



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL
COMPLEJO GANCHO CUERPO BASAL EN
LA BACTERIA MARINA *VIBRIO SHILONII*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
Y A E L G O N Z Á L E Z T I N O C O



Tutor: DR. GEORGES DREYFUS CORTÉS

MÉXICO, D. F.

Septiembre 2009



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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Georges Dreyfus Cortés en el Departamento de Genética Molecular, laboratorio 222 edificio norte, del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Georges Dreyfus Cortés	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Laura Camarena Mejía	Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Marina Gavilanez Ruíz	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Guillermo Mendoza Hernández, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de secuenciación de proteínas.

Se reconoce la asesoría técnica del Q. Francisco Javier de la Mora y la QFB. Teresa Vallado en los experimentos de purificación, análisis y cuantificación de proteínas.

Se reconoce la asesoría de la Dra. Araceli Patrón, la Biol. Rosa María Picaso Hernández y el Med. Cir. Rodolfo Paredes Días de la Unidad de Microscopía del IFC, UNAM en las técnicas de microscopía electrónica de transmisión.

Se reconoce el trabajo del auxiliar de laboratorio Sr. Bernardo Castillo en el mantenimiento y limpieza del laboratorio y su equipo.

El proyecto fue apoyado por CONACYT (IN218902-13). Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT (205598) para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marina Gavilanes Ruíz	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dra. Bertha González Pedrajo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. María del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Victor Manuel Luna Pabello	Facultad de Química, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por haberme permitido continuar con mis estudios en el posgrado.

Al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por alojarme durante estos años de trabajo, a mi tutor, el Dr. Georges Dreyfus por compartirme de su valiosa experiencia y conocimiento, así como a la Dra. Laura Camarena y a la Dra. Marina Gavilanes por toda su paciencia y consejo.

Muy especialmente a mi madre, la licenciada María de Rosario González Tinoco quien siempre tuvo fe en mi y me impulsó desde el principio para terminar este proyecto.

A mi novia Aurea Xaydé Esquivel Flores y a su familia por su incondicional apoyo y las lecciones de vida.

A los técnicos académicos el Q. Francisco Javier de al Mora y la QFB. Teresa Vallado por su disposición e incansable labor de asesoramiento y ayuda.

A los compañeros de laboratorio que tienen grillete de varios años como Ana Martínez y a los que estuvieron de paso por algún tiempo pero cuyas intervenciones fueron cruciales como los estudiantes de IBB Daniela Venegas y Aldo García. Asimismo a los alumnos del curso de Biología de Procariontes de la Facultad de Ciencias, semestre 2010-I, David, Lulú y Aura; pues ellos me recordaron mis orígenes en la facultad, el valor de los estudiantes como semilla para el futuro y reafirmaron mi vocación para la docencia.

A mis maestros Juan Carlos Orozco y Camilo Esquivel así como a mis compañeros del grupo Viveros de Haidong Gumdo y del grupo Tagalog de Kali Eskrima quienes me enseñaron a no rendirme nunca, a levantarme siempre y a pelear con honor.

Y a todos aquellos quienes de algún modo u otro me ayudaron a llegar hasta este punto, les agradezco; se que son muchos y estas hojas no son espacio suficiente para tal listado, pero que sepan que tienen igual mérito.

A todos, muchas gracias.

“Now see my wings of war!
The battle's confronting me
And for me... the battle has started again

The battle has started again...!!!”

Lost Horizon. The Kingdom Of My Will.

“Hay dudas que nos mutilan
hay deudas del corazón,
hay días que nos estorban,
hay dioses que van de dios.
Pero hay voces que no callan
si las sabes escuchar
son los gritos de tu gente
que te animan a luchar.”

Ars Amandi. En Tierra Firme.

Tabla de contenido

1. Introducción.	1
2. Antecedentes del flagelo bacteriano.	4
Estructura del flagelo polar en Vibrionaceas.	7
Ensamblaje y regulación de la biogénesis flagelar.	11
Funcionamiento del motor flagelar.	14
3. Hipótesis.	17
4. Objetivo general.	17
Objetivos particulares.	17
5. Materiales y Métodos.	17
6. Resultados.	21
7. Discusión.	28
8. Conclusiones y perspectivas.	32
Apéndice	33
Bibliografía.	34

Resumen

El flagelo bacteriano es un mecanismo de motilidad ampliamente usado entre los organismos procariontes, constituye una ventaja adaptativa y es muy importante tanto para la colonización de nichos como para la patogénesis. Cada uno de estos organelos es un heteromultímero formado por más de 25 proteínas dividido en tres secciones: filamento, gancho y cuerpo basal.

El filamento es una estructura extracelular, tubular y hueca formada por monómeros de una proteína conocida como flagelina. El gancho, la segunda estructura extracelular, presenta una forma curva y su función es la de proporcionar una unión flexible entre el filamento y el cuerpo basal. El cuerpo basal es la tercera sección del flagelo, forma parte del complejo del motor, su localización es intracelular y está formado por tres anillos y un eje. Los anillos, que rodean y proporcionan apoyo al eje, se encuentran asociados con las diferentes capas de la envoltura celular.

Se sabe que en bacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* un flujo de protones (H^+) está acoplado a la rotación de sus múltiples flagelos mientras que en las bacterias marinas como *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus* o *Vibrio parahaemolyticus* el torque en el flagelo polar depende de un flujo de iones sodio (Na^+). Se ha observado en estas bacterias, que la presencia de las proteínas MotX y MotY es necesaria para la rotación flagelar.

Vibrio shilonii es el modelo más estudiado de patogénesis en corales, pero poco se conoce sobre la biología y el sistema de motilidad de esta bacteria. La mayoría de los estudios sobre sistemas flagelares en el género *Vibrio* se ha enfocado en el filamento y la información disponible sobre la estructura del cuerpo basal es escasa. Dentro de estos pocos reportes existentes se han encontrado ciertas diferencias en la morfología del complejo que varían con la especie. En este trabajo se purificaron los cuerpos basales de la bacteria marina *Vibrio shilonii* y se demostró que su estructura es diferente a aquellas reportadas con anterioridad para otras especies dentro del género *Vibrio*.

1. Introducción.

La bacteria marina *Vibrio shilonii* es actualmente el modelo más estudiado de patogénesis en corales (58), pero se conoce poco sobre la biología de este organismo. Se aisló por primera vez en 1996 de corales blanqueados en la costa israelí del mar Mediterráneo, la cepa AK-1 fue descrita de manera morfológica y bioquímica. Sus células son bacilos ($2.4 \times 1.6 \mu\text{m}$) Gram-negativos, no formadores de esporas, móviles mediante un flagelo polar único envuelto por una extensión de la membrana plasmática externa que la célula utiliza para el nado en medio líquido (Fig. 1). Es capaz de formar colonias de color amarillo en medio selectivo para *vibrio* agar TCBS (sales biliares, tiosulfato y citrato) y es sensible al agente *vibrio* estático O129 (2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina). Después de 12 hrs. de incubación a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ en medio “Marine Broth” 3.7% adicionado con 1.5% de agar, se obtienen colonias translúcidas de manera ligera, de color blanco pálido, con forma redonda definida y no luminiscentes. El crecimiento óptimo se logra con una concentración final de NaCl al 2%. Debido a estas y otras características, la cepa AK-1 fue clasificada dentro de la clase γ -proteobacteria, orden *Vibrionales*, familia *Vibrionaceae*, género *Vibrio* (36). El perfil de ácidos grasos y la comparación de secuencias del DNA ribosomal de la subunidad 16S con otros miembros del género, señalaron a la cepa AK-1 como una especie nueva (Fig. 2), a la cual le fue dado el nombre de *Vibrio shiloi* (34) en reconocimiento al microbiólogo Moshe Shilo, pionero de la ecología microbiana en Israel. Ese mismo año, se hizo una corrección en la cual el nombre fue cambiado a *Vibrio shilonii* (22).

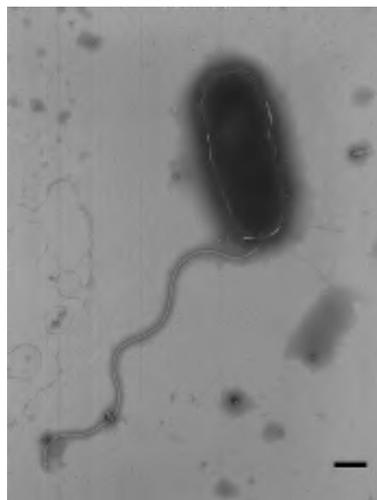


Figura 1. Micrografía electrónica de una célula completa de *V. shilonii* en medio líquido. Acetato de uranilo al 2% fue usado como material de contraste. Magnificación $\times 12,000$ a una aceleración de voltaje equivalente a 70 kV. Tomada en la Unidad de Microscopía Electrónica del IFC, UNAM. Barra = 500 nm.

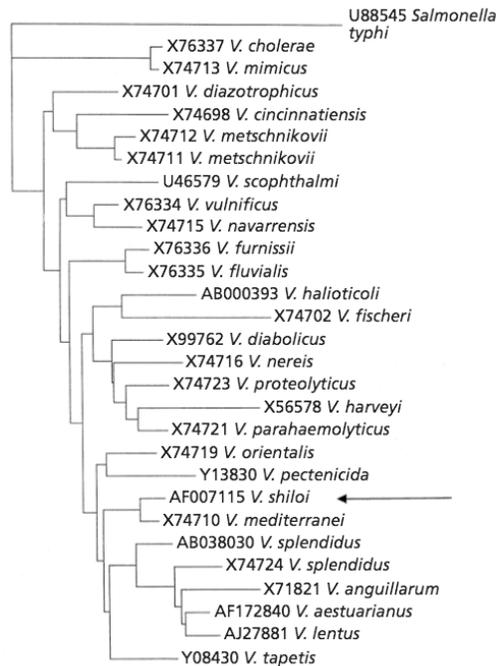


Figura 2. Árbol filogenético basado en las secuencias del DNA ribosomal de la subunidad 16S que muestra el parentesco entre 27 cepas de referencia del género *Vibrio* y la cepa AK-1 (señalada con una flecha). *Salmonella enterica* Typhi se usó como grupo externo. Tomado de la referencia (34).

De acuerdo con los resultados obtenidos al aplicar los postulados de Koch, se ha señalado a *Vibrio shilonii* como el agente causal del blanqueamiento en los corales de la especie *Oculina patagonica* –phylum *Cnidaria*, clase *Anthosoa*, orden *Scleractinia*- (Fig. 3). Durante estas pruebas, la cepa AK-1 de *Vibrio shilonii* fue aislada de las muestras provenientes de corales blanqueados, pero no fue hallada en aquellas de corales sanos (no blanqueados); se obtuvo en cultivo puro y se usó para infectar un grupo de corales sanos bajo condiciones controladas. A 26 °C un inóculo de 120 células por mililitro causó pérdida total de la pigmentación al 60 % del grupo experimental, mientras que no hubo efecto en aquellos grupos donde *Vibrio shilonii* no fuera inoculado o donde se agregara un antibiótico junto con las células. Cortes histológicos realizados tanto en tejidos infectados como sanos, mostraron una reducción del 70 al 90% en la densidad poblacional de las microalgas endosimbiontes (35, 36). Dicho de otro modo, el blanqueamiento de los corales por infección de *Vibrio shilonii*, se debe a que se destruye la relación simbiótica entre el hospedero y sus dinoflagelados fotosintéticos, que en conjunto son llamados *Zooxanthellae*.

De manera más detallada, la lisis de las microalgas (*zooxanthellae*) es el resultado de un proceso infectivo durante el cual se observan cinco diferentes pasos: 1) La bacteria se adhiere a un receptor (generalmente un polisacárido) en la mucosa del epitelio coralino; este receptor contiene



Figura 3. Efecto de blanqueamiento en los corales de la especie *Oculina patagonica* causado por *Vibrio shilonii*. En la mitad izquierda de la foto las algas endosimbiontes se encuentran aun presentes dentro del tejido del coral, por lo que este mantiene su color; en la mitad derecha, la infección por *V. shilonii* ha terminado por lisar a las algas y el tejido pierde su coloración. Tomado de la referencia (58).

grupos β -galactopiranosidos. 2) Penetra en la epidermis del animal. 3) Pierde el flagelo polar y se diferencia en forma de coco hacia un estado viable no cultivable (VNC). 4) Se replica de manera intracelular hasta alcanzar un número de 10^8 bacterias por cm^3 de tejido coralino. 5) Produce y secreta al medio un péptido de doce residuos, rico en prolina, denominado toxina P capaz de inhibir la fotosíntesis y lisar a las microalgas. El resultado de estos sucesos se traduce en una pérdida de hasta el 63% del abastecimiento de nutrientes para el coral, lo cual termina de manera irremediable en la muerte de la colonia (5-7).

Evidencia recabada mediante observación anual señala que la infección es dependiente de la temperatura, ya que el efecto de blanqueo en el arrecife se agudiza durante la estación cálida (Fig. 4). Por lo tanto, el actual incremento en la temperatura global, podría causar un aumento progresivo en el blanqueamiento de las poblaciones coralinas, lo cual representa un daño irreversible a la constitución del arrecife, cuyas últimas consecuencias son de gran importancia ecológica y económica. Bajo condiciones controladas, usando corales dentro de acuarios a diferentes temperaturas, se observó que el blanqueamiento ocurre de un modo acelerado a $29\text{ }^\circ\text{C}$, a $25\text{ }^\circ\text{C}$ es más lento y por debajo de los $20\text{ }^\circ\text{C}$ no hay blanqueamiento -incluso con un gran inóculo de células de *V. shilonii*-. Esto podría deberse a que ciertos factores de virulencia en la bacteria son activos sólo durante la estación cálida. Por otro lado, durante la estación fría, la presencia de *V. shilonii* se detectó

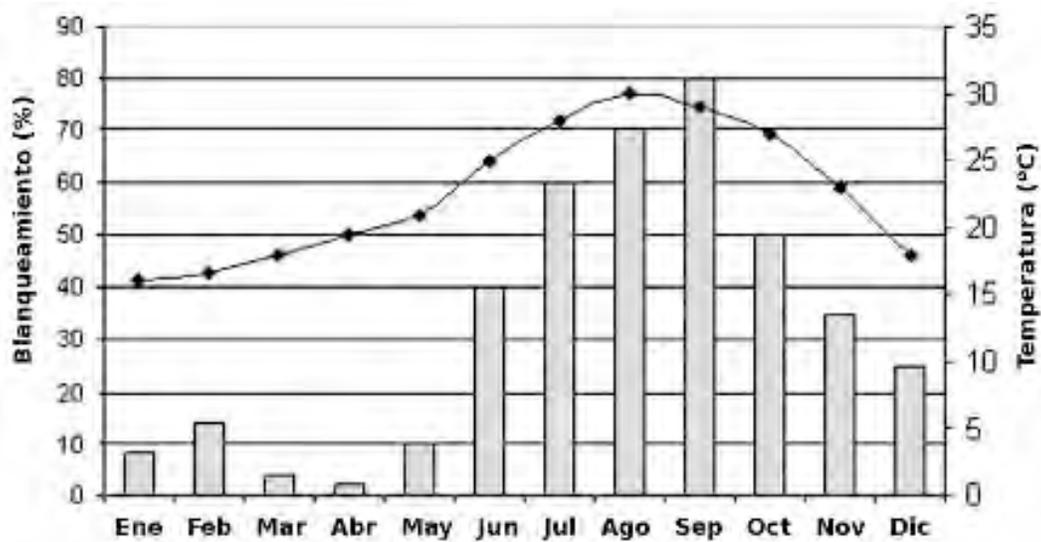


Figura 4. Patrón anual de blanqueo del coral *Oculina patagonica* en las costas mediterráneas de Israel desde 1995 hasta el 2003. Valor promedio mensual de la temperatura (♦) y porcentaje de superficie blanqueada (barras). Modificado de la referencia (58).

en el gusano de fuego de la especie *Hermodice carunculata* (Fig. 5). Gusanos traídos directamente del arrecife, pueden contener entre 0.6 y 2.9×10^8 células de *V. shilonii* por individuo. Cuando los gusanos infectados se ponen en contacto con los corales, estos últimos se blanquean en un lapso de 17 días; por otro lado, al colocar gusanos no infectados en presencia de corales sanos, el blanqueamiento no ocurre. Esta evidencia sugiere de manera importante que el gusano de fuego *H. carunculata* no sólo es el reservorio de invierno para *V. shilonii*, sino también un vector de transmisión (58).

2. Antecedentes del flagelo bacteriano.

El flagelo bacteriano es el organelo encargado de la motilidad de las células en su medio. La motilidad celular o nado, se basa en el movimiento rotatorio del filamento flagelar que funciona como una propela. Especies del género *Vibrio* –bacterias gram-negativas pertenecientes al grupo de las γ -proteobacterias– como *V. alginolyticus*, se desplazan a velocidades que van de 116 hasta 210 $\mu\text{m/s}$ en medio líquido; esto es equivalente a una tasa de rotación de 1,700 rps en 300 mM de NaCl a 35 °C mientras que *E. coli* alcanza una velocidad de 40 $\mu\text{m/s}$ la cual es equivalente a una tasa de rotación de 300 rps (42, 68). Los flagelos bacterianos pueden tener arreglos distintos dependiendo de los grupos (Fig. 6). Las espiroquetas, por ejemplo, poseen un flagelo intracelular periplásmico que les da su forma característica además de facilitarles el tráfico por medios de alta densidad (51). En las bacterias del género *Vibrio*, existe un flagelo polar único recubierto por lo que parece ser una extensión de la membrana celular externa; este arreglo flagelar con un filamento único se denomina monotrico. Un caso particular dentro del género es el de *Vibrio fischeri*, que presenta entre 2 y 8 flagelos polares en un arreglo llamado lofotrico, (2, 52) donde los múltiples filamentos se hallan concentrados sólo en un polo del cuerpo celular. *Campylobacter jejuni* y *Rhodospirillum rubrum* son ejemplos de un arreglo flagelar llamado anfotrico en el cual se halla un filamento en cada polo del cuerpo celular; las



Figura 5. Gusano de fuego *Hermodice carunculata*, reservorio de invierno y posible vector de transmisión para *V. shilonii*. Tomado de la referencia (58).

bacterias entéricas, como *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*, presentan múltiples flagelos desnudos distribuidos por toda la superficie celular en un arreglo llamado peritrico. Algunas

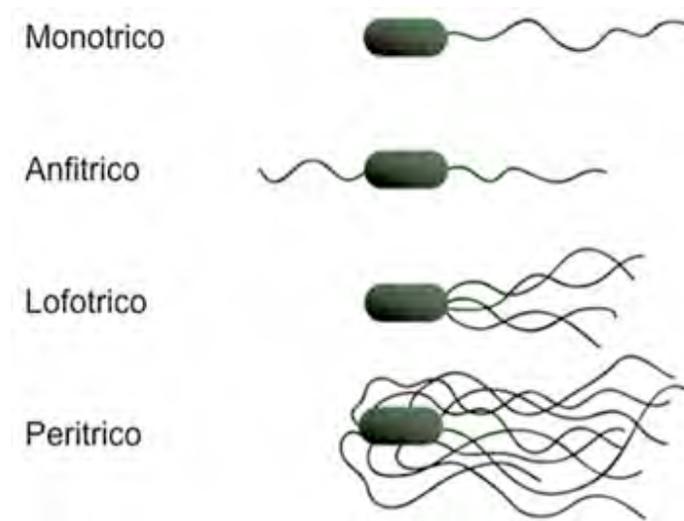


Figura 6. Diversos patrones de flagelación en bacterias gram-negativas. Arreglo monotrico, flagelo polar único como en las especies del género *Vibrio*; arreglo anfotrico, un filamento en cada polo del cuerpo celular como se observa en *Campylobacter jejuni*. Arreglo lofotrico, varios filamentos polares como el caso de *Vibrio fischeri* y el arreglo peritrico, múltiples flagelos alrededor del cuerpo celular, como los que se hallan en *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*.

especies como *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. harveyi* además del flagelo polar, presentan un conjunto de flagelos múltiples con arreglo del tipo peritrico (2), el cual ocurre sólo bajo ciertas condiciones. En medio líquido predomina el flagelo polar único, de naturaleza constitutiva, el cual se emplea durante el nado, sin embargo bajo situaciones en que el medio es más denso, se induce la flagelación múltiple y lleva a cabo un tipo de desplazamiento denominado como “swarming”. Estos filamentos desnudos se conocen como flagelos laterales y están constituidos por monómeros de la proteína LafA, la cual tiene una masa molecular de 30 kDa (45). Los alineamientos por BLAST para LafA de *V. parahaemolyticus*, contra las bases de datos de genomas ya secuenciados en varias especies del género *Vibrio*, mostraron que dicha proteína está presente en *V. shilonii* (número de acceso 149189854). Experimentos de nado con diversas concentraciones de agar y observaciones bajo el microscopio electrónico realizados por la estudiante de licenciatura en Investigación Biomédica Básica (IBB) Daniela Venegas en el laboratorio del Dr. G. Dreyfus (Instituto de Fisiología Celular, UNAM), demostraron que *V. shilonii* cuenta en efecto con un sistema de flagelos laterales dependiente de la densidad del medio (Fig. 7). En la Tabla 1 se muestran los patrones de flagelación para algunas especies del género *Vibrio*.

Tabla 1. Patrón de flagelación en varias especies del género *Vibrio*.

Organismo	Arreglo de flagelos polares	Presencia de la proteína LafA	
<i>V. alginolyticus</i>	Monotrico	283 aa	29.6 kDa
<i>V. anguillarum</i>	Monotrico		n e
<i>V. cholerae</i>	Monotrico		n e
<i>V. fischeri</i>	Lofotrico		n e
<i>V. harveyi</i>	Monotrico	289 aa	29.9 kDa
<i>V. parahaemolyticus</i>	Monotrico	284 aa	29.6 kDa
<i>V. shilonii</i> *	Monotrico	288 aa	29.9 kDa
<i>V. vulnificus</i>	Monotrico		n e

Nota. Modificado de la referencia (48) y (46). aa= aminoácidos. kDa = Kilodaltones. n e = no encontrado. * Resultado de la estudiante de IBB Daniela Venegas aún en redacción.

La motilidad tiene un papel tan importante en la invasión y colonización del hospedero que el flagelo se considera como un factor de virulencia. En cepas mutantes de *V. anguillarum* que presentan un flagelo polar intacto pero incapaz de rotar, se observa una disminución en la virulencia debido a que resulta imposible para las bacterias atravesar el recubrimiento de células epiteliales del hospedero (55). Asimismo, se sabe que los flagelos polares también participan en

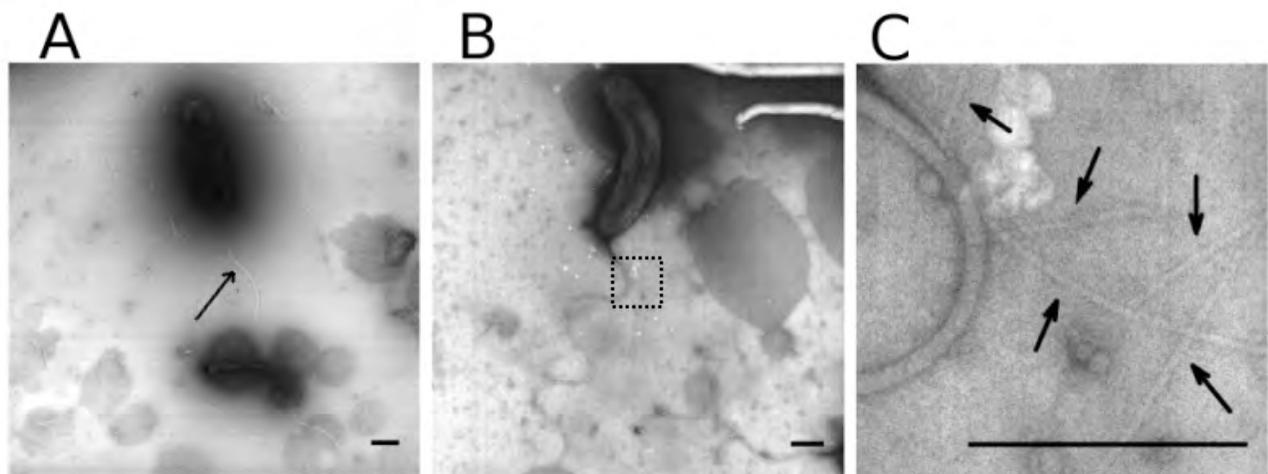


Figura 7. Motilidad en *V. shilonii* bajo diferentes condiciones ambientales. Panel A) Agar 0.4 % en el cual predomina el flagelo polar único. Panel B) Agar 0.6 % en el cual aparecen los flagelos laterales junto con el flagelo polar. Panel C) Ampliación del recuadro en B donde las flechas negras señalan a los flagelos laterales. Barra = 500 nm. Micrografías tomadas por Daniela Venegas, Unidad de Microscopia Electrónica, UNAM. 2008. Aceleración de voltaje equivalente a 70 kV.

la adherencia. Se ha observado en células de *V. vulnificus*, que la unión de las bacterias a las superficies mediante el flagelo, ayuda a la formación de biopelículas, lo cual no ocurre en cepas mutantes carentes de esta estructura (39). De igual modo en *V. alginolyticus*, un patógeno

considerado como letal para peces y agente causal de gastroenteritis en consumidores humanos, se ha detectado que la eliminación del gen *luxS*, involucrado en la comunicación interespecies por autoinductor del tipo 2 (AI-2), exhibe una virulencia disminuida en un modelo de pez debido a que dicha mutante se ve imposibilitada para ensamblar un flagelo polar (62).

Estructura del flagelo polar en *Vibrionaceas*.

Cada flagelo bacteriano es una compleja estructura integrada por más de 25 diferentes proteínas, dividida en tres secciones: filamento, gancho y cuerpo basal (Fig. 8). El filamento es una estructura extracelular de forma tubular, hueca, de entre 10 y 15 nm de ancho por casi 4000 nm de largo y está construida a partir de monómeros de una proteína conocida como flagelina; cada filamento puede contener hasta 20,000 subunidades de flagelina (23). En las especies del género *Vibrio*, el filamento polar es un heteropolímero constituido por 4 a 6 diferentes tipos de flagelinas; el número de estas flagelinas varía de acuerdo con la especie y su masa molecular oscila entre los 44.5 y 45.5 kDa. Todas las flagelinas están presentes en el filamento de manera simultánea y algunas se hallan en mayor proporción que otras (45, 46). De manera general, se sabe que las diferentes flagelinas tienen un papel estructural dentro del filamento, de modo tal, que al remover cualquiera de ellas no se obtiene un efecto evidente sobre la constitución del flagelo o la motilidad y en consecuencia, ninguna es indispensable; sin embargo, también se conoce la existencia de flagelinas con ciertas cualidades adicionales. En *V. parahaemolyticus* se ha observado que la eliminación del gen *flaC*, que codifica para una flagelina polar, produce flagelos laterales en medio líquido (43); de modo similar, interrupciones del homólogo de *flaC*, *flaA* en *V. cholerae* (30) y *V. anguillarum* (50), generan un fenotipo fla^- (sin filamento) o de virulencia disminuida respectivamente. En la Tabla 2 se muestra el número de genes que codifican para flagelina polar encontrados dentro del genoma de algunas especies del género *Vibrio*.

El flagelo polar está envuelto por lo que se ha sido descrito como una extensión de la membrana externa (2, 16); dicha característica incluye también a *Bdellovibrio bacteriovorus* y *Helicobacter pylori*. La cubierta membranal incrementa el grosor del filamento polar en un 50% llevándolo hasta un diámetro de 30 a 35 nm; aunque su función no es del todo clara, trabajos con *V. cholerae* (67) han postulado que la cubierta membranal podría actuar como camuflaje frente al

Tabla 2. Genes que codifican para las flagelinas presentes en los filamentos polares de algunas especies del género *Vibrio*.

Organismo	No. de genes que codifican para flagelina polar.
<i>V. anguillarum</i>	5
<i>V. cholerae</i>	5
<i>V. fischeri</i>	6
<i>V. parahaemolyticus</i>	6
<i>V. shilonii</i>	4
<i>V. vulnificus</i>	6

Nota. Modificado de referencia (48).

sistema inmune del hospedero, al reducir el potencial antigénico de las flagelinas. En el extremo distal del filamento se halla una cubierta formada por la proteína FlaH (48) (homóloga de la proteína FliD en *E. coli*), también conocida como HAP 2 (por sus siglas en inglés “**H**ook **A**ssociated **P**rotein”), la cual está involucrada en la polimerización de la flagelina; en *E. coli* esta cubierta esta formada por 5 subunidades de FliD (23). El filamento se encuentra unido a la segunda estructura extracelular, el gancho, mediante las proteínas accesorias FlgK (HAP 1) y FlgL (HAP 3) (48); se ha estimado un número de 11 subunidades para cada una de estas proteínas de unión (23). El gancho como su nombre lo indica presenta una forma curva y su función es proporcionar una unión flexible entre el filamento y el cuerpo basal; el gancho está formado por 126 a 132 subunidades (23, 60) de la proteína FlgE. El cuerpo basal, la tercera sección del flagelo, se localiza en el interior de la célula y está integrado por tres anillos y un eje (40). Los anillos se denominan de acuerdo a su asociación con las diferentes capas de la envoltura celular: el anillo MS recibe su nombre debido a que su región inferior se encuentra embebida en la membrana plasmática y la región que se encuentra mirando al periplasma es supramembranal; el anillo MS está constituido por la proteína FliF y actúa como base para el eje. El anillo P se encuentra en el periplasma, su nombre deriva de la asociación que tiene con las moléculas de peptidoglicano constituyentes de la pared celular; está formado a partir de la proteína FlgI. El anillo L es el más distal de los componentes del cuerpo basal, se halla embebido en la membrana de lipopolisacáridos o membrana externa (característica del grupo de las bacterias Gram-negativas) y FlgH es la proteína que lo integra. Se ha observado que la estequiometría de los anillos MS, L y P es de 26 subunidades cada uno (23, 60). Los anillos rodean y dan soporte a un

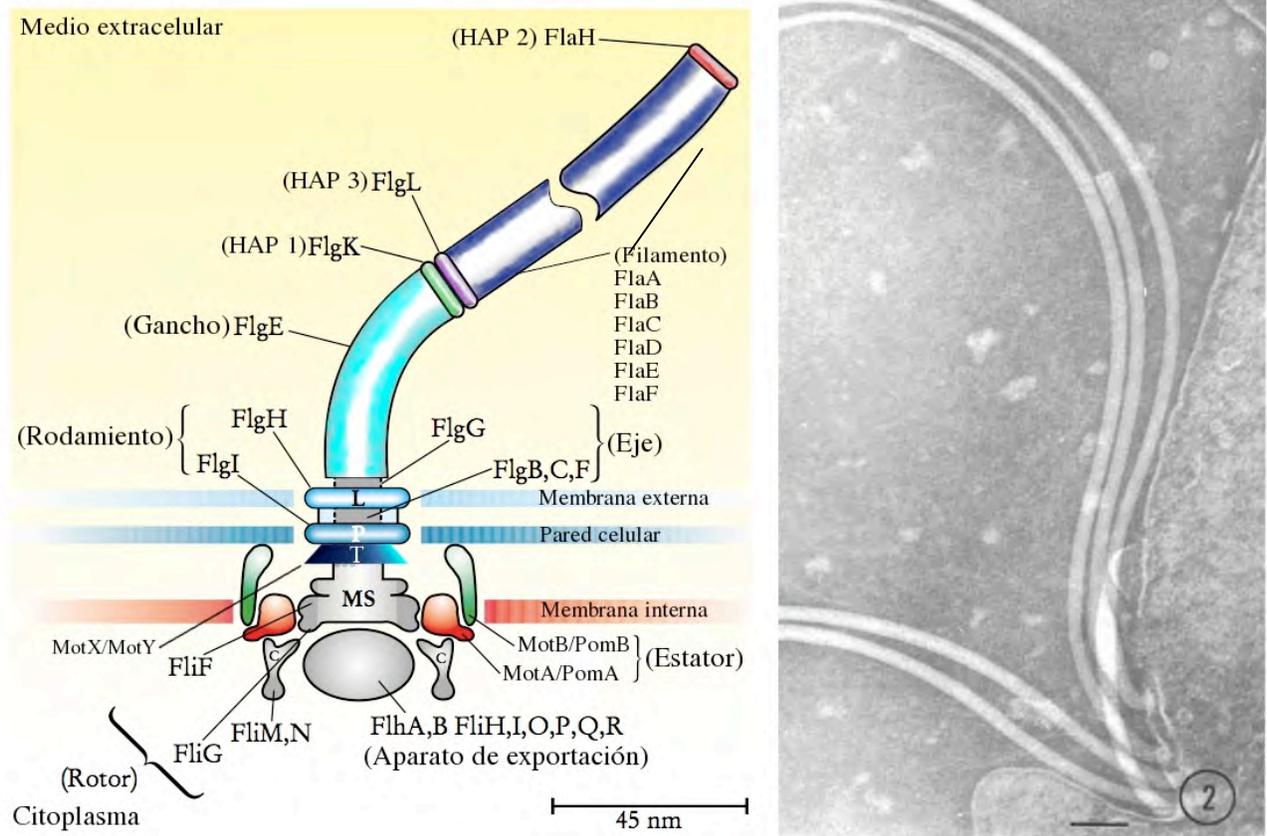


Figura 8. Localización de las tres secciones principales del flagelo polar. En el panel de la izquierda, se muestra un esquema del flagelo polar completo. El filamento, armado por las diferentes flagelinas (FlaA hasta FlaF), está unido al gancho mediante las proteínas accesorias FlgK (HAP 1) y FlgL (HAP 3); en el extremo distal de filamento, se halla una tapa constituida por la proteína FlaH (HAP 2), la cual está involucrada en la polimerización de las flagelinas y la elongación del flagelo. El gancho formado por la proteína FlgE, es el intermediario flexible entre el filamento y el cuerpo basal. La región intracelular del flagelo, el cuerpo basal, esta formada por los anillos MS, L y P los cuales proporcionan soporte a un eje. En las *Vibrionaceas*, las proteínas accesorias del motor de Na⁺, MotX y MotY forman un cuarto anillo, el anillo T (61). Asociados al anillo MS, en la parte inferior del cuerpo basal, están el anillo C o “switch” flagelar y el aparato de exportación. El panel izquierdo fue modificado de la referencia (8). El panel derecho muestra una micrografía de los flagelos en arreglo lofotrópico de *V. fischeri* en los cuales se observa el núcleo de flagelina envuelto por un recubrimiento de membrana (2).

eje cuya porción proximal (la más cercana al anillo MS) está formada por las proteínas FlgB, FlgC y FlgF; cada una de estas proteínas presenta una estequiometría de 6 subunidades (23). La porción distal del eje (la más alejada del anillo MS) sobre la cual se monta el gancho, se encuentra constituida por la proteína FlgG presente en 26 subunidades (23). El eje se acopla al anillo MS mediante la proteína de unión FliE (48). La masa molecular del cuerpo basal en *E. coli*, se ha estimado en 4400 kDa (60). Dentro del cuerpo basal de las bacterias del genero *Vibrio* se encuentra un cuarto anillo denominado anillo T (61) el cual está formado por las proteínas accesorias MotX y MotY y se localiza debajo del anillo P en el espacio periplásmico. MotX es una proteína de 28 kDa (47) involucrada en la localización del estator mediante la interacción con

la proteína PomB (54) y no es estable en ausencia de MotY (33); por otro lado MotY tiene una masa molecular de 32 kDa y en su estructura se han identificado dos dominios: una región C-terminal semejante a los dominios de proteínas como PomB y MotB con capacidad de unión a peptidoglicano (54) y una región N-terminal que interactúa con el cuerpo basal en un punto desconocido y estabiliza a MotX (33). Aunque la función de estas proteínas no es del todo clara, se sabe que en ausencia de MotX o MotY el estator no se ubica en torno al rotor y se produce un fenotipo paralizado (*mot-*) (48, 61). De manera general, el cuerpo basal es una estructura pasiva que recibe el torque del motor para transmitirlo al gancho y luego al filamento. El motor flagelar opera mediante un mecanismo rotatorio reversible y está dividido en dos secciones: el rotor y el estator. El rotor es una estructura en forma de campana llamada anillo C (por mirar hacia el citoplasma) el cual está conformado por las proteínas FliG, FliM y FliN (9, 17) e interactúa con la parte inferior del anillo MS; el anillo C es también conocido como el complejo del “switch” flagelar debido a que está asociado con el cambio de dirección en la rotación (65). La función de FliN aun no es clara (40). El estator es el elemento fijo del motor y está formado por varios complejos de las proteínas MotA y MotB que rodean al anillo C e interactúan con FliG para generar la rotación; el número estimado de complejos es de 10 unidades (26, 66). Dentro del género *Vibrio*, el estator del flagelo polar está constituido por las proteínas homologas a MotA y MotB, que son PomA y PomB (por sus siglas en inglés “polar flagellum motility”) (3, 48, 68). PomA tiene cuatro segmentos transmembranales y una asa citoplásmica mientras que PomB presenta sólo un cruce transmembranal en el extremo amino y un dominio de unión a peptidoglicano en el extremo carboxilo (3, 66). Ambas proteínas interactúan entre sí para formar un complejo compuesto por cuatro subunidades de PomA y dos subunidades de PomB ($PomA_4/PomB_2$) que funciona como un canal para el ion Na^+ ; es necesaria la presencia de ambas proteínas para que ocurra la translocación de iones (59, 66, 68, 70). Se sugiere que este complejo es la unidad funcional del estator (26, 59).

Ensamblaje y regulación de la biogénesis flagelar.

Debido a que el ensamblaje y funcionamiento del flagelo polar son costosos en términos de energía, es necesario un control estricto de la biogénesis (49). La construcción del flagelo polar tiene una organización jerárquica bajo la cual la expresión y la producción de proteínas estructurales y reguladoras, están regidas por puntos de control de un modo tal que el ensamblaje

de un segmento no puede iniciar sino hasta que el segmento previo ha sido terminado (8, 40) (Fig. 9). El flagelo polar de las bacterias *Vibrionaceas* requiere de dos factores de transcripción, la proteína RpoN (factor σ^{54}) para los genes tempranos (25, 28, 31) y la proteína FliA (factor σ^{28}) para los genes tardíos (28, 44, 57). En *V. cholerae* la cascada de síntesis flagelar incluye 4 clases de genes y comienza con la transcripción del activador maestro Clase I *flrA*, cuyo producto se une al factor de transcripción σ^{54} para activar los genes de clase II. Aunque las señales que inician la transcripción de *FlrA* aun no son del todo claras, se piensa que hay una relación entre el ciclo celular y la síntesis flagelar, esto debido a que el flagelo polar es constitutivo y está presente en todo momento durante la vida libre de la bacteria (57). Los genes dentro de la Clase II codifican para el anillo MS, el anillo C o “switch” flagelar, el aparato de exportación y los factores reguladores *FlrB*, *FlrC* y *FliA* (σ^{28}); estos elementos son los primeros en sintetizarse dentro de la jerarquía debido a que el flagelo se ensambla desde dentro hacia fuera de la célula. Cuando el ensamblaje del anillo MS, el anillo C y el aparato de exportación concluye, el sistema de dos componentes *FlrB/FlrC* se activa; la cinasa sensora de histidina *FlrB* transfiere un grupo fosfato a un residuo de aspartato conservado en el extremo amino terminal del regulador de respuesta *FlrC* el cual a su vez inicia la transcripción –dependiente de σ^{54} - de los genes de clase III (12). Dentro del grupo de genes Clase III están los que codifican para el cuerpo basal, una flagelina mayoritaria o principal *FlaA*, la tapa del filamento *FliD* (HAP 2) y el componente del motor , *MotY*. La transcripción de los genes de Clase IV es dependiente de *FliA* (factor σ^{28}); dentro de este grupo están los genes que codifican para las flagelinas adicionales (*FlaBCDE*), el regulador negativo *FlgM* (factor anti- σ^{28}), los componentes finales del motor, *MotX*, *PomA* y *PomB* así como para las proteínas encargadas de la quimiotaxis. Al mismo tiempo que se inicia la activación de los genes clase III por el sistema de dos componentes *FlrB/FlrC*, el factor *FliA* – que es una proteína de Clase II- inicia la síntesis de proteínas pertenecientes a la Clase IV como se mencionó antes. Entre estas proteínas está el factor anti- σ^{28} o *FlgM* cuya función es la de secuestrar al factor σ^{28} a modo de un asa de regulación negativa hasta que el cuerpo basal y el gancho estén terminados (11). Una vez que el complejo del gancho y el cuerpo basal se completa, el aparato de exportación secreta a *FlgM* al medio extracelular dejando a *FliA* libre para iniciar la transcripción de los genes de Clase IV (11, 57). De manera general el esquema de la cascada de síntesis flagelar en *V. cholerae* es muy similar al de *V. parahaemolyticus*, pero tiene algunas variables. *V. parahaemolyticus* presenta una cascada de tres clases: temprana, intermedia y tardía

(44). En la clase temprana se encuentran el regulador maestro FlaK (homólogo de FlrA en *V. cholerae*) y los factores reguladores FlaL y FlaM (homólogos de FlrB y FlrC respectivamente) (48). En la clase intermedia se encuentran los genes que codifican para el anillo MS, el “switch” flagelar, el aparato de exportación, el gancho, el cuerpo basal, las proteínas de unión HAP 1 y HAP 3, la proteína accesoria del motor MotY, las proteínas para quimiotaxis CheZABW además de las proteínas reguladoras FlhF, FlhG y FliA (σ^{28}). Por último, la clase tardía, está integrada por los genes del motor flagelar PomA y PomB, la proteína accesoria MotX, algunas chaperonas como FlgN, seis diferentes flagelinas, las proteínas para quimiotaxis CheV y CheR y el factor anti- σ^{28} , FlgM. La clase temprana e intermedia son dependientes del factor σ^{54} mientras que la clase tardía es dependiente del factor σ^{28} (28, 44, 48). Los elementos reguladores FlhF y FlhG están involucrados en el posicionamiento del flagelo polar y la determinación del número de filamentos respectivamente (37).

El aparato de exportación clasificado como un sistema de secreción tipo III, es el complejo encargado de transportar a las proteínas del eje y a los elementos extracelulares del flagelo como el gancho, las proteínas accesorias HAP y las flagelinas desde el citoplasma a través de la membrana interna. El aparato de exportación se ubica dentro del anillo C en el centro del anillo MS (24) y está formado por las proteínas transmembranales FlhA, FlhB, FliO, Flip, FliQ y FliR además de los componentes citosólicos FliH, FliI y FliJ (41). Los componentes transmembranales forman el canal de exportación dentro del anillo MS mediante la interacción de FlhA y FliF (27). Por otro lado, los elementos citosólicos son requeridos para la exportación flagelar específica y son capaces de interactuar con el canal. FliH es un regulador negativo para la ATPasa FliI y FliJ es una chaperona general que previene la agregación o desnaturalización de los sustratos flagelares próximos a ser exportados (41). Debido a que el ensamblaje del filamento sigue un orden jerárquico -como se mencionó antes-, se debe reconocer que el aparato de exportación no es solo una puerta con un transporte activo dependiente de ATP, sino que es capaz de discriminar que elementos serán translocados de acuerdo con cada etapa en el ensamblaje del flagelo. Esta discriminación de sustratos comprende dos estados: el modo eje / gancho y el modo filamento. Se mencionó con anterioridad que los genes flagelares tardíos en *V. parahaemolyticus* o de clase IV en *V. cholerae* son activados por FliA, el factor σ^{28} el cual se encuentra secuestrado por FlgM, el factor anti- σ^{28} cuando el complejo del cuerpo basal está en construcción; en este

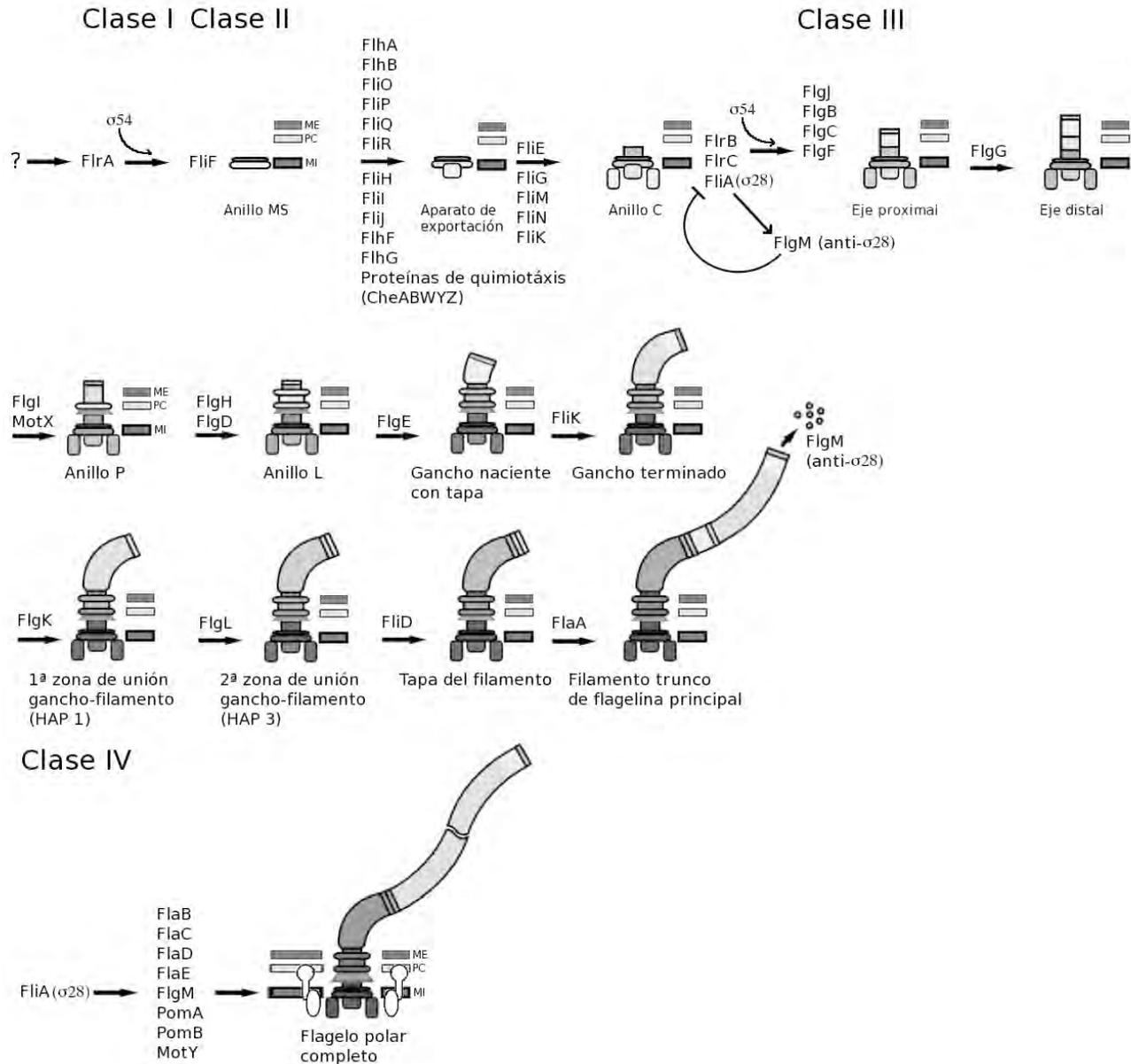


Figura 9. Ruta de biogénesis flagelar en *V. cholerae*. ME= membrana externa, PC= pared celular, MI= Membrana interna. Modificado de la referencia (40).

momento el aparato de exportación se encuentra en el modo eje / gancho. Una vez terminado el complejo del gancho y el cuerpo basal, la proteína de membrana FlhB del aparato de exportación atraviesa por un corte autocatalítico en la región “linker” (entre la Asn269 y la Pro270); se sugiere que la proteína reguladora de la longitud del gancho FliK está involucrada en este corte (18). Se piensa que el corte en la región “linker” de FlhB induce un cambio conformacional en la proteína que altera la especificidad del sustrato pasando del modo eje / gancho al modo filamento. En el momento en que el aparato de exportación entra en el modo filamento, FlgM se

secreta del citoplasma al medio extracelular dejando libre a FliA para iniciar la transcripción de los genes tardíos o de clase IV (15).

Funcionamiento del motor flagelar.

Se sabe que en *E. coli* y *S. enterica* los complejos MotA/MotB conducen un flujo de protones (H^+), originado a partir de un gradiente electroquímico, desde el periplasma hasta el citoplasma cruzando la membrana interna y que este flujo está acoplado con la rotación en sus múltiples flagelos (8, 40, 56) (Fig. 10). Cuando los protones pasan a través de la membrana, se unen a un residuo específico de aspartato (Asp 32) en la proteína MotB e inducen un cambio conformacional en MotA el cual a su vez lleva a la proteína FliG en el rotor a un paso simple de rotación (32). A continuación el residuo de aspartato libera al protón en el citoplasma, MotA regresa a su conformación original y FliG está listo para el siguiente ciclo (32, 40). Dentro del asa citoplásmica de MotA y el extremo C-terminal de FliG hay residuos conservados e importantes para la rotación que interactúan de manera electrostática entre sí para generar el torque (68). En FliG estos residuos son Lis264, Arg281, Asp288, Asp289 y Arg297 mientras que en MotA son Arg90 y Glu98 (32, 68, 72); de manera general, la función de estos residuos es redundante (la ausencia de uno en particular no es crítica para la función) y la carga parece ser su propiedad característica. En las bacterias marinas como *V. cholerae*, *V. alginolyticus* o *V. parahaemolyticus* la fuerza motriz para generar el torque en el flagelo polar depende de un gradiente electroquímico de iones sodio (Na^+) cuyo paso a través de la membrana interna, es conducido por las proteínas del estator PomA y PomB (3, 19, 59) (fig. 10). Se piensa que el principio para el funcionamiento del motor impulsado por sodio, es el mismo que en el motor impulsado por protón (68): los iones sodio en el periplasma se unen a un residuo específico de aspartato en PomB, el Asp 24 para ser translocados al citoplasma (19). El paso de los iones sodio induce un cambio conformacional en PomA que promueve un paso de rotación en FliG. La interacción de los residuos cargados Lis284, Arg301, Asp308, Asp309 y Arg317 ubicados dentro del dominio carboxilo terminal de FliG (69) con los residuos Arg88 y Glu96 (residuos cargados equivalentes a los de MotA) más otros residuos adicionales: Lis89, Glu97 y Glu99 (71) en el asa citoplásmica de PomA, genera el torque del flagelo polar. La neutralización de estos residuos en forma individual, no altera de manera significativa la función del estator, sin embargo la rotación flagelar se interrumpe cuando la carga de los cinco residuos se neutraliza de manera simultánea (71). Los fármacos

bloqueadores de canales de sodio como el amiloride o el fenamil son capaces de interrumpir este gradiente evitando la generación del torque en el filamento polar inhibiendo el desplazamiento de las células (4).

La rotación reversible del motor flagelar depende de un mecanismo de “switch” contenido en el anillo C. En *E. coli*, la rotación flagelar en dirección opuesta a las manecillas del reloj (en inglés “counter-clockwise” o ccw) conduce a los filamentos a formar una trenza que impulsa a las células hacia el frente; por otro lado, la rotación en dirección de las manecillas del reloj (en inglés “clockwise” o cw) desenreda la trenza flagelar permitiendo así un paro de reorientación en las células. El paso del modo de nado (rotación ccw) al paro y reorientación (rotación cw) depende de la interacción del regulador de respuesta quimiotáctico CheY en su estado fosforilado con la proteína del “switch” flagelar FliM. Cuando el medio es homogéneo y hay una concentración decreciente de ligando en los complejos de quimiorreceptores en el polo celular, se inicia la auto fosforilación de la cinasa sensora CheA, la cual transfiere su grupo fosfato al regulador de respuesta CheY. En su estado fosforilado, CheY-P se une primero al dominio amino terminal de FliM (FliM_N) y de manera sucesiva al dominio intermedio (FliM_M) desplazando –de manera competitiva- al dominio carboxilo terminal de FliG (FliG_C); este cambio de conformación en FliG altera en una manera aun desconocida su interacción con MotA (13) dando como resultado un cambio de sentido en la rotación flagelar, de nado a paro y reorientación. Bajo estas condiciones la frecuencia de paro y nado es semejante. Por otro lado, cuando existe en el medio un gradiente de sustancias favorables o nocivas, la concentración de ligando se incrementa en los complejos quimiorreceptores y la cinasa sensora CheA se desactiva; mientras disminuye la concentración de CheY-P en el citoplasma el dominio carboxilo terminal de FliG (FliG_C) regresa a su posición original con respecto a MotA y a su sitio de interacción con el dominio intermedio de FliM (FliM_M). En esta situación, la frecuencia de paro disminuye y los episodios de nado se vuelven más prolongados moviendo así a las células en dirección de los atrayentes o alejándolas de los repelentes.

El sistema de motilidad de *V. shilonii* no se ha descrito aun con detalle. Asimismo, el estudio sobre la motilidad en el género *Vibrio*, tan importante para la virulencia en especies de este grupo (39, 55), se ha enfocado principalmente en el filamento y la información disponible sobre la estructura y morfología del cuerpo basal es escasa. Hasta ahora existen pocos reportes sobre el aislamiento y la descripción del cuerpo basal en el género *Vibrio*, el más antiguo, es un

trabajo realizado en *V. cholerae* en el cual se describe una estructura nueva dentro del cuerpo basal, un anillo periplásmico adicional ubicado entre los anillos P y L (14). De manera más reciente, con *V. alginolyticus*, Terashima y colaboradores realizaron un trabajo (61) en el cual se propone que las proteínas MotX y MotY forman una estructura designada como anillo T; este

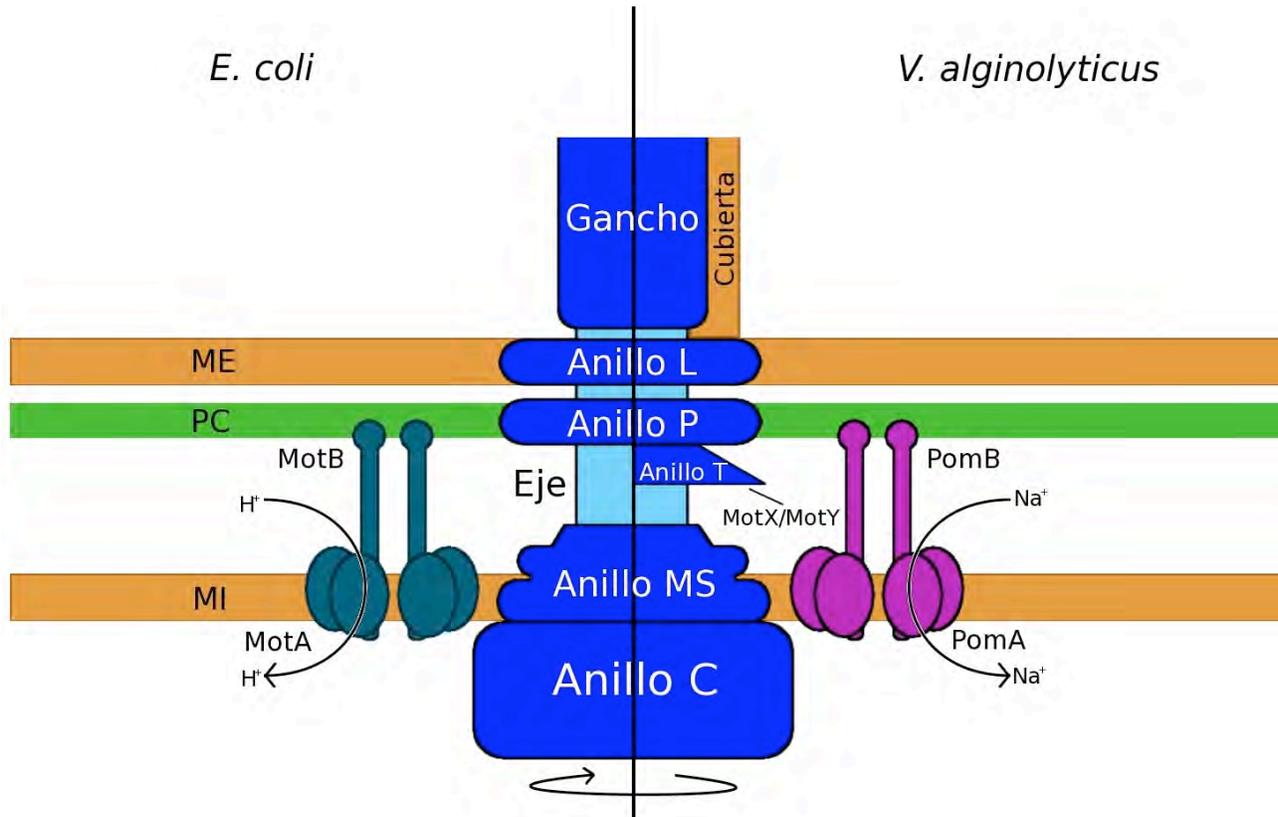


Figura 10. Comparación entre algunos componentes flagelares de las bacterias entéricas (*E. coli*) y de las bacterias marinas (*V. alginolyticus*). En *E. coli*, el complejo del estator MotA/B conduce un flujo de protones (H^+) que se encuentra acoplado a la generación del torque en el complejo del rotor, el anillo C. En *V. alginolyticus*, el principio de la fuerza motriz es el mismo; un flujo de iones, que en este caso es de iones sodio (Na^+), conducido desde el periplasma hasta el citoplasma por el complejo del estator PomA/B también está acoplado a la generación del torque en el complejo del anillo C. Asimismo las proteínas MotX/Y las cuales no están presentes en *E. coli* y que forman al anillo T son necesarias para la rotación del filamento. En *V. alginolyticus*, el flagelo polar está cubierto por una extensión de la membrana externa. Modificado de la referencia (66).

nuevo anillo podría tratarse de aquella estructura anteriormente reportada para *V. cholerae*.

La purificación y caracterización del cuerpo basal de *V. shilonii* es una estrategia relativamente sencilla que requiere de técnicas bioquímicas y de microscopía electrónica de transmisión ya documentadas (1, 61). Este trabajo pretende relacionar a la genética de la bacteria (genoma secuenciado de manera parcial) con una función sustentada en una estructura determinada.

3. Hipótesis.

Se ha observado que los cuerpos basales del flagelo polar en algunas especies del género *Vibrio* son diferentes entre si de modo estructural; por lo tanto es posible que el flagelo polar de *Vibrio shilonii* tenga un cuerpo basal con una estructura distinta a lo ya reportado con anterioridad.

4. Objetivo general.

Aislar y caracterizar de manera morfológica los componentes del cuerpo basal en el flagelo polar de la bacteria marina *V. shilonii*.

Objetivos particulares.

- Analizar el genoma parcialmente secuenciado de *V. shilonii* para predecir el peso molecular de los componentes del cuerpo basal.
- Purificar los complejos del cuerpo basal y analizarlos por medio de SDS-PAGE para determinar el peso molecular aparente de los componentes.
- Observar y tomar medidas a los complejos aislados mediante microscopía electrónica de transmisión.
- Secuenciar las proteínas resueltas en el gel para identificar los componentes del cuerpo basal y relacionar los datos de masa molecular obtenidos experimentalmente con aquellos obtenidos del análisis del genoma secuenciado de manera parcial.

5. Materiales y Métodos.

Cepas y condiciones de crecimiento. La extracción de los complejos del cuerpo basal se realizó en la cepa *V. shilonii* AK-1 del tipo silvestre (número de ATCC: BAA-91). Para el crecimiento rutinario se emplearon cajas de petri con medio de cultivo “Marine Broth Difco 2216” 3.7 % adicionadas con agar 1.5 % incubadas a 30 °C durante 12 hrs.

Análisis del genoma de Vibrio shilonii. El genoma de *V. shilonii* no se encuentra secuenciado en su totalidad, sin embargo una región que contiene gran parte de los genes codificantes para componentes del flagelo polar fue incluida; la secuencia reportada hasta ahora se encuentra en el sitio del NCBI bajo el número de acceso: NZ_ABCH00000000. Dentro de esta base de datos se buscaron las secuencias de aminoácidos de las proteínas del cuerpo basal; en la predicción del peso molecular de cada componente, se usó la herramienta “Compute pI/Mw tool” y la herramienta “LipoP 1.0 Server” para retirar la secuencia del péptido señal en algunos precursores. Ambas aplicaciones pertenecen al sitio ExPASy para análisis de proteínas.

A. Cultivos celulares y preparación de esferoplastos. Esta extracción se realizó como fue descrito previamente con algunas modificaciones a los protocolos de Macnab (1) y Homma (61). Un matraz con 1000 ml de medio líquido TBSW (52) (triptona 1%, MgSO₄ 35 mM, KCl 7mM, CaCl₂ 7mM y NaCl 1.5%) se inoculó con 10 ml (1/100 del volumen original) de un cultivo crecido toda la noche en el mismo medio y se incubó a 30 °C en agitación a 200 rpm. Después de 4 h de crecimiento, a una densidad óptica de 0.6 ($\lambda=600$ nm), las células se cosecharon mediante centrifugación a 6,000 X g durante 10 min a 4 °C. La pastilla se resuspendió en 100 ml (1/10 del volumen inicial) de amortiguador de sacarosa frío (sacarosa 0.5 M, Tris/HCl 50 mM pH 8.0) y las células se convirtieron en esferoplastos adicionando lisozima 0.1 mg/ml final y EDTA 2 mM final; la mezcla se incubó a 4 °C en agitación orbital moderada durante 40 min dentro de un matraz Erlenmeyer. Pasado este tratamiento, se determinó con ayuda del microscopio óptico de campo oscuro de alta intensidad, que la mayoría de las células habían perdido su forma de bacilo para pasar a una forma redonda.

B. Fraccionamiento subcelular. Los esferoplastos fueron lisados agregando Tritón X-100 a una concentración final de 1% (p/v); la lisis se realizó a 4 °C en agitación moderada durante 40 minutos. Por lo general, después de este paso, la suspensión se torna ligeramente translúcida, señal de que las células se han lisado en su mayor parte. Para reducir la viscosidad en el lisado, la

suspensión se traspasó a un vaso de precipitado, se le adicionó MgSO_4 y DNAsa I a una concentración final de 5 mM y 0.1 mg/ml respectivamente. El lisado se incubó a 4 °C en agitación moderada con una barra magnética durante 30 min. Es importante señalar que la suspensión, resultado del tratamiento con tritón X-100, se traspasó de un matraz Erlenmeyer a un vaso de precipitado en el cual se agitó con barra magnética para que la digestión con DNAsa I fuera más eficiente y completa, de lo contrario al agregar el polietilenglicol 6000, el DNA excedente se precipitará alterando las lecturas de la cuantificación de proteína. Después de que la viscosidad disminuyó, el EDTA se llevó a una concentración final de 5 mM. Las células no lisadas y los restos celulares se removieron mediante una centrifugación a 17,000 X g por 20 min a 4 °C. Al sobrenadante se le agregó polietilenglicol 6000 y NaCl a una concentración final de 2% y 100 mM respectivamente y se incubó a 4 °C durante 60 min sin agitación. La suspensión se centrifugó a 27,000 X g por 30 min a 4 °C y la pastilla se resuspendió en 6 ml de amortiguador TET Glicerol [Tris/HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 5 mM, Tritón X-100 0.1% (p/v) y Glicerol 6.25% (p/v)]. Los restos celulares restantes se removieron por centrifugación a 1,000 X g durante 15 min a 4 °C.

C. Concentración de cuerpos basales. La suspensión con los cuerpos basales se centrifugó a 100,000 X g por 30 min a 4 °C para concentrarlos y la pastilla se resuspendió en 300 μl del amortiguador TET Glicerol. El producto de este paso se designó como extracto de cuerpos basales.

D. Cromatografía de filtración en gel. El extracto de cuerpos basales se cargó en una columna de Sepharosa CL-4B con intervalo de exclusión de 60 a 20,000 kDa (64) (10 mm X 100 mm) equilibrada en amortiguador TET Glicerol filtrado por vacío con una membrana de 0.22 nm como se realizó con anterioridad (63). Antes de depositar el extracto de cuerpos basales en la columna, la solución con las proteínas se centrifugó a 1000 X g durante 5 min para dejar un sobrenadante libre de agregados. El procedimiento para cargar la muestra en la columna es como se describe a continuación: se dejó gotear el amortiguador hasta que alcanzó el nivel de la resina - sin permitir que esta se seque-, la solución con las proteínas se inyectó con una micropipeta en la superficie y se dejó gotear una segunda vez hasta que la muestra alcanzó de nuevo el nivel de la resina; al término de este paso, se añadió un pequeño volumen de amortiguador y la columna se conectó a un sistema de alimentación. Se colectaron 25 fracciones de 0.5 ml cada una, se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm y los datos se usaron para graficar un

perfil de elusión. Las fracciones con un valor de absorbancia superior al de la línea base se analizaron por SDS-PAGE (38) al 12.5% teñido con plata. La fracción correspondiente al pico con mayor valor de absorbancia –considerado como el producto final del proceso de purificación– se almacenó a 4 °C para su análisis posterior. Asimismo se tomaron muestras del fraccionamiento subcelular (lisis de los esferoplastos), de la suspensión de cuerpos basales después del tratamiento con polietilenglicol 6000 y NaCl así como del extracto antes de cargarlo en la columna para cuantificar la cantidad de proteína por el método de Bradford (10) y para separarlas en un gel desnaturante SDS-PAGE (38) al 12.5 % teñido con azul de Coomasie y observar su patrón de bandeo.

Análisis por microscopía electrónica. Se usaron 30 µl del producto final para el análisis por microscopía electrónica. La rejilla de cobre de 400 mesh recubierta con colodión y polvo de carbón, donde se montó la muestra, se trató con una solución de “alcian blue” al 1 % durante 10 min (20); el colorante se removió goteando agua sobre la rejilla hasta eliminar el color azul por completo. Enseguida la suspensión con los cuerpos basales se goteó sobre la rejilla y se dejó asentar durante 5 min; el exceso se eliminó con papel absorbente. A continuación la muestra se trató con una solución de acetato de uranilo al 1% durante 1 min 30 seg o con hepta-molibdato de amonio al 2% (pH 8.0) durante 2 min; el exceso se removió con papel absorbente y se dejó secar durante 15 min (21). La muestra se observó en el microscopio electrónico (JEM 1200EXIII JEOL, Japón) usando una aceleración de voltaje equivalente a 120 kV. La aplicación “Image J” se empleó para realizar mediciones de los cuerpos basales de las micrografías recabadas durante las observaciones y con la aplicación “Art Of Illution” se construyó un modelo basado en dichas mediciones.

Secuenciación de proteínas. Una vez que se confirmó de manera visual la presencia e integridad de los cuerpos basales en el producto final, la fracción correspondiente se precipitó en su totalidad con acetona fría y se resolvió por SDS-PAGE (38) al 12.5% teñido con azul de Coomasie, las proteínas resultantes se secuenciaron por la técnica de espectroscopía de masas (29).

6. Resultados.

Análisis del genoma de Vibrio shilonii. A partir de la información obtenida de las secuencias de péptidos y de la predicción de pesos moleculares, se construyó la Tabla 3. A pesar de que las proteínas del anillo C, FliG, FliM y FliN en efecto son parte del cuerpo basal, no se tomaron en cuenta para este listado debido a que este componente se pierde durante el proceso de purificación.

Tabla 3. Predicción del peso molecular para los componentes del complejo gancho-cuerpo basal de *V. shilonii* hecha a partir del genoma secuenciado parcialmente.

Nombre	Proteína	PM (kDa)
Anillo MS	FliF	63.98
Proteína B del eje	FlgB	14.16
Proteína C del eje	FlgC	15.04
Proteína D del eje	FlgD	25.09
Proteína F del eje	FlgF	27.03
Proteína G del eje	FlgG	27.95
Proteína del gancho	FlgE	46.83
Anillo P	FlgI	35.88
Anillo L	FlgH	26.32
Anillo T	MotX	21.82
Anillo T	MotY	31.21
Flagelina 1	FlaA	40.35
Flagelina 2	FlaB	40.03
Flagelina 3	FlaC	40.04
Flagelina 4	FlaD	40.6
HAP 1	FlgK	47.87
HAP 2	FlaH	68.12
HAP 3	FlgL	32.56

Purificación de cuerpos basales. A lo largo del proceso de extracción, se tomaron muestras en tres pasos importantes para observar su rendimiento: i) el fraccionamiento subcelular (lisis de los esferoplastos), ii) la suspensión de cuerpos basales después del tratamiento con polietilenglicol 6000 y NaCl además del iii) extracto antes de ingresar en la columna de filtración en gel; la cantidad de proteína recuperada en cada uno de los tres pasos se obtuvo mediante la técnica de Bradford (10) y se resume en la Tabla 4.

Tabla 4. Rendimiento de la proteína recuperada en tres diferentes pasos del proceso. Paso1) Fraccionamiento subcelular. Paso 2) Suspensión de cuerpos basales y Paso 3) Extracto de cuerpos basales antes de ingresar a la cromatografía. n = 4.

Paso	Volumen (ml)	Concentración (mg/ml)	Proteína (mg)	% de proteína recuperada
1	110	1.96 ± 0.67	215.3 ± 74.4	100
2	6	1.52 ± 0.9	9.46 ± 6.1	4.4
3	0.3	1.84 ± 1.1	0.55 ± 0.4	0.26

Igualmente, se tomó una muestra de cada paso para resolverla en un gel desnaturizante SDS-PAGE al 12.5% teñido con azul de Coomassie. La masa molecular de las bandas dentro del carril correspondiente al extracto de cuerpos basales (bandas problema), se calculó a partir de la regresión lineal de los Coeficientes de Migración (R_f) para las bandas del marcador de peso molecular. El procedimiento se explica a continuación. Se tomó la medida de la distancia de migración del frente directamente del gel desde el borde superior (origen de la migración) hasta el borde inferior y se anotó en milímetros (mm), lo mismo se hizo para cada una de las bandas del marcador de peso molecular. El valor R_f de cada banda, se calcula con la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{\text{Migración de la banda}}{\text{Migración del frente}}$$

Los valores de R_f se grafican contra el logaritmo base 10 (Log) de los valores de peso molecular del marcador, esto se hace para linearizar la gráfica que de otro modo sería una curva exponencial descendente más difícil de analizar. Después se hizo una regresión lineal con estos datos. La migración de las bandas problema se midió de la misma forma que las bandas del estándar de masa molecular y se obtuvo el valor R_f para cada una de ellas también. Ahora, los valores de R_f de las bandas problema se ingresaron en la ecuación de la recta, para obtener el valor del logaritmo de peso molecular correspondiente y se aplicó el antilogaritmo para conocer su valor real.

Al final de la corrida en el gel (Fig. 11) se resuelven 10 bandas que se repiten en otros geles de purificaciones independientes; estas bandas tienen una masa molecular correspondiente a: 63.3, 61.2, 55.4, 50.2, 45.7, 41.2, 38.3, 34.8, 29.7 y 15.6 kDa.

Debido a la gran cantidad de monómeros de flagelina presentes en el filamento, es probable que la banda mayoritaria de 50.2 kDa contenga a dicha proteína. Sin embargo, el peso observado de

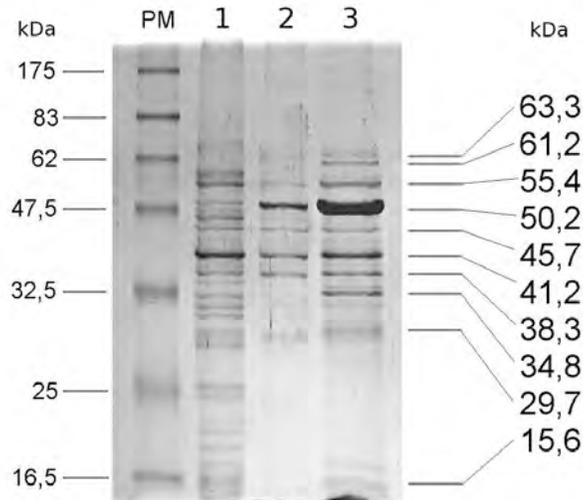


Figura 11. Seguimiento del proceso para purificar los cuerpos basales. Análisis por SDS-PAGE (38) al 12.5 % teñido con azul de Coomassie de tres pasos importantes del proceso de purificación: Carril 1) Muestra del fraccionamiento subcelular en presencia de tritón X-100 al 1% (p/v). Carril 2) Muestra de la suspensión de cuerpos basales tratada con polietilenglicol 6000 al 2% (p/v) y NaCl 100 mM y Carril 3) Muestra del extracto de cuerpos basales resuspendidos en amortiguador TET glicerol antes de ingresar a la columna de cromatografía por filtración en gel. En cada carril se cargaron 5 µg de proteína. PM, marcador de masa molecular.

esta banda en el gel no corresponde de manera exacta con el peso predicho por el genoma (alrededor de 40 kDa); este corrimiento anómalo podría ser ocasionado por algún tipo de modificación postraduccional involucrado en la interacción de las flagelinas con el recubrimiento membranal del filamento. En seguida, los demás valores de masa molecular del gel fueron comparados con aquellos obtenidos en el análisis del genoma para buscar coincidencias. Las bandas con masas moleculares cercanas a las que fueron calculadas con el genoma, podrían ser candidatos para secuenciar. El filamento no es, en sentido estricto, un componente del cuerpo basal, por lo que las flagelinas no fueron incluidas en la relación con el genoma; el resultado de la búsqueda se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultado de la comparación entre los valores de masa molecular observados en el gel y los calculados a partir del genoma parcialmente secuenciado de *V. shilonii*.

Valor observado en el gel (kDa)	Valor calculado a partir del genoma (kDa)	Proteína
63.3	63.98	FliF (anillo MS)
45.7	47.87	FlgK (HAP 1)
41.2	46.83	FlgE (gancho)
34.8	32.56	FlgL (HAP 3)
29.7	27.95	FlgG (eje)
15.6	15.04	FlgC (eje)

Cromatografía de filtración en gel. El paso de la cromatografía de filtración en gel se realizó con el fin de remover la mayor cantidad posible de proteínas contaminantes. Los perfiles de elución de varias purificaciones independientes, generan un pico con un alto valor de absorbancia en la fracción 5 seguido por un hombro en la fracción 6 y una meseta con bajo valor de absorbancia entre la fracción 8 y la 14 (Fig. 12A). Posteriormente cada perfil se examinó por SDS-PAGE (38) al 12.5 % teñido con plata, desde la fracción 4 hasta la 14 para ubicar a los cuerpos basales por su patrón de

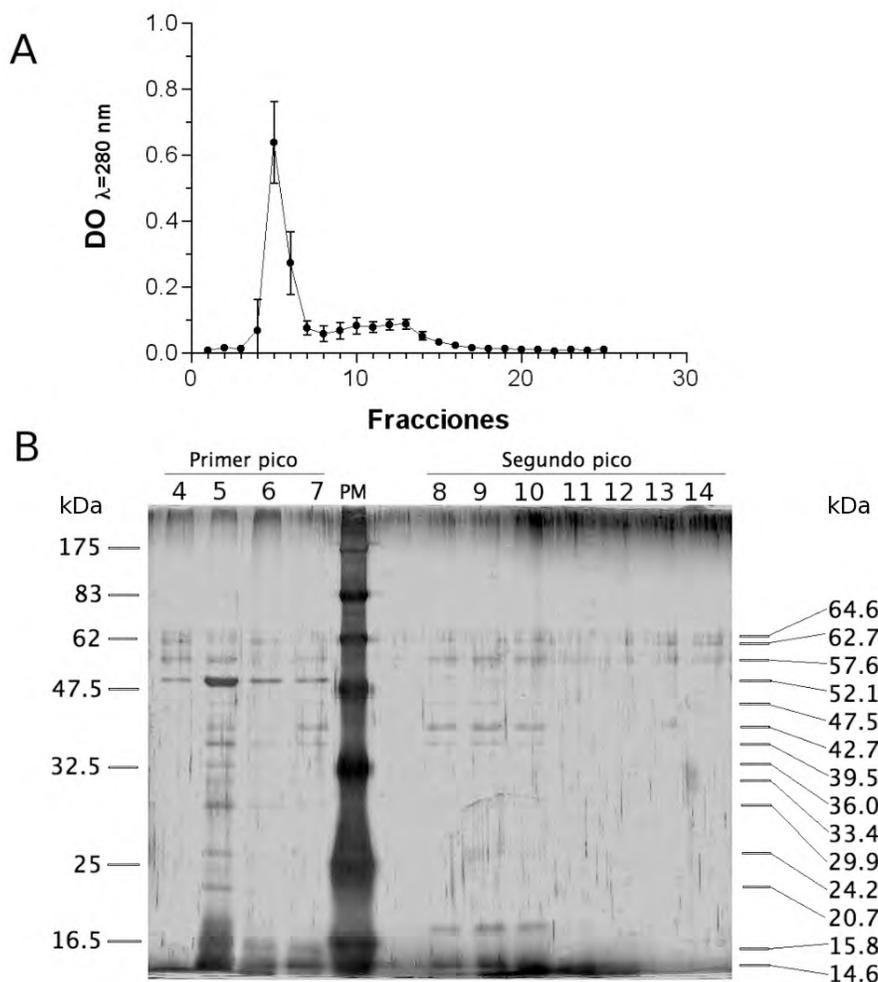


Figura 12. Resultado de la filtración en gel del extracto de cuerpos basales. Panel A) Perfiles de elución de tres purificaciones independientes (n= 3) en las cuales se repite un pico con alto valor de absorbancia seguido de un hombro y una meseta. Panel B) Gel SDS-PAGE al 12.5% teñido con plata de un extracto de cuerpos basales eluidos en la columna de filtración en gel; en él las fracciones 4 a la 7 corresponden al pico mayor y al hombro mientras que las fracciones 8 a 14 corresponden a la meseta.

bandeo. Se encontró que en el carril correspondiente a la quinta fracción, se resuelven entre 14 y 16 bandas más o menos estables y definidas con masas moleculares reproducibles (Fig. 12B). La quinta fracción de la columna de cromatografía de designó como producto final.

Análisis por microscopía electrónica. Para revelar la ultraestructura del cuerpo basal, se tomó una pequeña muestra del producto final de la purificación, se diluyó 5 veces con amortiguador TET libre de glicerol y se trató con una solución de hepta-molibdato de amonio al 2% ajustada a pH 8.0 (Fig. 13A) o con una solución de acetato de uranilo al 1% (Fig. 13B). Las micrografías muestran un gran anillo en la base del gancho, este componente podría tratarse del anillo L (asociado a la membrana externa); bajo esta pieza se halla el componente denominado anillo T anteriormente descrito para *V. alginolyticus* por Terashima (61) el cual tiene una forma de tazón mirando hacia el interior celular (Fig. 13C); al final en la porción más distal, se distingue lo que posiblemente es el anillo MS con una forma más compacta y un grosor poco mayor al de los otros dos anillos. Entre el anillo T y el MS hay una región expuesta del eje.

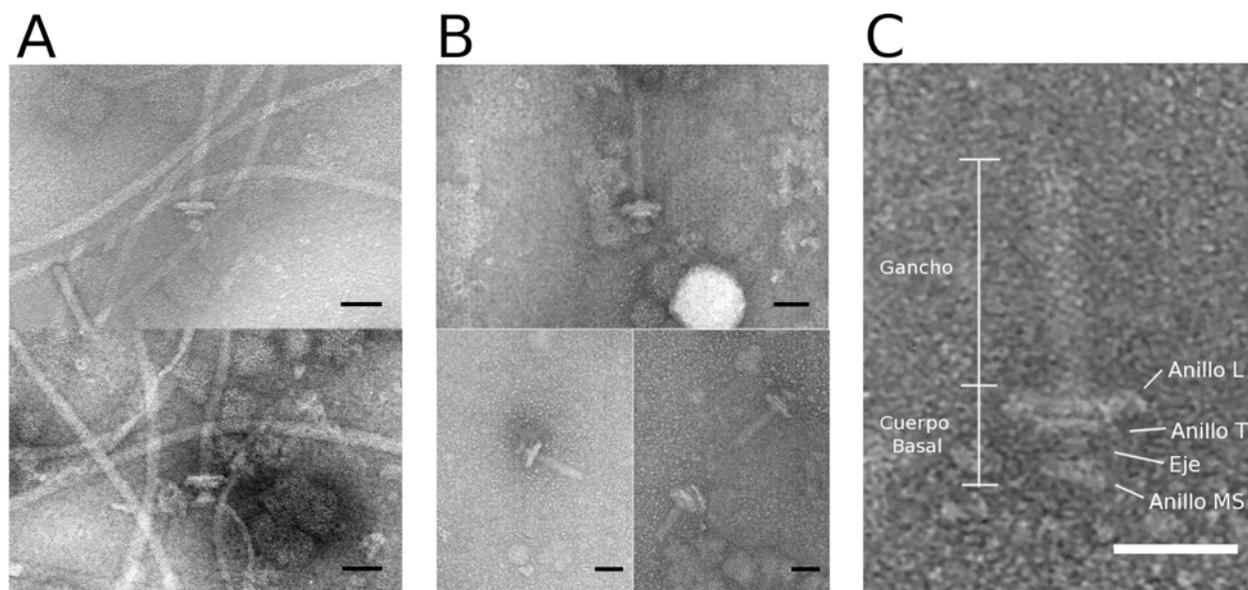


Figura 13. Micrografías de la preparación de cuerpos basales. Panel A) Complejos tratados con molibdato de amonio 2% (pH 8.0); en presencia de este material de contraste se tomaron las medidas de los componentes del cuerpo basal; magnificación x120,000. Panel B) Cuerpos basales contrastados con acetato de uranilo al 1%; en presencia de este agente es posible hallar algunos complejos sin filamento de flagelina, lo cual resulta útil para tomar las medidas del largo del gancho. Mitad superior del panel B: magnificación x120,000, mitad inferior: magnificación x100,000. Panel C) ampliación en la que se muestran las parte del cuerpo basal. Barras = 50 nm.

El hepta-molibdato de amonio es un material de contraste inocuo para la integridad de los complejos, tiene afinidad por las regiones hidrofóbicas de las proteínas y resalta los contornos de los cuerpos basales facilitando así las mediciones. Por otra parte el acetato de uranilo revela los detalles estructurales en los complejos puesto que se intercala sin problema entre los espacios de las proteínas; este tratamiento resultó útil para tomar las medidas del gancho. Una vez digitalizados los negativos, las mediciones de los complejos se realizaron con ayuda de la aplicación de distribución

libre “Image J” desarrollado por el “NIH” para el análisis de imágenes biológicas. Los datos tomados de 17 cuerpos basales diferentes se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Dimensiones de algunos componentes del cuerpo basal obtenidas a partir del análisis de las micrografías electrónicas.

	Anillo MS	Anillo T	Anillo L	Gancho
Diámetro (nm)	22.22 ± 3.14	29.13 ± 3.75	52.79 ± 2.91	16.16 ± 2.29
Ancho (nm)	10.54 ± 1.98	6.82 ± 0.68	9.54 ± 0.98	63.85 ± 3.76 nm de largo

Nota. Las medidas del gancho se tomaron de muestras tratadas con acetato de uranilo 1%, el resto de los datos provienen de muestras tratadas con hepta-molibdato de amonio 2% (pH 8.0) (n = 17).

Con los datos colectados de las micrografías analizadas, se construyó un modelo tridimensional del cuerpo basal con ayuda de la aplicación “Art of Illusion”; este modelo se comparó con la estructura ya reportada del cuerpo basal de *V. alginolyticus* (Fig. 14).

Secuenciación de proteínas. Con motivo de validar la relación entre las masas moleculares obtenidas al examinar el genoma y aquellas calculadas a partir del gel resultante de la cromatografía por filtración en gel, la fracción correspondiente al valor mas alto de absorbancia en el perfil (generalmente la fracción numero 5 en varias purificaciones independientes) se precipitó de manera total con acetona fría y se cargó en un gel SDS-PAGE al 12.5 % teñido con azul de Coomasie. De varios geles como este, fueron sustraídas tanto la banda mayoritaria como otras bandas de masas moleculares equivalentes a las reportadas en la tabla 5 y se sometieron a un proceso de secuenciación por espectrometría de masas (29). Dentro de los datos de secuencias obtenidos de varios geles hechos a partir de purificaciones independientes, se identificaron las siguientes proteínas: tres diferentes flagelinas (FlaABC) anotadas bajo los números de acceso 149188074, 149188075 y 149188076 respectivamente, y la proteína del gancho (FlgE) con número de acceso 149188066, ambas dentro de la banda mayoritaria con peso molecular en gel de 51.2 kDa; en la banda de 33.4 kDa, se halló a MotY, un componente del anillo T, con número de acceso 149190367 y a FlgH del anillo L cuyo número de acceso es 149188069. Asimismo, en la banda de 27.3 kDa se encontró a FlgG, un componente del eje con número de acceso 149191155 y en la banda de 34.1 kDa se ubicó un fragmento de FliF del anillo MS, número de acceso 149188085. La proteína FliF tiene una masa molecular reportada de 63.8 kDa, pero el péptido correspondiente identificado en el proceso de secuenciación se encontró en la banda de 31.4 kDa tal vez debido a un evento de degradación. El resultado de la secuenciación se resume en la Tabla 7.

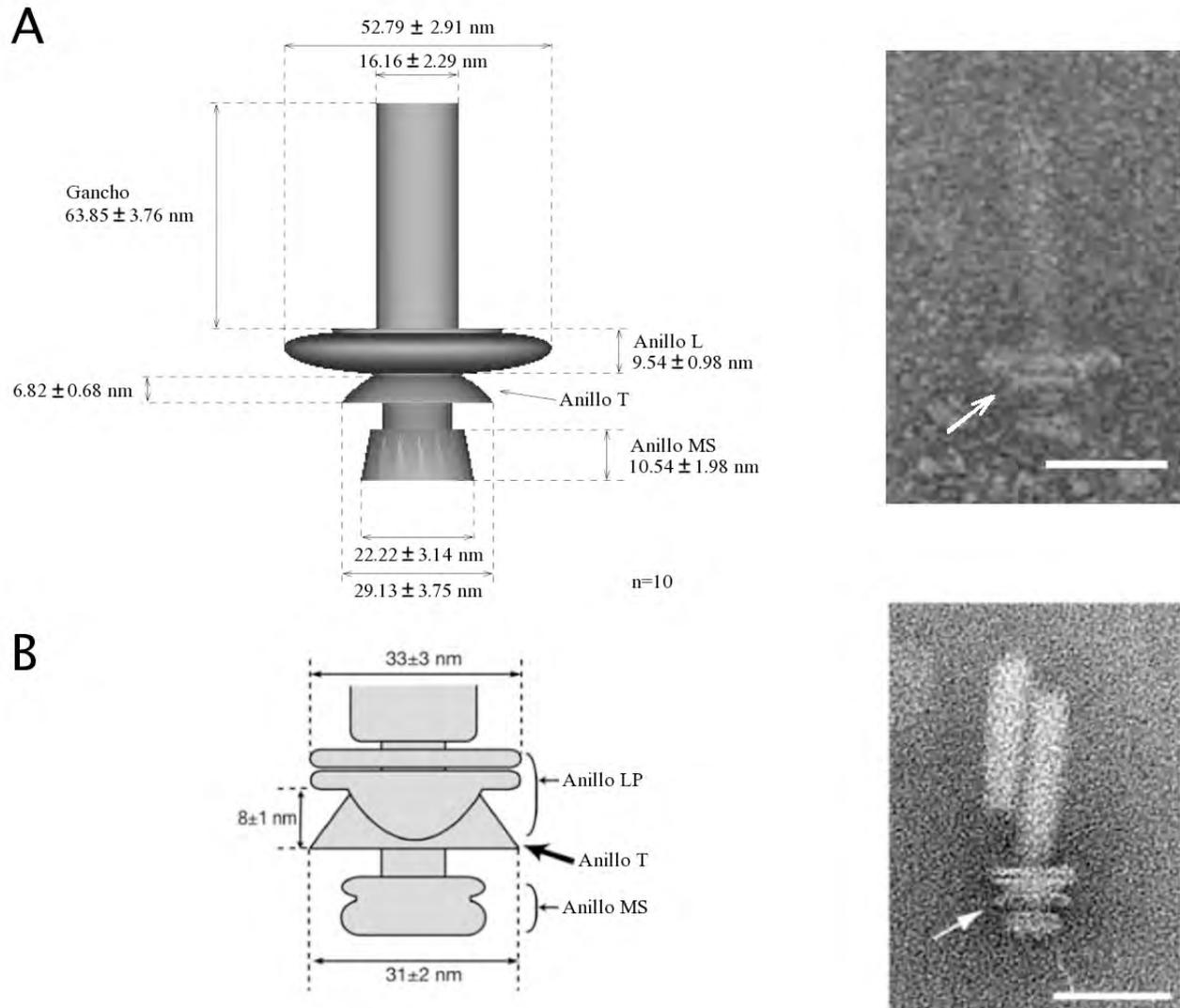


Figura 14. Comparación estructural. Panel A) Modelo del cuerpo basal en *V. shilonii* hecho a partir del análisis de las micrografías electrónicas de varias preparaciones independientes; en él se anota la media de los datos recabados para algunos componentes del complejo. Panel B) Modelo del cuerpo basal en *V. alginolyticus*. Modificado de la referencia (61). En el lado derecho de cada modelo, se muestra una micrografía electrónica de cada estructura correspondiente. Se observa que para *V. shilonii* no hay una clara separación entre el anillo L y el P; en su lugar se halla solo un anillo con un diámetro poco mayor a los 50 nm. Este elemento podría ser el anillo L. Las flechas blancas señalan la posición del anillo T. Barras = 50 nm.

Tabla 7. Componentes hallados del cuerpo basal.

Nombre (subestructura)	Masa molecular predicha por el genoma (kDa)	Masa molecular en gel (kDa)	Secuencia identificada	No. de acceso
FlaA (filamento)	40.4	52.1	KSSDALNTSMER	149188074
FlaB (filamento)	40.0	52.1	MAVNVNTNVSA	149188075
FlaC (filamento)	40.0	52.1	KAGNAMTQIAIT	149188076
FlgE (gancho)	46.8	52.1	ISGTGFFAVSK	149188066
MotY (anillo T)	31.2	33.4	LVHPIPNTFGDAEFIA	149190367
FlgH (anillo L)	26.3	33.4	TQSSGIVDTLR	149188069
FlgG (eje)	27.9	27.3	KMVSAADEMLQYI	149191155
FliF (anillo MS)	63.9	34.1*	AIKNRSSVNPDT	149188085

Nota. * Masa molecular de la banda donde se encontró el péptido de FliF.

7. Discusión.

El género *Vibrio* contiene algunas de las especies patógenas más importantes a nivel mundial, estas constituyen a los agentes etiológicos de infecciones por ingestión de alimentos y/o agua contaminados como es el caso de *V. cholerae* o de infecciones sistémicas (fascitis necrotizante), tal como sucede con *V. parahaemolyticus*. Como se mencionó en los ejemplos citados con anterioridad, el sistema de motilidad de estas bacterias juega un papel importante en el inicio y el transcurso de dichas enfermedades. *V. anguillarum* es el agente causal de la vibriosis en peces y requiere de una motilidad efectiva para atravesar la mucosa epitelial del hospedero; una vez superada esta barrera, el flagelo ya no es necesario para la virulencia. En mutantes Δ *motY* con fenotipo paralizado (flagelo completo pero incapaz de rotar) se observa una disminución de la virulencia en el modelo de trucha de hasta 750 veces con respecto a la cepa silvestre (55). *V. vulnificus* es la bacteria causante de gastroenteritis y septicemia debido al consumo de moluscos contaminados sin cocinar, esto especialmente en personas inmuno comprometidas. Para lograr una infección exitosa, la bacteria emplea el flagelo polar con el objetivo de adherirse y colonizar las células del epitelio intestinal mediante la formación de una biopelícula. Se ha observado que mutantes Δ *flgE* con un fenotipo carente de flagelo (incapaz de construir un flagelo completo) presentan una disminución significativa en la adherencia a las células epiteliales, además de una reducción evidente en el área de ocupación para biopelículas; en ambos casos, con respecto a la cepa silvestre (39). Ejemplos como estos apuntan a que la patogénesis en estas especies puede ser estudiada desde el punto de vista de la

motilidad flagelar, en otras palabras, entender la motilidad bacteriana podría dar pistas sobre los mecanismos de infección.

En este trabajo se han implementado técnicas para purificar los cuerpos basales de la bacteria marina *V. shilonii* de manera eficiente, como se puede observar en la separación por SDS-PAGE, en la cromatografía por límite de exclusión y en las micrografías electrónicas. Todos estos métodos han permitido comenzar a estudiar los sistemas de motilidad de esta bacteria al describir, de una manera bioquímica y morfológica, al complejo filamento - gancho - cuerpo basal. Así como el análisis de los datos ultra estructurales mostró un anillo L con dimensiones distintas a lo reportado con anterioridad, también reveló otro detalle interesante sobre este complejo. Tanto en el modelo como en las micrografías electrónicas de *V. alginolyticus*, se observa una clara separación entre el anillo L y el P dando como resultado un total de cuatro anillos en el cuerpo basal: L, P, T y MS; por otra parte, en el caso de *V. shilonii* las micrografías electrónicas y el modelo hacen evidente, en la base del gancho, una estructura con forma de anillo que se distingue por su diámetro particularmente grande (entre 50 y 54 nm), el cual examinado de manera longitudinal, parece ser una pieza única; en este trabajo se ha designado a dicho elemento como anillo L debido a su posición relativa a los demás componentes del cuerpo basal. Esta conformación resulta en tres anillos reconocibles de manera clara: L, T y MS. Ahora bien, esta diferencia en el número de anillos, conduce a la siguiente pregunta: ¿Dónde está el anillo P del cuerpo basal en *V. shilonii*?

Mientras se observaban las preparaciones tratadas con acetato de uranilo, se encontraron algunos cuerpos basales disociados; por un lado, estructuras de forma circular con un diámetro muy semejante al del anillo L (Fig. 15A) y por otro, complejos carentes de alguna pieza (Fig. 15B). Un detalle interesante sobre estas estructuras circulares es que parecen ser una sola pieza formada a partir de dos elementos arreglados de manera concéntrica, un anillo exterior y otro interior. Las mediciones de 5 diferentes complejos circulares, arrojaron un diámetro de 55.7 ± 4.4 nm para el anillo exterior, 34.5 ± 4.0 nm para el anillo interior y 12.6 ± 0.6 nm para la luz de este último (Fig. 15C). Comparando las imágenes, modelos y dimensiones de los cuerpos basales completos, tanto de *V. shilonii* como de *V. alginolyticus* con aquellos de los complejos circulares, es posible sugerir que este complejo es el característico anillo L de los cuerpos basales en *V. shilonii*; esto por las siguientes razones: el diámetro de ambas estructuras es muy similar (52.79 ± 2.9 nm del anillo L y 55.7 ± 4.4 nm del complejo circular) y por la existencia de cuerpos basales disociados carentes de un anillo L. Si bien estas premisas resultaran ciertas como para apuntar a que el anillo exterior es la estructura

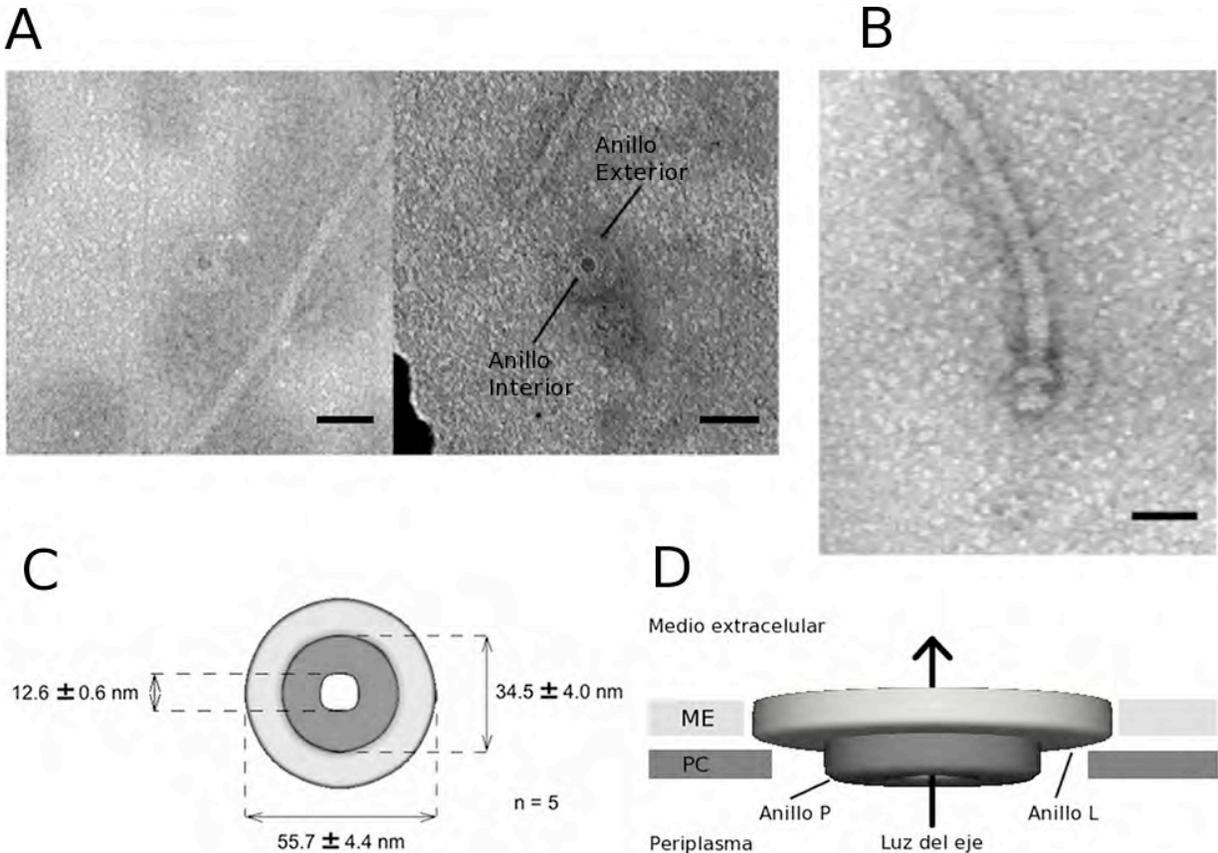


Figura 15. Micrografías electrónicas de cuerpos basales disociados. Panel A) Complejos circulares concéntricos asociados de manera usual a los filamentos, magnificación x100,000. Panel B) Cuerpo basal carente de anillo L, magnificación x150,000. Panel C) Modelo hecho a partir del análisis de estas estructuras. Los complejos parecen estar formados por un anillo exterior con un diámetro poco mayor a los 50 nm y un anillo interior de aproximadamente 35 nm de diámetro; la luz de este último anillo, es cercana a los 13 nm. Panel D) Posible arreglo de los anillos L y P en una conformación clásica. Acetato de uranilo al 1% fue usado como material de contraste en estas las micrografías. ME, Membrana externa; PC, Pared celular. Barras = 50 nm.

que corresponde con el anillo L, entonces es también plausible pensar que el anillo interior podría tratarse del anillo P en *V. shilonii*; una explicación para ello es que el anillo interior está en contacto de manera directa con el eje; que la luz de este anillo tiene un diámetro de 12.6 ± 0.6 nm el cual es idéntico al diámetro de la porción expuesta del eje en un cuerpo basal donde el anillo L está ausente y que el diámetro del anillo interior es muy semejante al del anillo P de *V. alginolyticus* (34.5 ± 4 nm para el anillo interior y 33.0 ± 3.0 nm para el anillo P). Al poner toda esta información junta, parecería decir que *V. shilonii* tiene un anillo exterior L montado alrededor de un anillo interior P. Una manera de probar esta hipótesis sería purificando cuerpos basales de una cepa mutante $\Delta flgH$ (incapaz de sintetizar un anillo L) (53) y ver si el anillo exterior desaparece. Por otro lado, sin una herramienta más precisa de disección, es imposible descartar la posibilidad de que ambos anillos se encuentren en la conformación clásica, el anillo P embebido en la pared celular y el anillo L en la

membrana externa haciendo cada uno contacto con el eje (1) y que están tan próximos el uno del otro que es imposible para la tinción negativa distinguir una separación clara entre las dos piezas (Fig. 15D).

Con motivo de hallar algún indicio sobre los posibles arreglos del anillo L, se realizó un alineamiento múltiple entre las proteínas FlgH de *V. shilonii* y de otras especies del género; al final, no se encontraron diferencias significativas entre las secuencias (Fig. 16). No obstante, si la conformación de un anillo exterior montado alrededor de un anillo interior es cierta, entonces el eje no tendría el punto de apoyo del anillo L y el anillo T podría reemplazarlo. Como ya se había mencionado antes, se ha propuesto que las proteínas MotX y MotY forman al anillo T; el estudio del cristal de MotY en *V. alginolyticus*, ha revelado que esta proteína tiene un dominio de unión a la pared de peptidoglicano en su extremo carboxilo terminal (54) y un dominio amino terminal capaz de estabilizar a MotX y de interactuar con el cuerpo basal en un punto desconocido. Una vez armado el anillo T, MotX interacciona con PomB para ubicar el estator alrededor del rotor (33). Si MotY puede unirse de modo simultáneo al cuerpo basal y a la pared de peptidoglicano, entonces es posible

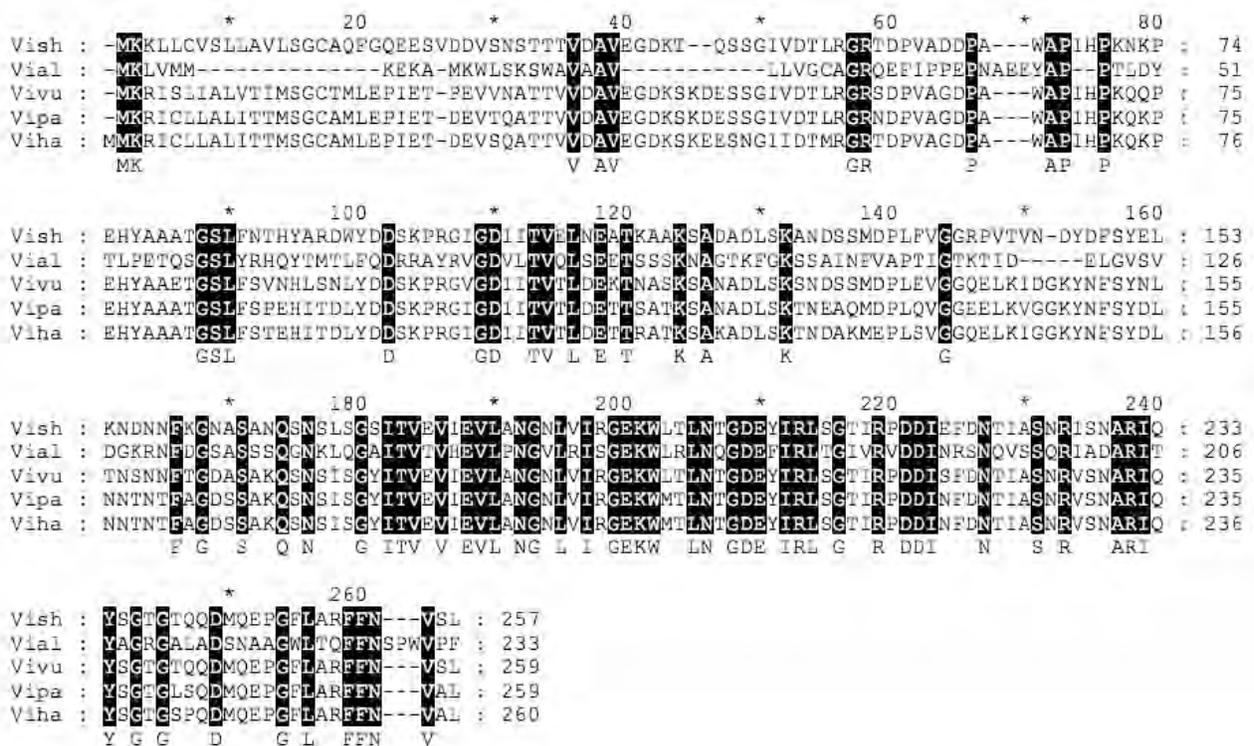


Figura 16. Alineamiento múltiple de FlgH entre *V. shilonii*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*. Con este análisis, realizado en la aplicación “Muscle”, no se encontraron diferencias importantes entre las cinco proteínas. Los residuos conservados están marcados en negro.

pensar en el anillo T como un punto de apoyo adicional para el eje. Considerando lo anterior, tal vez la función del anillo T en *V. shilonii* es la de estabilizar el eje a la altura de la pared de peptidoglicano, mientras que el anillo P, sobre el cual estaría montado el anillo L, proporciona el apoyo a la altura de la membrana externa. Hasta ahora la información recabada, no es suficiente para determinar de manera precisa la conformación de los anillos L y P; cualquiera que sea su arreglo, va más allá de los alcances de este trabajo. Sin embargo es posible pensar que tal vez los pocos detalles que fueros revelados aquí, podrían hablar sobre adaptaciones para lidiar con un hospedero tan diferente a un vertebrado o un molusco como lo es el coral.

8. Conclusiones y perspectivas.

En este proyecto para caracterizar de manera morfológica la estructura del cuerpo basal en la bacteria marina *V. shilonii*, se estandarizó un método eficiente y sencillo para purificar los cuerpos basales y se estableció una referencia de rendimiento para la extracción de proteína. Los complejos obtenidos por este método se observaron bajo el microscopio electrónico y se construyó un modelo basado en mediciones reales, por último se identificaron algunas de las proteínas componentes del cuerpo basal mediante un análisis de secuenciación por espectroscopía de masas el cual además sirvió para relacionar a los genes del complejo hallados en el genoma de *V. shilonii* con las masas moleculares de las bandas resueltas por SDS-PAGE. De los resultados de los experimentos realizados en este trabajo, se concluyen los siguientes puntos: i) el flagelo polar de *V. shilonii* posee un cuerpo basal con una estructura diferente a la reportada con anterioridad para otros cuerpos basales en especies del mismo género (14, 61), ii) la ubicación del anillo P en el cuerpo basal no es clara y iii) el diámetro del anillo L no se debe a alteraciones significativas en el número de aminoácidos presentes en los monómeros de FlgH. Está claro que las actividades de investigación expuestas en estos párrafos ofrecen un panorama general sobre el complejo del cuerpo basal de la bacteria marina *V. shilonii*, mas constituyen también el inicio de líneas de investigación interesantes tales como dilucidar la conformación de los anillos L y P dentro del cuerpo basal o el papel del anillo L en la formación del recubrimiento flagelar. No obstante que el conjunto de técnicas descritas en la sección de materiales y métodos de este texto forman en si mismas un conjunto de herramientas básicas que podrán usarse en futuros trabajos, es necesario el uso de otro tipo de estrategias para lograr una disección más precisa de los componentes del cuerpo basal y la descripción detallada del papel de estos en la motilidad bacteriana.

Apéndice

Medio TBSW (1000 ml)	
Triptona 1%	10 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O 35 mM	8.62 g
KCl 7mM	0.52 g
CaCl ₂ 7mM	1.03 g
NaCl 1.5%	15 g

Amortiguador de Sacarosa (500ml pH 8.0)	
Sacarosa	85.57 g (0.5M)
Tris	3.03 g (50mM)

Nota. Ajustar a pH 8.0 con HCl, dividir en alícuotas de 100 ml, esterilizar por autoclave y almacenar a 4 °C.

EDTA solución stock (0.1 M, 50 ml)	
EDTA	1.86 g

Triton X-100 solución stock (20%, 10 ml)	
Triton X-100	2 ml

Nota. Preparar con agua estéril y almacenar en tubo a 4 °C.

PEG 6000 solución stock (20%, 25 ml)	
PEG 6000	5 g

Nota. Preparar con agua estéril y almacenar a temperatura ambiente, se recomienda usar fresco.

Amortiguador TET GliOH (100 ml, pH 8.0)	
Tris	0.12 g (10 mM)
EDTA	0.18 g (5 mM)
Triton	100 µl (0.1%)
Glicerol	5 ml (5%)

Nota. Preparar con agua estéril y almacenar a 4 °C.

Amortiguador TE para lisozima (50 ml, pH 8,0)	
Tris	0,3 g (50 mM)
EDTA	0,18 g (10 mM)

Nota. Disolver 10 mg de lisozima en 1 ml de amortiguador TE; usar esta solución por cada 100 ml de células en suspensión.

Bibliografía.

1. **Aizawa, S. I., Dean, G. E., Jones, C. J., Macnab, R. M., and Yamaguchi, S.** 1985. Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol **161**:836-49.
2. **Allen, R. D., and Baumann, P.** 1971. Structure and arrangement of flagella in species of the genus *Beneckeia* and *Photobacterium fischeri*. J Bacteriol **107**:295-302.
3. **Asai, Y., Kojima, S., Kato, H., Nishioka, N., Kawagishi, I., and Homma, M.** 1997. Putative channel components for the fast-rotating sodium-driven flagellar motor of a marine bacterium. J Bacteriol **179**:5104-10.
4. **Atsumi, T., Maekawa, Y., Tokuda, H., and Imae, Y.** 1992. Amiloride at pH 7.0 inhibits the Na(+)-driven flagellar motors of *Vibrio alginolyticus* but allows cell growth. FEBS Lett **314**:114-6.
5. **Banin, E., Israely, T., Fine, M., Loya, Y., and Rosenberg, E.** 2001. Role of endosymbiotic *zooxanthellae* and coral mucus in the adhesion of the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi* to its host. FEMS Microbiol. Lett. **199**:33-7.
6. **Banin, E., Israely, T., Kushmaro, A., Loya, Y., Orr, E., and Rosenberg, E.** 2000. Penetration of the coral-bleaching bacterium *Vibrio shiloi* into *Oculina patagonica*. Appl. Environ. Microbiol. **66**:3031-6.
7. **Banin, E., Khare, S. K., Naider, F., and Rosenberg, E.** 2001. Proline-rich peptide from the coral pathogen *Vibrio shiloi* that inhibits photosynthesis of *Zooxanthellae*. Appl. Environ. Microbiol. **67**:1536-41.
8. **Berg, H. C.** 2000. Motile Behavior of Bacteria. Physics Today **53**.
9. **Boles, B. R., and McCarter, L. L.** 2000. Insertional inactivation of genes encoding components of the sodium-type flagellar motor and switch of *Vibrio parahaemolyticus*. J Bacteriol **182**:1035-45.
10. **Bradford, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**:248-254.
11. **Correa, N. E., Barker, J. R., and Klose, K. E.** 2004. The *Vibrio cholerae* FlgM Homologue Is an Anti-sigma 28 Factor That Is Secreted through the Sheathed Polar Flagellum. J Bacteriol **186**:4613-4619.
12. **Correa, N. E., Lauriano, C. M., McGee, R., and Klose, K. E.** 2000. Phosphorylation of the flagellar regulatory protein FlrC is necessary for *Vibrio cholerae* motility and enhanced colonization. Mol Microbiol **35**:743-55.
13. **Dyer, C. M., Vartanian, A. S., Zhou, H., and Dahlquist, F. W.** 2009. A Molecular Mechanism of Bacterial Flagellar Motor Switching. J Mol Biol.
14. **Ferris, F. G., Beveridge, T. J., Marceau-Day, M. L., and Larson, A. D.** 1984. Structure and cell envelope associations of flagellar basal complexes of *Vibrio cholerae* and *Campylobacter fetus*. Can J Microbiol **30**:322-33.
15. **Ferris, H. U., and Minamino, T.** 2006. Flipping the switch: bringing order to flagellar assembly. Trends Microbiol **14**:519-26.

16. **Follett, E., and Gordon, J.** 1963. An Electron Microscope Study of *Vibrio* Flagella. *J Gen Microbiol* **32**:235-239.
17. **Francis, N. R., Sosinsky, G. E., Thomas, D., and DeRosier, D. J.** 1994. Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J Mol Biol* **235**:1261-70.
18. **Fraser, G. M., Hirano, T., Ferris, H. U., Devgan, L. L., Kihara, M., and Macnab, R. M.** 2003. Substrate specificity of type III flagellar protein export in *Salmonella* is controlled by subdomain interactions in FlhB. *Mol Microbiol* **48**:1043-57.
19. **Fukuoka, H., Wada, T., Kojima, S., Ishijima, A., and Homma, M.** 2009. Sodium-dependent dynamic assembly of membrane complexes in sodium-driven flagellar motors. *Mol Microbiol* **71**:825-35.
20. **Gelderblom, H. R.** 2004. Hand-out 3: Basic Lab Course "Diagnostic EM in Infectious Diseases". Robert Koch Institute, Berlin.
21. **Hazelton, P. R., and Gelderblom, H. R.** 2003. Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. *Emerg Infect Dis* **9**:294-303.
22. **IJSEM, L. E.** 2001. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 51, part 4, of the *IJSEM*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* **51**:1621-1623.
23. **Jones, C. J., Macnab, R. M., Okino, H., and Aizawa, S.** 1990. Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **212**:377-87.
24. **Katayama, E., Shiraishi, T., Oosawa, K., Baba, N., and Aizawa, S.** 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**:458-75.
25. **Kawagishi, I., Nakada, M., Nishioka, N., and Homma, M.** 1997. Cloning of a *Vibrio alginolyticus* rpoN gene that is required for polar flagellar formation. *J Bacteriol* **179**:6851-4.
26. **Khan, S., and Dapice, M.** 1988. Effects of mot gene expression on the structure of the flagellar motor. *J Mol Biol* **202**:575-584.
27. **Kihara, M., Minamino, T., Yamaguchi, S., and Macnab, R. M.** 2001. Intergenic suppression between the flagellar MS ring protein FlhF of *Salmonella* and FlhA, a membrane component of its export apparatus. *J Bacteriol* **183**:1655-62.
28. **Kim, Y. K., and McCarter, L. L.** 2000. Analysis of the polar flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **182**:3693-704.
29. **Kinter, M., and Sheman, N.** 2000. *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*. Wiley & Sons, New York.
30. **Klose, K. E., and Mekalanos, J. J.** 1998. Differential regulation of multiple flagellins in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **180**:303-16.

31. **Klose, K. E., and Mekalanos, J. J.** 1998. Distinct roles of an alternative sigma factor during both free-swimming and colonizing phases of the *Vibrio cholerae* pathogenic cycle. *Mol Microbiol* **28**:501-20.
32. **Kojima, S., and Blair, D. F.** 2001. Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor. *Biochem.* **40**:13041-50.
33. **Kojima, S., Shinohara, A., Terashima, H., Yakushi, T., Sakuma, M., Homma, M., Namba, K., and Imada, K.** 2008. Insights into the stator assembly of the *Vibrio* flagellar motor from the crystal structure of MotY. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:7696-701.
34. **Kushmaro, A., Banin, E., Loya, Y., Stackebrandt, E., and Rosenberg, E.** 2001. *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1383-8.
35. **Kushmaro, A., Loya, Y., Fine, M., and Rosenberg, E.** 1996. Bacterial infection and coral bleaching. *Nature* **380**:396-96.
36. **Kushmaro, A., Rosenberg, E., Fine, M., and Loya, Y.** 1997. Bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **147**:159-165.
37. **Kusumoto, A., Shinohara, A., Terashima, H., Kojima, S., Yakushi, T., and Homma, M.** 2008. Collaboration of FlhF and FlhG to regulate polar-flagella number and localization in *Vibrio alginolyticus*. *Microbiol.* **154**:1390-9.
38. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
39. **Lee, J. H., Rho, J. B., Park, K. J., Kim, C. B., Han, Y. S., Choi, S. H., Lee, K. H., and Park, S. J.** 2004. Role of flagellum and motility in pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **72**:4905-10.
40. **Macnab, R. M.** 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* **57**:77-100.
41. **Macnab, R. M.** 2004. Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim Biophys Acta* **1694**:207-17.
42. **Magariyama, Y., Sugiyama, S., Muramoto, K., Maekawa, Y., Kawagishi, I., Imae, Y., and Kudo, S.** 1994. Very fast flagellar rotation. *Nature* **371**:752.
43. **McCarter, L., Hilmen, M., and Silverman, M.** 1988. Flagellar dynamometer controls swarmer cell differentiation of *V. parahaemolyticus*. *Cell* **54**:345-51.
44. **McCarter, L. L.** 2004. Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**:18-29.
45. **McCarter, L. L.** 1995. Genetic and molecular characterization of the polar flagellum of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **177**.
46. **McCarter, L. L.** 2006. Motility and Chemotaxis. In B. A. a. J. S. F. L Thompson (ed.), *The Biology Of Vibrios*, 1^o ed. ASM Press.

47. **McCarter, L. L.** 1994. MotX, the channel component of the sodium-type flagellar motor. *J Bacteriol* **176**:5988-98.
48. **McCarter, L. L.** 2001. Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**:445-62.
49. **McCarter, L. L.** 2006. Regulation of flagella. *Curr Opin Microbiol* **9**:180-6.
50. **Milton, D., O'Toole, R., Horstedt, P., and Wolf-Watz, H.** 1996. Flagellin A is essential for virulence of *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **178**:1310-1319.
51. **Motaleb, M. A., Corum, L., Bono, J. L., Elias, A. F., Rosa, P., Samuels, D. S., and Charon, N. W.** 2000. *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:10899-904.
52. **O'Shea, T. M., DeLoney-Marino, C. R., Shibata, S., Aizawa, S.-I., Wolfe, A. J., and Visick, K. L.** 2005. Magnesium Promotes Flagellation of *Vibrio fischeri*. *Journal Of Bacteriology* **187**:2058-2065.
53. **Ohnishi, K., Homma, M., Kutsukake, K., and Iino, T.** 1987. Formation of flagella lacking outer rings by flaM, flaU, and flaY mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**:1485-8.
54. **Okabe, M., Yakushi, T., and Homma, M.** 2005. Interactions of MotX with MotY and with the PomA/PomB Sodium Ion Channel Complex of the *Vibrio alginolyticus* Polar Flagellum. *J Biol Chem* **280**.
55. **Ormonde, P., Horstedt, P., O'Toole, R., and Milton, D. L.** 2000. Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **182**:2326-8.
56. **Pallen, M. J., Penn, C. W., and Chaudhuri, R. R.** 2005. Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era. *Trends Microbiol* **13**:143-9.
57. **Prouty, M. G., Correa, N. E., and Klose, K. E.** 2001. The novel sigma54- and sigma28-dependent flagellar gene transcription hierarchy of *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **39**:1595-609.
58. **Rosenberg, E., and Falkovitz, L.** 2004. The *Vibrio shiloi/Oculina patagonica* model system of coral bleaching. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:143-59.
59. **Sato, K., and Homma, M.** 2000. Functional reconstitution of the Na(+)-driven polar flagellar motor component of *Vibrio alginolyticus*. *J Biol Chem* **275**:5718-22.
60. **Sosinsky, G. E., Francis, N. R., DeRosier, D. J., Wall, J. S., Simon, M. N., and Hainfeld, J.** 1992. Mass determination and estimation of subunit stoichiometry of the bacterial hook-basal body flagellar complex of *Salmonella typhimurium* by scanning transmission electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:4801-5.
61. **Terashima, H., Fukuoka, H., Yakushi, T., Kojima, S., and Homma, M.** 2006. The *Vibrio* motor proteins, MotX and MotY, are associated with the basal body of Na-driven flagella and required for stator formation. *Mol Microbiol* **62**:1170-80.
62. **Tian, Y., Wang, Q., Liu, Q., Ma, Y., Cao, X., Guan, L., and Zhang, Y.** 2008. Involvement of LuxS in the Regulation of Motility and Flagella Biogenesis in *V. alginolyticus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **72**:1063-1071.

63. **West, M. A., and Dreyfus, G.** 1997. Isolation and Ultrastructural Study of the Flagellar Basal Body Complex from *Rhodobacter sphaeroides* WS8 (Wild Type) and a Polyhook Mutant PG. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **238**:733-737.
64. **Wu, C.-s.** 2004. *Handbook of Size Exclusion Chromatography and Related Techniques: Revised And Expanded*, 2 nd ed. CRC Press.
65. **Yamaguchi, S., Aizawa, S., Kihara, M., Isomura, M., Jones, C. J., and Macnab, R. M.** 1986. Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **168**:1172-9.
66. **Yonekura, K., Yakushi, T., Atsumi, T., Maki-Yonekura, S., Homma, M., and Namba, K.** 2006. Electron cryomicroscopic visualization of PomA/B stator units of the sodium-driven flagellar motor in liposomes. *J Mol Biol* **357**:73-81.
67. **Yoon, S. S., and Mekalanos, J. J.** 2008. Decreased potency of the *Vibrio cholerae* sheathed flagellum to trigger host innate immunity. *Infect Immun* **76**:1282-8.
68. **Yorimitsu, T., and Homma, M.** 2001. Na(+)-driven flagellar motor of *Vibrio*. *Biochim Biophys Acta* **1505**:82-93.
69. **Yorimitsu, T., Mimaki, A., Yakushi, T., and Homma, M.** 2003. The conserved charged residues of the C-terminal region of FliG, a rotor component of the Na+-driven flagellar motor. *J Mol Biol* **334**:567-83.
70. **Yorimitsu, T., Sato, K., Asai, Y., Kawagishi, I., and Homma, M.** 1999. Functional interaction between PomA and PomB, the Na(+)-driven flagellar motor components of *Vibrio alginolyticus*. *J Bacteriol* **181**:5103-6.
71. **Yorimitsu, T., Sowa, Y., Ishijima, A., Yakushi, T., and Homma, M.** 2002. The systematic substitutions around the conserved charged residues of the cytoplasmic loop of Na+-driven flagellar motor component PomA. *J Mol Biol* **320**:403-13.
72. **Zhou, J., Lloyd, S. A., and Blair, D. F.** 1998. Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:6436-41.