uno de ellos con las enzimas de restricción correspondientes. El vector de clonación pTZ19R fue digerido con las enzimas *XbaI* y *KpnI* y tratado con fosfatasa alcalina. Los fragmentos resultantes fueron ligados al vector, quedando unidos *fliL*-up y *fliL*-down entre sí por su sitio *EcoRV* y por sus sitios *XbaI* y *KpnI* con el vector pTZ19R. Una característica importante de este vector es que contiene el promotor *lac* que es inducido con IPTG y el fragmento α de *lacZ* en la región del polilinker, lo cual nos permite detectar la actividad β -galactosidasa agregando X-gal el cual es hidrolizado por la enzima transformándolo en un derivado azul; la presencia de colonias blancas es indicativo de plásmidos que llevan el inserto.

La reacción de ligación, fue utilizada para transformar la cepa de *E. coli* JM103, las colonias transformantes fueron seleccionadas. Se aislaron y se analizaron por restricción los plásmidos de algunas colonias blancas. Se identificó un plásmido cuyo patrón de restricción indicaba la correcta clonación de los insertos *fliL*-up y *fliL*-down; este plásmido fue designado como pTZ19R/*fliL*/up-down. Posteriormente, se introdujo un cassette de resistencia a kanamicina en el sitio *EcoRV* del pTZ19R/*fliL*/up-down. Las colonias fueron seleccionadas en presencia de kanamicina, con el fin de aislar sólo aquellas en las que se hubiese ligado el inserto. El plásmido resultante fue designado pTZ19R/*fliL*/up-kan-down.

Finalmente el fragmento *XbaI-KpnI* de pTZ19R/*fliL*/up-kan-down, se subclonó en el plásmido pJQ200mp18 en el sitio *SmaI*. El pJQ200 es un plásmido mobilizable dado que lleva la secuencia oriT; lleva un marcador de resistencia a gentamicina y el gen *sacB*, cuya expresión es letal en bacterias gram-negativas en presencia de sacarosa. El origen de replicación de este plásmido no es funcional en *Rhodobacter sphaeroides* por lo cual actúa

como plásmido suicida. El plásmido resultante fue designado pJQ200/*fliL*/up-kan-down y fue transformado en la cepa de *E. coli* S17-1.

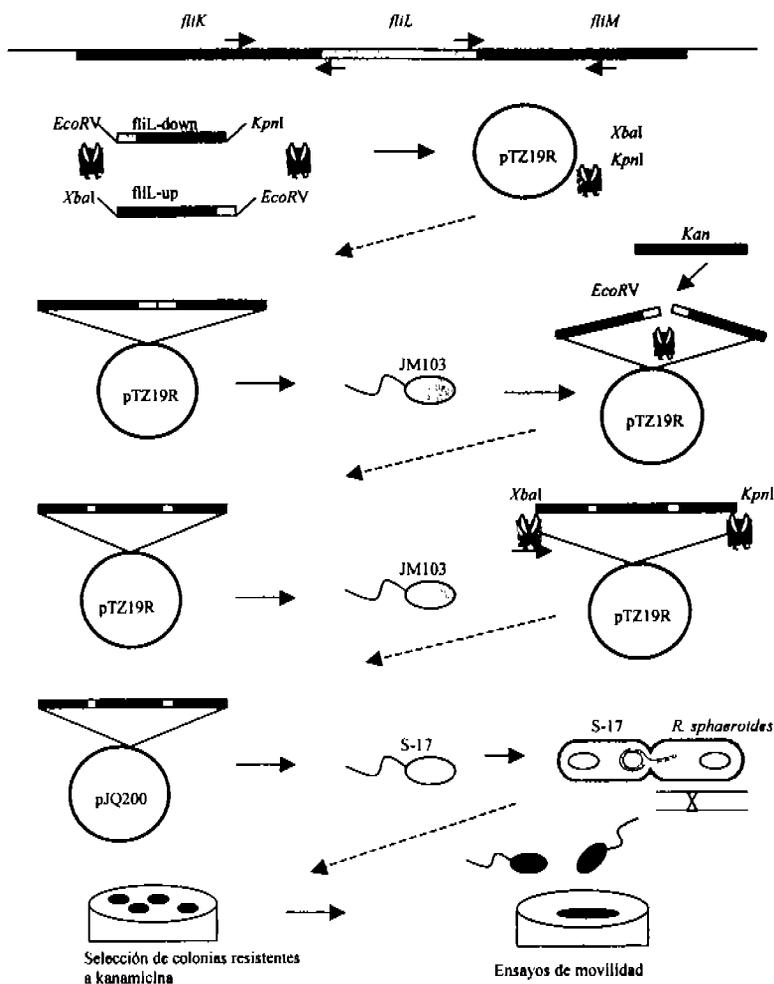


Figura 10. Esquema que ilustra de manera general la estrategia experimental utilizada para el aislamiento de la cepa mutante FS1 (*fliL*Δ1::kan), los detalles de la ilustración se describen en el texto.

Posteriormente dicha cepa fue conjugada con *Rhodobacter sphaeroides* siguiendo el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos. El remplazamiento del alelo silvestre ocurre porque el plásmido se integra al cromosoma mediante un evento de recombinación, para lo cual utiliza las secuencias *fil*-up y *fil*-down homólogas al cromosoma. Posteriormente por un segundo evento de recombinación el plásmido es escindido llevando con éste el gen silvestre *fil*⁺ y la copia interrumpida por el cassette de kanamicina permanece en el cromosoma de la bacteria. (fig. 11).

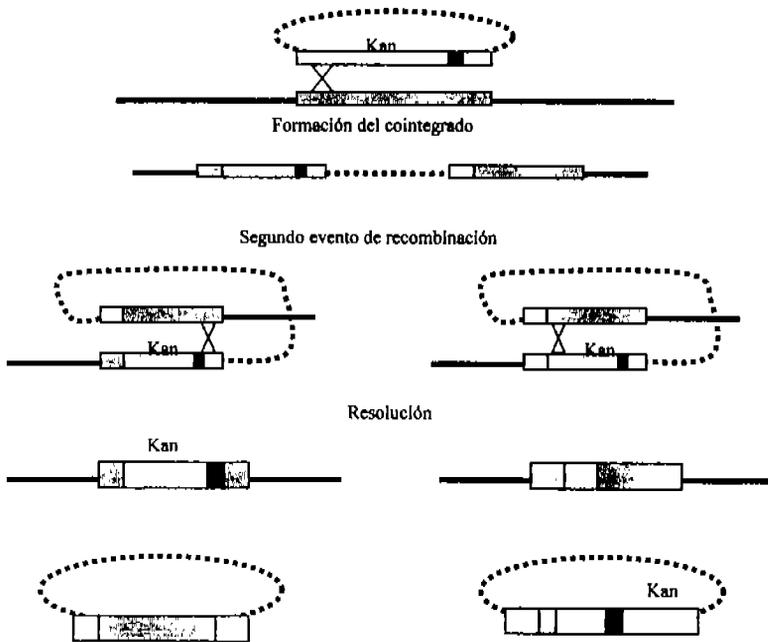


Figura 11. Modelo que ilustra como se lleva a cabo la delección de un gen cromosomal, mediante el reemplazamiento genético, en este caso se usa un cassette de resistencia a kanamicina como ejemplo (modificado de Hamilton *et al.*, 1989).

Resultados

En este trabajo se aislaron dos mutantes, designadas FS1 y FS2, una de ellas lleva inserto en el cromosoma un cassette de resistencia a kanamicina y otra un cassette de resistencia a espectinomicina respectivamente, que remplazan al gen *fliL*. Resultados previos indican que el cassette de kanamicina ejerce un efecto polar, mientras que el cassette de espectinomicina no altera la expresión de los genes río abajo de una unidad transcripcional (Ballado *et al.* 2001). La mutante con el cassette de resistencia a kanamicina (FS1) se aisló con el objetivo de tener un control negativo, el cual nos permitiría comparar la polaridad respecto al cassette de espectinomicina (FS2).

Con el fin de determinar la capacidad de nado de las cepas transconjugantes (Kan^R Gm^S), algunas de ellas se crecieron en medio líquido hasta fase exponencial y una alícuota fue observada en el microscopio óptico. Ninguna de ellas fue capaz de nadar, indicando que la mutación altera la funcionalidad del flagelo. En este punto, una de las cepas fue seleccionada y denominada FS1 para la cepa *fliL* Δ 1::*kan* y FS2 para la cepa *fliL* Δ 1::*aada*, la capacidad de nado de la cepa FS1 en una caja de agar suave se muestra en la figura 12.

Análisis de complementación

Con el propósito de determinar si la incapacidad de nado de las cepas FS1 y FS2 se debe únicamente a la lesión en el gen *fliL*, se llevó a cabo un análisis de complementación utilizando diversos plásmidos que llevan el gen *fliL* solo o acompañado de los genes aledaños. Las cepas con dichos plásmidos fueron probadas en cajas de nado, así como observadas al microscopio en iluminación de campo oscuro tomando una alícuota de cultivo en fase exponencial. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Análisis de complementación

FS1(<i>fliL</i> Δ1:: <i>kan</i>)	Fragmento	Complementación
pBG405a	<i>Sa</i> II 4.5kb (<i>fliKLMNOP</i> ')	+
pBG405b	<i>Sa</i> II 4.5kb (<i>fli</i> ' <i>PONMLK</i>)	-
pRK_ <i>fliL</i>	<i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI 1.3kb (<i>fliK</i> ' <i>LM</i> ')	-
FS2(<i>fliL</i>Δ1::<i>aadA</i>)		
pBG405a	<i>Sa</i> II 4.5 kb (<i>fliKLMNOP</i> ')	+
pRS501	<i>Eco</i> RI 5kb (<i>fliHIJKLM</i> ')	-
pRK_ <i>fliL</i>	<i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI 1.3 kb (<i>fliK</i> ' <i>LM</i> ')	-
pRK_ <i>fliLMN</i>	<i>Bam</i> HI (<i>fliK</i> ' <i>LMN</i>)	+
pRK_ <i>fliMN</i>	<i>Nco</i> I- <i>Kpn</i> I (<i>fliMN</i> ')	-
pRS14	<i>Sac</i> II (<i>fli</i> ' <i>MN</i> ')	-

(') indica cuando un gen se encuentra incompleto o truncado; (-) indica cuando no se recuperó el fenotipo silvestre y (+) cuando si se reestableció. La capacidad de nado fue determinada por observación al microscopio y por formación de halos de nado en cajas de agar suave.

Análisis genético y funcional de la mutante FS1

A continuación se desglosarán y comentarán los resultados mostrados en la tabla 2.

Primeramente, se verificó la polaridad del cassette de kanamicina sobre la transcripción de los genes río abajo del gen *fliL*, que en este caso corresponden a *fliM* y *fliN* (García *et al.*, 1998). Dada la polaridad del cassette de kanamicina, cuando se introdujo sólo el alelo silvestre *fliL*, la cepa mutante no reestableció su fenotipo (fig. 13; tabla 2, línea 3); en cambio cuando se introdujo la porción completa del operón correspondiente a los genes *fliLMN*, la cepa recobró el fenotipo silvestre de movilidad (tabla 2, línea 1 y fig. 14 panel IB y IIB). Este mismo fragmento clonado en dirección contraria al promotor del vector de expresión (pBG405b) (González-Pedrajo, 2000) se utilizó con el propósito de establecer si la complementación dependía de algún promotor presente en el inserto. Dado que este último plásmido no reestableció el fenotipo silvestre, se concluyó que este fragmento no lleva el promotor que permite la expresión de los genes *fliLMN*, lo cual esta de acuerdo con resultados previos obtenidos del análisis de complementación de una cepa que lleva una

lesión en el gen *fliM* (García *et al.*, 1998). Cabe mencionar que en esta cepa, puede distinguirse un pequeño halo de nado asimétrico alrededor del punto de inoculación, este tipo de halos irregulares se forma comúnmente por eventos de recombinación entre el plásmido y el cromosoma, los cuales dan lugar a células con capacidad de nado. Sin embargo, como estos eventos no ocurren sincronizadamente en la población, el halo muestra bordes irregulares (fig.14, panel IC y panel IIC).

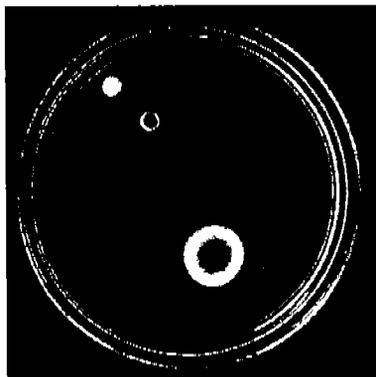


Figura 12. Caja de nado en donde se compara el patrón de desplazamiento de la cepa mutante (A) FS1 (*fliLΔ1::kan*), con la cepa silvestre (B) WS8.

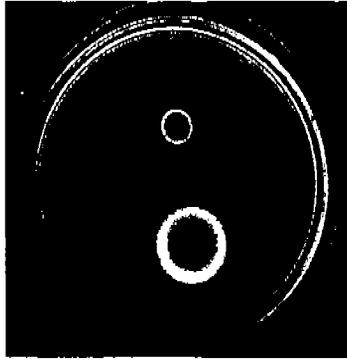


Figura 13. Capacidad de desplazamiento de la cepa WS8 y FS1/pRK_ *fliL*.

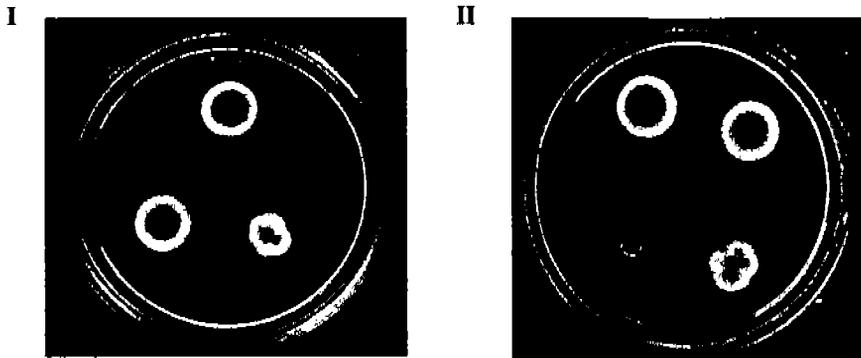


Figura 14. Fenotipo observado de : panel I (A) WS8, (B) FS1/ pBG405a y (C) FS1/ pBG405b. En el panel II las letras indican las mismas cepas que en el panel I y se incluye la cepa mutante FS1 (D).

Análisis genético y funcional de la mutante FS2

Cuando se ensayó la movilidad de la mutante no polar FS2 (*fliL*Δ1::*aada*) en cajas de nado, ésta no formó ningún halo en comparación con la cepa silvestre WS8 (fig. 15). A la cepa FS2 se le introdujo el plásmido pBG405a (tabla 2, línea 4), el cual contiene el operón completo al cual corresponde *fliL*, el resultado de esta transformación le permitió a la mutante no polar, recobrar su movilidad (fig. 15C), sin embargo, contrario a lo que esperábamos, cuando se introdujo sólo el alelo silvestre *fliL*, la cepa mutante fue incapaz de recobrar el fenotipo silvestre (figura 15B).

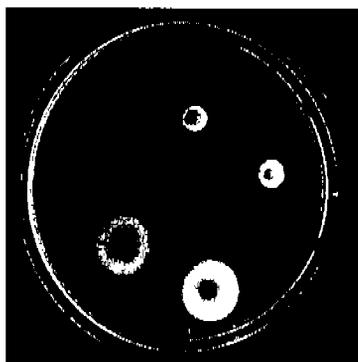


Figura 15. Nado en cajas de agar suave de las cepas: (A) FS2 (*fliL* Δ 1::*aadA*), (B) FS2/ pRK_ *fliL*, (C) FS2/ pBG405a y (D) WS8.

Los antecedentes previos, indicaban que el cassette de espectinomicina, no ejerce efecto polar sobre la transcripción de los genes río abajo (Ballado *et al.*, 2001; Poggio *et al.*, 2001); Por lo tanto, cuando nosotros introdujimos en la cepa FS2 el alelo silvestre *fliL*⁺ clonado en el vector de expresión pRK415, esperábamos que éste reestableciera el fenotipo silvestre. Sin embargo, pRK_ *fliL*⁺ no fue capaz de restaurar el fenotipo silvestre, mientras que pBG405a sí (tabla 2, líneas 4 y 6). La ausencia de complementación del alelo *fliL*⁺ nos llevó a proponer dos posibles hipótesis: por un lado, durante la amplificación de los productos de PCR *fliL*-up y *fliL*-down, se pudieron generar mutaciones que dieron origen a codones de paro y como consecuencia impidieran la correcta expresión de los demás genes del operón. Por otro lado, la forma en que se realizó la deleción en el gen *fliL* podría estar afectando la expresión (específicamente la traducción) de los genes ubicados río abajo de *fliL*.

Análisis de secuencia de los fragmentos *fliL*-up y *fliL*-down

Para desechar la primera hipótesis, se secuenciaron los dos fragmentos *fliL*-up y *fliL*-down, presentes en el plásmido pTZ19R/*fliL*-up-*fliL*-down. La secuencia obtenida se comparó con la reportada en las bases de datos correspondientes (fig. 16, 17 y 18); el análisis de secuencia reveló que los fragmentos clonados coincidían con la secuencia reportada.

DEFINICION Rhodobacter sphaeroides hook length control protein FliK (flik)

ACCESO U86454

ORGANISMO Rhodobacter sphaeroides

Bacteria;

Proteobacteria;

Alphaproteobacteria;

Rhodobacterales;

1441 cccggaccgc cgcgcggcgc ggtccgctcg cggaggcggg ccgggccgac
gacgcctctc

1501 cgcgtccccg ctcgtcgac ttcgcggcgc gcgcccaacc ggggacagcc
gggcgggagg

1561 gcgcgcggcg cgcctcctcc gcggtgcgg ggacagtgcc ctcgggcgag
ggtgcagccg

1621 ~~acacaaaccc~~ ***fliL*-up-1 forward** ~~accgtctccc~~ gctcctgcgg cacagagcc ggagatcgca
gcggcgcgcg

1681 ccgcaaccgc cgggaaggcg gccgacgcgt ccgaggcacc ggccgccgag
aacgcgtccg

1741 cggcgaccgt cggacaggac gggcagaga cggctctggc cgtggagccc
gccggggcca

1801 ctctgcggcg gtcagatccg gtggcccccg cccccctgac cgcctctccg
agcgacctgc

1861 gcctcgagcg ggcgggcgag ccccgggcgg gcgcggacgg gccctcgcc
ctcgcggccc

1921 ccgacgcacc ggccgagctg caggacagga tcctcgaggg cgcgcagggg
gagggcgaga

1981 tcgagatcgt gctcgcccc gagacctgg gccggctccg catccgcgtc
gagatgcgcg

2041 acggcaccgc gcaggtgagc ttcaccaccg aaaccggcca ggccgccgt
ctcctgtcgg

2101 ggcaggaagg acgcctgtcg gacctccttg agaagcacgg cctgtcgtc
ggccggcacg

2161 aggccggaca gggcgacacc ggccgcgcgt ccgaggcacc gctgcgcgag
ccccggccgc

2221 gcgcctccg ccctgcccc gatccttccg agcccgcgcg ccgtgcggcg
gccgggaccg

2281 tcaatctgat tgctga

//

fliL

***fliL*-up-3 reverse**

1 gtgaccgacg cctcgcctc cctcgacag aagccccgc ggggcgcggc **actattgaga**

61 **gagatggtat** taatgctgt cggggccttc ctgctggcgc ccgcttcgg
cgcggctac

ACCESO AF044254 REGION: 577..1548
DEFINICION flagellar switch protein (fliM) genes, complete cds
ORGANISMO Rhodobacter sphaeroides
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria;
Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Rhodobacter.

fliL

481 gcgctgcgcg gcgcggtgaa cgcacggctc cagcagctcg agggcttcgg cggcatcgag
541 gccgtcttct ~~taacctgatt~~ ~~catgatgag~~ ~~taa~~
// *fliL*down-1 forward

fliM

ORIGIN
1 atggccgcca ctcgcgcaa actctcgtcg aaggaggctg cagccctcgt
cggcaacctc
61 atggaggcca gcaaaagcac gagcctcgag aacggcctcg aggtccggcc
ttacgccttc
121 ggcgagaacg aactgaacca gctcggcgac tatcacgcgc tgcgcatcat
caacgagcgc
181 tictgcgcga cgcgcgcga cgtcttctcg ccgatgctgc gacttcagcc
ccggatctcg
241 tcttcccgc ccgaggctcg cagtttcgac gactaccgct cgagccagga
caatttcgtg
301 tcgatcaccg cgagccgat cgaggagctg cgcggcaacc agatgatcgt
gatcccgcg
361 cccctcatct cgtcgtgac cgacagctat tacggcggg **fliM1 reverse**
agatccgaa
tgccccacg
421 acgcgcaccg aattcaccgc gaccgaggag cgggtgatcg agctcgtgac
cgaccggctg
481 aacgtggcgc tgcaggtggc gtggcgcgac ctgatggccc tgacctcac
cgtggtcagc
541 cgcgaggaat cgatgcagtt cgcctcgttc gtggatggcg aggacatggt
ggtgaactgc
601 tccctcatgg tgcagctgcc caacaccgag cctgcgagct tcgacatcct
ctatccgctc
661 cagacgctga agccgatctc gtcgcagctg cgtcgcggga tgcagtcgga
tttcgtggac
721 gacgaccgga gctggcgcga gaagctgaa cgggcgatcc tgtccatccc
gctcaccctc **fliL**down-3 reverse
781 tcggcgcggc tctgcgaccc cgaggctccg ctg **gcgcaagc** **tcattgagat**
gcagccgggc
841 gatgtcgtgc cgggtcatct gaccgaggcg ctgtcgtctc tcgtcgaggg
ccagcccata
901 ttcgaggcgg ctcccggcga gcgcggcggg caggccgcgc tgaacctgac
gcgcgcgat
961 gtccggggct ag
//

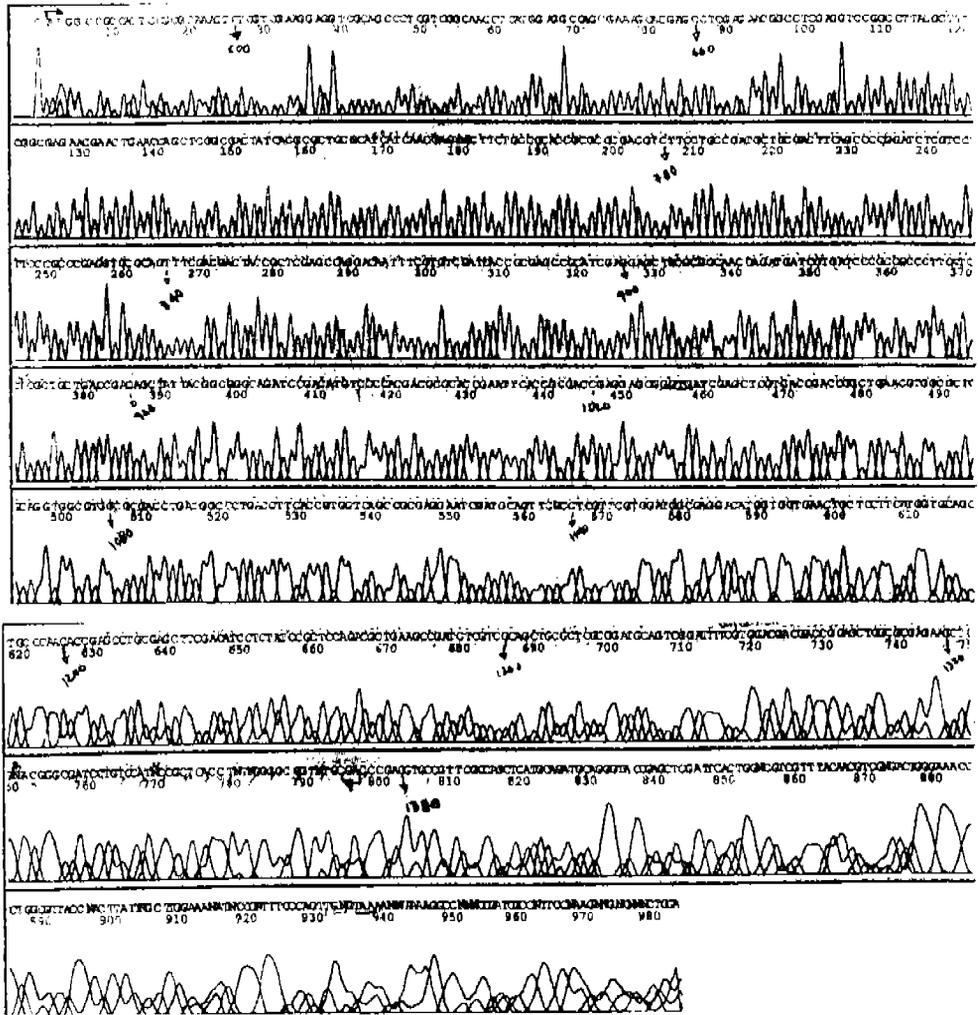


Figura 17. Secuencia reportada en la base de datos para *flim*, junto con el resultado de su análisis de secuencia, el cual se muestra en la parte inferior. También se indican los oligonucleótidos utilizados en letras negras.

DEFINICION Rhodobacter sphaeroides proteína flagelar (*fliL*)
 ACCESO AF044254 REGION: 1..573
 ORGANISMO Rhodobacter sphaeroides
 Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria;
 Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Rhodobacter.

```

                                     fliLup-3 reverse
1  gtgaccgacg cctccgcctc cctcgacacg aagccccgcc ggggccgcgg cctottgogc
   61 gagatggtot tcttctgctc cggggccttc ctgctggccg ccggttcgg
cgcgggctac
   121 ttctacttcg ccaatccgct gtcgcccgcg aaggacgtgc tgcgcctgat
cgaagcgcacg
   181 cccgagggcg acgaacccgc agccgaccgc gacgcgcgcg agaaggtgcc
cgggcccaag                                     950 forward
   241 cccgagcggg aatccttcgt caccagctac taccagtta aggagccgct
caagacgaac
   301 ctgcgcgctc cgcgccggct gctgcaggcg ggcacggcc tgtccacgca
atatgaccag
   361 aaggctatcg acaatgtcgc ccgcaacgag gtggcgctgc ggtcggacat
getggccatc
   421 gtggcacctt tctcggagga ggagctgcag gacaaggcgg gccgcgaccg
getggccgag
   481 gcgctgcgcg gcgcggtgaa cgcacgctc cagcagctcg agggcttcgg
cggcatcgag
   541 gccgtcttct tccatcatt cctcctgcag taa
//

```

Figura 18. Secuencia reportada en la base de datos para *fliL*, indicando los primers que se diseñaron para esta región.

Con base en los resultados anteriores se decidió explorar la segunda hipótesis, ésta implica que la forma en que se diseñó la delección en *fliL*, afecta negativamente la expresión del resto de los genes del operón, esto es, *fliM* y *fliN*. Para ello, se introdujo en la cepa FS2 los plásmidos pRS501, pRK_ *fliMN*, pRS14 (*fliM*) y pRK_ *fliLMN*. Los detalles se muestran en la figura 19; por un lado, pRS501 no complementa la cepa FS2 dado que no lleva el gen *fliN*, y *fliM* se encuentra truncado (fig. 19; panel III). El plásmido pRS14 (pRK_ *fliM*) y pRK_ *fliMN* tampoco complementan la cepa FS2 dado que en el primer caso *fliL* y *fliN* están ausentes, mientras en el segundo caso *fliL* está ausente (fig. 19 panel II letra D y panel I letra E, respectivamente). En contraste, el plásmido pRK_ *fliLMN* sí complementa la cepa

FS2 (fig. 19; panel II letra C), lo cual apoya la idea de que la mutación *fliL*Δ1::*aad* , afecta negativamente la expresión de los genes ubicados río abajo de *fliL*.

A partir de estos resultados también es posible inferir que la mutación del gen *fliL* en *R. sphaeroides* sí provoca un fenotipo aparente, esto es, en la cepa FS2 el fenotipo observado es una mezcla de la pérdida de la función de los genes *fliL*, *fliM* y *fliN*. Sin embargo, al complementar la cepa FS2 con el plásmido que lleva los genes *fliM* y *fliN*, el fenotipo observado correspondería únicamente a aquel ocasionado por la pérdida de *fliL*. Como se observa en la tabla 1, línea 8 y fig. 19 IE la cepa FS2/pRK_ *fliMN* es incapaz de nadar, por lo tanto podemos concluir que en *R. sphaeroides* la falta de FliL es indispensable para la movilidad de la bacteria, lo cual, puede derivar en dos posibles fenotipos Mot⁻ o Fla⁻. Finalmente, para verificar que los genes clonados en el plásmido pRK_ *fliMN* se estaban expresando correctamente, se utilizó como control la cepa NG1 (*fliM*::*uid-aadA*) la cual se sabe es posible complementar con el alelo *fliMN* (Garcia, *et al.*, 1998), como se observa en la fig. 19 IC y ID la cepa NG1 se complementa adecuadamente con el plásmido pRK_ *fliMN*.

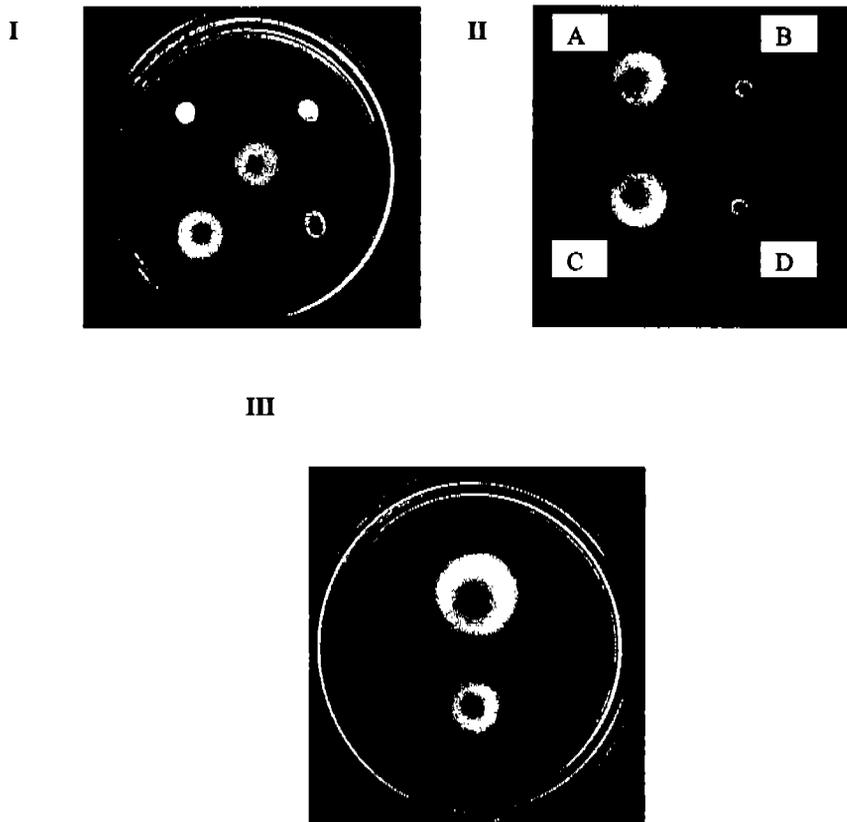


Figura 19. Nado en cajas de agar suave de las cepas (I): (A) WS8, (B) FS2, (C) NG1, (D) NG1/pRK_ *fliMN*, (E) FS2/pRK_ *fliMN*; (II) : (A) WS8; (B) FS2/WS8Δ*fliL1::aadA*; (C) FS2/pRK_ *fliLMN*; (D) FS2/pRK_ *fliM*; (III) cepa WS8 y FS2/pRS501.

Determinación del fenotipo de la cepa FS2

Para tener una aproximación del posible fenotipo que provoca la ausencia del gen *fliL*, es decir, determinar si es Mot⁻ o Fla⁻ se realizó un Western blot (ver materiales y métodos) de la cepa mutante FS2 (*fliLΔ1::aadA*) complementada con pRK_ *fliMN*, utilizando anticuerpos contra flagelina (FliC), esto, para detectar de forma indirecta la

presencia o ausencia de flagelo (los anticuerpos anti-flagelina de *R. sphaeroides* fueron amablemente donados por el Q. Francisco de la Mora del grupo del Dr. G. Dreyfus). Para realizar el Western blot se tomaron como controles negativos a la cepa SP6 (*rpoN2Δkan*) y NG1, las cuales hasta donde se sabe no desarrollan flagelo y como control positivo a la cepa WS8.



No.	Cepa
1	WS8
2	FS2 (<i>fliLΔ1::aadA</i>)
3	FS2/pRK <i>fliL</i>
4	FS2/pRK <i>fliMN</i>
5	FS2/pRK <i>fliLMN</i>
6	NG1 (<i>fliM::uid-aadA</i>)
7	SP6 (<i>rpoN2Δkan</i>)

Figura 20. Western blot de la cepa FS2 y FS2 /pRK *fliMN* utilizando anticuerpos anti-flagelina. En la tabla se enumeran las cepas utilizadas para el análisis y en la figura se indica el carril correspondiente a cada muestra, y con una flecha la banda correspondiente a flagelina; las fracciones indicadas corresponden al paquete celular o pastilla (P) y el sobrenadante o porción extracelular (SN).

Como puede observarse en la figura 20, la presencia de flagelina fue detectada tanto en el control positivo WS8, como en la mutante FS2, al igual que las cepas derivadas de FS2 con los plásmidos: pRK *fliL*, pRK *fliMN* y pRK *fliLMN*; en el caso de los controles negativos el único en donde no se distinguió la presencia de flagelina fue en la cepa SP6

(*rpoN2Δkan*), siendo una sorpresa para nosotros encontrar flagelina en la cepa NG1(este resultado será discutido mas adelante).

La flagelina fue encontrada tanto en la fracción correspondiente a la pastilla (pellet) como al sobrenadante, esto es debido a que la flagelina es exportada desde el interior de la célula, hasta que finalmente alcanza su posición final en el espacio extracelular formando parte del filamento.

Este resultado nos sugiere que el fenotipo de una cepa *flH⁻* en *R. sphaeroides* puede ser Mot⁻ (esto es, con flagelo, pero incapaz de rotarlo).

Discusión

Una aproximación para conocer el efecto que un determinado gen ejerce sobre el fenotipo de un organismo, generalmente consiste en aislar una "mutante nula" (siempre y cuando no sea un gen esencial), esto es, que carezca completamente del gen de interés. En bacterias usualmente los genes se encuentran agrupados en unidades denominadas operones; cuando un agrupamiento de genes es transcrito para formar un solo mRNA, éste se denomina mensajero policistrónico, el cual codifica para varios polipéptidos; esta forma de expresión, puede derivar en dos procesos conocidos como acoplamiento traduccional y polaridad.

El acoplamiento traduccional se refiere a la dependencia que presenta un polipéptido para ser traducido, sólo, hasta que el polipéptido que lo precede haya completado este mismo proceso; esto es debido a que en ocasiones el codón de inicio de un gen ubicado en segundo lugar en el orden de traducción, se encuentra dentro de una estructura secundaria formada por el mRNA, que regularmente suele ser una horquilla, el

codón de inicio del segundo gen es liberado cuando el ribosoma que ha traducido al gen que lo precede se acerca al codón de término, esto permite al ribosoma reasociarse o continuar con la traducción del segundo gen (Snyder y Champness, 2003).

La polaridad es un fenómeno que se da a nivel de transcripción, ésta puede deberse a diferentes causas: por una mutación por inserción utilizando por ejemplo un transposón, o bien, cuando se mutageniza un gen utilizando un cassette de resistencia a algún antibiótico, en ambos casos las secuencias insertadas pueden contener terminadores de la transcripción, lo cual impide que los genes ubicados río abajo sean expresados.

Como se mencionó en la introducción *Rhodobacter sphaeroides* (WS8), es móvil gracias a la rotación de un único flagelo, en este trabajo al remover (deletar) el gen *fliL* y remplazarlo por un cassette de resistencia a kanamicina, se obtuvo una cepa incapaz de nadar (fig. 13); para confirmar el efecto polar derivado de la inserción de este cassette, realizamos un análisis genético, mediante una prueba de complementación. Para ello, se introdujo en la célula mutante el alelo silvestre *fliL*⁺, esto puede llevarse a cabo con un plásmido que puede replicarse establemente en la bacteria, con lo cual ésta se convierte en un organismo parcialmente diploide que posee dos copias de esa región del cromosoma, mientras que permanece haploide para el resto de los demás genes.

El objetivo de construir la mutante polar (FS1), fué utilizarla como control negativo del análisis genético, es decir, comparar el efecto de un cassette con efecto polar y otro con efecto no polar. En la caja de nado en donde se muestra la mutante polar, se distingue claramente como su movilidad se ve disminuida, al compararla con la cepa silvestre, la cual claramente forma un halo alrededor del punto de inoculación, mientras que la mutante permanece como un punto fijo sobre la caja de nado (fig. 12).

Cuando a la cepa FS1 (*fliL*Δ1::*kan*) se le introdujo la porción completa correspondiente al operón *fliKLMN*, la mutante reestableció el fenotipo silvestre de nado (fig. 14B). Posteriormente se utilizó este mismo fragmento, pero clonado en dirección contraria al promotor del vector, dicha construcción fue incapaz de restaurar la movilidad de la cepa FS1, este resultado confirma que la expresión de este fragmento depende del promotor del vector, por lo que en su orientación inversa los genes en este fragmento no son expresados correctamente. En el patrón de nado de la mutante FS1 (*fliL*Δ1::*kan*) que lleva el vector pBG405b se observa la formación de un pequeño halo irregular, el cual puede ser interpretado como producto de eventos de recombinación que generan células móviles (fig. 14C). Finalmente, se introdujo sólo el fragmento correspondiente al gen *fliL* y en concordancia con la polaridad del cassette de kanamicina, no se reestableció la movilidad de la cepa mutante. Los resultados anteriores nos permiten distinguir, cómo son los patrones de nado de las distintas cepas cuando se les coloca en superficies semisólidas; también es importante remarcar, cómo el efecto polar que ejerce el cassette de kanamicina impide que el fenotipo silvestre sea recobrado cuando se introduce solo el alelo *fliL*.

Posteriormente, se realizaron los experimentos para aislar una mutante que se planeaba no tuviera efecto polar designada FS2 (*fliL*Δ1::*aadA*), el fenotipo de la cepa FS2 que se observó en cajas de nado, nos indicaba que era una cepa no móvil. Para su análisis genético introdujimos en la cepa mutante la porción completa correspondiente al operón *fliKLMN*, esto dio como resultado el restablecimiento de la movilidad. Posteriormente se utilizó el alelo silvestre *fliL* clonado en el vector de expresión pRK415 para complementar a la cepa mutante FS2 (*fliL*Δ1::*aadA*), la cual esperábamos recobrar el fenotipo silvestre, sin embargo, el vector que lleva clonado el gen *fliL* fue incapaz de complementar a la mutante

FS2. Se descartó la posibilidad de que se hubieran introducido mutaciones en *fliK* y/o *fliM* durante el proceso de obtención de la cepa mutante (ver fig. 16, 17 y 18). Finalmente se determinó que la falta de movilidad en la cepa FS2 no solo era provocada por el daño ejercido sobre alguno de los genes ubicados corriente abajo de la delección en *fliL*, esto se confirmó mediante análisis de complementación utilizando fragmentos que incluían a los genes *fliM* y *fliMN* los cuales fueron incapaces de restablecer el fenotipo silvestre. Este resultado sugería que el daño observado en la cepa FS2 era la sumatoria de la falta de expresión de los genes *fliL*, *fliM* y *fliN*. Por otro lado, los resultados obtenidos nos indicaban que la mutación de la mutante *fliL* Δ 1::*aadA*, ejercía un efecto polar sobre el resto de los genes río abajo del operón, esto debido quizá a un posible acoplamiento traduccional de los genes correspondientes a este operón, y no específicamente debido a la polaridad *per se* del cassette de espectinomicina (Ballado, *et al.*, 2000; Poggio, *et al.*, 2001).

Como indican los resultados del Western blot, la cepa mutante FS2 (*fliL* Δ 1::*aad*), así como las cepas utilizadas en el análisis genético, exportan flagelina, y posiblemente el filamento se ensamble lo cual, a su vez nos sugiere que el fenotipo de una cepa *fliL*⁻ inferidos a partir de la cepa FS2/pRK_*fliMN* es Mot⁻. Sin embargo, para confirmar este resultado será necesario realizar observaciones al microscopio electrónico y detectar la presencia del flagelo.

En la cepa NG1 que se uso como control negativo en el Western blot, se encontro flagelina en las fracciones correspondientes al sobrenadante (SN) y a al paquete celular (P) (fig. 20). La presencia de flagelina en la primer fracción (SN) fue una sorpresa para nosotros, ya que los antecedentes indicaban que su fenotipo es Fla⁻ (García *et al.*, 1998), igual que en especies entericas como *E. coli* y *S. enterica* en donde se ha reportado que una

delección severa en este gen (*fliM*) impide la formación del flagelo (Toker *et al.*, 1996; Mathews *et al.*, 1998). Además, se sabe que el aparato de exportación se aloja al centro del anillo C (Katayama *et al.*, 1996); debido a esta característica estructural se ha planteado la posibilidad de que el anillo C sea un elemento indispensable para la estabilización del complejo de exportación.

Sin embargo, los datos de microscopía electrónica reportados para esta cepa no son claros, ya que se determinó que solo el 90% de las células observadas en una muestra no forman flagelo, indicándose además, la presencia de algunos flagelos rotos en el campo visual (García *et al.*, 1998). Por otra parte, la falta de un análisis tipo Western blot con anticuerpos dirigidos contra flagelina, impiden determinar con precisión el fenotipo de esta cepa, lo cual abre la posibilidad de que en *R. sphaeroides* la ausencia de *FliM* puede ser suplida a nivel estructural por algún otro componente del sistema flagelar.

Conclusiones

Aunque el fenotipo nulo de *fliL* en *Rhodobacter sphaeroides* no puede ser directamente determinado de la cepa FS2, el análisis genético y funcional que en el presente trabajo se realizó, así como las técnicas de biología molecular empleadas, nos indican que el gen *fliL* parece ser un elemento indispensable en esta bacteria, específicamente relacionado con los procesos que generan la rotación del flagelo; este resultado coincide al mismo tiempo, con lo reportado para otras bacterias monoflageladas como *Caulobacter crescentus* (Jenal *et al.*, 1994).

Perspectivas

Las perspectivas de este trabajo, están encaminadas en primera instancia, en aislar una mutante con efecto no polar, esto es, que pueda ser complementada con el alelo *fliL*⁺ y, a partir de ella caracterizar su fenotipo nulo. El siguiente paso consiste en establecer la función específica que FliL tiene en el aparato flagelar, determinando las interacciones que realiza con los demás componentes del sistema, así mismo determinar los efectos estructurales derivados de la mutación en *fliL* mediante la observación del flagelo en el microscopio óptico y electrónico.

Bibliografia

Adler, J. 1966. Chemotaxis in bacteria. *Science*. 708-716.

Alison, C., Emody, L., Coleman, N., Hughes, C. 1994. The role of swarm cell differentiation and multicellular migration in the uropathogenicity of *Proteus mirabilis*. *J. Infect. Dis.* 169, 1155-1158.

Armitage J. 1981. Multiple methylation and bacterial adaptation. *Nature* 289, 121-122.

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

Armitage, J. P., y Macnab, R. M. 1987. Unidirectional, intermittent rotation of flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 169, 514-518.

Ausubel, F. M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Sedman, J.A. Smith y K. Struhl (ed.). 1989. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, USA

Bahl, C. P., Mariani, K. J., Slawinsky, R. W. J., y Narang, S. A. 1976. A general method for inserting specific DNA sequences. *Nucleic.Acids. Res.* 27, 4305-4313.

Ballado, T., Camarena, L., González-Pedrajo, B., Silva-Herzog, E. y Dreyfus, G. 2001.

The hook gene (*flgE*) is expressed from the *flgBCDEF* operon in *Rhodobacter sphaeroides*: study of an *flgE* mutant. *J Bacteriol* **183**, 1680-1687.

Berg, H. C., y L. Turner. 1993 Torque generated by the flagellar motor of *Escherichia coli*. *Biophys. J.* **65**, 2201-2216.

Birnboim, H. C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods. Enzymol.* **100**, 243-255.

Blair, D. F., y Berg, H. C. 1988. Restoration of torque in defective flagellar motors. *Science.* **242**, 1678-81.

Blair, D. F., y Berg, H. C. 1991. Mutations in the MotA protein of *Escherichia coli* reveal domains critical for proton conduction. *J. Mol. Biol.* **202**, 575-584.

Blair, D. F. 1995. How bacteria sense and swim. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 489-522.

Blair, D. F., y H. C. Berg. 1990. The Mot A protein of *Escherichia coli* is a proton conducting component of the flagellar motor. *Cell* **60**, 439-449

Blair, D. F., Kimm, D. Y., y Berg, H. C. 1991. Mutant MotB proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**, 4049-4055.

Bren, A., y Eisenbach, M. 1998. The N terminus of the flagellar switch protein, FliM, is the binding domain for the chemotactic response regulator, CheY. *J. Mol. Biol.* **278**, 507-514.

Budrene, O. E., y Berg C. H. 1991. Complex patterns formed by motile cells of *Escherichia coli*. *Nature* **349**, 630-633

Burkart, M., Toguchi, A., y Harshey, R. 1998. The chemotaxis system, but not chemotaxis, is essential for swarming motility in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 2568-2573.

Burnette, W. N. 1981. Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.

Chaconas, G., y Van de Sande, J. H. 1980. 5' ³²P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods Enzymol.* **65**, 75-80.

Chassy, B. M., Mercenier, A., y Flickinger, J. 1988. Transformation of bacteria by electroporation. *Trends. Biotechnol.* **6**, 303-309.

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

Chun, S., y Parkinson, J. S. 1988. Bacterial motility: membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein. *Science.* **239**, 276-278.

Clarent, L., y Hughes, C. 2002. Interaction of atypical prokaryotic transcription activator FlhD₂C₂ with early promoters of the flagellar gene hierarchy. *J Mol Biol* **321**, 185-199.

Cohen, S.N., Chang, A. C. Y., y Hsu, L. 1972. Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2110-2114.

Conley, M. P., Wolfe, A. J., Blair, D. F., y Berg, H. C. 1989. Both CheA and Che W are required for reconstitution of chemotactic signaling in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**, 5190-5193.

Donohue, T. J., y Kaplan, S. 1991. Genetic techniques in *Rhodospirillaceae*. *Methos. Enzymol.* **204**, 459-485.

García, N., Campos, A., Osorio, A., Poggio, S., González-Pedrajo, B., Camarena, L., y Dreyfus, G. 1998. The flagellar switch genes *fliM* and *fliN* of *Rhodobacter sphaeroides* are contained in a large flagellar gene cluster. *J Bacteriol* **180**, 3978-3982.

Ferré, A., de la Mora, J., Ballado, T., Camarena, L., y Dreyfus, G. 2004. Biochemical study of multiple CheY response regulators of the chemotactic pathway of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **186**, 5172-5177.

Fraser, M. G., y Hughes, C. 1999. Swarming motility. *Curr Opin Microbiol.* **2**, 630-635

Garza, A. G., Biran, R., Wohlschlegel, J. A., y Manson, MD. 1996. Mutations in *motB* by changes in stator or rotor components of bacterial flagellar motor. *J. Mol. Biol.* **258**, 270-285.

Ghelardi, E., Calandroni, F., Salvetti, S., Beecher, J. D., Gominet, M., Lereclus, D., Wong, L. C. A., y Senesi, S. 2002. Requirement of *flhA* for swarming differentiation, flagellin export and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **184**, 6424-6433.

González-Pedrajo Bertha M. J. 2000. Biogénesis del flagelo bacteriano: caracterización de los operones *fliK* y *fliG*. Tesis de Doctorado (Doctorado en Investigación Biomédica Básica) UNAM, México.

González-Pedrajo, B., Ballado, T., Campos, A., Socket, E. R., Camarena, L. y Dreyfus, G. 1997. Structural and genetic analysis of a mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 deficient in hook length control. *J Bacteriol* **179**, 6581-6588.

Hamilton, M. H., Aldea, M., Washburn, K. B., Babitzke, P., y Kushner, R. S. 1989. New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**, 4617-4622.

Harshey, M. R. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 249-275.

Harshey, R. M., y Matsuyama, T. 1994. Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hiperflagelate swarmer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8631-8635

Hirano, T., Minamino, T., y Macnab, R. M. 2001. The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase. *J. Mol. Biol.* **312**, 359-69.

Holmes, D. S., y Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**(1): 193-197.

Homma, M., Iino, T., y Macnab, R. M. 1988. Identification and characterization of the products of six region III flagellar genes (flaAII.3 through flaQI) of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **170**, 2221-2228.

Homma, M., Kutsukake, K., Iino, T., y Yamaguchi, S. 1984. Hook associated proteins essential for flagellar filament formation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **157**, 100-108.

Jenal, U., White, J., y Shapiro, L. 1994. *Caulobacter* flagellar function, but not assembly requires FliL, a non-polarly localized membrane protein present in all cell types. *J. Mol Biol.* **243**, 227-244.

Kamiya, R., Asakura, S., Wakabayashi, K., y Namba, K. 1979. Transition of bacterial flagella from helical to straight forms with different subunit arrangements. *J. Mol. Biol.* **131**, 725-742.

Katayama, E., Shiraishi, T. Oosawa, K., Baba, N., y Aizawa, S-I. 1996. Geometry of the flagellar motor in the cytoplasmic membrane of *Salmonella typhimurium* as determined by stereo-photogrammetry of quick-freeze deep-etch replica images. *J. Mol. Biol.* **255**, 458-475.

Keen, T. N., Tamaki, S., Kobayashi, D., y Trollinger, D. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* **70**, 191-197.

Khan, S., Dapice, M., y Reece, T. S. 1988. Effects of mot gene expression on the structure of the flagellar motor. *J. Mol. Biol.* **202**, 575-584.

Kihara, M., Homma, M., Kutsukake, K., y Macnab, R. 1989. Flagellar switch of *Salmonella typhimurium*: gene sequences and deduced protein sequences. *J. Bacteriol.* **171**, 3247-3257.

Kihara, M., Minamino, T., Yamaguchi, S., y Macnab, R. M. 2001. Intergenic supression between the flagellar MS ring protein FliF of *Salmonella* and FlhA, a membrane component of its export aparatus. *J. Bacteriol.* **183**, 1655-1662.

Konkel, M. E., Klena, J. D., Rivera-Amill, V., Monteville, M. R., Biswas, D., Raphael, B., y Mickelson, J. 2004. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J. Bacteriol.* **186**, 3296-3303.

Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., y Lara-Tejero, M. 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurtum* type III secretion system. *Science.* **280**, 602-5.

Kubori, T., Yamaguchi, S., y Aizawa, S. -I. 1997. Assambly of the switch complex onto the Msring complex of *Salmonella typhimurtum* does not require any other flagellar proteins. *J. Bacteriol.* **179**, 813-817.

Kubori, T., Shimamoto, N., Yamaguchi, S., Namba, K., Aizawa, S-I. 1992. Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmenella typhimurtium*. *J. Mol. Biol.* **226**, 433-46.

Kuo, C. S., y Koshland, E. D. Jr. 1986. Sequence of the *flaA* (*cheC*) locus of *Escherichia coli* and discovery of a new gene. *J Bacteriol* **166**, 1007-1012.

Kutsukake, K. 1997. Hook-length control of the export-switching machinery involves a double-locked gate in *Salmonella typhimurtum* flagellar morphogenesis. *J. Bacteriol.* **179**, 1268-1273.

Kutsukake, K., y Iino, T. 1994. Role of the FliA-flgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar formation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**, 3598-3605.

Kutsukake, K., Ohya, Y., y Iino, T. 1990. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **172**, 741-47.

Lloyd, S. A., Tang, H., Wang, X., Billings, S., y Blair, D. F. 1996. Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: evidence of a direct role for FliG but not for FliM or FliN. *J. Bacteriol.* **178**, 223-231.

Mackenzie, C., Choundary, M., Larimer, F. W., Predki, P. F., Stilwagen, S., Armitage, J., Barber, R. D., Donohue, T. J., Hosler, J. P., Newman, J. E., Shapleigh, J. P., Sockett, R. E., Zeilstra-Ryalls, J., y Kaplan, S. 2001. The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Photosynthesis Research.* **70**, 19-41.

Macnab, R. M. 1992. Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu Rev. Genet.* **26**, 131-158.

Macnab, R. M. 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* **57**, 77-100.

Macnab, R.M. 1996. Flagella and motility. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd edn, pp. 123-145. Edited by F. C. Neidhardt, R Curtiss III, JL Ingraham, ECC Lin, KB Low. Washington, DC: ASM Press.

Madhusudan, C., Fu, X-Y., Mackenzie, C., y Kaplan, S. 2004. DNA sequence duplication in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. Evidence of an ancient partnership between chromosomes I and II. *J. Bacteriol.* **186**, 2019-2027.

Malakooti, J., Ely, B., y Matsumara, P. 1994. Molecular characterization, nucleotide sequence, and expresión of the *fliO*, *fliP*, *fliQ*, and *fliR* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**, 189-197.

Malakooti, J., Komeda, Y., y Matsumara, P. 1989. DNA sequense analisis, gene product identification, and localization of flagellar motor components of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**, 2728-2734.

Marykwas, D. N., Schmidt, S. A., y Berg, H. C. 1996. Interacting components of the flagellar motor of *Escherichia coli* revealed by the two-hybrid system in yeast. *J. Mol. Biol.* **256**, 564-576.

Mathews, A. A., Tang, H. L., y Blair D. F. 1998. Domain analysis of the FlhM protein of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 5580-5590.

Minamino, T., y Macnab, R. M. 1999. Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J. Bacteriol.* **181**, 1388-1394.

Minamino, T., y Namba, K. 2004. Self-assembly and type III protein export of bacterial flagellum. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**, 5-17

Mullis, K. B., y Faloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.

Pandza, S., Baetens, M., Park, C. H., Au, T., Keyhan, M., y Matin, A. 2000. The G-protein FlhF and general stress response induction in *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbio.* **36**, 414-423.

Patterson-Delafield, J., Martinez, R. J., Stocker, B. A., y Yamaguchi, S. 1973. A new fla gene in *Salmonella typhimurium*-flaR- and its mutant phenotype-superhooks. *Arch. Microbiol.* **90**(2), 107-120.

Poggio, S., Aguilar, C., Osorio, A., González-Pedrajo, B., Dreyfus, G., y Camarena, L. 2000. σ^{54} promoters control expression of genes encoding the hook and basal body complex in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **182**, 5787-5792.

Poggio, S., Osorio, A., Corkidi, G., Dreyfus, G., y Camarena, L. 2001. The N terminus of FliM is essential to promote flagellar rotation in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **183**, 3142-3148.

Poggio, S., Osorio, A., Dreyfus, G., y Camarena, L. 2002. The four different σ^{54} factors of *Rhodobacter sphaeroides* are not functionally interchangeable. *Mol. Microbiol.* **46**, 75-85.

Quandt Jürgen y Hynes F., Michael. 1993. Versatile suicide vectors, which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene* **127**, 15-21.

Raha, M., Sockett, H., y Macnab, R. M. 1994. Characterization of the *fliL* gene in the flagellar regulon of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**, 2308-2311.

Schoenhals, J.G., y Macnab M. R. 1999. FliL is a membrane-associated component of the flagellar basal body of *Salmonella*. *Microbiology* **145**, 1796-1775.

Segura, A., Duque, E., Hurtado, A., y Ramos L. J. 2001. Mutations in genes involved in the flagellar export apparatus of the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1 strain impair motility and lead to hypersensitivity to toluene shocks. *J Bacteriol* **183**, 4127-4133.

Simon, R., U. Priefer y A. Pühler. 1983. A broad host-range mobilization system for *in vivo* genetic engineering, transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology*. **1**, 778-785.

Sistrom, W. R. 1960. A requirement for sodium in the growth of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *J. Gen. Microbiol.* **22**, 778-785.

Snyder, L., y Champness, W. Molecular genetics of bacteria. Edit. ASM Press; 2nd edition; pp. 113-156. Washington, DC, USA. 2003.

Sockett, R. E., Foster, J. C. A. y Armitage, J. P. 1990. Molecular biology of the *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. *FEMS Symp.* **53**, 473-479.

Sockett, E. R., y Armitage, J. 1991. Isolation, characterization, and complementation of a paralyzed flagellar mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8. *J. Bacteriol.* **173**, 2786-2790.

Soutorina, O., Kolb, A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Rimsky, S., Danchin, A., y Bertin, P. 1999. Multiple control of the flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of HN-S protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhCD* master operon. *J. Bacteriol.* **181**, 7500-7508.

Staley, J. T., Bryant, M., Fennig, N., y Holt, J. Bergey's manual of systematic bacteriology. Edit. Williams and Wilkins; Vol. 3, pp. 1958-1672. 1989. USA.

Tang, H., y Blair, D. F. 1995. Regulated underexprsion of the FliM protein of *Escherichia coli* and evidence for a location in the flagellar motor distinct from the MotA/MotB torque generators. *J. Bacteriol.* **177**, 3485-3495.

Tang, H., Billings, S., Wang, X., Sharp, L., y Blair, D.F. 1995. Regulated underexprsion and overexpression of the FliN protein of *Escherichia coli* and evidence for an interaction between FliN and FliM in the flagellar motor. *J. Bacteriol.* **177**, 3496-3503.

Tang, H., Braun, T. F., y Blair, D. F. 1996. Motility protein complex in the bacterial flagellar motor. *J. Bacteriol.* **177**, 3496-3503.

Thomas, D., Morgan, D. G., y DeRosier, D. J. 2001. Structures of bacterial flagellar motors from two FliF-FliG gene fusion mutants. *J. Bacteriol.* **183**, 6404-6412.

Toguchi, A., Siano, M., Burkart, M., y Harshey, R. 2000. Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **182**, 6308-6321.

Toker, A. S., Kihara, M., y Macnab, M. R. 1996. Deletion analysis of the FliM flagellar switch protein of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **178**, 7069-7079.

Toker, S. A., y Macnab, M. R. 1997. Distinct regions of bacterial flagellar switch rprotein FliM interact with FliG, FliN and CheY. *J. Mol. Biol.* **273**, 623-634.

Tylor, L. B., Zhulin, B. I., y Johnson, S. M. 1999. Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 103-28.

Vieira, J., y Messing, J. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene.* **19**, 259().

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

Wieslander, L. 1979. A simple method for recover intact high molecular weight RNA and DNA after electrophoretic separation in low gelling temperature agarose gels. *Anal. Biochem.* **98**, 305-309.

Yamaguchi, S., Fujita, H., Ishihara, A., Aizawa-I, S. y Macnab, R. M. 1986. Subdivision of flagellar genes of *Salmonella typhimurium* into regions responsible for assembly, rotation and switching. *J. Bacteriol.* **166**, 187-193.