



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización del Papel de CtrA en la regulación de los
genes flagelares Fla2 en *Rhodobacter sphaeroides*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

Elidet Gómez César



DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Rosa Laura Camarena Mejía
2015

Ciudad Univeritaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Gómez
César
Elidet
11 67 16 08
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología

2. Datos del Tutor

Dra.
Laura
Camarena
Mejía

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Luciana
Raggi
Hoyos

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Luis
Servín
González

5. Datos de sinodal 3

Dra.
Claudia Andrea
Segal
Kischinevzky

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Alfonso José
Vilchis
Peluyera

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización del Papel de CtrA en la regulación de los genes flagelares Fla2 en
Rhodobacter sphaeroides.

64 p.
2015

AGRADECIMIENTOS

A los abuelitos Trini y Toto porque sin ustedes dos nada de lo que conozco hubiera sido posible. A mi mamá quien ha dedicado gran parte de su vida a ser de mí y mis hermanos personas de bien y sobre todo trabajadoras. Todo lo que soy es en gran parte a ti, Te amo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por juntar a personas tan maravillosas académicamente como personalmente para mí.

Agradezco inagotablemente a mis amigos; Alicia, Ángel, Gaby, Isaac, Laura, Karen, Melania, Yuritzí, Víctor y Sahid por todos y cada uno de los momentos fuera y dentro de la facultad que nos hicieron divertirnos como enanos y confiar como sabios en esta bonita amistad.

A mi hermana Diana por ser tan trabajadora, responsable y divertida siempre siendo un ejemplo para mí. A mi hermano Gerardo por ser el hombre de la casa con todo lo que implica, electricista, cocinero, albañil etc., y siempre estar con nosotras. A mi papá por su apoyo. Especialmente a mi primo, Antonio por crecer a mi lado y por las inmensas conversaciones tan extrañas y loquitas e interesantes de casi cada fin de semana.

A Alejandro Castrejón por haber echo de Elidet una mejor persona en varios aspectos y por compartir conmigo sus poderosos sueños.

A la Doctora Laura Camarena Mejía por aceptarme en su laboratorio, por confiar en mi (se lo agradezco infinitamente), por su tiempo y sobre todo por compartir con todos nosotros su conocimiento y amor por la ciencia... y por *R. sphaeroides*. A Anet Rivera por su tiempo y esfuerzo por querer hacer de mí una persona crítica y analítica en el campo de la ciencia, eso incluye el no haber claudicado con esta torpe pupila.

A Auro por todo su apoyo y sonrisas, también por mandarme a clases cuando aún quería quedarme a seguir con un experimento.

A Clelia y Benjamín por toda su ayuda con mis dudas en el sistema CckA-ChpT-CtrA. Además CtrA les agradece el grupo fosforilo.

Y el resto de mis compañeros de laboratorio; Caleb, José, Raúl, Sandra, Manuel, Verónica, Cindy, Sebastián, Ana Laura, Luis David, Andrés, Telma por hacer de las comidas momentos muy divertidos.

A los miembros de mi jurado; Dra. Lucina Raggi, Dr. Luis Servín, Dra. Claudia Segal y al M. en C. Alfonso Vilchis por el tiempo dedicado a la revisión de mi trabajo y por ayudarme a presentar un trabajo con mayor calidad y bonito.

Finalmente agradezco, el apoyo financiero de PAPIIT a través del Proyecto IN204614 con Título: “Estudio *in vivo* e *in vitro* de la morfogénesis del eje flagelar de *Rhodobacter sphaeroides* y análisis de las interacciones entre dos nuevos componentes del estator que son esenciales para la rotación del flagelo”

A todos ustedes mucho éxito en la vida

Dedicatoria

A toda mi familia, especialmente a la mujer de mi vida

Teresa.

Índice

Resumen	2
Introducción	
▪ Flagelo	3-4
▪ Biosíntesis Flagelar	4-7
▪ Motilidad	7-8
▪ Regulación Genética; Operones Flagelares	8-11
Antecedentes Particulares	
▪ Proteína CtrA	11-13
▪ Sistema CckA-ChpT-CtrA en otras bacterias	13-14
▪ <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	14-18
Planteamiento del Problema	18-19
Hipótesis	19
Objetivos	19
Material y Método	19-30
Resultados	30-37
Discusión	37-40
Conclusión	40
Perspectivas	40-41
Apéndice	41-52
Referencias	52-60
Anexos	60-65

RESUMEN

La motilidad y la quimiotaxis son procesos complejos que utilizan una gran variedad de microorganismos para sobrevivir bajo una amplia variedad de condiciones ambientales. El flagelo bacteriano es la estructura responsable de la motilidad de muchas bacterias. Este apéndice es resultado de la expresión de aproximadamente 50 genes cuyos productos se encuentran involucrados en procesos de ensamblaje, exportación y control transcripcional de las proteínas del flagelo.

La biosíntesis flagelar bacteriana es un proceso altamente regulado. En *Salmonella* spp., los genes flagelares de motilidad y quimiotaxis constituyen una jerarquía de expresión de tres clases, siendo el operón de clase I u operón maestro *flhDC* el encargado de desencadenar la cascada biosintéticas. Por su parte, reportes en α -proteobacterias como *Caulobacter crescentus* y *Rhodobacter capsulatus* han revelado la importancia de la proteína CtrA en la regulación de la motilidad. CtrA es una proteína perteneciente a la familia de proteínas reguladoras de respuesta destacadas en sistemas de dos componentes. En su forma activa, fosforilada en un residuo de aspártico conservado, CtrA es capaz de activar o reprimir la expresión de sus genes blanco. En este trabajo se caracterizó la presencia e importancia de esta proteína para la regulación de la expresión de genes flagelares 2 de *Rhodobacter sphaeroides*. A partir del aislamiento y caracterización de una cepa mutante en *ctrA*, y una cepa doble mutante en *ctrA* y su regulador *sciP*, se puede confirmar que *ctrA* y su producto proteico en esta bacteria son funcionales y esenciales para la correcta expresión de los genes flagelares *fla2*. Adicionalmente, se llevó a cabo la sobre-expresión y purificación de la proteína CtrA con el fin de continuar el estudio sobre esta proteína.

INTRODUCCIÓN

La motilidad y la quimiotaxis son procesos complejos que utilizan una gran variedad de microorganismos para sobrevivir bajo una amplia variedad de condiciones ambientales (Macnab, 1996). La motilidad flagelar representa una ventaja importante para las bacterias, ya que les permite desplazarse hacia condiciones favorables o en caso contrario, evitar ambientes perjudiciales. En consecuencia, las bacterias flageladas compiten con mayor éxito en comparación con otros microorganismos (Fenchel, 2002).

El flagelo bacteriano es la estructura responsable de la motilidad de muchas bacterias (Magariyama, 1994). Este apéndice es producto de la expresión de aproximadamente 50 genes cuyos polipéptidos se encuentran involucrados en procesos de ensamblaje, exportación y control transcripcional del mismo flagelo; esta estructura tiene componentes citoplasmáticos, periplasmáticos y externos a la célula. El filamento flagelar es una propela helicoidal semi-rígida que rota gracias a la energía generada por el motor flagelar, el cual es impulsado por el gradiente de protones o iones de sodio a través de la membrana celular a velocidades de hasta 1000 Hz (Magariyama, 1994). La dirección de la rotación del flagelo es controlada por el complejo “switch” (interruptor), ubicado en la base del flagelo y está formado por las proteínas FliM, FliN y FliG, que responden a la presencia de la proteína quimiosensora, CheY-P (Kojima, 2007).

El flagelo es una estructura constituida de tres partes: el filamento (propela helicoidal), el gancho (unión universal) y la estructura basal (motor rotatorio) (**figura 1**). Cabe destacar que la localización y el número de flagelos varía entre las especies bacterianas (**Figura 2**).

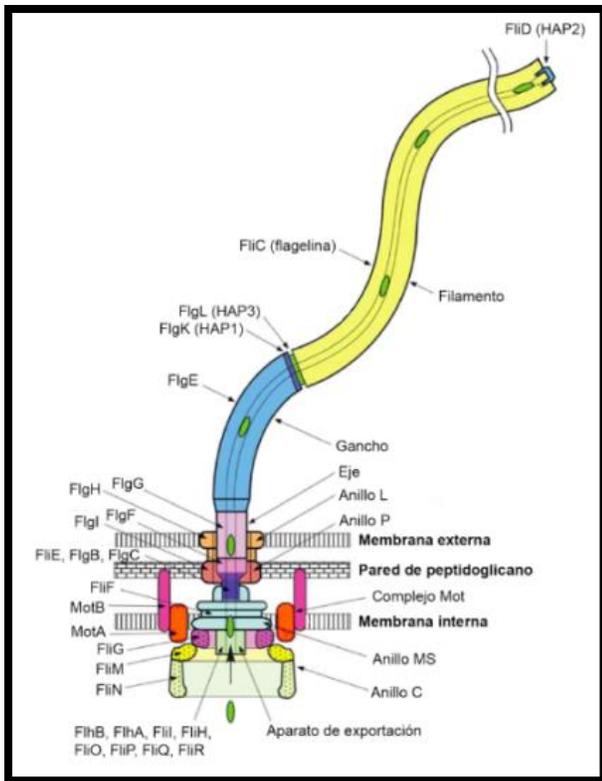


Figura 1. Representación esquemática del flagelo bacteriano (Minamino, 2004)

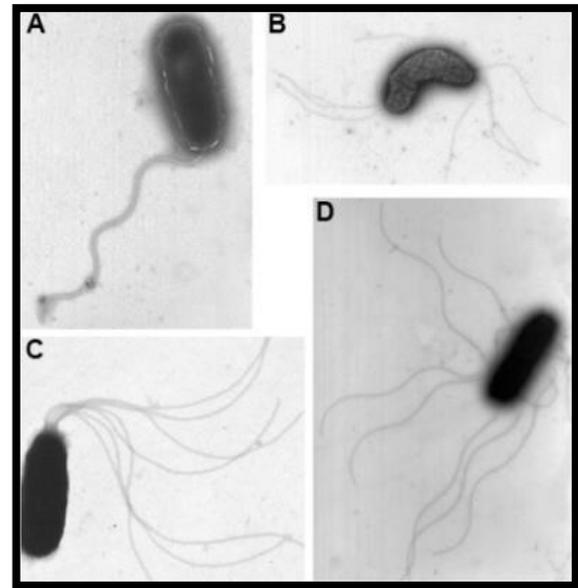


Figura 2. Patrones de flagelación de diferentes bacterias. A) *Vibrio shilonii*, monotrico y polar B) *Rhodospirillum rubrum*, anfitrico C) *Vibrio fischeri*, lofotrico D) *Salmonella enterica*, peritrico.

Además, algunas bacterias flageladas se pueden desplazar en medios líquidos (swimming) y sobre superficies (swarming) (Terashima, 2008). En estas bacterias el nado en líquido es promovido por un solo flagelo polar mientras que el desplazamiento sobre superficies o en ambientes viscosos está habilitado por la producción de numerosos flagelos laterales.

Biosíntesis flagelar

La biosíntesis flagelar inicia con el ensamblaje de los componentes de la membrana interna (**figura 3**). En procariontes la mayoría de las proteínas de la membrana citoplasmática son insertadas a través del traslocón SecYEG (du Plessis, 2011). El anillo MS, ubicado en la membrana interna (Mi) está formado por aproximadamente 27 subunidades de la proteína FliF (Ueno, 1992). El anillo C se une en la cara citoplasmática del anillo MS (Francis, 1994). El anillo C contiene a las proteínas del interruptor (“switch”) FliM y FliN (Zhao, 1996) y está asociado con el anillo MS a través de la proteína FliG (Thomas, 2006).

El ensamblaje de estas tres proteínas del cuerpo basal requiere de la plataforma del anillo MS (Katayama, 1996). En el centro del anillo MS, se ensamblan seis proteínas de Mi que conforman el aparato de exportación flagelar (FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ y FliR); éstas proteínas junto con tres proteínas solubles adicionales (FliJ, FliH y FliI) son las responsables de la exportación de la mayoría de los componentes axiales del flagelo (Macnab, 2003). El aparato de exportación flagelar es homólogo a los sistemas de secreción tipo III, presentes en bacterias patógenas de plantas y animales (Macnab, 2003; Abby, 2012; Van Gijsegem, 1995).

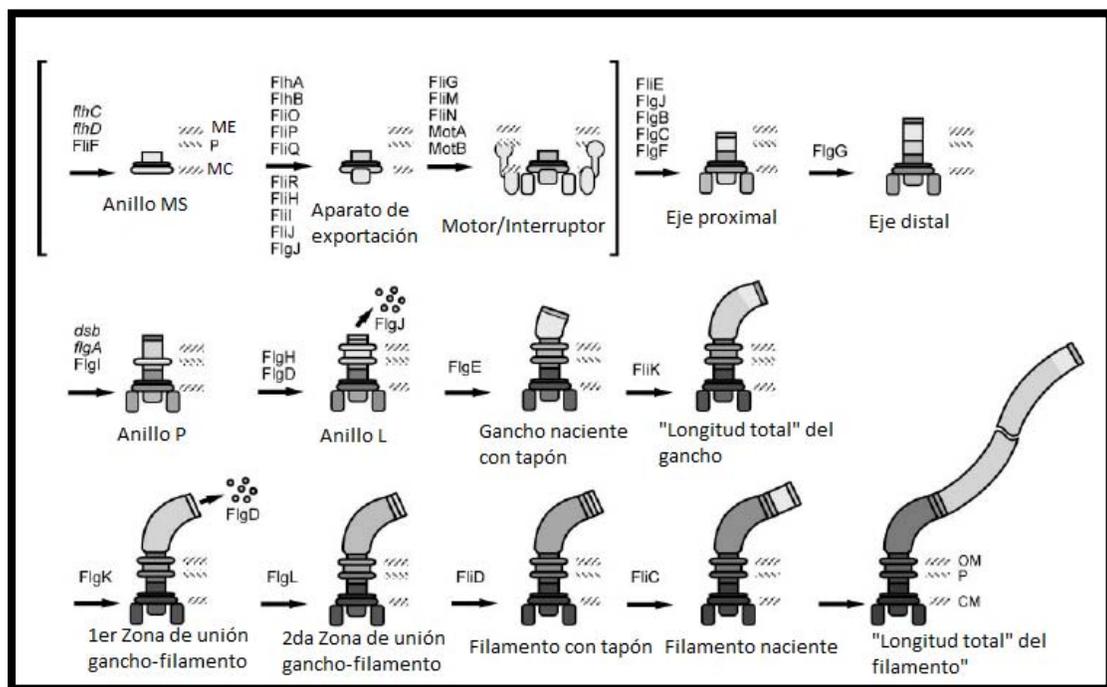


Figura 3. Vía morfogenética del flagelo de *Salmonella* spp. Los paréntesis indican las subestructuras que son ensambladas antes de la utilización de la vía de exportación de tipo III. Las proteínas Mot constituyen el estator elemento del motor y son proteínas integrales de membrana que rodean al anillo MS, mientras que FliG y el anillo C (FliM y FliN) constituyen los elementos del rotor (Macnab, 2003).

Una vez formado el anillo MS y el aparato de exportación, la primera proteína en ser secretada es la proteína FliE. FliE es un componente del cuerpo basal que se ubica en el espacio periplásmico y se ensambla sobre el anillo MS, a continuación se ensamblan los componentes del eje (Macnab, 2003).

El eje está compuesto por las proteínas FlgB, FlgC, FlgF y FlgG (Macnab, 2003), se añaden aproximadamente 6 subunidades de cada una de las proteínas FlgB, FlgC y FlgF de forma secuencial hasta que el eje alcanza la pared celular, en este punto, aproximadamente 26 subunidades de la proteína FlgG se ensamblan para formar el eje distal que cruza los anillos L y P (Minamino, 2007; Okino H, 1990). La formación del eje requiere de la proteína FlgJ, que es exportada al espacio periplasmático vía el aparato de exportación flagelar y su extremo N-terminal actúa como andamiaje para facilitar el crecimiento del eje en formación (Kubori, 1992; Hirano, 2001). FlgJ también tiene la actividad de acetilglucosaminidasa en su dominio C-terminal, hidrolizando el peptidoglicano para permitir que el eje penetre en la capa de peptidoglicano (Nambu, 1999; Herlihey, 2014).

El anillo P (constituido por FlgI) se forma alrededor del eje distal, y se encuentra en estrecho contacto con la pared de peptidoglicanos, posteriormente, se forma el anillo L (FlgH) en la membrana externa (Chevance, 2007). FlgI y FlgH son exportadas por el sistema general de exportación, dependiente de SecA. La formación del anillo P requiere del sistema Dsb (Dailey, 1993). La proteína FlgI contiene dos residuos de cisteína importantes para la estabilidad de la proteína (Hizkuri, 2006). La formación del anillo P también requiere a la proteína FlgA que actúa como chaperona periplasmática, ayudando a la reacción de polimerización de FlgI en el anillo P (Nambu, 2000). Los anillos L y P permiten el paso del eje a través de la capa de peptidoglicanos y de la membrana externa; además, se ha propuesto que estos forman una especie de forro que permite la libre rotación del eje (DeRosier, 1998). Recientemente se determinó que la formación del anillo L, permite la remoción de la proteína FlgJ del extremo distal del eje y con ello el cese del crecimiento de esta estructura. Por lo tanto FlgH forma una especie de seguro que impide el crecimiento del eje más allá de la membrana externa (Cohen, 2014). Las siguientes proteínas en ser ensambladas son FlgD y FlgE. FlgD se asocia a la punta del eje y actúa como un andamiaje para llevar a cabo la polimerización de la proteína FlgE, que da lugar al gancho (Ohnishi, 1994; Hirano, 1994). Después de que el gancho alcanza una longitud definida, FlgD se disocia de la punta del gancho para ser remplazada por las proteínas HAPs (de las siglas en inglés, hook associated proteins): FlgK (HAP1), FlgL (HAP3) y FlhD

(HAP2) (Macnab, 1996). La exportación de FlgK y FlgL es facilitada gracias a la chaperona FlgN (Fraser, 1999), por su parte la proteína FliT es chaperona de FliD (Bennett, 2001). Las subunidades del filamento FliC son insertadas en el extremo distal del flagelo en formación, mientras que la proteína FliD permanece en la punta, facilitando la incorporación de las nuevas subunidades de flagelina (Macnab, 2003). FliD actúa como tapa para facilitar la elongación del filamento por inserción de cada subunidad de FliC entre las zonas de FlgL y FliD (**figura3**) (Maki-Yonekura, 2003).

Motilidad

El motor flagelar es una máquina que transforma la energía química en mecánica, este se puede dividir en dos componentes: rotor y estator (proteínas MotA y MotB) (Zhou, 1998). La fuerza de torsión o rotación en el motor flagelar se genera por las interacciones rotor-estator acopladas a la translocación de protones a través de un canal formado dentro del estator. MotA es una proteína con cuatro cruces transmembranales y tiene entre las hélices transmembranales 2 y 3 (TM2-TM3) una larga asa citoplasmática con residuos cargados, importantes para el funcionamiento del motor flagelar. La proteína MotB presenta un pequeño dominio citoplasmático, un cruce transmembranal y una larga región periplasmática que en su extremo C-terminal se asocia a la pared de peptidoglicanos. En la región TM de MotB se encuentra un residuo conservado de ácido aspártico que es esencial para el transporte de protones a través del canal. Se ha estimado que hay al menos 11 copias de los complejos MotA/MotB alrededor del rotor (Reid, 2006). La estequiometría de los complejos del estator es (MotA₄MotB₂), ubicándose las hélices TM de MotA alrededor de las hélices TM de MotB. Se piensa que la unión de un protón al residuo conservado Asp32 de MotB presente en el canal, induce un cambio conformacional en la proteína MotA, que permite la interacción de los residuos cargados del asa citoplasmática de MotA (Arg90 y Glu98), con los residuos cargados del dominio carboxilo terminal de FliG (Lys264, Arg281, Asp281, Asp288, Asp289 y Arg297) (Lloyd, 1997). La repulsión de cargas provoca el movimiento del rotor, quien a su vez transmite el torque hacia el eje, el gancho y el filamento. Las mutaciones de tipo sustitución del residuo Asp32 de MotB por varios aminoácidos, excepto por glutamato, suprime la

motilidad, en específico la rotación, y no el ensamblaje del flagelo. Por otro lado, de forma individual, ninguno de los residuos ácidos en MotA y FliG son esenciales para la generación del torque. Sin embargo, la neutralización o la inversión de cargas de este conjunto de residuos alteran la rotación del motor, por lo que se cree que funcionan colectivamente. Hasta el momento no se sabe acerca de un residuo crítico para la rotación presente en las proteínas MotA y FliG, por lo que el único residuo cargado esencial para la rotación es el Asp32 de MotB (Zhou, 1998).

Regulación genética; operones flagelares

La biogénesis del flagelo bacteriano es un proceso altamente regulado que en *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., requiere de la expresión de más de 50 genes para la formación y correcta función del flagelo (Macnab, 2003). La gran cantidad de energía que se requiere para el proceso de ensamblaje provoca que las bacterias hayan desarrollado sistemas altamente organizados y regulados (regulación transcripcional, pos-transcripcional) para la construcción del mismo (Terashima, 2008).

Los genes involucrados en la síntesis del flagelo bacteriano forman una cascada ordenada (o jerarquía) en la que la expresión de un gen presente en un determinado nivel requiere de la transcripción de otros genes ubicados en un nivel más alto (Macnab, 1996). En la parte superior de la jerarquía está el operón maestro *flhDC* en enterobacterias (Kutsukake, 1990), y los genes maestros *fleQ* o *fliA* en *Pseudomonas aeruginosa* (Arora, 1997) y *Vibrio cholerae* (**figura 4**).

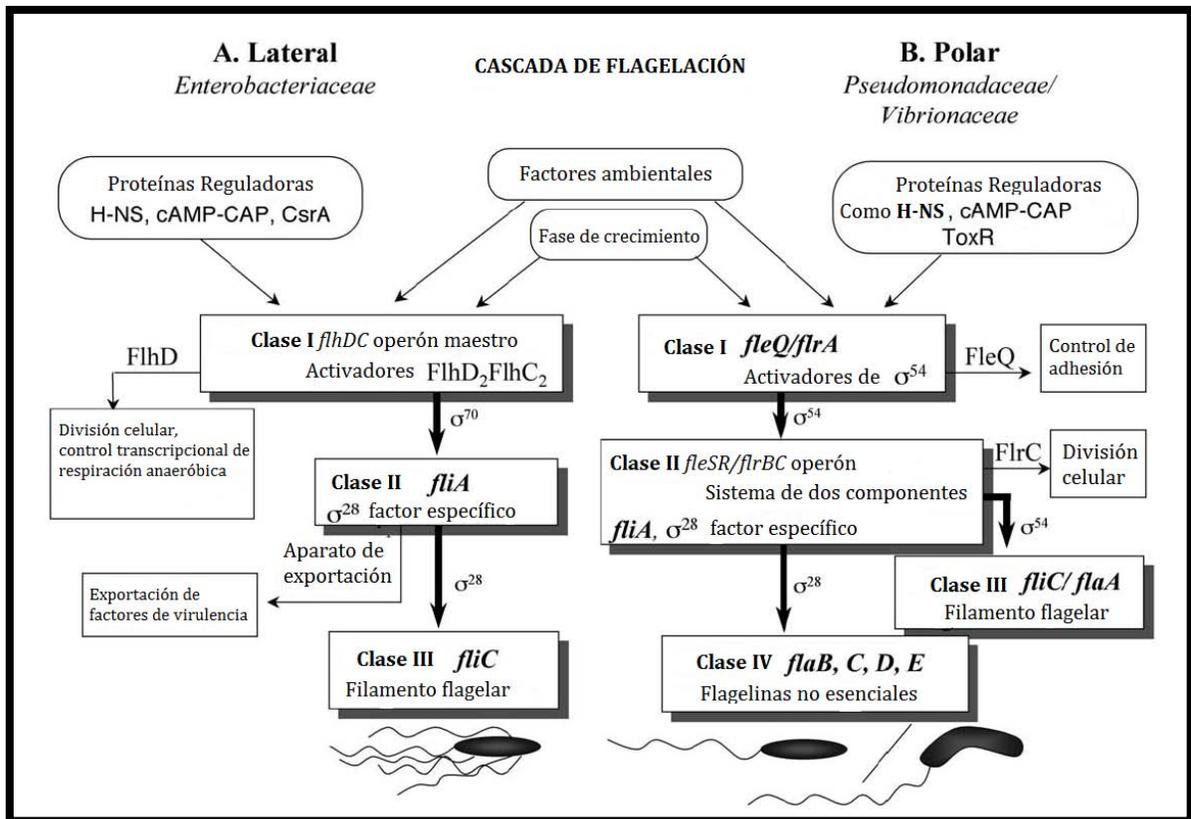


Figura 4. Cascada de flagelación. Flagelo peritricos (familia de Enterobacteriaceae) y polar (familias de Pseudomonadaceae, Vibrionaceae). Comparación de los factores que controlan la expresión de los genes flagelares y su conexión con otros procesos celulares (Soutourina, 2003).

En *Salmonella* sp., los genes flagelares de motilidad y quimiotaxis constituyen una jerarquía de expresión de tres clases (Kutsukake, 1990). En la parte superior de la jerarquía está el operón de clase I u operón maestro, que contiene los genes *flhDC* (Liu, 1994). Las proteínas FlhD y FlhC forman un complejo heterotetramérico (FlhD₂FlhC₂) que mediante su interacción con la RNA polimerasa asociada al factor sigma-70 estimula la expresión de los genes de clase II. Los productos de los genes de esta clase, son requeridos para la formación y ensamblaje del gancho y del cuerpo basal (HBB de las siglas hook basal body). En esta clase también son producidas las proteínas que controlan la expresión de los genes de la clase III, FliA (σ^{28}) y FlgM. La proteína FliA es un factor σ necesario para el reconocimiento de los promotores de la clase III, mientras que FlgM es un factor anti- σ , que mantiene a la proteína FliA inactiva hasta que termina la formación del HBB. En este

momento, la proteína FlgM es secretada a través del aparato de exportación flagelar, lo que permite que FliA se asocie a la RNA polimerasa para llevar a cabo la expresión de los genes de clase III, entre ellos los genes que codifican para las proteínas HAPs, flagelina (fliC), y los genes de quimiotaxis (**figura 4**). (Kutsukake, 1990).

Una forma de regulación de los genes flagelares, que contrasta con las anteriores debido al tipo de activadores transcripcionales involucrados, es aquella descrita en la bacteria *C. crescentus*. En esta bacteria, en lo alto de la jerarquía, se encuentra el regulador maestro CtrA, el cual en estado fosforilado promueve la expresión de los genes flagelares de clase II, entre los que se incluyen a los genes que codifican para el anillo MS, para las proteínas del aparato de exportación y el anillo C (FliM, FliN y FliG). Además son transcritos los genes regulatorios *rpoN*, *flbD* y *fliX*. La proteína FliX mantiene inactivo a FlbD hasta que se ha formado el anillo MS y el aparato de exportación flagelar. En este momento, mediante un mecanismo desconocido, FlbD puede ser fosforilado y junto con el factor σ -54 (RpoN) inicia la transcripción de los genes de clase III (anillos L, P y gancho) y IV (flagelinas) (Curtis, 2010).

La proteína CtrA es un regulador de respuesta que forma parte de los sistemas de dos componentes bacterianos (en inglés TCS). Estos sistemas pueden estimular cambios en la expresión génica y el comportamiento en respuesta a una variedad de estímulos ambientales e intracelulares. Un típico TCS consiste de una cinasa de histidina (HK) sensora y un regulador de respuesta (RR). La cinasa de histidina es autofosforilada en respuesta a algún estímulo particular y posteriormente transfiere el grupo fosforilo a un regulador de respuesta, el cual una vez fosforilado produce una respuesta adaptativa (**apéndice 1, detalles del funcionamiento de los TCS**). Varios ejemplos de sistemas de transducción de señales son OmpR-EnvZ, NtrB-C, PhoB-R y UhpABC en *E. coli* y ComP-A en *Bacillus subtilis*, los cuales detectan y generan respuestas adaptativas ante cambios en osmolaridad o concentración de compuestos como amoníaco, fosfato, azúcares fosforiladas, además de la densidad poblacional (Hoch, 2000). Otro ejemplo muy bien estudiado y de interés particular para este trabajo es el sistema de transducción de

señales formado por CckA-CtrA, el cual como se menciona en el párrafo anterior, controla la síntesis del flagelo en *C. crescentus*, así como su ciclo celular.

Las proteínas CckA-ChpT-CtrA juegan un papel crítico en el control de la progresión del ciclo celular y la morfogénesis de *C. crescentus* (Jacobs, 2003). Este mecanismo de regulación se centra en el regulador de respuesta CtrA (Quon, 1996) la histidín-cinasa, CckA (Jacobs, 1999), la histidín-fosfotransferasa ChpT (Biondi, 2006), así como por el factor de transcripción SciP (Gora, 2010). CckA y ChpT activan a CtrA mediante la fosforilación en un residuo de aspartato conservado, provocando de esta manera cambios en la expresión de hasta el 25% de los genes presentes en esta bacteria (**figuras 5a y 7, resumen de proteínas implicadas**) (Laub, 2000).

La proteína CtrA (de las siglas regulador transcripcional del ciclo celular A) fue primeramente identificada como una proteína esencial para la replicación del DNA en la α -proteobacteria *C. crescentus* (Quon, 1996); ésta se encuentra agrupada dentro de la familia de OmpR, que se caracteriza por tener un dominio C-terminal de unión al DNA, y su actividad de represor o activador transcripcional depende de la fosforilación de su dominio regulador N-terminal (Delgado, 1993; Rampersaud, 1994; Russo, 1991). CtrA contiene cada uno de los aminoácidos conservados que definen a los miembros de esta familia, incluyendo el sitio de fosforilación, un residuo de aspartato (Asp51) y otros residuos que se conservan dentro del sitio activo (Volz, 1993).

Proteína CtrA

Ya que CtrA ha sido exhaustivamente estudiada en *C. crescentus*, brevemente se describirá su función en este microorganismo.

El ciclo celular de la bacteria *C. crescentus* es acompañado por transiciones morfológicas que producen una asimetría en la célula predivisional (**figura 5b**). CtrA es un regulador de respuesta que regula al menos 55 genes y operones, entre los que destacan aquellos que controlan el ciclo celular (Laub, 2002), y la formación del flagelo (descrito en la sección anterior) (**figura 5 a**). En este microorganismo, CtrA es controlado por una combinación de

tres factores: transcripción, fosforilación y proteólisis (Tan, 2010). A nivel transcripcional *ctrA* es activado por *GrcA*, cuya expresión se encuentra directamente controlada por *DnaA*, *CtrA* activa la transcripción de *ccrM*, el cual codifica para una metiltransferasa, que mediante metilación activa a uno de los promotores de *dnaA*. Estas proteínas forman un circuito de activación positiva que da lugar a la expresión de proteínas esenciales para la división celular (*FtsA*, *FtsZ*, *FtsQ*, *FtsW*), y para la replicación (helicasa, DNA polimerasa III, DNA girasa, DNA primasa).

A nivel de actividad, *CtrA* es fosforilado por la histidín-cinasa *CckA* y la fosfotransferasa *ChpT*; la actividad de *CckA* es controlada a su vez por la proteína *DivL*, que estimula la actividad cinasa de *CckA*. Sin embargo, el regulador de respuesta *DivK* en estado fosforilado puede unirse a *DivL* e impedir la activación de *CckA*. El estado de fosforilación de *DivK* es controlado por la cinasa *DivJ* y por la fosfatasa *PleC*, las cuales se ubican en polos opuestos de la célula. La distribución espacial de *PleC* y *DivJ* controla parte del desarrollo asimétrico de esta bacteria (Tsokos, 2012). Finalmente, la degradación de *CtrA* ocurre cuando *ChpT* deja de fosforilar a la proteína *CdpR*, la cual en estado defosforilado favorece la localización de la proteasa *ClpXP* en el polo celular. El complejo *CtrA-RcdA* es reclutado al polo celular gracias a la diguanilato ciclasa *PopA* (Smith, 2014), que da lugar a la drástica disminución intracelular de *CtrA*, permitiendo que se inicie un nuevo ciclo (Domian, 1997; McGrath, 2006).

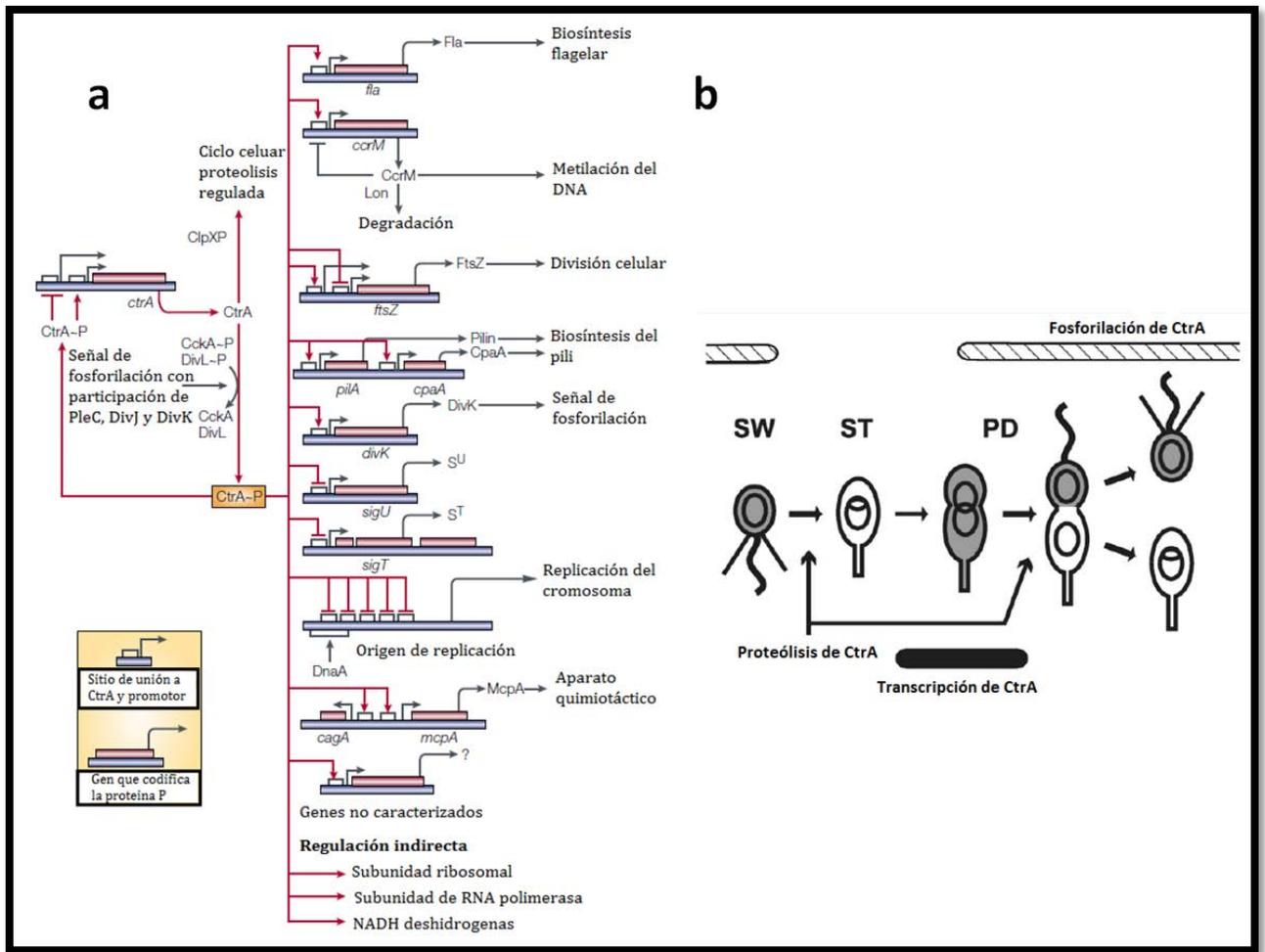


Figura 5. a) Red genética controlada por el regulador de respuesta CtrA. Ciclo celular dependiente del control de la transcripción, fosforilación y proteólisis de CtrA. La proteína CtrA es activada por fosforilación, que está mediada por CckA. La proteína CtrA es degradada por la proteasa ClpXP en la transición de células nadadoras a las células prostecadas. CtrA-P se une a sitios en el origen de replicación, inhibiendo con ello la iniciación de la replicación del DNA en células nadadoras y en células predivisionales tempranas. CtrA-P también activa o reprime la transcripción de varios genes en el ciclo celular. **b)** Cambios en la expresión de CtrA a lo largo del ciclo celular en *C. crescentus* (Jensen, 2002).

Además, recientemente se encontró que el factor de transcripción SciP, regula a CtrA uniéndosele e inhibiendo de esta manera su acción como activador transcripcional. SciP es una proteína de 93 residuos de aminoácidos con un peso de 11 kDa y una estructura hélice-giro-hélice que representa a una clase de moléculas que modulan la actividad del regulador de respuesta sin afectar a la fosforilación (Gora, 2010).

Sistema CckA-ChpT-CtrA en otras bacterias

Estudios bioinformáticos, han hecho evidente la conservación de esta proteína entre diferentes especies de α -proteobacterias. Homólogos con diferentes grados de similitud en secuencia de residuos de aminoácidos han sido encontrados en *Brucella abortus* (80%), *Rhodobacter capsulatus* (73%), *Sinorhizobium meliloti* (90%), *Rhodobacter sphaeroides* (78%), entre otras (**figura 6**) (Bellefontaine, 2002; Lang, 2000; Barnett, 2001).

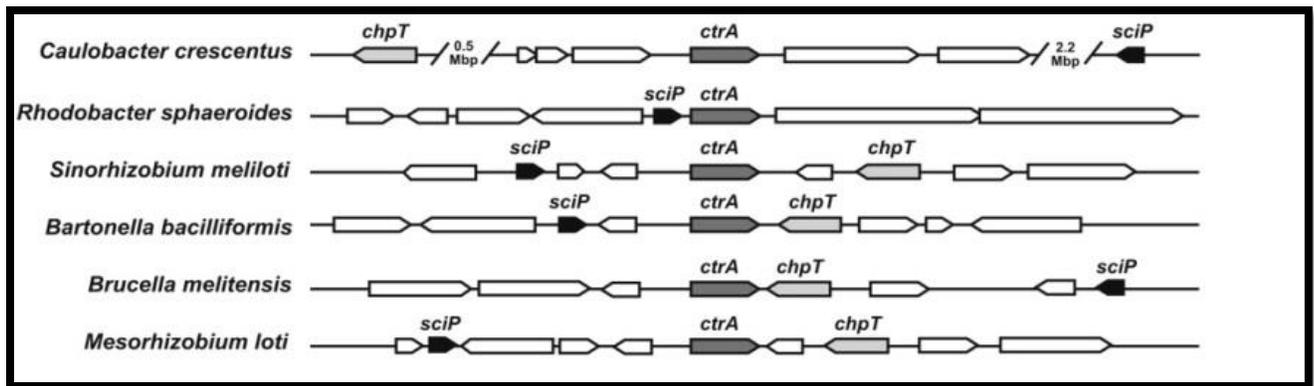


Figura 6. Organización genómica de ortólogos de *ctrA*, *chpT*, y *sciP* en *Rhodobacter sphaeroides* y otras α -proteobacterias (Gora, 2010).

En *R. capsulatus* se ha demostrado que CtrA no es esencial para la viabilidad, sin embargo se ha observado que la expresión de 216 genes es afectada en ausencia de CtrA, entre ellos destacan los genes RcGTA (agentes de transferencia genética en *R. capsulatus*) (Lang, 2000) y los genes flagelares. En ambos casos se propone a CtrA como un regulador positivo quizá a nivel transcripcional (Lang, 2001).

En el año 2012, estudios realizados en *R. capsulatus* sugirieron un modelo de regulación de los genes flagelares similar al presentado en *C. crescentus*, donde homólogos de CckA, ChpT, CtrA y SciP fueron involucrados en la expresión de los genes flagelares y en la producción de RcGTA (**figura 7b**) (Mercer, 2012).

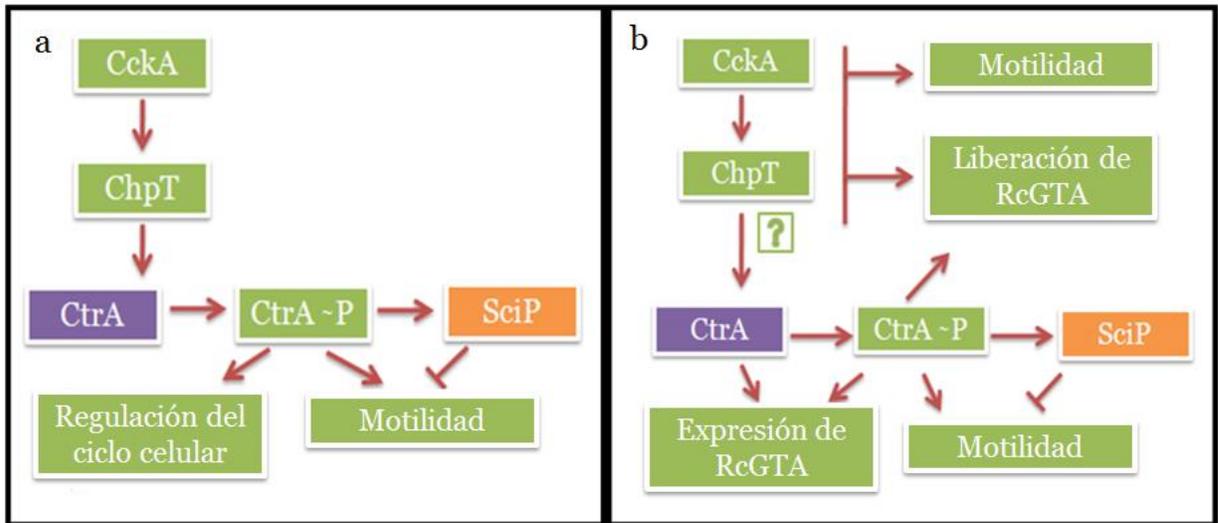


Figura 7. Modelos propuestos del sistema de dos componentes CckA-ChpT-CtrA. CtrA funciona como el regulador de respuesta y es fosforilado por la histidín cinasa CckA y la fosfotransferasa ChpT
a) *Caulobacter crescentus* **b)** *Rhodobacter capsulatus* (Mercer, 2012)

Por otra parte, estudios con *Brucella abortus* y *Sinorhizobium meliloti* han demostrado que en estos microorganismos CtrA es esencial para la sobrevivencia. Cepas de *B. abortus* que sobre-expresan a CtrA conducen a la deformación de la morfología, ya que se observan células de mayor tamaño y ramificadas, sugiriendo que CtrA participa en el ciclo celular. Además, en este mismo estudio se identificaron tres diferentes promotores (P1, P2' y P2) para *ctrA*, sugiriendo una regulación compleja (Bellefontaine, 2002). *S. meliloti* muestra 5 promotores, lo que se presume como un mecanismo de mayor regulación en comparación con otras α -proteobacterias (Barnett, 2001).

Rhodobacter sphaeroides

R. sphaeroides es una bacteria púrpura no sulfurosa de alta diversidad metabólica que pertenece al subgrupo de las α -proteobacterias. Esta bacteria puede crecer utilizando cualquiera de las dos respiraciones, aeróbica o anaeróbica y puede realizar fotosíntesis.

Los compuestos orgánicos (como ácidos) son la fuente de carbono durante el crecimiento aeróbico y fotoheterotrófico, mientras que el CO₂ es usado como fuente de carbono durante el crecimiento autotrófico. Además *R. sphaeroides* también puede fijar N₂, cuando este elemento es escaso. Estudios de esta diversidad metabólica han permitido observar un perfil de expresión génica flexible, donde los cambios en las condiciones de crecimiento se acompañan de cambios a gran escala en la expresión génica (Mackenzie, 2007).

El genoma de esta bacteria consta de dos cromosomas circulares (cromosoma I, 3.11 Mb y el cromosoma II, 0,9 Mb) más varios plásmidos (Mackenzie, 2001).

Entre las cepas de *R. sphaeroides* más utilizadas en los laboratorios a nivel mundial, destaca la cepa WS8 (tipo silvestre), la cual se emplea como modelo para realizar estudios relacionados con la biogénesis flagelar, la motilidad y la quimiotaxis. Esta cepa se caracteriza por poseer un único flagelo de localización subpolar (denominado actualmente Fla1) mirar **figura 8**, cuya rotación impulsa el cuerpo celular a velocidades que alcanzan hasta 100µm/s (Olmos, 2010) presentando el patrón de nado tridimensional aleatorio caracterizado por periodos de nado recto interrumpidos por eventos de reorientación. El motor de este flagelo es dependiente del gradiente de H⁺ (Macnab, 1996).



Figura 8. *Rhodobacter sphaeroides* cepa WS8. Célula con un único flagelo subpolar. Laboratorio del Doc. Georges Dreyfus.

Al igual que ocurre en otros microorganismos, la transcripción de los genes flagelares Fla1 sigue un patrón jerárquico. En lo alto de la jerarquía se encuentra el regulador maestro

fleQ, la proteína FleQ activa la transcripción de los genes de clase II entre los que se encuentran los genes que codifican para las proteínas FliF (anillo MS), FliG (anillo C), las proteínas de exportación FliHI y el activador transcripcional FleT. La proteína FleQ se asocia con FleT y este complejo lleva a cabo la activación de los genes de clase III. En esta clase son expresados el resto de los genes necesarios para la formación del cuerpo basal y del gancho (HBB), así como los genes *fliA* y *flgM*. La proteína FliA es un factor σ alternativo que reconoce la secuencia nucleotídica de los promotores de clase IV, y FlgM es un factor anti- σ que mantiene inactivo a FliA hasta la completa formación del HBB. En la clase IV son expresados los genes que codifican para la flagelina, y las proteínas FliS y FliD (**figura 9**). (Poggio, 2007).

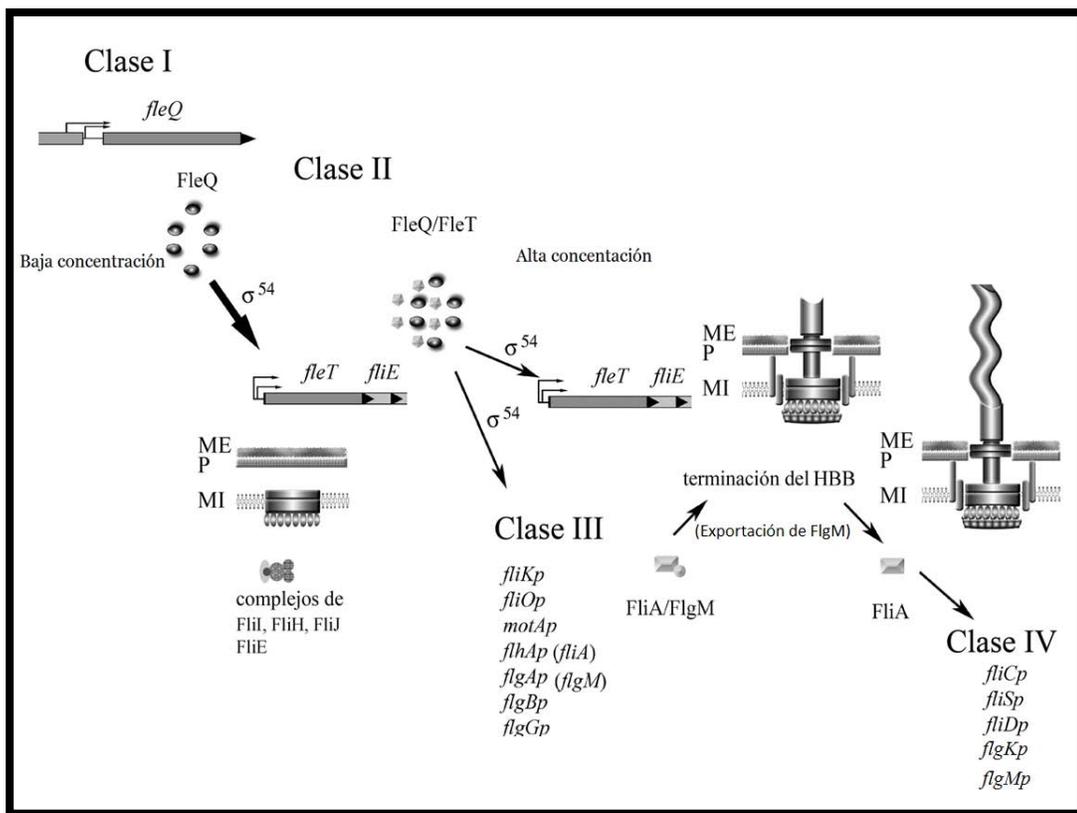


Figura 9. Modelo propuesto de la jerarquía flagelar en *R. sphaeroides* (Poggio, 2005)

Como resultado de la secuenciación del genoma de *R. sphaeroides*, se detectó la presencia de un segundo conjunto de genes que podría dar lugar a la formación de un segundo

flagelo (Mackenzie, 2001). A estos genes se les denominó *fla2* y durante algún tiempo se consideró que estos podrían ser pseudogenes ya que hasta ese momento no había sido posible observar la existencia de un segundo flagelo en *R. sphaeroides*. Sin embargo, recientemente fue posible aislar en el fondo genético *fla1*- una cepa capaz de nadar gracias a una mutación puntual que permitió la expresión de los genes Fla2 (Poggio, 2007; Vega-Baray, 2015).

Los genes *fla2* se encuentran mayoritariamente en el cromosoma I (Mackenzie, 2001), siendo identificados 30 genes flagelares en dicho locus y otros genes *fla2* en diferentes regiones del cromosoma, entre ellos *fliG2* y la flagelina *flaA* (que se encuentra en el plásmido pRS241A) (**figura 10**) (Mackenzie, 2001).

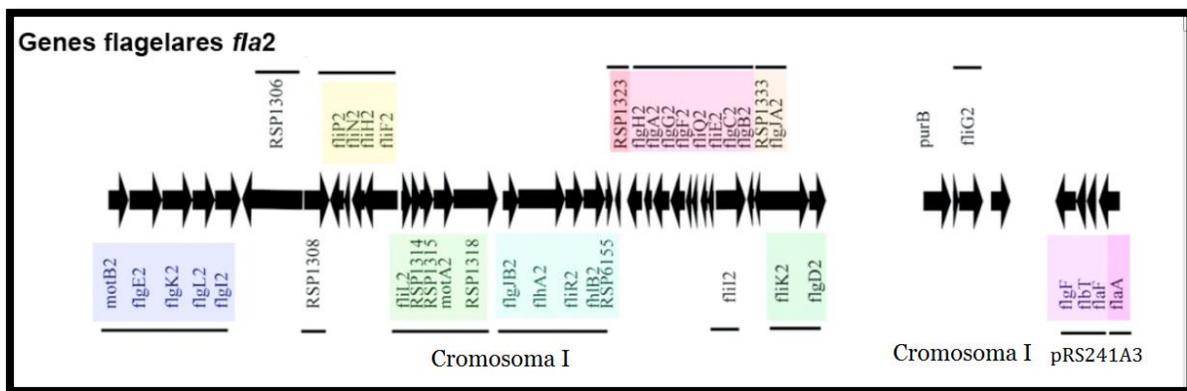


Figura 10. Organización genética de los genes flagelares *fla2* de *R. sphaeroides*. Las flechas representan los genes y la dirección de su transcripción (Poggio 2007).

Las mutantes *fla1*⁻ que expresan el segundo conjunto de genes flagelares, denominadas Fla2⁺, sintetizan múltiples flagelos polares (de 2 a 4) que facilitan el nado en un medio líquido. Imágenes de microscopía electrónica de esta cepa muestran las características estructurales de este nuevo flagelo, siendo el filamento más delgado (10nm) en comparación con el filamento del flagelo Fla1, además las longitudes de los ganchos también son diferentes, siendo para *fla1* de 100nm y 130nm para la cepa *fla2* (**figura 11**).

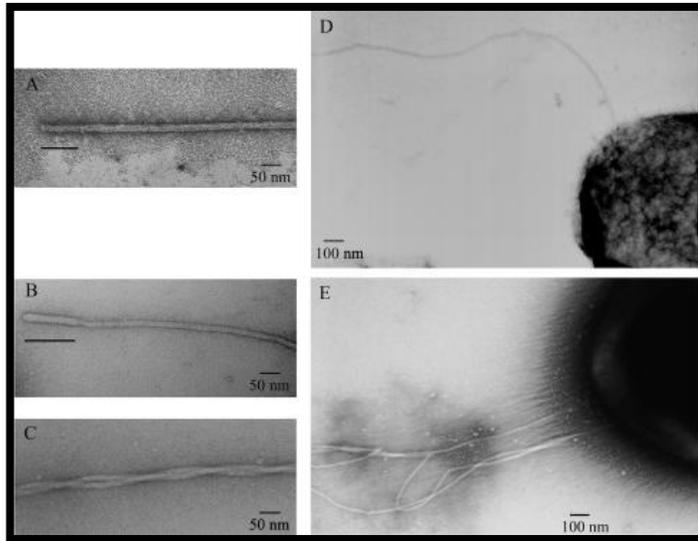


Figura 11. Imágenes de microscopía electrónica de los dos diferentes tipos de flagelos ensamblado de *R. sphaeroides*. **A)** Estructuras encontradas en WS8; filamento y gancho. **B)** Estructura filamento gancho encontrada en la cepa SP18fla2+. **C)** Filamentos entrelazados encontrados en la cepa SP18fla2+. **D)** Flagelo subpolar de la cepa WS8. **E)** Flagelos polares de la célula SP18fla2+ (Poggio, 2007).

A la fecha, se sigue trabajando en la caracterización del sistema flagelar Fla2, el cual ha generado numerosas interrogantes acerca de la forma en que estos genes son expresados y regulados. A pesar de que ya han sido elucidados algunos aspectos de su regulación, quedan aún muchas preguntas relacionadas con las condiciones metabólicas que favorecen su expresión.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante más de diez años, se consideró que *R. sphaeroides* poseía un único flagelo para desplazarse. Dicha concepción estaba basada en el hecho de que era detectado un único flagelo subpolar al observar muestras de células bajo el microscopio óptico y electrónico. Asimismo, todas las mutaciones que abolían el nado de la bacteria afectaban la rotación o ensamblaje de este flagelo subpolar. La presencia de un segundo conjunto de genes flagelares en el genoma de *R. sphaeroides* fue inesperada y se adujo que estos podían representar genes no funcionales, ya que su expresión no había sido detectada previamente. Un parteaguas en esta concepción fue el aislamiento de una mutante

espontánea que era capaz de nadar en ausencia del regulador maestro del sistema flagelar ya conocido. Se demostró que dicha mutante era capaz de ensamblar varios flagelos polares cuya presencia era dependiente de los genes que hasta ese momento eran considerados como pseudogenes. La mutación presente en esta cepa (ahora denominada Fla2+) fue identificada como un cambio puntual en el gen *cckA*. Dicho cambio favorece la autofosforilación de CckA *in vitro*, lo que permite suponer que *in vivo* debe existir un aumento en los niveles de CtrA-P, que permitirían la expresión de los genes *fla2*. Sin embargo, no había evidencia directa al respecto de la influencia que CtrA y SciP ejercerían sobre la expresión de los genes *fla2*. Este trabajo se planteó como objetivo el estudiar el papel de la proteína CtrA en la expresión de los genes flagelares 2 de *R. sphaeroides*.

HIPÓTESIS

Mutaciones que inactiven el gen *ctrA* provocarán una disminución en la expresión de los genes *fla2*, generando cambios fenotípicos en la motilidad flagelar de la cepa Fla2+ de *Rhodobacter sphaeroides*

OBJETIVO

Objetivo general

- Caracterizar el papel de *CtrA* en la regulación de genes flagelares *fla2* en *R. sphaeroides*.

Objetivos particulares

- Establecer protocolos de clonación y mutagénesis para obtener una cepa $\Delta ctrA$ y caracterizar el fenotipo de nado en diferentes condiciones de crecimiento.
- Obtener una cepa doble mutante en los genes *ctrA-sciP* y caracterizar el fenotipo resultante.
- Realizar ensayos de complementación para ambas cepas mutantes $\Delta ctrA$ y $\Delta ctrA-sciP$ y caracterizar los fenotipos observados.

- Clonar el gen *ctrA* en un vector de sobre-expresión, y establecer protocolos de purificación de la proteína.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas y condiciones de cultivo

Durante los experimentos se utilizaron distintas cepas de *Rhodobacter sphaeroides* y *Escherichia coli* enlistadas en la **tabla 1**. *R. sphaeroides* fue cultivada en medio mínimo de Sistrostom utilizando como fuente de carbono 100 μ M de ácido succínico o 0.2% de cas aminoácidos (**anexo 1**). Esta bacteria fue cultivada de forma aeróbica (condición heterotrófica, en la oscuridad con agitación a 250 rpm) o anaeróbica (condición fotoheterotrófica, bajo iluminación continua) a 30 °C. En caso de requerirlo, (principalmente por la selección de plásmido), se adicionaron antibióticos a las siguientes concentraciones: Espectinomicina 50 μ g/mL, kanamicina 25 μ g/mL, tetraciclina 1 μ g/mL y gentamicina 5 μ g/mL. Por su lado, *Escherichia coli* fue cultivada en medio Lysogenic Broth (**anexo 1**) a 37°C con una agitación de 200 rpm. Cuando fue necesario se adicionaron antibióticos en las siguientes concentraciones: 100 μ g/mL de espectinomicina, 100 μ g/mL de ampicilina, 50 μ g de kanamicina, 15 μ g/mL de tetraciclina, 30 μ g/mL de gentamicina.

Para los ensayos de nado se elaboraron placas de agar suave con 20-25 mL de medio Sistrostom adicionado con 100 μ M de succinato y 0.22% de agar (**anexo 1**). Estos medios fueron incubados bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas (en este caso, las cajas se colocaron en jarras de anaerobiosis con sobres de reducción de oxígeno), la incubación fue a 30 °C por aproximadamente 48 horas.

Tabla 1. Cepas de bacterias utilizadas

Cepa	Características	Fuente de Referencia
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>		
WS8	Cepa silvestre	Sockett, W., 1990
AM1	Derivada de Δ fleQ::kan cckA _{L391F}	del Campo, A., 2007; Vega, B., 2015

AM1 Δ ctrA::aadA	Derivada de Am1 Δ ctrA::aadA	Este estudio
AM1 Δ sciP-ctrA::aadA	Derivada de AM1 Δ sciP- ctrA::aadA	Este estudio
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10	Cepa de clonación	Invitrogen
S17	recAendAthihsdR RP4-2 Tc::Mu::Mu::Tn7, TprSm ^r	Simon, R., 1982
Helper	JM103 (pRK2013)	Ausubel, J., 1987
Rosseta	BL21. Deficiente en proteasas ompT y lon	Sorensen, H., 2004 (Novagen)

Plásmidos utilizados en este trabajo

Para las clonaciones de rutina, se utilizó el plásmido pTZ19R de 2870 pb Ap^R (Fermentas) o el plásmido pCR2.1-TOPO de 3931 pb, Ap^R, Kan^R (Invitrogen). Para llevar a cabo el aislamiento de cepas mutantes se utilizó un plásmido suicida incapaz de replicarse en *R. sphaeroides* pero estable en *E. coli* denominado pJQ200mp18, Gm^R de 4.9 Kb (Quandt, 1993). Para llevar a cabo la expresión de genes en *R. sphaeroides*, se utilizó el plásmido pRK415 el cual es un vector movilizable Tc^R de 10.5 Kb, y permite la expresión de los genes clonados en la región del MCS (sitio de multiclonación) a partir del promotor *lac* (Keen, 1988). El plásmido pWM5 fue utilizado como fuente del cassette de resistencia aadA (Spc^R), el cual corresponde a un fragmento de 1400 pb (Metcalf, 1993).

Técnicas de DNA recombinante

Las técnicas rutinarias de purificación de ácidos nucleicos, restricción de DNA, clonación, y amplificación de DNA, fueron realizadas siguiendo protocolos previamente reportados (Sambrook, 2001). Una breve descripción de algunos de estos métodos se encuentran en los anexos 2-5.

Obtención de las cepa *AM1ΔctrA::aadA* y *AM1ΔsciP- ctrA::aadA*

Para aislar las cepas con las mutaciones $\Delta ctrA$ y $\Delta sciP-ctrA$, las regiones aledañas a los genes a eliminar fueron amplificadas por PCR usando como templado el DNA cromosómico de la cepa AM1 (método para extracción de DNA cromosómico, **anexo 2**) y los oligonucleótidos de la **tabla 2**. La estrategia para la mutagénesis y la ubicación de los productos de amplificación se encuentra esquematizada en la **figura 12 a y b**.

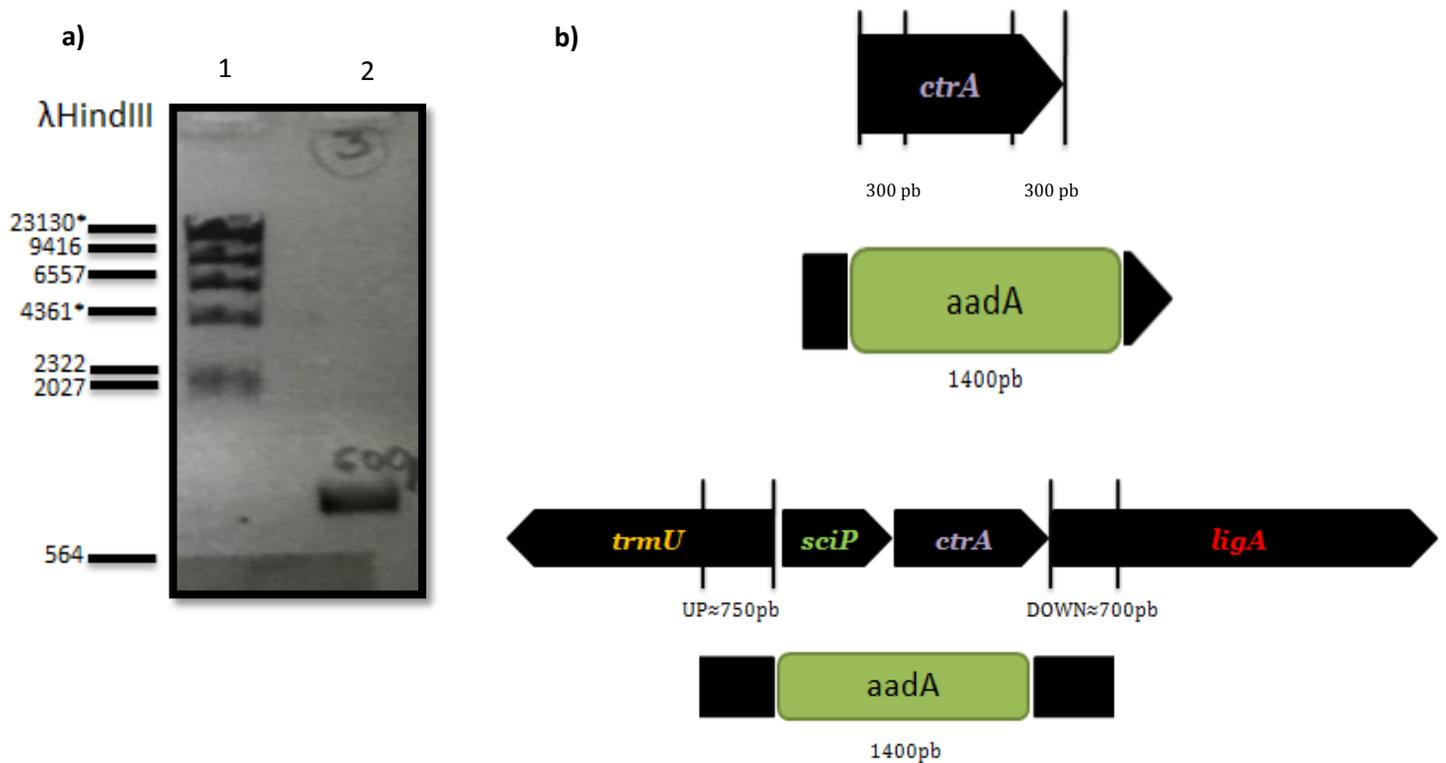


Figura 12. a) Carril 1 marcador de peso molecular. Carril 2 PCR de producto de ligación UP-DO de *ctrA* con un total de ≈ 600 pb. **b)** Representación de mutagénesis *ctrA* (parte superior) y *sciP-ctrA* (parte inferior) se señalan las regiones UP y DOWN utilizadas para la producción de mutantes.

Los productos de amplificación de las regiones río arriba y río debajo de *ctrA*, denominados UP y DO, fueron digeridos con *Bam*HI, ligados entre sí y sujetos a una segunda reacción de amplificación utilizando los oligonucleótidos *ctrA*for (*Xba*I) y *ctrA*rev (*Eco*RI). El producto esperado de 602 bp se muestra en la **figura 12 a**, este fue clonado en el plásmido pCR2.1-TOPO (el método de clonación de productos de PCR en pCR2.1-TOPO se encuentra en el **anexo 2b**).

Por otro lado, los productos de PCR UP y DO destinados a generar la delección simultánea de *sciP* y *ctrA*, fueron amplificados utilizando los oligonucleótidos *dscf1 for1 (XbaI)* y *dscr1 rev1 (HindIII)* para el producto UP; y *dscr2 for2 (HindIII)* y *dscr2 rev2 (XbaI)* para el producto DO, en ambos casos se utilizó DNA total de AM1 como templado de amplificación. Los productos fueron digeridos con *HindIII* y posteriormente ligados. La reacción de ligasa fue sujeta a una segunda reacción de amplificación utilizando los oligonucleótidos *dscf1 for1 (XbaI)* y *dscr2 rev2 (XbaI)*. El producto de amplificación de 1,400 pb fue clonado en pCR2.1-TOPO.

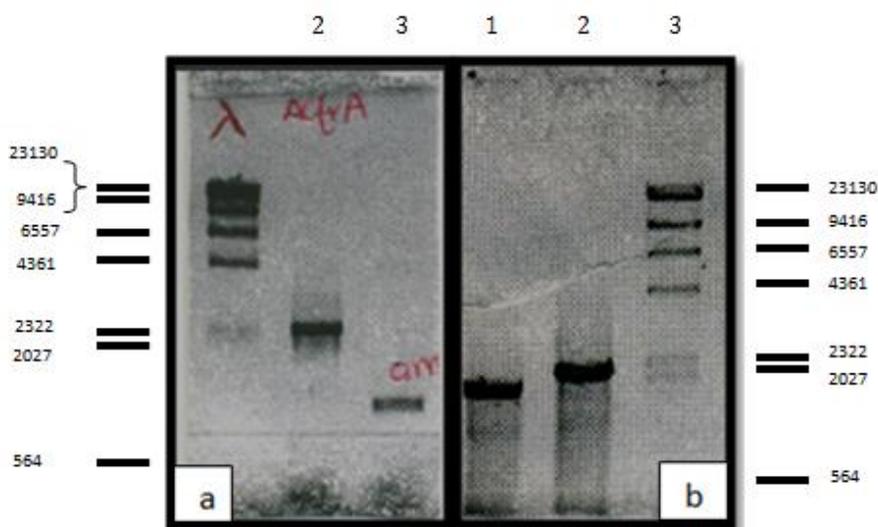
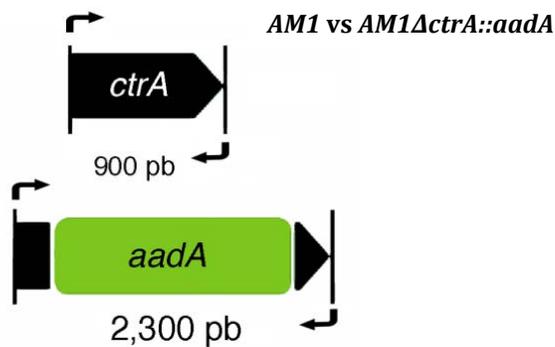
Posteriormente, los productos de PCR ya clonados en pCR2.1 TOPO fueron subclonados en pTZ18R o pTZ19R. El fragmento de 600 pb destinado a eliminar el gen *ctrA*, y por esto denominado fragmento *ctrA*, fue clonado en pTZ18R; mientras que el producto de PCR destinado a eliminar los genes *sciP* y *ctrA*, denominado fragmento *trmU-ligA* fue clonado en pTZ19R *HindIII*. Los plásmidos resultantes fueron digeridos (linearizados) con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*, respectivamente. El cassette de resistencia a espectinomicina, *aadA*, de carácter no polar fue ligado en los plásmidos ya linearizados y fueron seleccionadas las clonas resistentes a Ap y Spc.

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para este trabajo.

Oligonucleótidos	Secuencias
ctrA	
<i>ctrA for (XbaI)</i>	5'-GGTCTAGACGGCAACTTTAGATTGTAT-3'
<i>ctrA rev (EcoRI)</i>	5'-GTGAATTCTCCGCAGCTTTAGGCAACC-3'
<i>ctrA inrev (BamHI)</i>	5'-CAGGATCCGCGGAGCTGGCGCAGGACCT-3'
<i>ctrA infor (BamHI)</i>	5'-GTGGATCCAGGGCAGCAGCTCACGAAG-3'
sciP-ctrA	
<i>dscf1 for1(XbaI)</i>	5'-CCTCTAGAGCTGTTCGGGCTTGTCGGCCA-3'
<i>dscr1 rev1 (HindIII)</i>	5'-CCAAGCTTCCTCATCCCTCCATCAGG-3'
<i>dscf2 for2 (HindIII)</i>	5'-CCAAGCTTCGAGACGGTCTGGGGCCG-3'
<i>dscr2 rev2 (XbaI)</i>	5'-CCTCTAGAGGTCCGGCGCGCGTCCGAG-3'
<i>sciPfXbaI*</i>	5'-CCTCTAGACGAAACCCAGCGAATTGA-3'

Subclonación de los alelos mutantes $\Delta ctrA::aadA$ y $\Delta sciP-ctrA::aadA$ en el plásmido suicida movilizable pJQ200mp18

Los fragmentos de DNA que llevan los alelos $\Delta ctrA::aadA$ y $\Delta sciP-ctrA::aadA$ fueron purificados y subclonados en el plásmido suicida, pJQ200mp18; posteriormente fueron introducidos en la cepa AM1 de *Rhodobacter sphaeroides* por medio de una conjugación biparental (ver anexo 6), utilizando las cepas S17/pJQ200mp18+ $\Delta ctrA::aadA$ y AM1 de *R. sphaeroides* para el caso de la mutante sencilla; y una conjugación triparental entre las cepas TOP10/pJQ200mp18+ $\Delta sciP-ctrA::aadA$, la cepa HB101/pRK2013 (helper de *E. coli*) y la cepa AM1 de *R. sphaeroides*, para el caso de la doble mutante $\Delta sciP-ctrA::aadA$. Las cepas en las cuales ocurrió el evento de doble recombinación fueron seleccionadas como $Spc^R Gm^S$. Se aisló y purificó una cepa a partir de cada conjugación. La presencia del alelo mutado en estas cepas, fue confirmada mediante PCR. En la **figura 13** se muestran los productos de PCR detectados en la cepa silvestre y en la cepa $\Delta ctrA::aadA$; como se puede observar, dicho producto muestra un tamaño de 900 pb al utilizar el DNA de la cepa silvestre, mientras que con el DNA de la cepa mutante se generó un producto de 2300 pb. Esto confirma por un lado la ausencia del alelo silvestre de *ctrA* en la cepa mutante y la presencia de $\Delta ctrA::aadA$. De forma similar, los productos de PCR obtenidos para la cepa silvestre y mutante $\Delta sciP-ctrA::aadA$, difieren por ≈ 300 pb, lo cual representa la diferencia esperada entre los alelos silvestre y mutante (**figura 13**).



AM1 vs AM1ΔsciP-ctrA::aadA

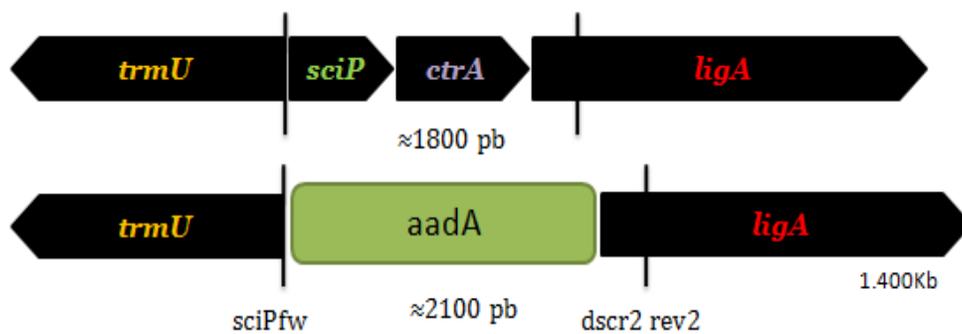


Figura 13. Izquierda. Representación esquemática de amplificaciones entre la cepa AM1 y la cepa mutante $\Delta ctrA::aadA$. **Derecha** Representación esquemática de amplificaciones entre la cepa AM1 y la cepa mutante $\Delta sciP-ctrA::aadA$. **Centro** Productos de PCR corridos en gel de agarosa 1%. Panel a; carril 2 AM1 $\Delta ctrA::aadA$, carril 3 cepa AM1. Panel b; carril 1 AM1, carril 2 AM1 $\Delta sciP-ctrA::aadA$. Nótese que el oligonucleótido utilizado para la amplificación de *sciP-ctrA* fue *sciPf*.

Análisis de la capacidad de nado

La capacidad de nado de las cepas mutantes fue probada en cajas de agar suave, las cuales contenían medio de Sistrostom sin succínico y la fuente de carbono indicada en cada caso, y 0.22% de agar. Después de ser inoculadas las cajas fueron incubadas fotoheterotróficamente por 48h.

Complementación de cepas mutantes

Se llevó a cabo la complementación de la mutante sencilla $\Delta ctrA::aadA$, con el plásmido pRK_ctrA. Dicho plásmido fue obtenido al clonar en pRK415 el producto de PCR generado con los oligonucleótidos ctrA for (*Xba*I) y ctrA rev (*Eco*RI) (ver **tabla I**). El plásmido fue introducido a la cepa AM1 $\Delta ctrA::aadA$ y AM1 $\Delta sciP-ctrA::aadA$ mediante conjugación. La capacidad de nado de las transconjugantes fue evaluada en cajas de agar suave.

Immunodetección (Western blot) de las proteínas FlaA y FlgE2.

La detección de las proteínas FlgE2 (46KDa) y FlaA (27KDa) fue realizada mediante Western blot en extractos obtenidos a partir de la cepa silvestre AM1 y de la cepa mutante AM1 $\Delta ctrA::aadA$. Para cada extracto se utilizó 1 mL de cultivo a DO_{600} de 0.6 – 0.8, el cual fue centrifugado a 14,000 rpm a 4°C por 2 minutos, los paquetes celulares fueron resuspendidos con 200 μ L de buffer de carga 1X y β -mercaptoetanol, después fueron sonicados tres veces 10 segundos con espacios de 30 segundos, posteriormente se hirvieron durante 5 minutos. Las muestras se corrieron en SDS-PAGE 12% y las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se llevó a cabo durante 45 min a 250 mA en buffer de transferencia pH 9.9 ($NaHCO_3$ 10mM, Na_2CO_3 3mM y MeOH al 20%). La membrana fue enjuagada con TBST (Tris•Cl 20 mM, pH 7.5, NaCl 500 mM y Tween20 al 0.05%) y bloqueada con 1% de leche descremada en TBST durante 2 horas. Posteriormente la membrana fue lavada con TBST e incubada durante 1 h con el anticuerpo primario, α -FlaA (1:10,000) o α -FlgE2 (1:50,000) diluídos en TBST. Al término de estos lavados, la membrana fue incubada durante 1 h con el anticuerpo secundario α -IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina diluido en TBST 1:10,000. Transcurrido este

tiempo se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con TBST. La membrana se incubó durante 2 min en buffer de lavado final (Tris 20 mM, MgCl₂ 1 mM a pH 9.8) y la presencia del anticuerpo secundario fue detectada por quimioluminiscencia usando 900µL de CDP-Star (Applied Biosystems) y 50 µL de Nitro Block (Applied Biosystems). Las membranas fueron expuestas entonces a placas de rayos-X para detectar la señal generada por la hidrólisis del sustrato.

Construcción de la fusión GTS-CtrA y análisis de solubilidad

Para obtener la proteína GST-CtrA, la región codificante de *ctrA* fue amplificada por PCR utilizando los oligonucleótidos mostrados en la **tabla 3**. El producto de PCR fue clonado en el vector pGEX-2T. Dicha clonación dio por resultado la fusión de la región codificadora de *gst* (glutación-S-transferasa) con *ctrA*. Como se observar en la **figura 14**, la fusión *gst-ctrA* queda bajo control del promotor *tac*, presente en el plásmido, el cual es inducible por IPTG. El plásmido resultante fue introducido en la cepa Rosetta BL21 (*E. coli*). La proteína de fusión fue entonces obtenida a partir de cultivos en fase exponencial inducidos con IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido).

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados

Nombre del Oligonucleótido	Secuencia
ctrApGEXfor (<i>Bam</i>HI)	5' CCGGATCCAGAATACTGCTGGTGG A 3'
pBADctrArev (<i>Eco</i>RI)	5'-CCGAATTCGTCCAGCCCGCCTGTCCCG-3'

Para ello, a partir de un cultivo de 3 mL crecido durante toda la noche, se tomaron 200 µL con los que se inoculó un matraz de 20 mL de LB con los antibióticos cloranfenicol (resistencia de la cepa) y ampicilina (resistencia del vector de expresión). Este cultivo se incubó a 37°C hasta fase exponencial (DO₆₀₀ de 0.5), luego se dividió en 3 tubos con 3 mL cada uno de ellos a los que se les agregó distintas concentraciones de IPTG: S/I (sin inductor), 0.1 mM y 1mM. Los tubos se pusieron a incubar a 37°C por 3 horas. Una vez que terminó el tiempo de inducción, se tomó 1 mL de cada cultivo y se centrifugó a 4°C a

máxima velocidad (14,000 rpm) por 2 minutos. Se descartó el sobrenadante, y el paquete celular se resuspendió con 200 μ L de buffer de carga 1X con β -mercaptoetanol. Finalmente las muestras se hirvieron por 5 minutos y se analizaron por SDS-PAGE al 12% utilizando la tinción con azul de Coomassie.

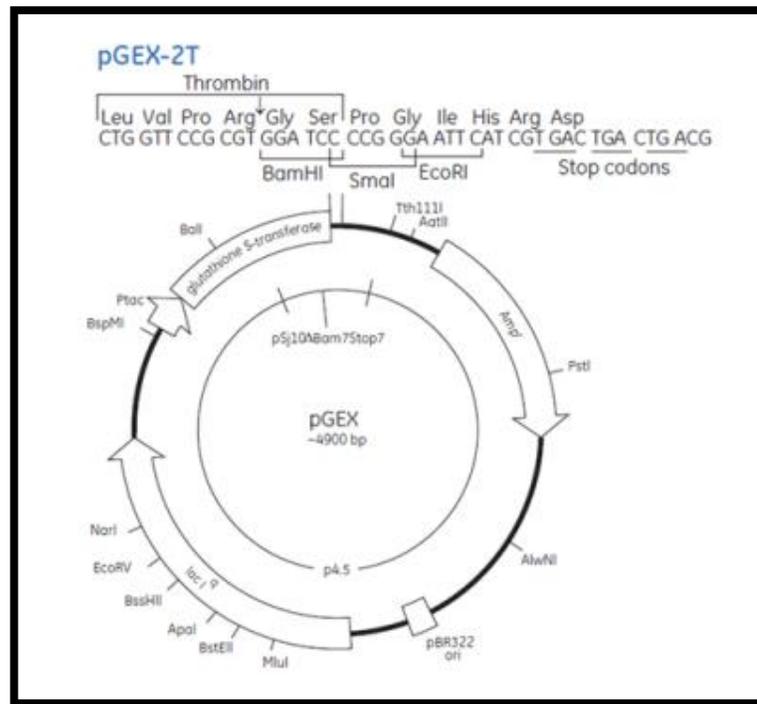


Figura 14. Mapa del plásmido pGEX 2T (4948 pb). Contiene el promotor tac (*ptac*) seguido de la secuencia completa codificante de GST (Smith, 1986), luego un MCS (sitio de multi-clonación) que contiene sitios de reconocimiento para *Bam*HI, *Sma*I y *Eco*RI y continúa con el codón de terminación TGA en tres distintos marcos de lectura, el gen codificante para la β - lactamasa, *Ap*^R, ori (origen de replicación) y un fragmento del operón *lac* que contiene el alelo *lac*^q y parte de *lacZ*. Además contiene una secuencia de reconocimiento a trombina.

Para determinar si la proteína inducida se encontraba en la fracción soluble o insoluble del extracto celular, se procedió a separar cada una de estas fracciones. Para ello, se centrifugó 1 mL de cultivo inducido, se eliminó completamente el medio y se resuspendió el paquete celular en 200 μ L de Tris 50 mM, glicerol al 5% y NaCl 50mM (a pH 8), después se sonicó tres veces durante 10 segundos con espacios de 30 segundos entre cada sonicación, nuevamente se centrifugó a 4°C durante 2 minutos a máxima revolución (14,000 rpm), y se recuperaron 100 μ L en un tubo nuevo de la fase acuosa (parte soluble). La pastilla se resuspendió con 50 μ L de buffer de carga 1X y se hirvió por 5 minutos; al

final se le agregó 150 μL de H_2O . Por su parte a la parte acuosa se le agregó 200 μL de buffer de carga con β -mercaptoetanol. Estas muestras se analizaron en SDS-PAGE al 12%.

Purificación de Proteína de Fusión GTS-CtrA

La proteína GST-CtrA fue purificada mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina de glutatión sefarosa (Sigma). Se partió de un cultivo de 30 mL el cual fue inoculado con un pre-cultivo de toda la noche a una dilución 1:100. Posteriormente se dejó crecer hasta alcanzar la fase exponencial (D.O._{600} de 0.6), en este momento se agregó 0.5 mM de IPTG, y se incubó por 3 horas adicionales. Transcurrido este tiempo el cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos y se congeló. Posteriormente se resuspendió en 1 mL de solución PBS 1X (NaCl 137mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10mM y KH_2PO_4 0.18 mM), 20% de glicerol, además se le adicionó 100 μL de lisozima de una solución 10 mg/mL y 100 μL de EDTA (ácido tetraacético diamina etileno) de una solución 500 mM esta mezcla se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente (TA) en un tubo (1.5 mL). Las muestras fueron sonicadas 3 veces por 10 segundos en lapsos de 30 segundos. Nuevamente se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y limpio (este paso se repitió 3 veces). Al tercer sobrenadante se le añadió un volumen de 200 μL de resina glutatión sefarosa, previamente lavada con PBS 1X y se incubó en hielo por 1 hora, frecuentemente se mezclaba por inmersión. Una vez transcurrido el tiempo se volvió a centrifugar a 5000 rpm por 2 minutos y se retiró el sobrenadante (se recupera en un tubo NP, no pegado). Después se realizó la adición de 1 mL de PBS y se mezcló por inmersión frecuentemente durante 15–20 minutos, nuevamente se centrifugó 2 minutos a 5 000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Esto se repite por al menos 3 ocasiones (L1, L2 y L3, lavados). Las eluciones se obtuvieron al agregar 500 μL de la solución Tris-glutatión, se realizaron centrifugaciones de 5 minutos a 5000 rpm y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo, esto se repitió al menos 3 veces (E1, E2 y E3, eluciones). Para finalizar, la resina se resuspendió en 100 μL de PBS (R, resina). Las muestras obtenidas; NP, L1, L2, L3, E1, E2, E3 y R fueron analizadas por SDS-PAGE al 12% y reveladas utilizando la tinción con azul de Coomassie.

RESULTADOS

Caracterización de la movilidad de las cepas AM1 Δ *ctrA*::*aadA* y AM1 Δ *sciP*-*ctrA*::*aadA*

Se realizó una mutación en el gen *ctrA* para observar si su producto proteico estaba implicado en la regulación de la expresión de los genes *fla2* de *Rhodobacter sphaeroides*. La mutante sencilla del gen *ctrA* fue diseñada del tipo delección/inserción, provocando la pérdida de aproximadamente 300pb del gen original y remplazándolas por el cassette de resistencia a espectinomicina (*aadA*) de 1400 pb, **figura 12 b**. El alelo Δ *ctrA*::*aadA* fue construido como se describe en la sección de material y métodos y clonado en un plásmido suicida. Dicho plásmido fue introducido a la cepa AM1 (Fla2+) de *R. sphaeroides* y se seleccionaron las mutantes en las cuales hubiese ocurrido el evento de doble recombinación. El intercambio del alelo silvestre por el alelo mutante fue confirmado por PCR (**ver material y métodos**).

También se obtuvo la cepa doble mutante Δ *sciP*-*ctrA*::*aadA* siendo *sciP* el gen que se encuentra río arriba de *ctrA*, y parecen formar un solo operón. Para la cepa doble mutante Δ *sciP*-*ctrA*, la mutación se diseñó como una delección total de ambos genes (**figura 12 b**). La obtención de la mutante y su verificación fue realizada de forma similar a la descrita para la mutante Δ *ctrA* (los detalles se encuentran en la sección de **material y métodos**).

La movilidad de las cepas mutantes AM1 Δ *ctrA*::*aadA*yAM1 Δ *sciP*-*ctrA*::*aadA* fue probada en placas de agar suave y comparada con la de cepa silvestre AM1 tanto en condiciones aeróbicas (resultado no mostrado) como en condiciones anaeróbicas. Las mutantes fueron incapaces de desplazarse del punto de inoculación (**figuras 15a y b**), a diferencia de la cepa parental, que genera un halo de nado que indica un funcionamiento apropiado de la estructura flagelar. El mismo resultado fue observado para las condiciones aeróbicas o anaeróbicas de crecimiento.

El defecto en el nado fue confirmado al observar las cepas mutantes bajo el microscopio óptico, ya que no presentaron desplazamiento alguno. Este resultado

descarta que la falta de halo en la caja de agar suave haya podido ocurrir por un defecto en la vía quimiotáctica.

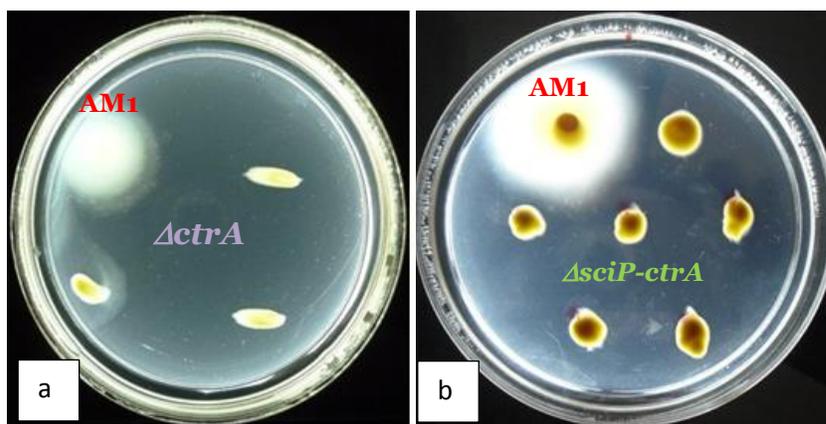


Figura 15. Pruebas de motilidad. **a)** Cepa mutante AM1 $\Delta ctrA::aadA$ **b)** Cepa mutante AM1 $\Delta sciP-ctrA$. En condiciones anaeróbicas, medio Sistro 100 μ M de succinato, 0.22 % de agar a 48 horas de incubación. En ambos casos, en la parte superior izquierda se inoculó la cepa silvestre AM1.

Análisis del fenotipo de nado de la cepa AM1 $\Delta ctrA::aadA$ con el plásmido pRK415 *ctrA*

Con el fin de demostrar que el fenotipo observado en la mutante AM1 $\Delta ctrA::aadA$ se debía únicamente a la mutación de este gen, se llevó a cabo una prueba de complementación en *trans* introduciendo el gen *ctrA* de tipo silvestre en un vector de expresión. Dicho gen fue clonado en el plásmido pRK415 de la forma que se describe en **material y métodos**. En la **figura 16a** se puede observar que la cepa $\Delta ctrA::aadA+pRK415ctrA$ generó halos de nado muy similares a los presentados por la cepa silvestre lo que demuestra que la falta de nado de la cepa parental es causado exclusivamente por la pérdida del gen *ctrA*.

Por su parte la cepa $\Delta sciP-ctrA::aadA$ también fue complementada con la misma construcción PRK415+*ctrA**wt*. La **figura 16b** muestra la recuperación del nado de la cepa doble mutante, sin embargo se puede observar que el halo de nado es menor en comparación al generado por la cepa AM1.

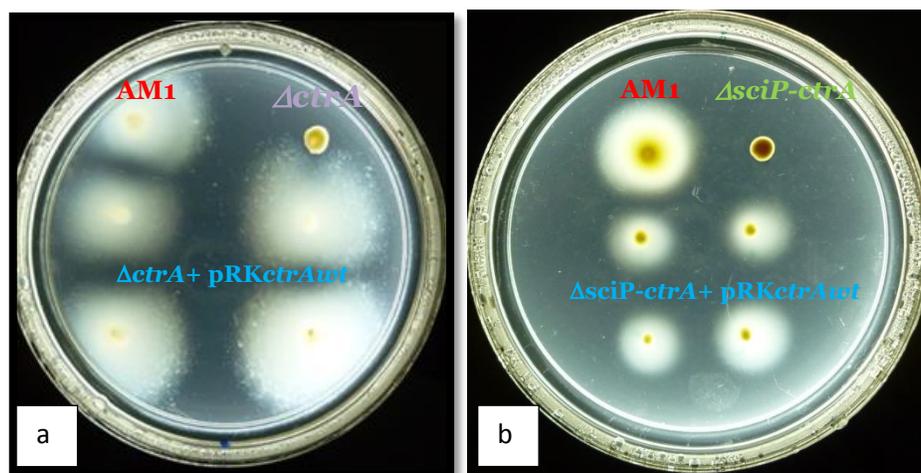


Figura 16. Prueba de movilidad a) Cepa *AM1ΔctrA::aadA+pRK415ctrA* b) Cepa *AM1ΔsciP-ctrA::aadA+pRK415ctrA*. Cajas de agar suave, medio de Sistrum suplementado con 100 μM succinato. Las cajas fueron incubadas anaeróbicamente durante 48h. En la parte superior fueron inoculadas, el control positivo /cepa AM1) y el control negativo (cepa mutante).

Expresión de las proteínas flagelares FlgE2 y FlaA en la cepa mutante *ΔctrA::aadA*.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos anteriores demuestran que CtrA desempeña un papel central para el desplazamiento mediado con el flagelo 2. Sin embargo quedaba por demostrar que en ausencia de CtrA la expresión de las proteínas del sistema Fla2 era abolida, por esta razón se decidió realizar ensayos de inmunodetección de las proteínas FlgE2 (gancho) y FlaA (filamento) en la cepa mutante *ctrA*. Se optó por realizar un ensayo de Western blot utilizando extractos totales de las cepas AM1 y AM1 *ΔctrA::aadA* y de la cepa WS8 que sólo ensambla el flagelo 1 pero es incapaz de ensamblar el flagelo 2. La **figura 17** muestra que ambas proteínas son detectadas en las muestras correspondientes a la cepa AM1, esto es, FlgE2 como una banda de 46 kDa y FlaA de 25 kDa. De acuerdo a lo esperado, la cepa mutante en *ctrA* no tuvo expresión de ninguna de las dos proteínas.

Cabe mencionar que la **figura 17a** muestra la expresión de FlgE2 en los extractos totales de dos controles positivos correspondientes a las cepas LMG194+pBADflgE2 (cepa de *E. coli* que sobre-expresa FlgE2) y AM1, además se tiene un control negativo

correspondiente al extracto de la cepa WS8; finalmente se observa el extracto total de AM1 Δ ctrA::aadA sin expresión alguna de la proteína FlgE2.

Para la prueba con el anticuerpo anti-FlaA se analizaron además de los extractos totales (marcados como ET en la **figura 17b**), otras dos fracciones; una de ellas corresponde a la proteína presente en el sobrenadante del medio de cultivo después de que las células fueron sometidas a un estrés mecánico para desprender y/o romper los filamentos flagelares (fracciones marcadas como SN), y la otra fracción corresponde al paquete celular obtenido después de dicho tratamiento (marcado como P). Cabe mencionar que el tratamiento descrito nos permite evaluar la presencia de flagelina extracelular, la cual presumiblemente debe estar ensamblada en el filamento. Los resultados confirman la ausencia de flagelina en la cepa mutante Δ ctrA::aadA.

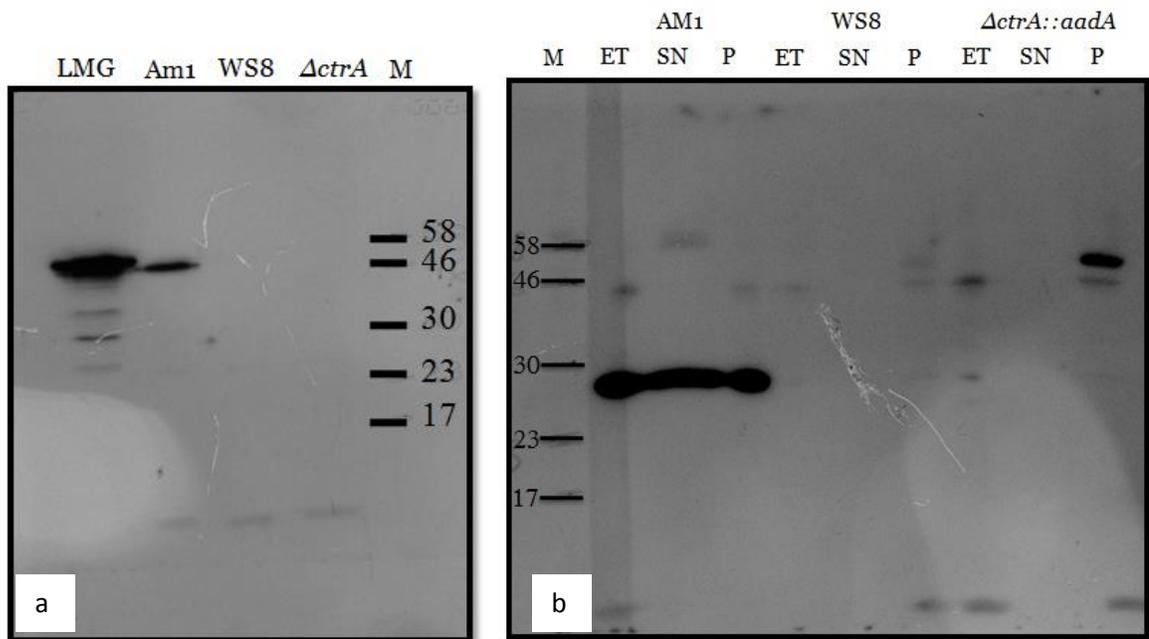


Figura 17. a) Análisis de Western blot con el anticuerpo anti-FlgE2 en extractos celulares totales provenientes de las cepas indicadas. El anticuerpo primario fue utilizado en una dilución de 1:50 000. **b)** Análisis de Western blot con el anticuerpo anti-FlaA de varias cepas de *Rhodobacter sphaeroides*, Extracto total (ET); sobrenadante (SN) y pastilla (P) obtenidos después de un tratamiento de estrés mecánico. El anticuerpo primario fue utilizado en una dilución de 1:10 000.

Sobre-expresión de la proteína GST-CtrA.

Las bacterias de *E. coli* de la cepa BL21, deficientes en la expresión de las proteasas OmpT y Lon, fueron transformadas con el plásmido pGEX-2TctrA. El vector pGEX ha sido ampliamente utilizado para lograr la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli*. En este plásmido se fusiona la región codificadora del gen de interés con la región codificadora de la glutatión-S-transferasa (GST, PM 26 KDa), cuya secuencia fue originalmente obtenida de *Schistosoma japonicum*. El plásmido pGEX permite la expresión de la proteína de fusión a partir del promotor *tac*, el cual es inducible en presencia de IPTG (Smith, 1988). En general, tales proteínas de fusión son solubles y fáciles de purificar a partir de células lisadas bajo condiciones no desnaturizantes, mediante la absorción a la resina glutatión-agarosa (Smith, 2000).

Para la sobre-expresión de la proteína GST-CtrA y una posible purificación fue necesario establecer las condiciones óptimas para obtener la mayor cantidad de proteína. Las variables analizadas fueron: colonia transformada, tiempo de inducción (no mostrado) y concentración de inductor. El nivel de expresión de la proteína recombinante fue determinado mediante SDS-PAGE a partir de los lisados bacterianos.

En la **figura 18a** se observan las proteínas del extracto celular total analizadas en un gel al 12% de acrilamida. Los primeros 3 carriles muestran los extractos totales de un cultivo sin inducir o inducido con 0.1 mM, o 1 mM durante tres horas. Las muestras fueron obtenidas a partir de uno de los candidatos a analizar denominado P4. En dichos carriles (1, 2 y 3), fue posible observar una banda alrededor de los 46 KDa, cuya concentración aumentó de forma ascendente con la concentración de IPTG, por lo cual se consideró que podría corresponder a la proteína fusión GST-CtrA. Sin embargo, el peso molecular de la proteína observada no fue el esperado, ya que la proteína GST tiene un peso molecular de 26 kDa (Smith, 1988) y CtrA uno de 27 kDa, lo que daría un total de 53 kDa para la proteína fusión GST-CtrA. Con la secuenciación del inserto en esta construcción, se descartó que se hubiera generado un codón de paro en la secuencia de *ctrA* que pudiera dar lugar a una proteína más chica; por lo tanto existen dos posibilidades para explicar la

migración alterada del polipéptido, una es que presente una migración anómala, dicho fenómeno ha sido observado en ciertos polipéptidos debido entre otros factores, a la presencia de regiones con estructuras resistentes a la desnaturalización por SDS. Alternativamente, una región de la proteína de fusión podría estar siendo degradada.

Por su parte los carriles 5, 6 y 7 corresponden a los extractos totales de un segundo candidato, denominado P8, el cual fue tratado igual que P4. En el carril 5 se encuentra el extracto celular del cultivo sin inducir, y los carriles 6 y 7 corresponden a los extractos de cultivos incubados con 0.1 mM y 1.0mM IPTG, durante tres horas. Como se puede observar, fue imposible detectar la presencia de la proteína de fusión GST-CtrA, lo que indica que la cepa correspondiente no contiene la construcción correcta.

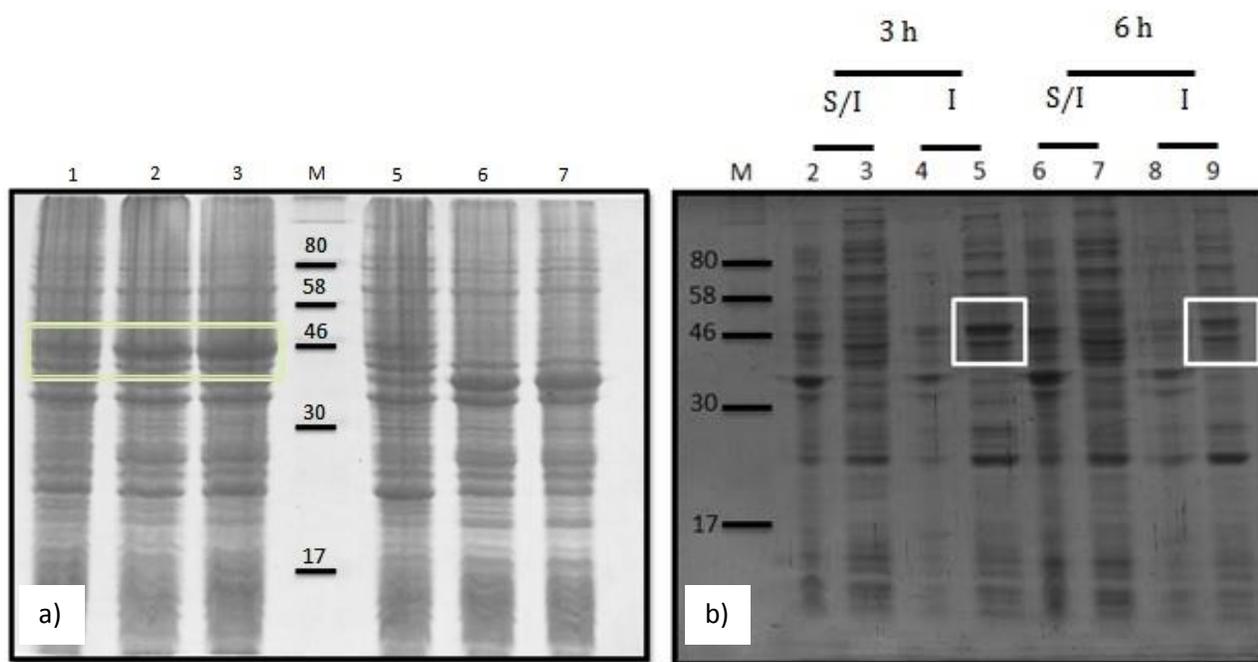


Figura 18. Análisis de la expresión de la proteína CtrA-GST. (a) Expresión de la proteína CtrA-GST variando la concentración de IPTG y probando dos distintos cultivos bacterianos (b) Precipitados y Sobrenadantes de la cepa Rosseta+pGEXctrA, a 3 horas y 6 horas de inducción con 0.5mM de IPTG. SDS-PAGE al 12%.

Como resultado de la secuenciación del inserto presente en la clona pGEX+ctrA, se detectó el cambio de A (alanina) por T (treonina) en la posición 95, el cual se ubica en la región cercana al amino terminal de CtrA. Consideramos que aún con este cambio podrían generarse anticuerpos policlonales que fueran de utilidad para detectar la proteína en extractos totales. Por lo cual se procedió a establecer los protocolos para su purificación. Como primer paso, se determinó la solubilidad de la proteína sobre-expresada.

La **figura 18b** muestra las proteínas de las fracciones solubles (sobrenadantes) e insolubles (pastillas) del cultivo bacteriano P4 (seleccionado como portador de la construcción pGEX+ctrA). Los carriles 2, 3, 4 y 5 corresponden a las muestras procesadas 3 h después de añadir el inductor y los carriles del 6 al 9 son las muestras procesadas 6 h después. Para estos experimentos se utilizó una concentración de IPTG de 0.5 mM, debido a la mínima diferencia que se observó al utilizar las concentraciones 0.1 mM y 1 mM (comparadas en **figura 18a**, los carriles 2 y 3).

De estos experimentos se observó que la proteína de 46 kDa, presumiblemente GST-CtrA, se encuentra en la fracción soluble (carriles 5 y 9) y se aprecia en mayor cantidad después de 3 h de inducción. En el experimento se incluyó la muestra sin inducir, la cual fue procesada de forma similar a las muestras inducidas, estos controles se indican como S/I en la **figura 18b**.

Purificación de la proteína de fusión GST-CtrA

La purificación de la proteína GST-CtrA se realizó mediante cromatografía de afinidad, utilizando sefarosa acoplada a glutatión, el cual es sustrato de la glutatión-S-transferasa (Harper, 2011). A partir de 30 mL de cultivo de la cepa que lleva pGEX+ctrA, la proteína fue purificada de la fase soluble de la forma en la que se indica en **material y métodos**.

La **figura 19** muestra las bandas correspondientes a la proteína de fusión GST-CtrA purificada presente en los carriles marcados como E1 y E2, la proteína obtenida siguiendo este protocolo aun presenta contaminantes en la zona de alto peso molecular, aunque claramente la proteína GST-CtrA es mayoritaria. Asimismo, se puede apreciar que en la

resina (carril R) no fue eluída la totalidad de la proteína. Consideramos que mejorando la elución de la proteína aunado a un paso adicional de purificación (por peso molecular) se podrá obtener la proteína GST-CtrA con un alto grado de pureza.

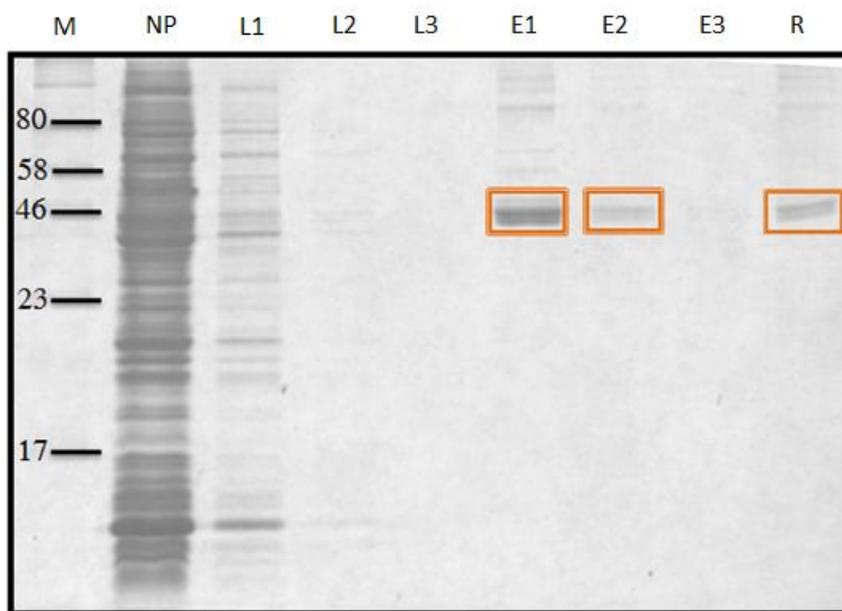


Figura 19. Purificación de la proteína recombinante GST-CtrA. Las fracciones obtenidas: (NP) fracción no retenida por la resina, (L) lavados, (E) eluciones y (R) suspensión de una alícuota de la resina.

DISCUSIÓN

La familia de reguladores de respuesta de los sistemas de traducción de señales de dos componentes controlan la expresión de una amplia variedad de genes (Reisenaure, 1999). CtrA es un regulador de respuesta que se une al DNA y regula directamente operones que controlan el ciclo celular en *C. crescentus*, incluyendo la biosíntesis del flagelo (Laub, 2002).

En *R. sphaeroides* se reconocen aproximadamente 49 pares de genes que podrían codificar para sistemas de dos componentes, entre los que se encuentran homólogos de la vía de señalización de dos componentes CckA-CtrA. Experimentos previos en el laboratorio han demostrado que CckA se encuentra involucrada en el control de la

expresión del sistema flagelar 2(*fla2*), siendo el homólogo de CtrA el gen denominado como RSP_2621 en *R. sphaeroides*.

En este trabajo se estudió la importancia del gen *ctrA* para la regulación de la expresión de los genes flagelares 2 de *R. sphaeroides*, mediante el aislamiento de una mutante de interrupción en el gen *ctrA* y una doble mutante con la delección *sciP-ctrA* (**figuras 15, 16**) se demostró que CtrA es indispensable para promover la motilidad mediada por el flagelo 2.

Trabajos realizados con *R. capsulatus* habían demostrado una severa reducción de la motilidad flagelar al inactivar *ctrA* (Mercer, 2012), además dicho estudio reveló que el fenotipo no motil de estas cepas mutantes correlacionó con la falta de transcripción de los genes *flhA*, *flgE* y flagelina, los cuales pertenecen a distintos niveles (clase II, clase III y clase IV respectivamente) de la cascada jerárquica de la biosíntesis flagelar en *R. capsulatus* (Lang, 2002).

Es importante mencionar que *R. capsulatus* no posee otra copia de los genes flagelares como ocurre en *R. sphaeroides*, por lo tanto la regulación de dichos genes podría presentar ciertas diferencias.

Mediante ensayos de Western blot, en este trabajo fue demostrado que la cepa mutante AM1 $\Delta ctrA::aadA$ no es capaz de expresar las proteínas FlgE2 y FlaA (**figura 17a, b**), lo cual nos lleva a concluir que la falta de motilidad de dicha cepa es debida a la falta de expresión de al menos estas proteínas flagelares, esto es, en esta mutante no se encontrarán las estructuras, del gancho y filamento.

Cabe resaltar, y debido a que las proteínas utilizadas son de distintas clases en la jerarquía flagelar, siendo FlgE2 de clase II (homóloga a la de *Salmonella* spp.) y FlaA de la clase IV (homóloga a FliC del sistema Fla1, *R. sphaeroides*) nosotros podemos concluir que la biosíntesis del flagelo debido a la mutación en *ctrA* es bloqueada en estos niveles. Sin embargo, resultados obtenidos en el laboratorio nos indican que CtrA es necesaria para la expresión de los promotores flagelares tempranos (localizados en los niveles superiores

de la jerarquía) como lo son el promotor de *flgB*, *fliI*, *fliL*, y *fliF* (Rivera A. comunicación personal). A partir de esta información se puede considerar que la falta de expresión de los genes tardíos (como flagelina) podría ocurrir por la falta de expresión de los genes de la clase superior más que a un control directo de CtrA sobre la expresión de *flaA*, similar a como ocurre en *C. crescentus*, en donde *ctrA* sólo regula un pequeño número de genes flagelares tempranos (Quon, 1996).

En *C. crescentus*, CtrA se encuentra en lo alto de la jerarquía de la biosíntesis flagelar. En el citoplasma, CtrA es fosforilada en el residuo 51 durante la fase G1 del ciclo celular (cuando la célula es nadadora) (Wheeler, 1999), lo cual favorece la unión de CtrA-P a los sitios en el DNA con la secuencia conservada TTAA-N₇-TTAA. De este modo CtrA-P activa la transcripción de los genes de clase II (Reisenauer, 1999) encargados de codificar a los componentes del cuerpo basal ubicados en de la membrana interna (anillo MS y aparato de exportación) y a los factores de transcripción, FlbD y σ -54. El resto de los niveles inferiores de la jerarquía flagelar son activados por FlbD a partir del momento en que una señal desconocida generada por la formación del anillo MS y el aparato de exportación, permite la activación de la proteína FlbD, la cual junto con σ -54 promueve la transcripción de los genes flagelares tardíos.

Por otra parte y con los experimentos hasta ahora realizados, suponemos que en *R. sphaeroides*, el gen *sciP* pudiera también estar implicado en la regulación de los genes flagelares de forma positiva, si bien es sabido que en otras bacterias este gen funciona como un factor inhibidor de la transcripción mediada por CtrA. En el ensayo de nado de la cepa $\Delta sciP-ctrA::aadA$ llevando el plásmido pRKctrA, se observó que el restaurar la expresión de *ctrA* no es suficiente para permitir el nado silvestre de la cepa mutante (**figura 16 b**), lo cual nos lleva a suponer que SciP podría actuar como un estabilizador para la proteína CtrA, o bien como modulador de su actividad.

En *R. sphaeroides* aún hay muchas preguntas acerca de la forma en que funciona la regulación del segundo sistema flagelar, este estudio permitió concluir que CtrA es necesario para la activación del sistema flagelar 2. Esto, aunque es similar a lo observado

en otras bacterias, fue un caso inesperado ya que no hay que olvidar que *R. sphaeroides* cuenta con el sistema flagelar 1, el cual se expresa siempre bajo las condiciones comúnmente empleadas en el laboratorio. De ahí surge la pregunta ¿en qué condiciones se expresan o funcionan los reguladores maestros (CckA/CtrA) del sistema flagelar 2? Un primer acercamiento fue establecer que efectivamente CtrA es esencial para permitir la expresión de los genes *fla2*, de ahí consideramos que será de utilidad el determinar de qué forma, dónde y bajo qué condiciones interactúa con el DNA para activar la biosíntesis flagelar, el determinar si está sujeta a controles transcripcionales o postranscripcionales, etc.

Una herramienta de utilidad será contar con la proteína pura para llevar a cabo ensayos de unión a DNA y establecer cuáles son los genes directamente controlados por CtrA. Asimismo, con la proteína pura será posible generar anticuerpos que nos permitan explorar la estabilidad *in vivo* de la proteína en diferentes condiciones de crecimiento e incluso podrían realizarse experimentos de CHIP para encontrar nuevos genes regulados por CtrA entre los cuales pudiera haber genes encargados de coordinar de algún modo la síntesis del flagelo 1 y el flagelo 2.

CONCLUSIONES

1. La mutación $\Delta ctrA::aadA$ provoca un fenotipo fla- en *Rhodobacter sphaeroides* cepa AM1.
2. La mutación doble $\Delta sciP-ctrA::aadA$ provoca un fenotipo no nadador en *Rhodobacter sphaeroides* que al complementarla con el alelo *ctrA* silvestre obtiene un fenotipo nadador diferente al de la cepa AM1.
3. Las proteínas flagelares FlgE2 y FlaA no son expresadas en la cepa AM1 $\Delta ctrA::aadA$, por lo que estas proteínas son reguladas directa o indirectamente por este regulador de respuesta

PERSPECTIVAS

1. Realizar y analizar la complementación con los genes silvestres de la cepa doble mutante $\Delta sciP-ctrA$
2. Obtener la cepa mutante $\Delta sciP$
3. Purificar la proteína CtrA y obtener anticuerpos.

APÉNDICE

Sistema de traducción de señales: Transducción de señales de dos componentes

La vida en el mundo microbiano se caracteriza por continuas interacciones entre la célula bacteriana y su ambiente. La capacidad de una bacteria para detectar diferentes parámetros ambientales que incluyen la fuerza osmótica, el pH, la temperatura, la concentración de nutrientes o compuestos dañinos es un requisito para su supervivencia (Mascher, 2006).

Uno de los modos más comunes para percibir las señales del medio ambiente se basa en los sistemas de traducción de señales conocidos comúnmente como sistemas de dos componentes (TCS de las siglas en inglés *two-component systems*) (Stock, 2000). Estos sistemas pueden provocar cambios en la expresión de genes y comportamiento en respuesta a gran variedad de estímulos intracelulares y ambientales (Mercer, 2012). El mecanismo de señalización en estos sistemas se basa en la transferencia del grupo fosfato entre residuos His-Asp.

Los sistemas de dos componentes son requeridos para innumerables respuestas en bacterias; no obstante que estos sistemas se encuentran distribuidos en organismos de los tres dominios: Eubacteria, Archaea, y Eukarya, su abundancia en cada dominio difiere sustancialmente. Por ejemplo los sistemas de transferencias His-Asp representan la mayoría de las vías de señalización en las eubacterias, sin embargo en las células eucariontes la cascada de señalización por fosforilación involucra cinasa con dominios conservados de Ser/ Thr y Tyr (Stock, 2000).

Un típico TCS consiste de una cinasa de histidina (HK) sensora y un regulador de respuesta (RR). La característica común entre esta gran familia de proteínas involucradas en la

señalización, es la presencia de una cinasa de histidina dimérica que es autofosforilada mediante la hidrólisis de ATP, la cual posteriormente transfiere el grupo fosforilo a un regulador de respuesta, que una vez fosforilado produce una respuesta adaptativa. No obstante estos sistemas pueden ser más complejos y pueden incluir más de un evento de transferencia del grupo fosforilo, lo que incluye la existencia de cinasas de histidina híbridas formadas por la fusión de la HK a un dominio RR, en este caso existen dominios de fosfotransferencia (His) presentes en las mismas histidina-cinasas, o independientes de estas, que actúan como intermediarios para la transferencia del grupo fosforilo al RR final; la existencia de estos dominios adicionales permite la construcción de una vía de fosfotransferencia más compleja (**figura 20**) (Khorchid, 2006).

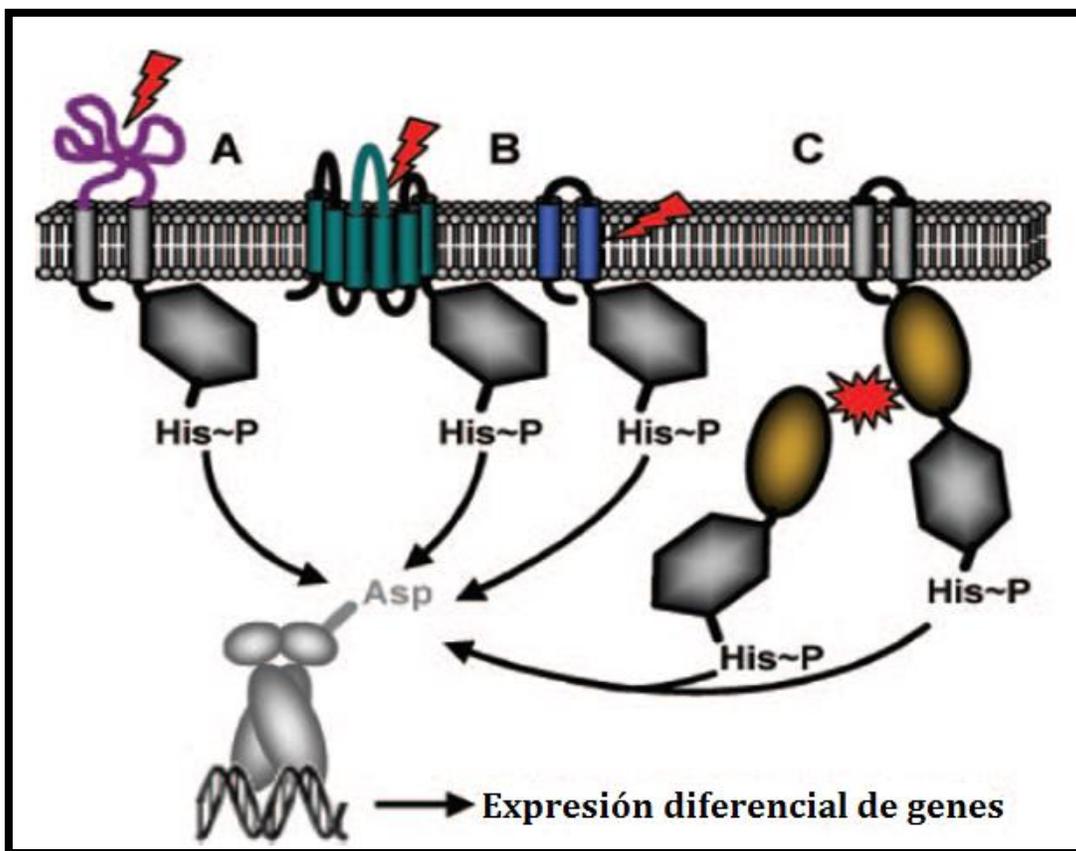


Figura 20. Representación esquemática de tres diferentes mecanismos de percepción de estímulos. A) HKs periplasmática B) HKs transmembranal C) HKs citoplasmática (Mascher, 2006).

Estructura y función de las cinasas de histidina (HK) que forman parte de los TCS

Las cinasas de histidina de los TCS se encuentran dentro de una de las familias más diversas de proteínas, estos traductores de señales han sido creados a partir de la combinación de dominios sensores, catalíticos y otros dominios auxiliares. La naturaleza modular de estas proteínas permite su adaptación a las necesidades específicas del sistema de señalización (Stock, 2000). Los miembros de esta familia de proteínas cuentan con un tamaño < 40 kDa y > 200 kDa, provocando que HKs con mayor tamaño contengan de 5 a 6 dominios únicos estructural y funcionalmente hablando (Stock, 2000).

Las HKs constan de dos partes: una región sensora extracelular variable, localizada en la región N-terminal de la proteína, la cual es responsable de percibir la señal o estímulo y la región conservada encargada de la reacción catalítica, C-terminal. Ambas partes están unidas por una región conectora. La región C-terminal está formada por dos dominios catalíticos, uno denominado dominio de dimerización (DHp), que permite que las HKs se encuentren como homodímeros e incluye la histidina aceptadora del grupo fosforilo, y el dominio catalítico que se une al ATP de aproximadamente 350 aminoácidos (Stock, 2000).

Diversos dominios sensores en las HK comparten poca similitud en la secuencia principal, lo que apoya la idea de que han sido diseñados para las interacciones específicas estímulo-ligando. En numerosos casos, el estímulo específico y el mecanismo sensor permanecen indefinidos; para otros casos, la información estructural (PhoQ) ayuda a definir la interacción extracelular ligando-receptor. Sin embargo, el modo de transmisión de la señal aún es un objeto de estudio (Stock, 2000).

En cinasas transmembranales, el dominio sensor de las HK está unido al dominio de cinasa citoplasmática a través de una hélice transmembranal y una región citoplásmica denominada conector o entrelazador (linker). Aunque este segmento es el menos conocido en una HK, múltiples estudios indican que estas regiones de entrelazado son críticas para propagar la señal de transducción. Las regiones de unión son de longitudes variables que van de 10 a más de 180 aminoácidos. Además se ha identificado una α -hélice de 50 residuos, que muestra un motivo espiral enroscado, que en muchos casos

pertenecen directamente a la caja H del dominio cinasa. Repeticiones similares han sido identificados en otras proteínas multidominios tales como la adenilato ciclasa, fosfatasa PP2C y diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa (Stock, 2000).

Estructuralmente hablando, el dominio transmisor comprende una secuencia con el residuo de histidina conservado para la autofosforilación (caja H) y el dominio catalítico altamente conservado (catalítico). El dominio conservado con el residuo de His típicamente tiene dos α -hélice (caja X) que sirve como un dominio de dimerización (DHp) o dominio HisKA. El dominio catalítico (HATPasa) contiene las cajas conservadas N, D, F y G con sus respectivos aminoácidos altamente conservados, este dominio es el encargado de catalizar la autofosforilación de las HKs (**figura 21**) (Mascher, 2006).

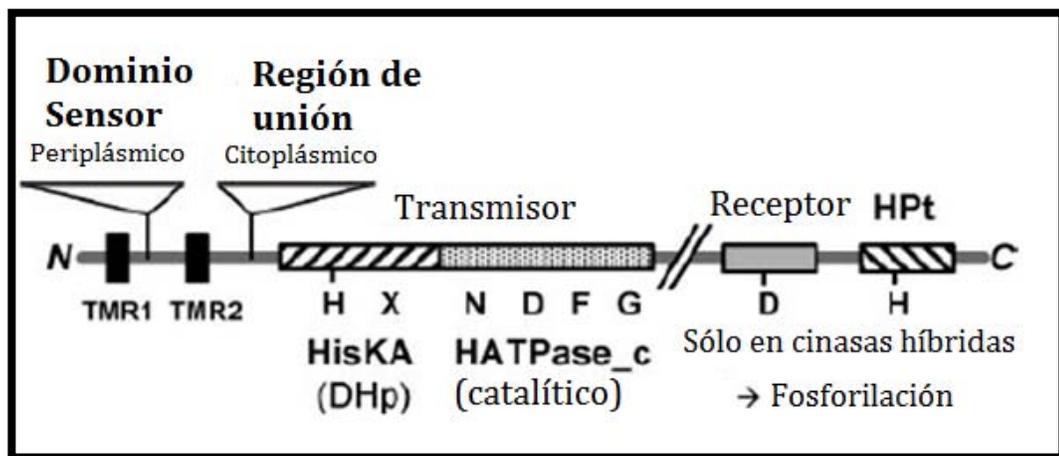


Figura 21. Características, dominios y cajas de la proteína Histidin-cinasa. Núcleo de la proteína Histidin-cinasa EnvZ en *E. coli* (Mascher, 2006).

Las cinasas de histidina (HK) de los TCS han sido agrupadas en dos clases principales: ortodoxas e híbridas. Entre las primeras, una de las más estudiadas es la cinasa osmo-sensora EnvZ que está formada de dos regiones transmembrana; tiene su extremo N-terminal (dominio sensor) embebido en el espacio periplasmático y su región catalítica C-terminal expuesta en el citoplasma de la célula. Existen otros ejemplos de HKs con múltiple segmentos transmembrana. Sin embargo no todas las HKs ortodoxas se encuentran unidas a regiones membranales, ya que existen HK que se ubican en el

citoplasma, donde pueden ser reguladas por estímulos intracelulares o por interacciones con otros dominios citoplasmáticos de otras proteínas (**Figura 20**) (Stock, 2000).

Por su parte, las cinasas híbridas construyen vías de señalización más elaboradas; este tipo de cinasas se encuentran distribuidas sólo en algunos procariontes pero sí en muchas células eucariontes. Su principal característica es presentar múltiples sitios fosfodadores y fosfoceptores promoviendo así más de una transferencia del grupo fosforilo. Las cinasas híbridas promueven múltiples esquemas de fosforilación. Un claro ejemplo de este tipo de cinasas es la HK híbrida ArcB en *E. coli* que participa en el sistema de control redox/anaeróbico; esta proteína contiene dos regiones transmembrales ubicadas en la región N-terminal seguidas por un dominio HK, un dominio similar al dominio regulador de RR y finalmente una segunda región que contiene un residuo His conocido como dominio fosfotransferente, HPT (**Figura 22**) (Stock, 2000).

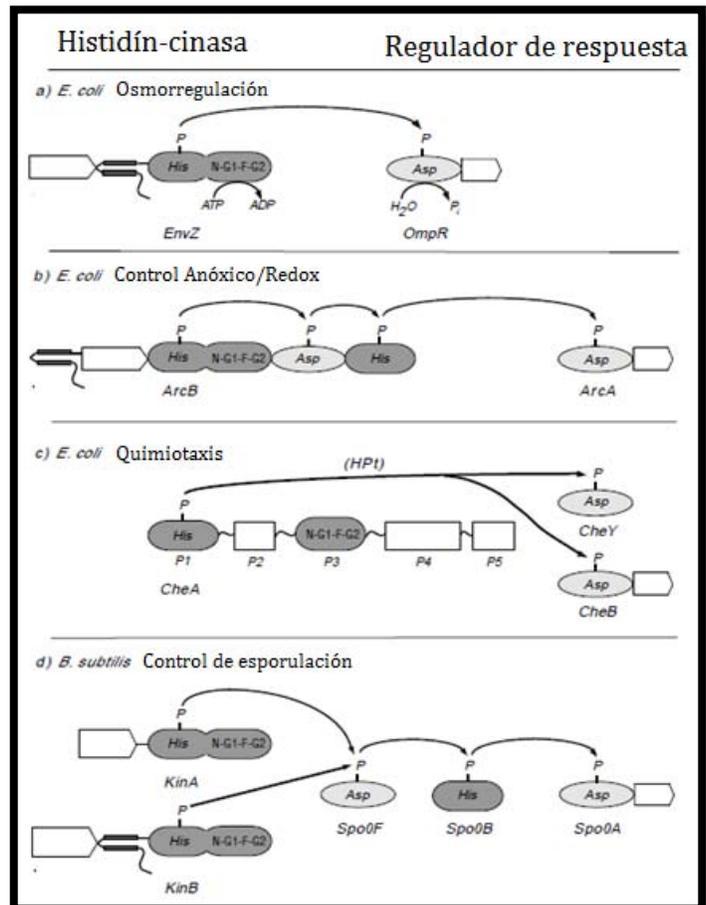


Figura 22. Diagrama esquemático que representa la organización modular de sistemas de dos componentes, en distintos organismos. a) HKs de tipo ortodoxa b) y c) HKs de tipo híbrida (Stock, 2000).

Estructura y función de proteína fosfotransferente (Hpt)

Un número pequeño de TCS contienen dominios HPt (de las siglas en inglés histidine phosphotransfer). En procariontes, las HPt son casi exclusivamente componentes de las cinasas híbridas, mientras que en los eucariontes se encuentran en proteínas separadas. El dominio HPt es de aproximadamente 120 aminoácidos de longitud y contienen un residuo de His capaz de participar en la reacción de transferencia del grupo fosforilo. Este dominio desempeña un papel de conexión con otros dominios, ya que se fosforila en un residuo de His y transfiere el grupo fosforilo a otros residuos, aunque carece de actividad cinasa y fosfatasa (Stock, 2000).

Su estructura básica consta de un motivo conservado, formado por cuatro alfa-hélices que provienen de una sola cadena polipeptídica y que se disponen de forma antiparalela (arriba-abajo-arriba-abajo), el residuo de histidina se ubica de forma expuesta sobre una de estas hélices (Kato, 1997).

Estructura y función de proteínas reguladora de respuesta (RR)

En la mayoría de los sistemas procariontes, los RR son el componente final de la vía de señalización de los TCS, su actividad principal es funcionar como interruptores de fosforilación activando así una respuesta adaptativa. Las proteínas reguladoras de respuesta (RR) son fosforiladas por la HK en un residuo Asp altamente conservado (Stock, 2000).

La naturaleza química de estas proteínas permite que algunas pequeñas moléculas como acetyl fosfato, carbamoyl fosfato, imidazol fosfato y fosforamidato funcionen como fosfodonadores, demostrando así que las RR pueden catalizar la transferencia del grupo fosforil independiente de la asistencia de una HK (Stock, 2000).

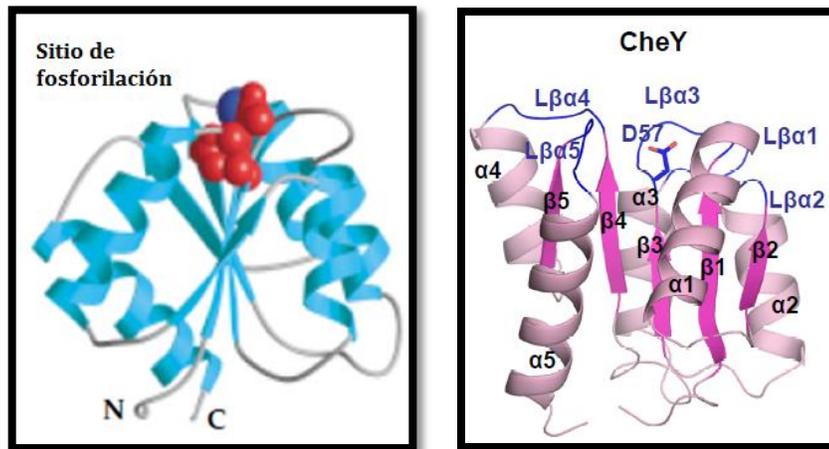


Figura 23. CheY de *S. tyhimurium* miembro de la familia de reguladores de respuestas. Proteína reguladora con sus dos dominios: Regulatorio conservado y dominio efector, contiene un grupo conservado de residuos de Asp (rojo) que une Mg^{2+} y forma el sitio activo para la transferencia del grupo fosforilo (Stock, 2000).

En general las proteínas reguladoras de respuesta (RR) están compuestas de dos dominios: un dominio regulador N-terminal conservado (REC) y un dominio efector variable, C-terminal.

La mayoría de estas proteínas son factores de transcripción con dominios efectores de unión al DNA. Estos dominios de unión al DNA pueden ser subdivididos dentro de tres principales familias representados por OmpR, NarL y NtrC. No todos los RRs tienen dominios de unión al DNA, unos pocos tienen dominios C-terminal que funcionan como enzimas (CheB en la quimiotaxis), además existen proteínas RRs que carecen totalmente del dominio efector C-terminal (CheY).

Estudios con la proteína CheY (**figura 23**) han permitido caracterizar el dominio regulador conservado (REC) de las proteínas RR. Contiene aproximadamente 128 residuos y presenta un plegamiento único (α/β) con un núcleo central de 5 láminas β paralelas rodeadas por 5 hélices α , colocándose 3 α hélices en una cara de la hoja β y las dos α hélices restantes en la otra. El centro catalítico está formado por un bolsillo ácido muy conservado circundado por los lazos (loops) que conectan los extremos C-terminal de las

láminas β con las hélices α y que se denominan $L\beta\alpha 1$ (conexión $\beta 1-\alpha 1$), $L\beta\alpha 2$, $L\beta\alpha 3$, $L\beta\alpha 4$ y $L\beta\alpha 5$. Este bolsillo incluye el residuo Asp57 capaz de ser fosforilado que se encuentra expuesto al solvente en $L\beta\alpha 3$ y otros dos residuos ácidos, Asp 12 y Asp 13 que se encuentran adyacentes al residuo catalítico en $L\beta\alpha 1$ y que están implicados en la coordinación del ión Mg^{2+} . El grupo de residuos altamente conservados que rodean el centro activo del dominio regulador se completa con la Thr 87 y Lys 109 que no están directamente relacionados con la catálisis pero que han demostrado ser clave en los cambios conformacionales inducidos por la fosforilación (Stock, 1993).

Las cadenas laterales presentes en el bolsillo ácido, esto es, los carboxilatos, están involucrados en la coordinación del Mg^{2+} que se requiere para la transferencia del grupo fosforilo, tanto en las reacciones de fosforilación y defosforilación. La estructura de CheY-Mg indica una coordinación octaédrica que involucra Asp57, Asp12, el oxígeno en la cadena principal del Asp 59, y tres moléculas de agua, lo que sugiere un mecanismo de transferencia del grupo fosforilo a través de un estado de transición de fósforo pentavalente bipiramidal (fosforano) (Stock, 2000).

Muchas proteínas RR (Spo0F, NtrC, PhoB, NarL, CheB, Spo09 y FixJ) presentan características generales muy similares a las de CheY, sin embargo, muestran algunas diferencias estructurales ya sea por cambios en las longitudes y conformaciones de los bucles en la superficie, así como en las orientaciones de las hélices (Stock, 2000).

El dominio C-terminal de los RR se denomina dominio efector y aunque son muy diversos, de forma mayoritaria son dominios de unión a DNA, por lo que activan o reprimen la transcripción de genes específicos. El mecanismo específico de regulación transcripcional, la disposición de los sitios de unión al DNA, así como las secuencias de DNA que reconocen, difieren de un RR a otro. Los dominios efectores de unión a DNA presentan diferentes tipos de plegamiento siendo uno de los más comunes los de tipo hélice-giro-hélice (HTH), aunque también pueden observarse hélices aladas, o hélice-lazo-hélice. En otros casos, el dominio efector es un dominio enzimático como el de metilesterasa (CheB) (Bunn, 2004).

Reacción

En un TCS paradigmático, un estímulo modula la autofosforilación del residuo de histidina conservado y específico de una HK, siendo posteriormente este mismo grupo fosforilo transferido al aspartato conservado y específico del correspondiente RR. Esta modificación altera las propiedades transcripcionales, enzimática o mecánicas de este último componente. La transducción de la señal en un sistema básico de dos componentes incluye tres reacciones, siendo dos de ellas reversibles (Stock, 2000).

1. Reacción de autofosforilación: $\text{HK-His} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{HK-His}\sim\text{P} + \text{ADP}$.

La llegada de un estímulo a la HK, induce la fosforilación en el residuo de His conservado utilizando una molécula de ATP.

2. Reacción de fosfotransferencia: $\text{HK-His}\sim\text{P} + \text{RR-Asp} \rightleftharpoons \text{HK-His} + \text{RR-Asp}\sim\text{P}$

El grupo fosforilo es transferido desde la His al residuo de Asp conservado del dominio aceptor del correspondiente RR.

3. Reacción de defosforilación: $\text{RR-Asp}\sim\text{P} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-Asp} + \text{Pi}$

El RR pierde el grupo fosforilo espontáneamente o mediante catálisis por la HK.

El mecanismo enzimático de un sistema de fosfotransferencia His-Asp-His-Asp consta al menos de cinco reacciones de transferencias del grupo fosforilo.

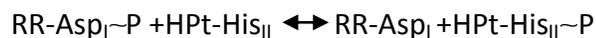
1. Reacción de autofosforilación:



2. Primera reacción de fosfotransferencia:



3. Segunda reacción de fosfotransferencia:



4. Tercera reacción de fosfotransferencia:



5. Reacción de defosforilación:



En los sistemas de fosfotransferencia, el grupo fosforilo pasa de un residuo a otro y no hay amplificación de señales.

En algunos casos, los sistemas de fosfotransferencia integran múltiples rutas de señalización, como ya se ha propuesto en el sistema KinA-Spo0F de *B. subtilis* **figura 22d** (Stock, 2000).

- Autofosforilación de la HK

Las HKs catalizan la transferencia del fosfato y del ATP a un residuo aceptor de igual manera que las cinasas eucariontes con dominios conservados de Ser/Thr/Tyr, sin embargo la gran diferencia de la reacción radica en las uniones que forman. Mientras las cinasas eucariontes forman uniones fosfoésteres (P-O), las HKs bacterianas generan un enlace fosforamidato (P-N) que es resultado de la unión del grupo fosforilo al nitrógeno del grupo imidazol (Stock, 2000).

La fosforilación de la His se puede producir tanto en el nitrógeno 1 como en el 3 del anillo de imidazol. Sin embargo, en las HKs caracterizadas hasta el momento, sólo se ha observado fosforilación en el nitrógeno de la posición 3 del imidazol. La estabilidad química del enlace fosforamidato es un elemento clave en la función biológica ya que termodinámicamente la energía libre que se desprende en la hidrólisis del enlace P-N ($\Delta G = -12$ a -14 Kcal/mol) es mayor que la del enlace P-O ($\Delta G = -6.5$ a 9.5 Kcal/mol) (Attwood, 2007). El enlace P-N de alta energía es adecuado para la transferencia del grupo fosforilo a otras moléculas. Por ello, también se forman intermediarios fosfo-His en enzimas tales como succinil-CoA sintetasa del ciclo de Krebs, piruvato fosfato dicinasa del ciclo de las pentosas, etc. Además debido a la alta energía del enlace fosforamidato, el equilibrio de la reacción de autofosforilación en HKs favorece a la proteína defosforilada,

por lo que la reacción se da debido al elevado cociente ATP/ADP (10:1) intracelular (Egger, 1997).

En estado nativo, las HKs actúan como homodímeros, y es necesaria la unión del ligando ATP en el dominio CA para donar el grupo fosforilo a la His catalítica en el dominio DHp. Esto implica que deben producirse cambios conformacionales que aproximen el dominio CA al dominio DHp. La reacción de fosforilación de las HK ocurren en el dímero. En este sentido, la mayoría de los estudios realizados hasta el momento han apoyado un mecanismo de autofosforilación trans-intermolecular donde el ATP unido al dominio CA de una subunidad fosforila a la histidina catalítica de la subunidad contraria (Stock, 2000), no obstante existen excepciones en las cuales la fosforilación ocurre a través de un mecanismo intramolecular.

- Fosfotransferencia HK-RR

En general, las reacciones enzimáticas de transferencia del grupo fosforilo pueden producirse por transferencia directa del grupo fosforilo a un nucleófilo entrante o a través de la formación de un intermediario covalente. Ejemplos de este último caso ocurren en las fosfatasa alcalinas, las fosfatasa de tirosina, nucleótido difosfato cinasa y P-ATPasas. En estas reacciones de dos estados, un nucleófilo enzimático forma un intermediario estable con el fosforilo entrante mientras que el grupo saliente es desplazado. Este intermediario es atacado por un nucleófilo entrante, que puede ser una molécula de agua, como ocurre en el caso de la fosfatasa alcalina. Las fosfotransferasas utilizan gran variedad de nucleófilos enzimáticos como el grupo carboxilo del Asp (P-ATPasa), el grupo tiol de la Cys (fosfatasa de tirosina), el grupo hidroxilo de la Ser (fosfatasa alcalinas), y el grupo imidazol de la His (nucleósido difosfato cinasa) (Thompson, 2001).

La reacción de fosfotransferencia en las HKs se puede producir a través del mecanismo de sustitución nucleofílica concertada S_N^2 (asociativa, reacción bimolecular) o por etapas S_N^1 (disociativa, reacción monomolecular). En el primer caso, el grupo fosforilo, el Asp del RR y la His se encuentran alineados en el estado de transición formando un complejo lineal pentavalente, de manera que el enlace que se está formando Asp-P acompaña a la rotura

del enlace His-P. En el segundo caso se producen dos etapas; la primera es lenta y la rotura del enlace fosforamidato provoca la formación de un intermedio metafosfato inestable que rápidamente forma enlace con el Asp del RR (**figura 23**).

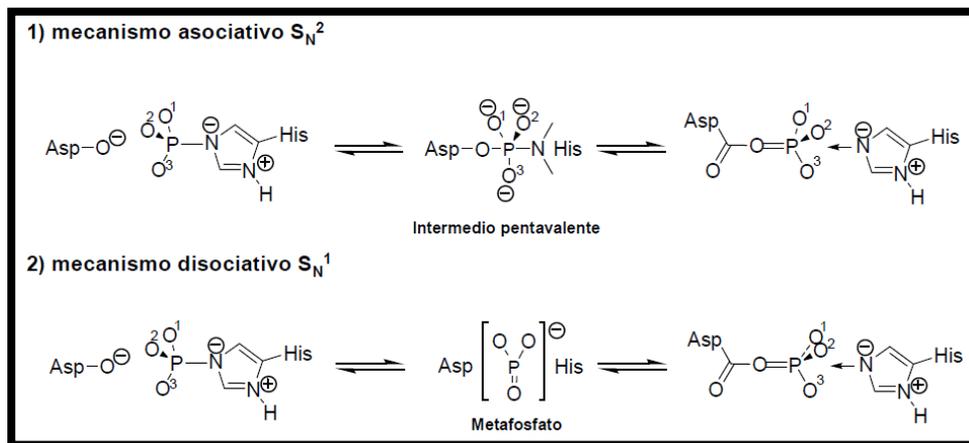


Figura 23. Mecanismo de transferencia de fosforilo en las HKs 1) Mecanismo asociativo, 2) Mecanismo disociativo.

- Fosforilación/defosforilación del RR

La fosforilación en un residuo de Asp produce un enlace de alta energía acilfosfato al igual que el enlace fosfoanhídrido en la molécula de ATP. La fosforilación en un residuo de Asp es el enlace más energético en una proteína. Los acilfosfatos son rápidamente hidrolizables tanto en condiciones ácidas como básicas. La estabilidad del enlace acilfosfato en un RR es bastante variable y depende de cada RR; por ejemplo, a temperatura ambiente la vida media del RR CheY de *E. coli* es de 10 s y hasta horas para OmpR-P de *E. coli* (Stock, 2000)

La variabilidad en la vida media del RR fosforilado puede deberse a la autodefosforilación propia del RR (utilizando el oxígeno de una molécula de agua como nucleófilo que ataca al fosfato), al acceso más fácilmente de la molécula de agua al centro catalítico del RR (esto provoca una defosforilación más rápida) o por la actividad mediada por la HK (importante para la regulación de la fosforilación del RR) (Stock, 2000).

REFERENCIAS

1. Abby, S., Rocha, E., *et. al* (2012). The Non-Flagellar Type III Secretion System Evolved from the Bacterial Flagellum and Diversified into Host-Cell Adapted Systems. *PLOS Genetics*. Vol 8. Issue 9. e1002983.
2. Aora, S., Ritchings, B., *et. al* (1997). A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in cascade manner. *Journal Bacteriology*. Vol 178. pp 5574-5581.
3. Armitage, J., Pitta, P., *et. al* (1999). Transformations in flagellar structure of *Rhodobacter sphaeroides* and possible relationship to changes in swimming speed. *Journal Bacteriology*. Vol 181. pp 4825-4833.
4. Attwood, P., Piggott, M., *et. al* (2007). Focus on phosphohistidine. *Amino acids* Vol. 32 pp. 145-156.
5. Ballado, T., Campos, A., *et. al* (1996). Flagellar genes from *Rhodobacter sphaeroides* are homologous to genes of the *fliF* operon of *Salmonella typhimurium* and to the type- III secretion system. *Gene*. Vol 170. pp 69-72
6. Bangdong, L., Brun, A., *et. al* (2001). Positive regulation of Motility and flhDC expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. Vol 40. No. 1. pp 245-256.
7. Barnett, M., Hung, D., *et. al* (2001). A Homolog of the CtrA Cell Cycle Regulator is Present and Essential *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 183. No. 10 pp. 3204-3210.
8. Bellefontaine, A., Pierreux, C., *et. al* (2002). Plasticity of transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*. *Molecular Microbiology*. Vol. 43 No. 4 pp. 945-960.
9. Bennett, J., Thomas, G., *et. al* (2001). Substrate complexes and domain organization of the *Salmonella* flagellar export chaperones FlgN and FliT. *Molecular Microbiology*. Vol 39. pp 781-791.
10. Biondi, E., Reisinger, S., *et. al* (2006). Regulation of the bacterial cell cycle by an integrated genetic circuit. *Nature*. Vol. 444. pp. 899-904.

11. Bunn, M., Ordal, G., *et. al* (2004). Receptor conformational changes enhance methylesterase activity during chemotaxis by *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*. Vol. 51 pp. 721-728.
12. Cohen, E., Hughes, T., *et. al* (2014). Rod-to-Hook Transition for Extracellular Flagellum Assembly Is Catalyzed by the L-Ring-Dependent Rod Scaffold Removal. *Journal of Bacteriology*. Vol 196. No.13.pp 2387-2395.
13. Curtis, P., Brun, Y., *et. al* (2010). Getting in the Loop: Regulation of Development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 74. No. 1 pp 13-41.
14. Delgado, J., Forst, S., *et. al* (1993). Identification of a phosphorylation site and functional analysis of conserved aspartic acid residues of OmpR, a transcriptional activator for *ompF* and *ompC* in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiology*. Vol. 10. Pp. 1037-1047.
15. DeRosier, D., (1998). *et. al* The Turn of the Screw: The Bacterial Flagellar Motor. *Cell*. Vol.93 pp. 17-20
16. Domian, I. J., Quon, K.C., and Shapiro, L. (1997). Cell type-specific phosphorylation and proteolysis of transcriptional regulator controls the G1 to-S transition in a bacteria cellcycle. *Cell* 90, 415-424.
17. Domian, I., Reisenauer, A., *et. al* (1999). Feedback control of a master bacterial cell-cycle regulator. *Proc Natl. Acad. Sci*. Vol. 97. pp 6648-6653.
18. du Plessis, D., Nouwen, N., *et. al* (2011). The Sec translocase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808 pp. 851-865
19. Egger, L., Park, H., *et. al* (1997). Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay. *Genes Cells* Vol. 2 pp. 167-184
20. Fenchel, T. 2002. Microbial behavior in a heterogeneous world. *Science* 296, 1068-1071.
21. Fraser, G., Bennett, C., *et. al* (1999). Substrate-specific binding of hook-associated proteins by FlgN and FliT, putative chaperones for flagellum assembly. *Molecular Microbiology*. Vol 32. pp 569-580

22. Gora, K., Tsokos, C., *et. al* (2010). A Cell-Type-Specific Protein-Protein Interaction Modulates Transcriptional Activity of a Master Regulator in *Caulobacter crescentus*. *Cell*. Vol. 39. pp 455-467
23. Harper, S., Speicher, D., *et. al* (2011). Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol Biol*. Vol. 681 pp. 259-280.
24. Herlihey, F., Moynihan, P., *et. al* (2014). The essential Protein for Bacterial Flagella Formation FlgJ Function as a β -N-Acetylglucosaminidase. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 289. No. 45. pp.31029-31042.
25. Hirano, T., Minamino, T., *et. al* (2001).The Role in Flagellar Rod Assembly of the N-terminal Domain of *Salmonella* FlgJ, a Flagellum-specific Muramidase. *Journal Molecular Biology*. Vol 312 pp. 359-369.
26. Hirano, T., Yamaguchi, K., *et. al* (1994). Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *Journal Bacteriology*. Vol 176. pp. 5439-5449.
27. Hoch, J., Two- component and phosphorelay signal transduction. *Microbiology*. Vol. 3. pp165-170.
28. Hutter, M., Helms, V., *et. al* (2000). Phosphoryl transfer by a concerted reaction mechanism in UMP/CMP-kinase. *Protein Sci*. Vol 9. Pp 2225-2231
29. Jacobs, C., Ausmees, N., *et. al* (2003) Functions of the CckA histidine kinase in *Caulobacter* cell cycle control. *Molecular Microbiology*. Vol 47. No. 5 pp 1279-1290.
30. Jacobs, C., Domian, I., *et. al* (1999). Cell-cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell*. Vol 97. pp. 111-120
31. Jones, C., Macnab, R., *et. al* (1990). Stoichimetric Analysis of the Flagellar Hook-(Basal-Body) Complex of *Salmonella typhimurium*. *Journal Molecular Biology*. Vol. 212 pp.377-387.
32. Katayama, E., Oosaawa, S., *et. al* (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. Vol. 255. pp 458-75.
33. Kato, M., Mizuno, T., *et. al* (1997). Insights into multistep phosphorelay from the crystal structure of the C-terminal HPt domain of ArcB. Cell Vol. 88. pp 717-723
 34. Khorchid, A., Ikura, M., *et. al* (2006). Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer. The international journal of biochemistry & cell biology Vol.38 pp. 307-312.
 35. Kojima, M., Kudo, T., *et. al* (2007). The bidirectional polar and unidirectional lateral flagellar motors of *Vibrio alginolyticus* are controlled by a single CheY species. Molecular Microbiology. Vol. 64 pp 57-67.
 36. Kubori, T., Shimamoto, S., *et. al* (1992). Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. Journal Mol. Biol. Vol. 182 pp. 433-446.
 37. Kutsukake, K., Ohya, Y., *et. al* (1990). Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. Journal Bacteriology. Vol 172. Pp. 741.747.
 38. Lang, A., Beatty, T. *et. al* (2000). Genetic analysis of bacterial genetic exchange element: The gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus*. PNAS. Vol.97, No. 2 pp. 859-864.
 39. Lang, A., Beatty, T., *et. al* (2001). A Bacterial Signal Transduction System Controls Genetic Exchange and Motility. Journal of Bacteriology. Vol. 184, No. 4.pp 913-918.
 40. Laub, M., Chen, S., *et. al* (2002). Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell-cycle. Proc. Natl Acad.Sci.USA. Vol 99. Pp. 4632-4637
 41. Liu, X., Matsumura, P., *et. al* (1994). The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. Journal Bacteriology. Vol 176. pp. 7345-7351.
 42. Lloyd, S., Blair, D., *et. al* (1997). Charged residues of the rotor protein FliG essential for torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*. Journal Molecular Biology. Vol 266 pp. 733-744.

43. Mackenzie, C., (2007). Post-genomic adventures with *Rhodobacter sphaeroides*. Annu. Rev. Microbiol. 61, 283-307
44. Mackenzie, C., Choudhary, M., (2001). The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.3.1 Photosynthesis Research. Vol. 70. pp 19-41
45. Macnab, R. (1996) Flagella and Motility. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology Washington. DC. pp.123-145
46. Macnab, R., (2003). How Bacteria Assemble Flagella. Annu. Rev. Microbiol Vol. 57 pp. 77-100
47. Mascher, T., Helmann, J., et. al (2006). Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 70 No. 4 pp. 910-938.
48. McGrath, P., Iniesta, A., et. al (2006). A Dynamically Localized Protease Complex and a Polar Specificity Factor Control a Cell Cycle Mater Regulator. Cell. Vol. 124 pp. 535-547.
49. Mercer, R., Quinlan, M., et. al (2012). Regulatory system controlling motility and gene transfer agent production and release in *Rhodobacter capsulatus*. FEMS Microbiol. Vol. 331. pp 53-62.
50. Metcalf, W., Wanner, B., et. al (1993). Construction of new beta-glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement. Gene. Vol. 129 pp. 17-25
51. Nambu. T., Kutsukake, K., et. al (2000). The *Salmonella* FlgA protein a putative periplasmic chaperone essential for flagellar P ring formation. Microbiology. Vol 146 pp. 1171-1178.
52. Nambu. T., Minamino, R., et. al (1999). Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurim*. Journal. Bacteriology. Vol 181 pp. 1555-1561.

53. Ohnishi, K., Ohto, Y., *et. al* (1994). FlgD Is a Scaffolding Protein Needed for Flagellar Hook Assembly in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. Vol.176. No.8. pp.2272-2281
54. Olmos, F., Domenzain, C., *et. al* (2010). The Flagellar Protein FliL is Essential for Swimming in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 192 . No. 23 pp. 6230-6239.
55. Poggio, S., Abreu-Goodger, C., *et. al* (2007). A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal Bacteriology*. Vol 189. Pp. 3208-3216.
56. Poggio, S., Osorio, A., *et. al* (2005). The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding protein. *Molecular Microbiology*. Vol. 58. No. 4 pp. 969-983.
57. Quon, K., Marczynski, G., *et. al* (1996). Cell Cycle Control by an Essential Bacterial Two-Component Signal Transduction Protein. *Cell*. Vol. 84, 83-93.
58. Rampersaud, A., Harlocker, S., *et. al* (1994). The OmpR protein of *Escherichia coli* binds to sites in the ompF promoter region in a hierarchical manner determined by its degree of phosphorylation. *Journal. Biology. Chemical*. Vol. 269 pp. 12559-12566.
59. Reid, S., Leake., *et. al* (2006). The maximum number of torque-generating units in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol.103 pp. 8066-8071
60. Reidenauer, A., Quon, K., *et. al* (1999) The CtrA Response Regulator Mediates Temporal Control of Gene Expression during the *Caulobacter* Cell Cycle. *Journal Bacteriology* Vol. 181 No. 8. pp. 2430-2439.
61. Romero, T., *et. al* (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNAmolecule CsrB. *Molecular Microbiology*. Vol 29. No. 6. pp. 1321-1330

62. Russo, D., Silhavy, J., *et. al* (1991). EnvZ controls the concentration of phosphorylated OmpR to mediate osmoregulation of the porin genes. *Journal Molecular Biology*. Vol222. Pp 567-580.
63. Smith, D., Corcoran, L., *et. al* (2000). *Current Protocols in Molecular Biology*. 16.7.1-16.7.7.
64. Smith, D., Johnson, K., *et. al* (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with Glutathione S-Transferase. *Gene*. Vol 67. Pp 31-40.
65. Smith, S., Joshi, K., *et. al* (2014). Cell cycle-dependent adaptor complex for ClpXP-mediated proteolysis directly integrates phosphorylation and second messenger signals. *PNAS*. Vol.111. No. 39. pp.14229-14234.
66. Sorensen, H., Mortensen, K., *et. al* (2005). Advanced genetic for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Vol 115. pp.113-128
67. Soutourina, O., Bertin, P., *et. al* (2003). Regulation cascade of flagella expression in Gram-negative bacteria. *FEMS. Microbiology Reviews*. 27 pp. 505-523
68. Stock, A. Martinez E., *et. al* (1993). Structure of the Mg (2+)-bound form of CheY and mechanism of phosphoryl transfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry*. Vol. 32 pp. 133375-13380.
69. Stock, A. Robinson, V., *et. al* (2000). Two-Component Signal Transduction. *Annu. Rev. Biochem*. Vol. 69 pp. 183-215.
70. Tan, M., Kozdon, J., *et. al* (2010). An essential transcription factor, SciP, enhances robustness of *Caulobacter* cell cycle regulation. *PNAS*. Vol 107. No. 44 18985-18990.
71. Terashima, H., Kojima, S., *et. al* (2008). Flagellar Motility in Bacteria: Structure and Function of Flagellar Motor. *International Review of Cell and Molecular Biology*. Vol 270 pp 39-83.
72. Thompson, P., Cole, P., *et. al* (2001). Probing the mechanism of enzymatic phosphoryl transfer with a chemical trick. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol. 98 pp. 8170-8171.

73. Tsokos, C. Laub, M., *et. al* (2012). Polarity and cell fate asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *NIH Curr Opin Microbiol*. Vol.15 No. 6 pp. 744-750.
74. Ueno, T., Oosawa, K., *et. al* (1992). M ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF. *Journal Mol Biol*. Vol 227 pp. 672-677.
75. Van, G., Gough, C., *et. al* (1995). The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Molecular Microbiology*. Vol.15 No.6 pp. 1095-1114
76. Vega, B., Domenzain, C., *et. al* (2015). The flagellar set Fla2 in *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the CckA pathway and is repressed by organic acids and the expression of Fla1. *J. Bacteriol*. Vol 197.No.5 pp 833-847
77. Volz, K., *et. al* (1993). Structural conservation in the CheY superfamily. *Biochemistry*. Vol.32. pp. 11741-11753.
78. Wheeler, R., Shapiro, L., *et. al* (1999). Differential localization of two histidine kinases controlling bacterial cell differentiation. *Mol. Cell*. Vol4. pp683-694.
79. Yonekura, Maki, Y., *et. al* (2003). Domain movements of HAP2 in the cap-filament complex formation and growth process of the bacterial flagellum. *PNAS*. Vol.100. No. 26. Pp. 15528-15533.
80. Zhao, R., Pathak, H., *et. al* (1996). FliN is a major structural protein of the C-ring in the *Salmonella typhimurium* flagellar basal body. *Journal Mol Biol*. Vol 261 pp. 195-208.
81. Zhou, J., Sharp, L., *et. al* (1998). Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol 95 pp. 6436-6441.
82. Zhou, J., Sharp, L., *et. al* (1998). Function of protonatable residues in the flagellar motor of *Escherichia coli*: a critical role for Asp 32 of MotB. *Journal Bacteriol*. Vol. 180 pp. 2729-2735.

ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo

Lysogenic Broth (Bertani, 1951)

Triptona 10g	NaCl 10g
Extracto de levadura 5g	H ₂ O c.b.p 1L

Medio Sistrom 10X (Sistrom, 1962)

KH ₂ PO ₄ 27.2g	MgSO ₄ •7H ₂ O 3g
NH ₄ Cl 1.95g	CaCl ₂ •2H ₂ O 0.334 g
Ácido succínico 40g	FeSO ₄ •7H ₂ O 0.020g
Ácido L-glutámico 1g	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O 0.002g
Ácido L-aspartico 0.4g	Solución de elementos traza 1mL
NaCl 5g	Solución de vitaminas 1mL
Ácido nitriloacético 2g	H ₂ O c.b.p 1L

❖ Elementos traza

EDTA 1.765g	CuSO ₄ •5H ₂ O 0.392g
ZnSO ₄ •7H ₂ O 10.95 g	Co (NO ₃) ₂ •6H ₂ O 0.248g
FeSO ₄ •7H ₂ O 5g	H ₃ BO ₃ 0.114g
MnSO•H ₂ O 1.54g	H ₂ O c.b.p 100mL

❖ Solución de vitaminas

Ácido nicotínico 1g	Biotina 0.010g
Tiamina-HCl 0.5g	H ₂ O c.b.p 100 mL

Anexo 2. Extracción de DNA cromosómico

Tomar 3 mL de un cultivo crecido toda la noche y centrifugar (1.5 mL a la vez) a máxima velocidad por 1 minuto. La pastilla formada se resuspende con 0.5 mL de buffer TW, se añaden 30 μ L de SDS 10% y 5 μ L de proteasa K para incubarse por 2 horas a 37 °C

Posteriormente se le agrega 1 volumen de una mezcla fenol-cloroformo (1:1) agitándose vigorosamente, la mezcla se centrifuga por 5 minutos a máxima velocidad y se recupera la fase acuosa en un tubo nuevo, a ésta se le agrega nuevamente 1 volumen de una mezcla fenol-cloroformo (1:1) y se agita vigorosamente, se centrifuga por 5 minutos a máxima velocidad y se recupera la fase acuosa, de ser necesario se agrega otra mezcla fenol-cloroformo (1:1). Estas mezclas funcionan como lavados

Una vez obtenida la fase acuosa lo más hialina posible, se agregan 2 volúmenes de etanol al 100% y 0.1 volumen de acetato de sodio, se agita hasta observar la red de DNA. Se centrifuga por 2 minutos a máxima velocidad y se lava la pastilla con etanol al 70%, nuevamente se vuelve a centrifugar 2 minutos a máxima velocidad y se seca el pellet por 10 minutos a 65 °C, para finalmente resuspender en 200 mL de H₂O A 65°C.

Anexo 2b. Clonación de productos de PCR en el vector pCR2.1-TOPO

La clonación se realizó con 8 μ L del fragmento puro (PCR), 1 μ L de buffer Kit invitrogen, 0.5 μ L de dNTPs y 0.5 μ L de la enzima *Taq* recombinante (Invitrogen). Esta mezcla se incubó a 72° C por 10 minutos. Posteriormente se recuperaron 4 μ L de la reacción y se agregaron 1 μ L de sales (kit) y 0.5 μ L de vector pCR 2.0 TOPO, se mezcló perfectamente. Después se tomaron 4 μ L de esta última mezcla y fueron agregados a las células competentes mezclándose suavemente, se incubaron por 30 minutos en hielo. Estas células recibieron un choque térmico a 42° C por 30 segundos y luego fueron pasadas nuevamente a hielo durante 5 minutos. Finalmente las células se recuperaron con 1 mL de medio LB por 1 hora a 37 °C, transcurrido este tiempo se sembraron en una placa de agar

LBamp (resistencia del plásmido), además se le agregaron 40 µL de Xgal para la selección de colonias transformadas

Anexo 3. Purificación de Plásmido con el Kit QIAprep Spin Miniprep (columnas QIAGEN)

El cultivo de 15 mL ON se centrifuga a 4000 rpm por 10 minutos, se le quita perfectamente el medio y se resuspende en 0.9 mL de P1 con 30 µL de RNAsa. Se transfiere a 2 tubos nuevos a los que se les agrega P2 e invierten suavemente de 3 a 5 veces, se dejan a temperatura ambiente durante 3 minutos. Posteriormente se le añaden 350 µL de N3 e invierten de suavemente de 3 a 5 veces. Nuevamente se centrifugan por 15 minutos a 14000 rpm. El sobrenadante es pasado a la columna azul y centrifugados por 1 minuto a 14 000 rpm y se le agregan 500 µL de buffer PB y se deja a TA por 1 minuto, luego se centrifuga 1 minuto a 14 000 rpm Se le añaden 750 µL de buffer PE y se deja reposar por 2 minutos a TA, se descarta la solución acuosa y nuevamente se centrifuga 1 minuto a 14 000 rpm. Finalmente la columna se pasa a un tubo nuevo y se eluye con 40 µL de H₂O se espera 1 minuto a TA para luego centrifugar 1 minuto a 14 000 rpm.

Anexo 4. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa 1%. QIAquick gel extraction.

Primero se prepara un gel de agarosa al 1% y se separan las muestras de DNA, se tiñe con bromuro de etidio y se corta la banda deseada con la ayuda de una lámpara de luz UV de longitud de onda larga. Posteriormente se pesa dentro de un tubo nuevo, sacando el peso neto del gel. Se añade 10 µL de Capture Buffer Type 3 por cada 10 mg y se incuba por 15 minutos a 65°C para disolver el gel, transcurrido el tiempo la mezcla se pasa a la columna QIAquick y se deja reposar por 2 minutos a TA después se centrifuga por 1 minuto a máxima velocidad (13 000 rpm), se descarta el precipitado. Seguido de esto se añaden 500 µL de Wash Buffer Type 1 a la columna (etanol) y nuevamente se deja reposar durante 2 minutos a TA, nuevamente se centrifuga por 30 segundos a 13 000 rpm, se descarta el precipitado. Finalmente la columna se pasa a un tubo nuevo y se le agrega 20 µL de Elution Buffer Type 4(H₂O), se esperan 4 minutos a TA y luego se centrifuga a 13,

000 rpm durante 1 minuto. Se cuantifica y se corre 1 μ L de la purificación en un gel de agarosa al 1%.

Anexo 5. Células competentes.

Partiendo de un cultivo ON se crece un cultivo hasta una densidad óptica celular de 0.6 a 0.8 D.O. Posteriormente se pone en hielo de 5 a 10 minutos. Centrifugar a 5000 rpm por 5 minutos. Decantar y resuspender la pastilla. Después agregar la mitad del volumen original (5 mL) de CaCl_2 (100mM). Dejar en hielo 15 minutos. Centrifugar 5 minutos a 5000 rpm en frío. Decantar y resuspender en 800 μ L de CaCl_2 100 mM. Dejar las células en hielo al menos dos horas para la transformación.

Anexo 6. Conjugación entre *R. sphaeroides* y *E. coli*.

La conjugación se realizó utilizando los cultivos bacterianos de *E.coli* (S17 o TOP10 con el plásmido pRK2013 (que lleva las funciones de transferencia y por ello se denomina “helper”) y *R. sphaeroides* (AM1). Todos se reinocularon de un cultivo previo de toda la noche y en presencia de los antibióticos adecuados, se incubaron a 37°C (*E. coli*) y 30 °C (*R. sphaeroides*) esperando hasta que alcanzaran un crecimiento exponencial (OD_{600} de 0.6) Posteriormente y en condiciones asépticas se tomaron 1.5 mL de cada cultivo y se centrifugaron a 7 000 rpm durante 4 minutos, después se descartó el medio y se resuspendió el pellet con micropipeta, además se le agregó 1 mL de medio LB para luego volver a centrifugar a 7 000 rpm durante 4 minutos. Esto se repitió por al menos 3 veces para realizar los lavados a las células. Finalmente y después de la última centrifugación se descartó el medio y se resuspendieron las pastillas para luego mezclar las *E. coli* en el tubo de *R. sphaeroides*. A este tubo se le agregó 1 mL de LB y se centrifugo a 7 000 rpm, el medio se descartó y se resuspendió la pastilla en aproximadamente 30 μ L, los cuales se colocaron sobre un pedazo de papel de nitrocelulosa en una placa de LB. Después de haber sido incubados durante 5 h a 30° C, las células se recolectaron y se platearon en cajas de Petri conteniendo el medio selectivo apropiado.