



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

Instituto de Investigaciones Biomédicas

**Mecanismos que regulan la expresión
de la flagelina del flagelo 2 de
*Rhodobacter sphaeroides***

TESIS

que para obtener el título de
Licenciado en Investigación Biomédica Básica

presenta:

Manuel Alejandro González Vera

Directora de Tesis:

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía

Facultad de Medicina



México, Distrito Federal

Junio 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio B-017 del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la supervisión y apoyo de la Dra. Laura Camarena Mejía, la Dra. Clelia Domenzain Reyna, el Dr. Sebastian Poggio y la QFB Aurora Osorio Franco

El desarrollo del presente trabajo fue financiado parcialmente por los donativos PAPIIT IN204614 e IN206811.

A mi madre

Índice

Resumen	1
Introducción	2
El flagelo bacteriano: estructura y función	2
La regulación de la biogénesis flagelar: el paradigma en γ -proteobacterias	6
La regulación de la biogénesis flagelar: los sistemas flagelares en α -proteobacterias	9
Los flagelos de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	15
Planteamiento del problema	20
Hipótesis y Objetivo General	21
Resultados	22
Expresión del gen <i>flaA</i> en la cepa silvestre AM1 y en las cepas mutantes MG1 y MG2	22
Mapeo del sitio de inicio de la transcripción del gen <i>flaA</i>	26
Análisis de delección de la región 5' UTR del gen <i>flaA</i>	28

Análisis bioinformático de los genes <i>flaF</i> y <i>flbT</i> de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	30
Aislamiento y caracterización de la cepa mutante MG3	33
Aislamiento y caracterización de la cepa mutante MG4	36
Análisis bioinformático del marco de lectura abierto <i>RSWS8N_19879</i>	37
Aislamiento y caracterización de la cepa mutante MG5	41
Aislamiento y caracterización de la cepa doble mutante MG6	43
Discusión	47
Perspectivas	52
Material y Métodos	55
Referencias	70

Resumen

El ensamblaje del flagelo bacteriano es un proceso complejo que requiere de una acción coordinada de diversos mecanismos que operan a nivel transcripcional y postranscripcional. Los sistemas involucrados en esta coordinación son diversos y en el clado de las α -proteobacterias no han sido muy estudiados. *Rhodobacter sphaeroides* es una α -proteobacteria con dos sistemas flagelares. En este trabajo, se muestra la existencia de mecanismos de control de la biogénesis flagelar presentes en el segundo sistema. Por un lado, se encontró que la transcripción del gen *flaA*, el cual codifica para la proteína estructural del filamento, es dependiente de la presencia de las estructuras flagelares tempranas. Se determinó el sitio de inicio de la transcripción del gen *flaA* y se analizó la contribución de la región reguladora ubicada hacia la región 5' a partir del punto de inicio de la transcripción. Adicionalmente se observó que el ARNm del gen *flaA* posee una región 5' no traducida de 121 pares de bases, lo que sugiere una regulación postranscripcional. Se determinó que las proteínas FlbT, FlaF y el producto del locus RSWS8N_19879 participan en dicho control postranscripcional, todos, aparentemente, con una función reguladora positiva. La identificación de RSWS8N_19879 resulta particularmente interesante porque se desconoce del todo su función bioquímica y, hasta ahora, su papel en la biogénesis flagelar. Se propone que RSWS8N_19879 y FlbT forman parte de una sola vía de regulación.

Introducción

El flagelo bacteriano: estructura y función

El flagelo bacteriano es una estructura subcelular que permite el desplazamiento sobre superficies o a través de medios líquidos o semisólidos. La motilidad es ventajosa para un organismo pues le permite relocalizarse hacia condiciones de desarrollo óptimas [23, 26].

Estructuralmente, el flagelo bacteriano es un filamento largo, delgado y helicoidal que protruye del cuerpo celular, este se asocia a la estructura intracelular denominada cuerpo basal a través del gancho (Fig. 1) [6, 8]. Los sistemas flagelares utilizan gradientes químicos entre el espacio periplásmico y el citoplasma para generar el torque con el que hacen girar el filamento, impulsando así a la célula [6].

Para su estudio al flagelo se le divide conceptualmente en tres regiones principales: el cuerpo basal, el gancho y el filamento [6]. Funcionalmente, el filamento es un elemento rígido de estructura helicoidal que actúa como propela [4, 6]. El gancho, al ser flexible, permite la reorientación del filamento con respecto al resto del cuerpo celular, lo que faculta a la célula “trenzar” varios filamentos para aumentar la eficiencia del nado [8]. Por último, el cuerpo basal está compuesto por un aparato de exportación, un rotor y un estator.

Específicamente, el filamento está compuesto por decenas de miles de copias de la proteína flagelina [6, 23], las cuales son ensambladas por un pentámero de la proteína de coronamiento del filamento, FliD [16]. Por lo general, el filamento mide el equivalente a varias veces el largo del cuerpo

celular, aunque su longitud exacta es variable. Por esta misma razón el filamento es, por mucho, el elemento más masivo del flagelo [6, 23].

El gancho está formado por repeticiones de la proteína FlgE arregladas de manera helicoidal. La interfaz entre el gancho y el filamento la conforman las proteínas FlgK y FlgL [15]. Análogamente al mecanismo de crecimiento del filamento, las subunidades del gancho son incorporadas al mismo por un polímero de la proteína FlgD [27]. Aunque a diferencia del filamento, la longitud del gancho sí está fija [6]. El mecanismo que media la longitud del gancho aún no ha sido elucidado por completo en ningún sistema.

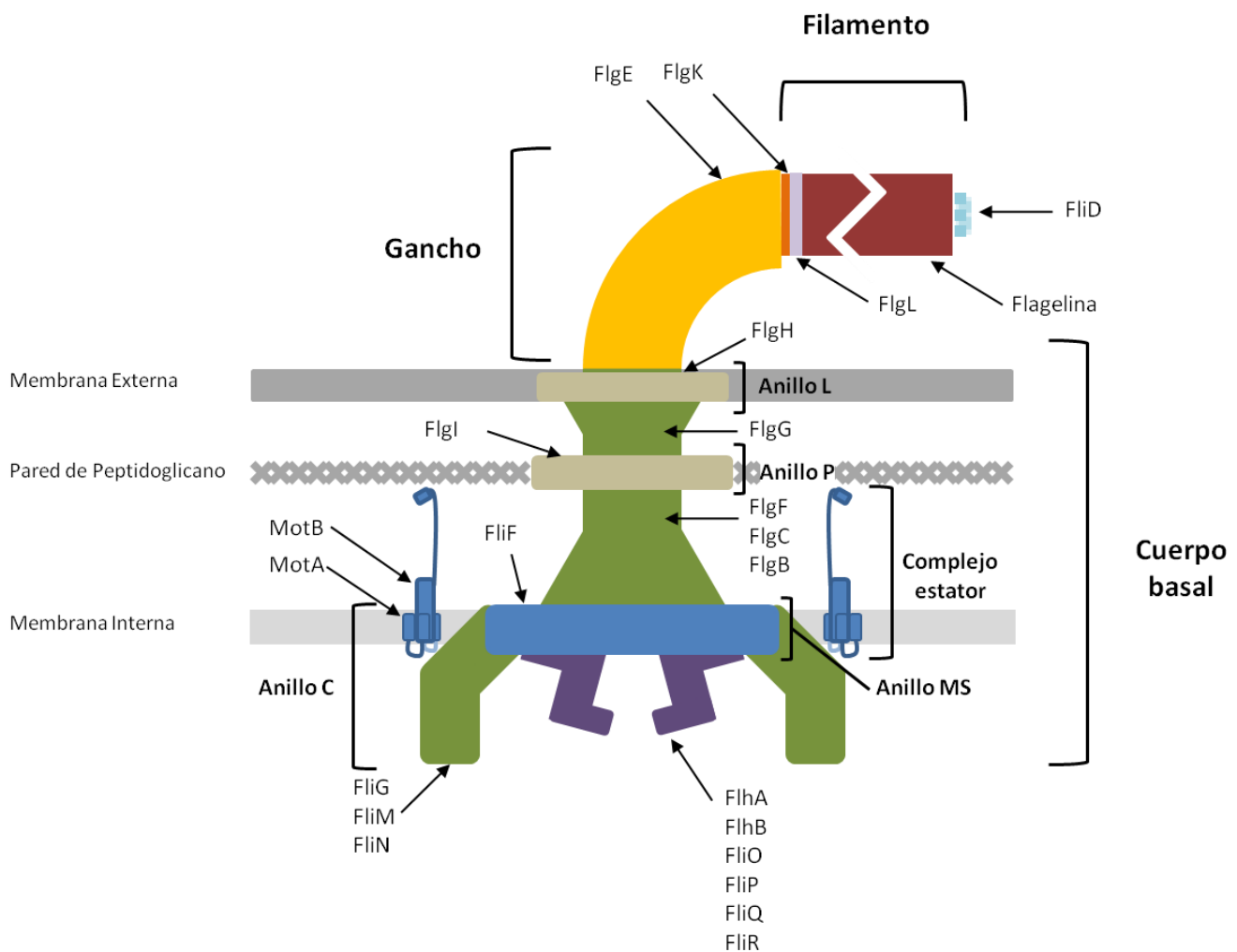


Figura 1. Esquema básico de la estructura de un flagelo en bacterias Gram-negativas

El cuerpo basal se compone por una serie de anillos, un eje que los atraviesa, los complejos estatores y un aparato de exportación (Fig. 1). Los anillos específicos pueden variar dependiendo del sistema flagelar [32] pero básicamente en bacterias Gram-negativas son, el anillo L, el anillo P, el anillo MS y el anillo C que se encuentran en la membrana externa, en la pared de peptidoglicano, en la membrana interna y en el citoplasma, respectivamente [6]. La función de los tres primeros consiste en abrirle paso al eje a través de la envoltura celular y facilitarle el giro; mientras que la función del último es la interacción con las proteínas del estator con quienes genera el torque [6,8].

Cada uno de los anillos está formado por diferentes proteínas, asociadas con una estequiometria específica [18]. El anillo P está formado por la proteína FlgH, el anillo P por la proteína FlgI, el anillo MS por la proteína FliF y el anillo C por las proteínas FliG, FliM y FliN [6].

Se piensa que en el centro del anillo MS se encuentran las proteínas membranales FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ y FliR, quienes forman el aparato de exportación flagelar, cuya función es la translocación de todos los componentes flagelares de localización extracitoplásmica con la excepción de las proteínas que conforman los anillos L y P. La capacidad del aparato de exportación de existir en conformaciones que discriminan entre sustratos del cuerpo basal y del gancho y entre los sustratos necesarios para el ensamblaje del filamento juega un papel regulatorio importante en la biogénesis del flagelo [6].

Sobre la cara periplásmica del anillo MS se forma una estructura helicoidal rígida conocida como 'el eje'. El eje está compuesto por las proteínas FlgB, FlgC, FlgF y FlgG. Se sabe que la proteína FlgG forma la parte más distal del eje, entre la pared de peptidoglicano y la membrana externa. Sin embargo, para el resto de los componentes del eje aún no ha sido completamente esclarecida su posición relativa [6].

Finalmente, el estator está compuesto, para el caso de los sistemas que utilizan gradientes de protones, por las proteínas MotA y MotB. Estas proteínas se asocian a razón de dos copias de MotB por cada cuatro copias de MotA para formar un canal de protones, acoplado su flujo a la rotación flagelar [6, 20, 23].

Adicionalmente, la rotación del flagelo se encuentra controlada por el sistema quimiotáctico, éste le permite a la bacteria percibir señales del medio ambiente. El sistema quimiotáctico consta de varias proteínas citoplásmicas que, a través de una cascada de fosforilaciones, transducen la señal de los receptores quimiotácticos a la proteína CheY. En estado fosforilado, CheY es capaz de interactuar con el anillo C y de esta forma alterar la dirección de giro del flagelo, lo que da lugar a la reorientación del cuerpo celular. La modificación de la frecuencia de estos eventos de reorientación resulta en un nado dirigido ininterrumpido de mayor duración en la dirección de atrayentes o en la dirección opuesta de repelentes [25].

La regulación de la biogénesis flagelar: el paradigma en γ -proteobacterias

El ensamblaje de un flagelo es un proceso costoso que requiere de la síntesis *de novo* de cerca de cuarenta diferentes proteínas. De particular nota es la síntesis de las varias decenas de miles de subunidades de flagelina que se requieren para ensamblar el filamento. Adicionalmente, el proceso es riesgoso pues un flagelo funcional requiere de la acción coordinada de las varias proteínas que lo componen; una sola mutación que provoque la pérdida de la función en cualquiera de ellas, generalmente resulta en un flagelo incompleto e inservible [6, 23, 26].

Es poco sorprendente encontrarse entonces que, además de las proteínas flagelares estructurales y quimiotácticas, los sistemas flagelares cuentan con proteínas reguladoras cuya función es controlar la expresión concertada en tiempo y cantidad, de sí mismas y del resto de los elementos del sistema. Los sistemas de regulación conformados por estas proteínas son a menudo estrictos y jerárquicos [1, 6, 23].

El primer sistema regulador de la biogénesis flagelar en ser descrito en extenso fue el de las γ -proteobacterias *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*. En estos casos, el regulón flagelar contiene más de 60 genes organizados en una jerarquía con tres diferentes clases reguladas diferencialmente de forma transcripcional (Fig. 2). En tales casos, uno de los puntos de control de la expresión genética responde al estado de avance del ensamblaje del sistema flagelar [6].

El primer operón en ser transcrito es *flhDC*, genéricamente a los elementos que ocupan este lugar en la jerarquía se les denomina ‘reguladores maestros’. Este operón se encuentra bajo el control de múltiples señales reguladoras globales, tales como el estado metabólico de la célula, la disponibilidad de nutrientes o estrés ambiental [6]. La integración de estas señales determina el grado de expresión del operón. Si el operón *flhDC* es transcrito, las proteínas resultantes forman el complejo heteromultimérico FlhD₄C₂. Este complejo actúa como un factor transcripcional que estimula la transcripción dependiente de Eσ-70 (RNA polimerasa asociada al factor sigma 70) de los promotores flagelares de clase II y reprime la transcripción de su propio operón. Los genes de clase II codifican para los componentes estructurales necesarios para el ensamblaje del cuerpo basal y del gancho así como las proteínas FliK, FliT, FliA y FlgM. Estas proteínas componen el siguiente punto de control regulatorio. FliA es un factor sigma flagelar conocido también como σ-28 y FlgM es su correspondiente factor anti-sigma. FliT es una proteína chaperona de los sustratos de secreción tardíos. FliK ‘sensa’, mediante algún mecanismo no del todo entendido, cuando el gancho ha alcanzado la longitud máxima predeterminada. Este evento desencadena un cambio en la especificidad del sistema de exportación flagelar, el cual se piensa que se debe a la proteólisis de FlhB, de este modo finaliza la exportación de sustratos de la clase II e inicia la secreción de los sustratos de clase III [6, 13].

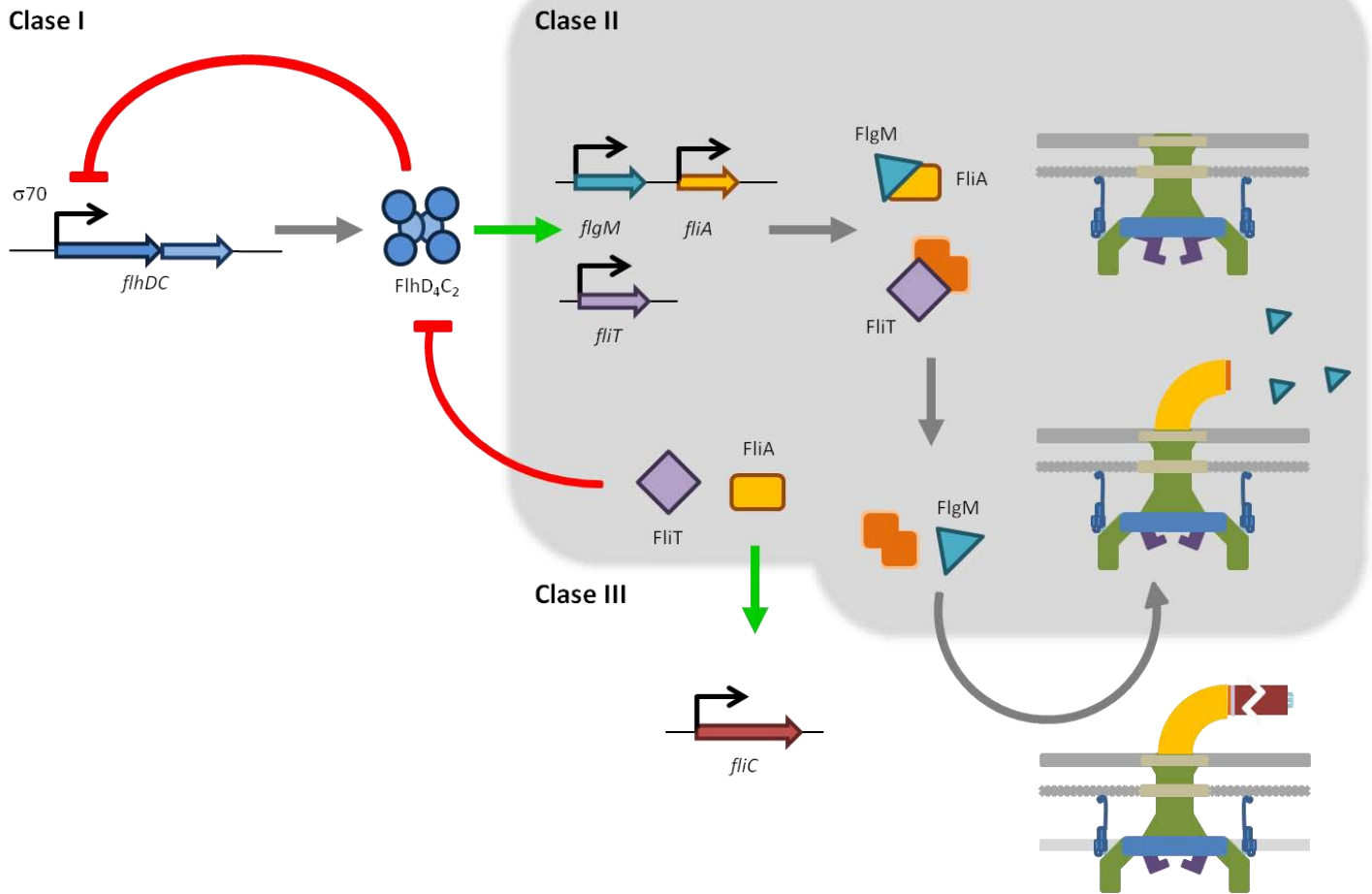


Figura 2. Esquema de la jerarquía flagelar de *E. coli* / *S. enterica*. El regulador maestro *flhDC* promueve la expresión de los componentes tempranos del flagelo. Un segundo punto de control conformado por el factor transcripcional flagelar σ_{28} permite la síntesis de los elementos tardíos del flagelo una vez que las estructuras tempranas han sido completadas.

Con esta especificidad modificada, el aparato de exportación empieza a secretar sustratos tardíos, entre los que se encuentra FlgM, esto altera la proporción de FlgM con respecto a FliA en el citoplasma de la célula e implica que ahora hay copias libres de FliA que pueden dirigir la transcripción de los genes de clase III. La proporción de FlgM a FliA es autoregulada por el hecho de que tanto *flgM* como *fliA* tienen promotores

de clase II y promotores de clase III. Así, un exceso de FlgM disminuye la transcripción de *flgM* y *fliA* desde los promotores de clase III mientras que un exceso de FliA aumenta la transcripción de *fliA* y *flgM* desde esos mismos promotores. FliT se disocia también de sus sustratos de secreción y comienza a reprimir al complejo FlhD₄C₂, apagando así la expresión de los genes de clase II. Es entre los genes de la clase III, la última clase, que se encuentra la flagelina (FliC), así como su chaperona la proteína FliS, la proteína de coronamiento, FliD y los componentes del sistema quimiotáctico [6] (Fig. 2).

Esta no es la única forma de regulación flagelar, estudios en distintas especies han revelado otros sistemas con más o menos clases en la jerarquía y con niveles de regulación adicionales al control transcripcional [1].

La regulación de la biogénesis flagelar: los sistemas flagelares en α -proteobacterias

En el clado de las α -proteobacterias no existen organismos para los cuales se hayan descrito en detalle los mecanismos que regulan la biogénesis flagelar y las señales a las que responden. El sistema del cual se tiene más información es el flagelo de la bacteria oligotrófica *Caulobacter crescentus*. Esta bacteria es un interesante modelo de estudio por su división celular dimórfica. Está demostrado también que la biogénesis flagelar de *C. crescentus* está fuertemente acoplada al ciclo celular [7, 17, 22].

En *C. crescentus* la proteína CtrA es un regulador crítico del ciclo celular además de ser el regulador maestro de la biogénesis flagelar. La actividad de CtrA es dependiente de su estado de fosforilación. La fosforilación de CtrA es dependiente de la cinasa de histidina, CckA. Estas proteínas forman parte de un sistema de dos componentes híbrido, altamente conservado en α -proteobacterias, conformado por la cinasa de histidinas CckA, la fosfotransferasa ChpT y CtrA como regulador de la respuesta. Adicionalmente CtrA también puede ser regulado por proteólisis [7].

La jerarquía flagelar de *C. crescentus* consta de cuatro clases. La acumulación de CtrA-P promueve la transcripción dependiente de $E\sigma$ -70 de los genes de clase II durante la fase S del ciclo celular. Los elementos de la clase II incluyen los componentes del anillo MS, el anillo C, el aparato de exportación y las proteínas reguladoras FlbD y FliX. La proteína FliX bloquea la activación (por fosforilación) de FlbD en tanto no esté finalizada la estructura formada por el anillo MS y el aparato de exportación. Una vez terminada la formación de esta estructura, FlbD es fosforilado y junto con $E\sigma$ -54 lleva a cabo la transcripción de los genes de clase III y de clase IV (Fig. 3). Se ha demostrado la ocupación *in vivo* de los promotores de genes de clase II, III y IV por las proteínas CtrA, FlbD y FliX [7].

La clase IV, que comprende a los genes que codifican para las subunidades del filamento, se encuentra bajo un nivel de regulación adicional mediado por las proteínas FlaF y FlbT (Fig. 4). Ambas actúan como reguladores postranscripcionales del mensajero de la flagelina mayoritaria de *C. crescentus*, FljK. Existe evidencia que sugiere que la proteína FlbT podría unirse a un asa presente en la estructura secundaria

de la región 5' no traducida del mensajero de *fljK*. La modificación de dicha estructura resulta en la inhabilidad de FlbT de interactuar con el mensajero y por ende la vida media del mensajero aumenta [2, 3, 9]. Por su parte, aunque se desconoce su actividad bioquímica específica, se sabe que FlaF actúa como promotor de la síntesis de FljK. La delección del gen *flaF* produce una cepa sin niveles detectables de flagelina. Este fenotipo es abolido con una segunda mutación en el gen *flbT*. La cepa doble mutante recupera la expresión de flagelina pero no recupera la motilidad, lo que sugiere un papel de FlaF en el ensamblaje del filamento [22].

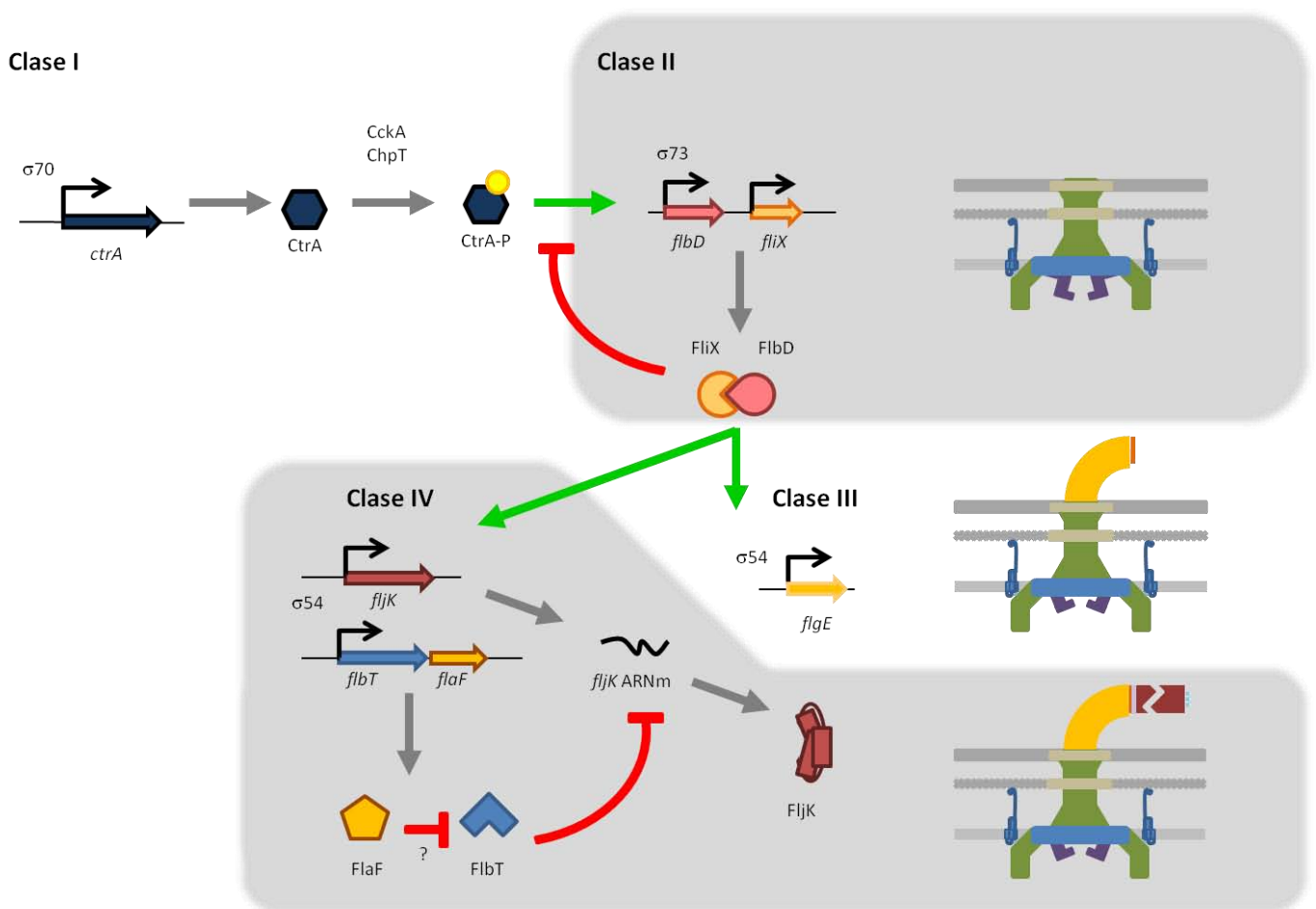


Figura 3. Esquema de la jerarquía flagelar de *C. crescentus*. El regulador maestro *ctrA* promueve la expresión de los componentes tempranos en sincronía con el ciclo celular. Hay dos puntos de control adicionales uno es transcripcional y afecta a todas las

estructuras tardías del flagelo, el otro es postranscripcional y afecta únicamente a la flagelina mayoritaria FljK. Se desconoce a qué señales responden los reguladores de estos puntos de control.

Se sabe que los niveles de FlbT en la célula permanecen constantes a lo largo del ciclo celular mientras que los niveles de FlaF sí varían, llegando a un pico durante el ensamblaje del filamento al final del ciclo de división [22]. Se desconoce cuál es la señal precisa sensada por el punto de control FlbT/FlaF. No hay registros de información estructural sobre FlaF o FlbT. Una búsqueda de dominios conservados muestra que tanto FlaF y FlbT están compuestos únicamente por dominios homónimos; mismos que aunque identificables, guardan una baja identidad con sus homólogos en otras especies.

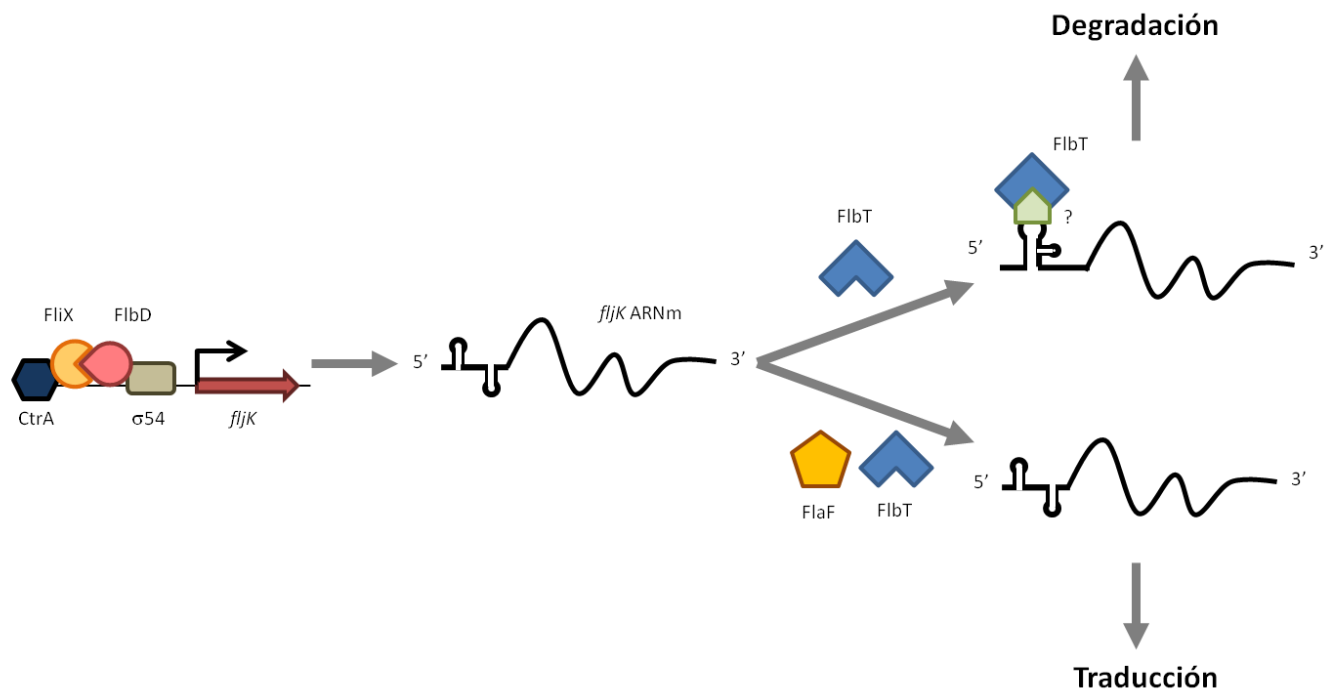


Figura 4. Mecanismo propuesto para el punto de control mediado por FlaF/FlbT en *C. crescentus*

Existen genes homólogos a *flbT* y *flaF* de *C. crescentus* en muchas otras α -proteobacterias pero su función sólo ha sido estudiada en una especie más, el patógeno intracelular *Brucella melitensis*. Hasta hace poco, a *B. melitensis* se le consideraba una especie de bacteria no flagelada mas se demostró que, en medio rico al inicio de la fase de crecimiento exponencial, produce un flagelo polar cubierto. Además, se demostró que los genes flagelares son necesarios para el establecimiento de una infección *in vivo* en cabras y ratones [10, 14, 34].

Se sabe poco de la regulación de la biogénesis flagelar en *B. melitensis* aunque de la poca información que se tiene es evidente que es distinta a las previamente descritas. El gen *ftcR* codifica para una proteína con un dominio de regulador de respuesta y un dominio de unión a DNA que actúa como el regulador maestro del sistema flagelar, en este sentido, se ha demostrado la unión directa de FtcR a las regiones río arriba del gen *FliF* (Fig. 5). Por otro lado, se ha observado también que la expresión de *ftcR* es controlada por la proteína VjbR, la cual participa en la respuesta de percepción a la densidad poblacional (sensado de cuórum); esta proteína pertenece a la misma familia que la proteína LuxR [21].

El flagelo de *B. melitensis* se encuentra también bajo la influencia del factor sigma de función extracitoplásmica RpoE1, quien actúa como un represor del sistema. En una cepa carente de este gen se observa la sobreexpresión de FlgE así como una mayor actividad transcripcional de los genes *ftcR*, *fliF*, *flgE*, *fliC*, *flaF* y *flbT*. Interesantemente, la cepa produce también filamentos más largos [12].

También se ha demostrado que la fosfodiesterasa de di-GMP cíclico, BpdA modula la expresión del sistema flagelar. Su ausencia causa una gran disminución en las actividades transcripcionales de los genes *fliF*, *flgE* y *flgB*. Este efecto no fue observado al probar otras fosfodiesterasas presentes en el genoma [28].

Es de especial interés notar que la síntesis de FliC, la única flagelina de *B. melitensis*, no se ve alterada por la delección del gen *flgE* o del gen *fliF*. Sin embargo, al igual que en *C. crescentus*, la flagelina en *B. melitensis* también está controlada por FlbT y FlaF pero, muy extrañamente, estas proteínas parecen tener sus roles funcionales intercambiados, esto es, una cepa que carece de *flbT* mostró niveles indetectables de flagelina, y la sobreexpresión de FlaF tiene también un efecto negativo sobre la expresión de flagelina (Fig. 5). La expresión del gen *flbT* en una cepa carente del gen *ftcR* o del gen *flbT*, basta para restaurar la producción de flagelina. El mismo efecto se obtiene introduciendo en *trans* el gen *flbT* de *Sinorhizobium meliloti*. Este resultado sugiere que la función de FlbT como activador podría estar conservada entre organismos del orden Rhizobiales [11].

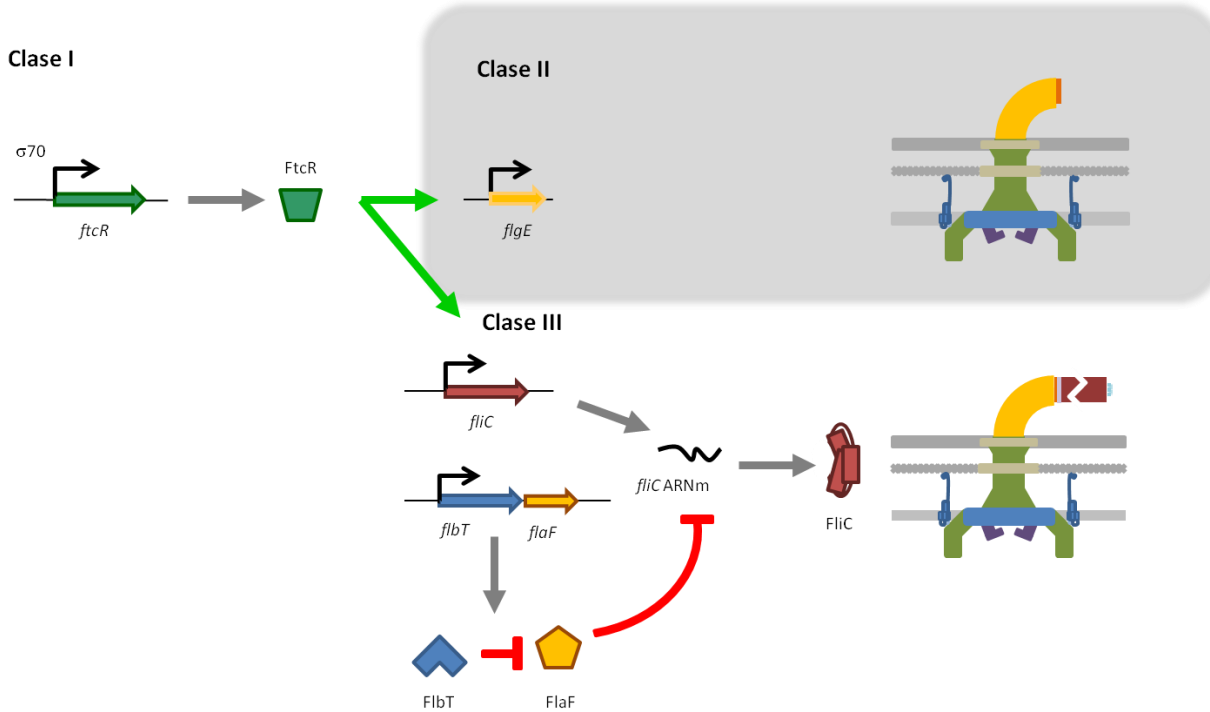


Figura 5. Esquema de la jerarquía flagelar de *B. melitensis*. El regulador maestro *ftcR* promueve la expresión de todos los genes estructurales. El único punto de control adicional hasta ahora descrito es la regulación postranscripcional de la flagelina. Se sabe que este punto de control involucra a FlaF y a FliB.

Los flagelos de *Rhodobacter sphaeroides*

Rhodobacter sphaeroides es una α -proteobacteria púrpura de vida libre y de gran diversidad metabólica. Es capaz de crecer en condiciones de fotoheterotrofia anaeróbica, fotoautotrofia anaeróbica y quimioheterotrofia aeróbica además poder de fijar nitrógeno atmosférico.

R. sphaeroides cuenta con dos sistemas flagelares [29]. El primero de ellos, denominado *fla1*, es de expresión común en condiciones de laboratorio y la expresión de los genes de este sistema da lugar a la síntesis un solo filamento de localización subpolar en el cuerpo celular [42]. Este sistema flagelar se encuentra bien caracterizado y por mucho tiempo se pensó el

único en *R. sphaeroides*. La secuenciación del genoma de *R. sphaeroides* reveló un segundo conjunto de genes flagelares [41], denominado *fla2*, que no habían sido previamente identificados mediante experimentos de mutación al azar que afectaran la motilidad de la bacteria. Se demostró que estos genes no eran producto de una duplicación de los del primer conjunto de genes flagelares y que podían ensamblar un flagelo funcional que era morfológicamente distinto al flagelo *fla1* [29]. Interesantemente, a diferencia de otros organismos con dos sistemas flagelares, este segundo sistema no parecía codificar flagelos ‘auxiliares’ sino para otro flagelo ‘principal’ que era funcionalmente redundante y mutuamente exclusivo con *fla1* (Fig. 6). Un análisis filogenético de varias de las proteínas estructurales de ambos sistemas reveló que el sistema *fla1* guardaba una mayor semejanza a los flagelos de las γ -proteobacterias y que el sistema *fla2* era más parecido a los flagelos de las α -proteobacterias [29]. Este resultado sugería que *fla2* era el sistema nativo de *R. sphaeroides* y que el sistema *fla1*, proveniente probablemente de una γ -proteobacteria, había sido adquirido por un evento de transferencia horizontal. La presencia de sistemas homólogos a *fla1* en otras tres especies de α -proteobacterias, que carecen de un segundo sistema, sugiere que el evento de transferencia no fue reciente [29].

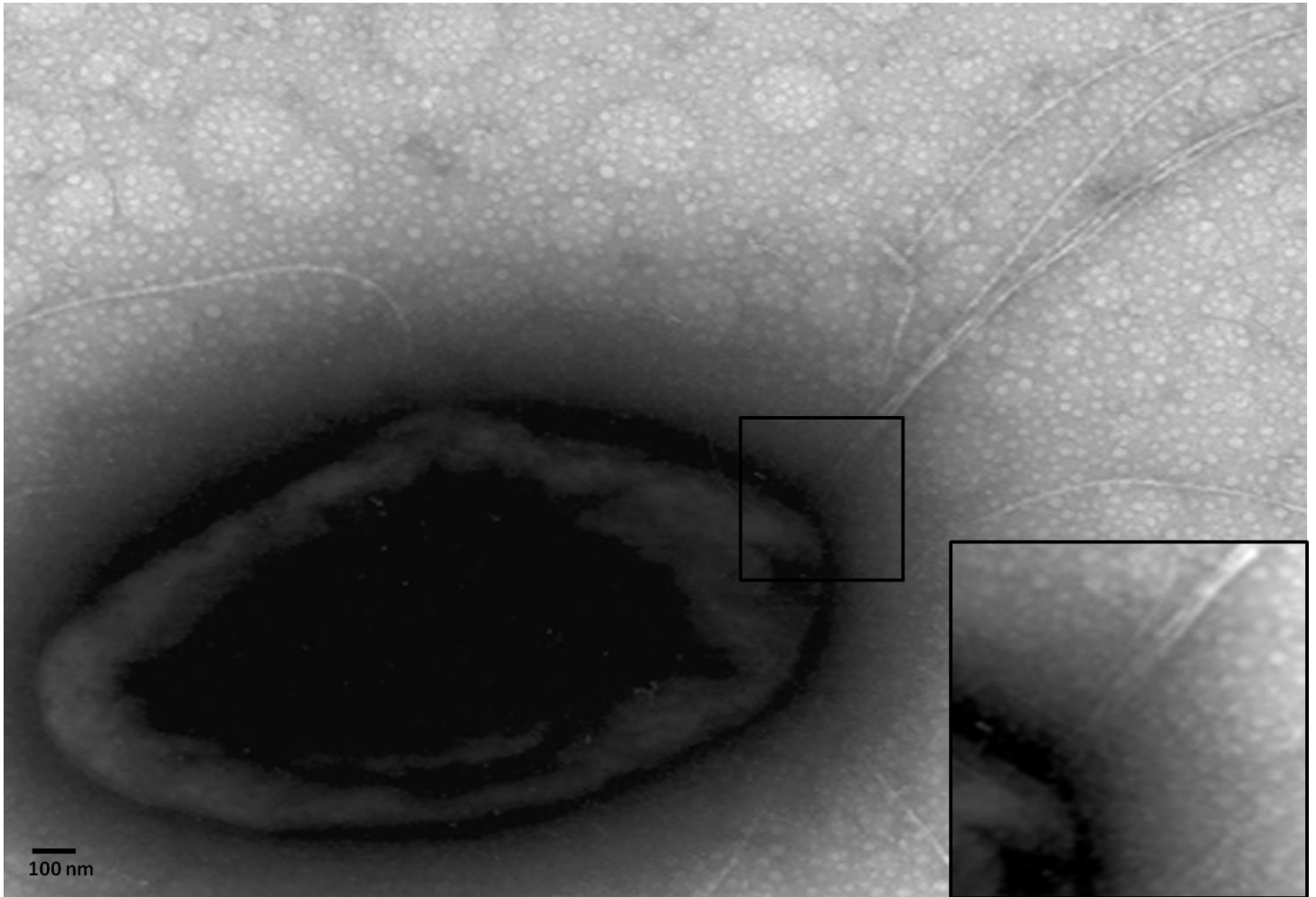


Figura 6. Micrografía electrónica de transmisión de una célula de la cepa AM1 de *R. sphaeroides* expresando el sistema flagelar 2. El recuadro muestra una ampliación de bases de los filamentos subpolares.

La jerarquía que regula la biogénesis flagelar del sistema *fla1* ha sido descrita previamente (Fig. 7) [30]. El regulador maestro del sistema es la proteína FleQ, una proteína cuya función es actuar como un activador especializado de la transcripción dependiente de $E\sigma$ -54. Un homohexámero de FleQ promueve la transcripción de los genes de clase II. Esta clase contiene a los genes *fliF* y *fleT*; éste último produce una segunda proteína activadora. Un heterodímero de hexámeros de FleQ y FleT dirige la transcripción dependiente de $E\sigma$ -54 de los genes de clase III. Esta clase

incluye al resto de los componentes estructurales del cuerpo basal y del gancho y los genes que codifican para las proteínas FliA y FlgM que operan un punto regulatorio de funcionamiento similar al ya descrito para los sistemas flagelares de *E. coli* y *S. enterica*. La última clase incluye a *fliC*, que es el gen de la flagelina del sistema *fla1*, al gen *fliS* y al gen *fliD* [30].

El primer aislamiento de una cepa de *R. sphaeroides* que permitía la expresión del sistema *fla2* se realizó bajo condiciones de fotoheterotrofia anaeróbica a partir de una cepa con una delección en el gen *flgC* [29]. En un trabajo posterior se observó que varias mutantes seleccionadas para expresar el sistema *fla2* mostraban una mutación en el gen *cckA*, en la región que correspondía al dominio de cinasa de histidinas del producto, y se comprobó que, al igual que en *C. crescentus*, la expresión del sistema *fla2* de *R. sphaeroides* era dependiente del sistema de dos componentes CckA-ChpT-CtrA. Adicionalmente, se encontró que la expresión de CckA es sensible a la presencia de ciertas fuentes de carbono [33]. Además de estos resultados, no hay más información sobre la regulación del sistema flagelar *fla2* de *R. sphaeroides*.

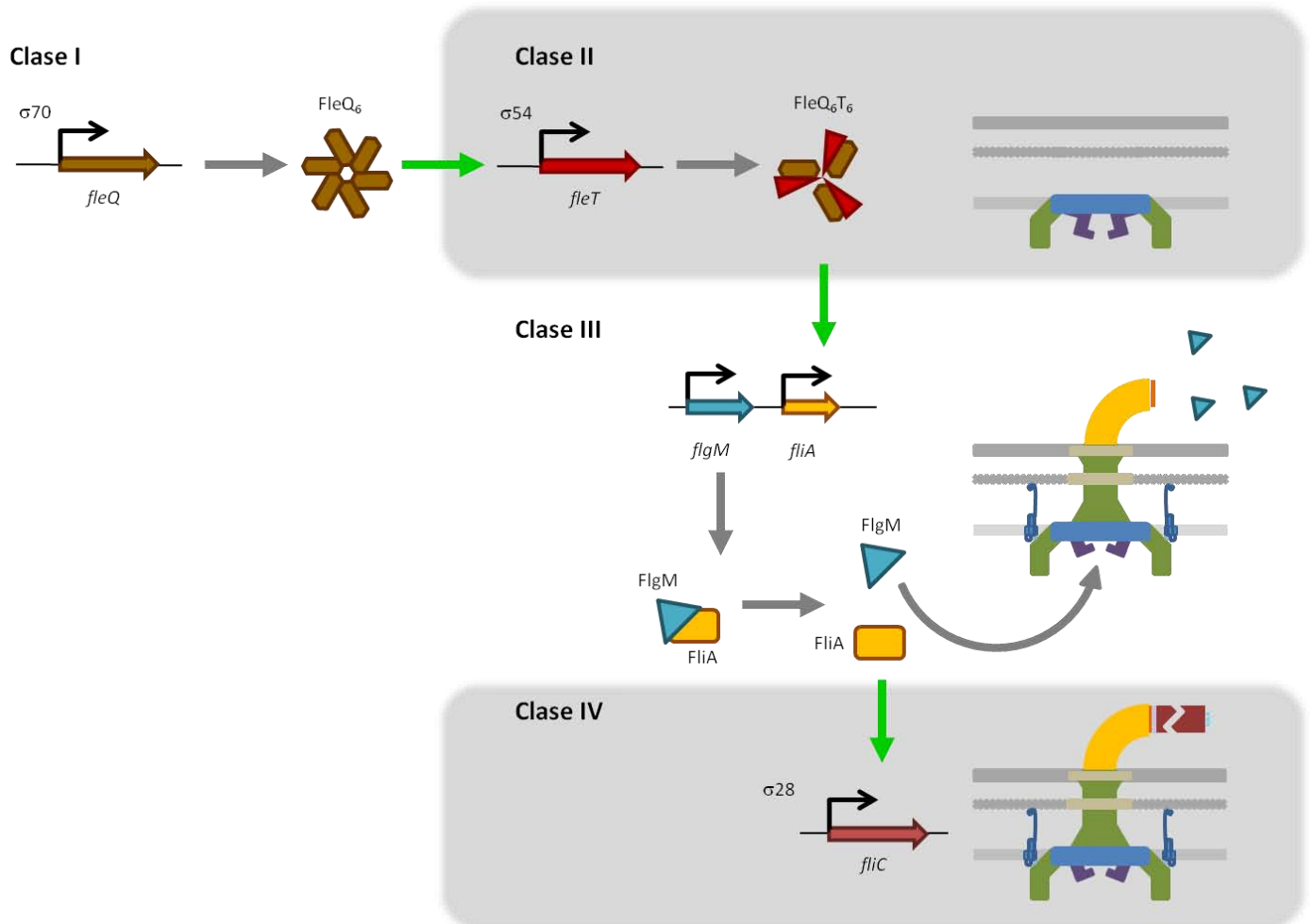


Figura 7. Esquema de la jerarquía de flagelar del sistema *fla1* de *R. sphaeroides*. El regulador maestro *fleQ* permite la expresión de algunos genes tempranos flagelares y de FleT, un segundo regulador con el que oligomeriza para transcribir el resto de los genes estructurales del gancho y del cuerpo basal. Un último punto de control que regula al filamento es operado por el factor sigma flagelar σ_{28} .

Planteamiento del problema

La regulación flagelar en α -proteobacterias es un campo poco explorado. En *R. sphaeroides*, una bacteria con dos sistemas flagelares, la regulación de la biogénesis del sistema flagelar nativo (*fla2*) no ha sido ampliamente estudiada. Este trabajo se plantea realizar una caracterización general de los mecanismos de control de la biogénesis flagelar presentes en el sistema flagelar *fla2* de *R. sphaeroides*.

A semejanza de lo observado en *C. crescentus*, *R. sphaeroides* cuenta con la proteína CtrA y ésta tiene un papel en la regulación de la expresión de los genes flagelares. Así mismo, cuenta con homólogos de los genes *flbT* y *flaF*. El mecanismo operado por estos reguladores está lejos de ser esclarecido y sorprendentemente existe al menos una especie de α -proteobacteria, *B. melitensis*, donde la función de los mismos parece estar invertida con respecto a lo observado en *C. crescentus*. Adicionalmente, en el sistema *fla2* de *R. sphaeroides* los genes *flaF* y *flbT* parecen formar un operón con un tercer marco de lectura abierto de función desconocida y sin homólogos en *C. crescentus* pero sí en *B. melitensis* (Fig. 8). Este marco de lectura, llamado *RSWS8N_19879*, podría codificar un nuevo regulador de la biogénesis flagelar.

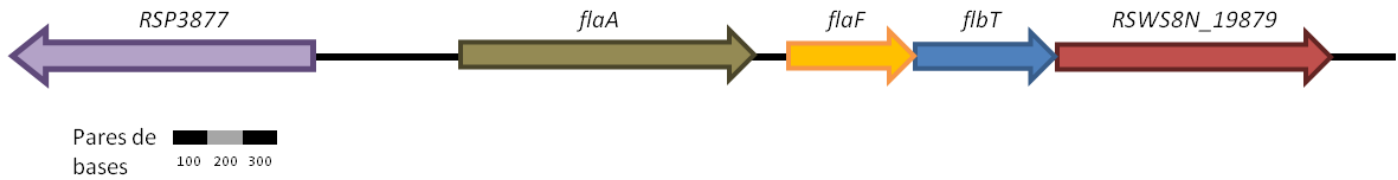


Figura 8. Esquema a escala del operón *flaF-flbT-RSWS8N_19879*

En vista de que el estado de ensamblaje de las estructuras flagelares tempranas regula la expresión de los genes flagelares tardíos en muchas de las especies bacterianas hasta ahora descritas, nos planteamos mutagenizar genes estructurales tempranos del sistema *fla2* y evaluar sus efectos sobre la transcripción y traducción de un gen tardío, específicamente del gen *flaA* que codifica para la flagelina del sistema *fla2*. Adicionalmente, nos planteamos el evaluar el papel de los genes *flbT* y *flaF* en *R. sphaeroides* así como explorar la posible función reguladora de *RSWS8N_19879* en la biogénesis flagelar.

Hipótesis

El gen *flaA* en *R. sphaeroides* se encuentra bajo regulación transcripcional y postranscripcional sensible al estado de ensamblaje del flagelo.

Objetivo General

Caracterizar los mecanismos que regulan la expresión del gen *flaA* del flagelo 2 de *R. sphaeroides*

Resultados

Expresión del gen *flaA* de en la cepa silvestre AM1 y en la cepas mutantes MG1 ($\Delta fliF2::aadA$) y MG2 ($\Delta flhA2::aadA$)

Para averiguar si la transcripción del gen *flaA* se encontraba regulada por la expresión de los genes flagelares tempranos, y presumiblemente por la formación de la estructura gancho- cuerpo basal, se decidió aislar dos cepas mutantes en las cuales se interrumpieron los genes *fliF2* (componente estructural del anillo MS) y *flhA2* (componente del aparato de exportación) con un casete de resistencia a antibiótico (Fig. 9A).

La cepa parental que se utilizó para el aislamiento de todas las cepas mutantes de este trabajo fue la cepa AM1 [25], ésta no puede expresar el flagelo 1 debido a una mutación en el gen *fleQ*; además, la cepa AM1 lleva una mutación puntual en el gen *cckA*, lo cual permite la expresión del flagelo 2, en condiciones anaeróbicas [33].

Se obtuvo la cepa MG1 ($\Delta fliF2::aadA$) sustituyendo el alelo silvestre *fliF2* de la cepa AM1 por uno interrumpido por un casete de resistencia a espectinomicina (*aadA*) (ver Material y Métodos). La cepa resultante mostró defectos de motilidad en ensayos de nado en agar suave (Fig. 9C). Además, la cantidad de flagelina sintetizada por esta cepa, evaluada por ensayos de Western blot, era también menor a la de la cepa parental (Fig. 9B). El fenotipo de nado de la cepa parental era recuperado en la cepa MG1 cuando se introducía en *trans* una copia silvestre del operón *fliFHNP2* (Fig. 9C), pero no cuando se introdujo un plásmido que solo incluía el gen

fliF2, sugiriendo que el casete de resistencia provocó un efecto polar sobre la expresión de los genes ubicados río abajo de *fliF2*.

Se obtuvo también la cepa mutante MG2 ($\Delta flhA2::aadA$) sustituyendo el alelo *flhA2* de la cepa AM1 por uno interrumpido con el casete *aadA*. La cepa resultante presentó defectos de motilidad en ensayos de nado en agar suave (Fig. 9D). La cantidad de flagelina sintetizada por esta cepa, evaluada por ensayos de Western blot, también fue menor a la de la cepa parental (Fig. 9B). El fenotipo de nado de la cepa parental fue recuperado en la cepa MG2 cuando se introdujo en *trans* una copia del alelo silvestre (Fig.9D).

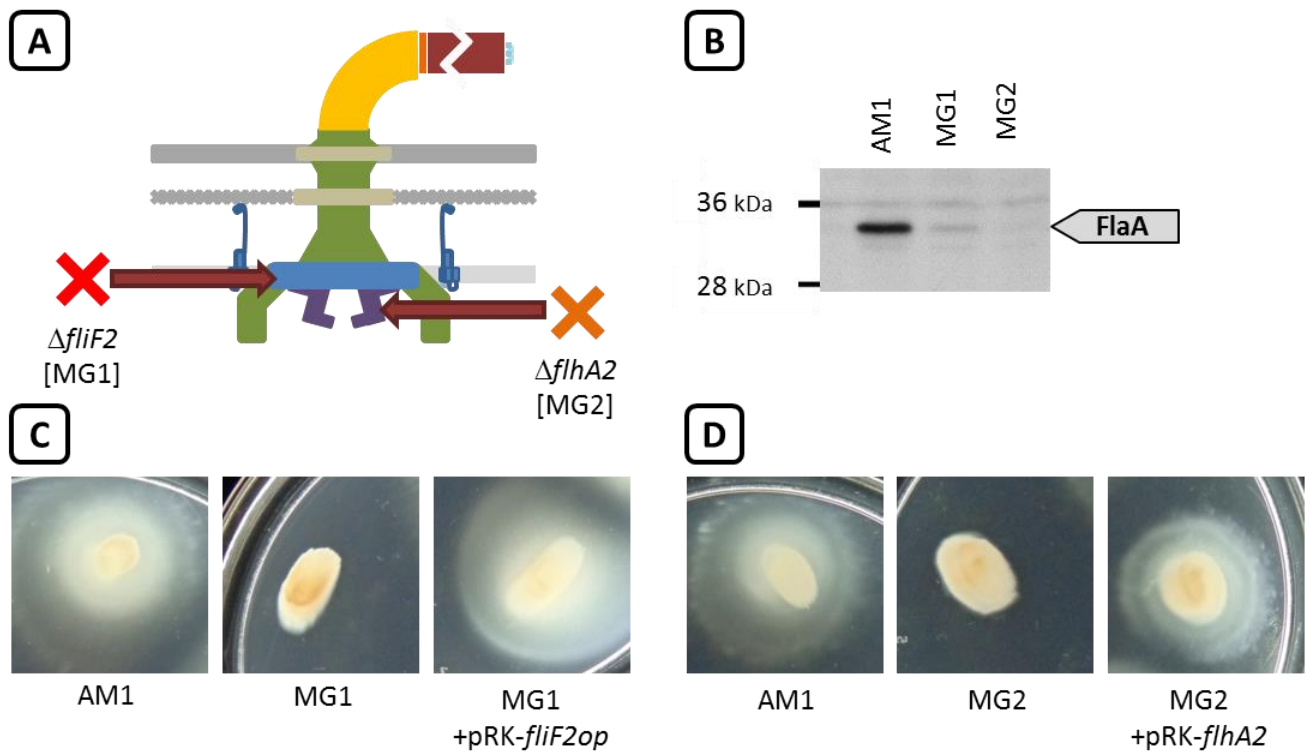


Figura 9. [A] Esquema del flagelo señalando las estructuras formadas por las proteínas codificadas por los genes *fliF2* y *flhA2*. [B] Western blot α -FlaA realizado con extractos totales de las cepas indicadas, las cuales fueron cultivadas en condiciones de expresión del flagelo 2 (en anaerobiosis y con 100 μ M succinato como fuente de carbono). [C] Halos de nado en cajas de agar suave de la cepa MG1, la cepa complementada y la cepa

parental. [D] Halos de nado en cajas de agar suave de la cepa MG2, la cepa complementada y la cepa parental.

Para cuantificar de forma indirecta la expresión del gen *flaA* (flagelina del flagelo 2), se construyó una fusión transcripcional entre el gen reportero *lacZ* y la región río arriba de *flaA*, que incluye su promotor nativo, en el plásmido pMP220 (Fig. 10) [39]. Esta construcción se introdujo a las cepas MG1 ($\Delta flIF2::aadA$) y MG2 ($\Delta flhA2::aadA$) para evaluar la actividad del promotor del gen *flaA* (*flaAp*). Como controles, la construcción se introdujo también en la cepa parental AM1 y en la cepa EA1 (*ctrA::aadA*), deficiente en la síntesis de la proteína CtrA [33].

Las cepas fueron crecidas en condiciones favorables para la expresión de los genes *fla2* y al evaluar la actividad del reportero, las cepas MG1 y MG2 se observó una actividad considerablemente menor que la detectada en la cepa parental (Fig. 10C). Este resultado sugiere que la transcripción del gen *flaA* se regula de forma negativa en ausencia de los componentes flagelares tempranos.

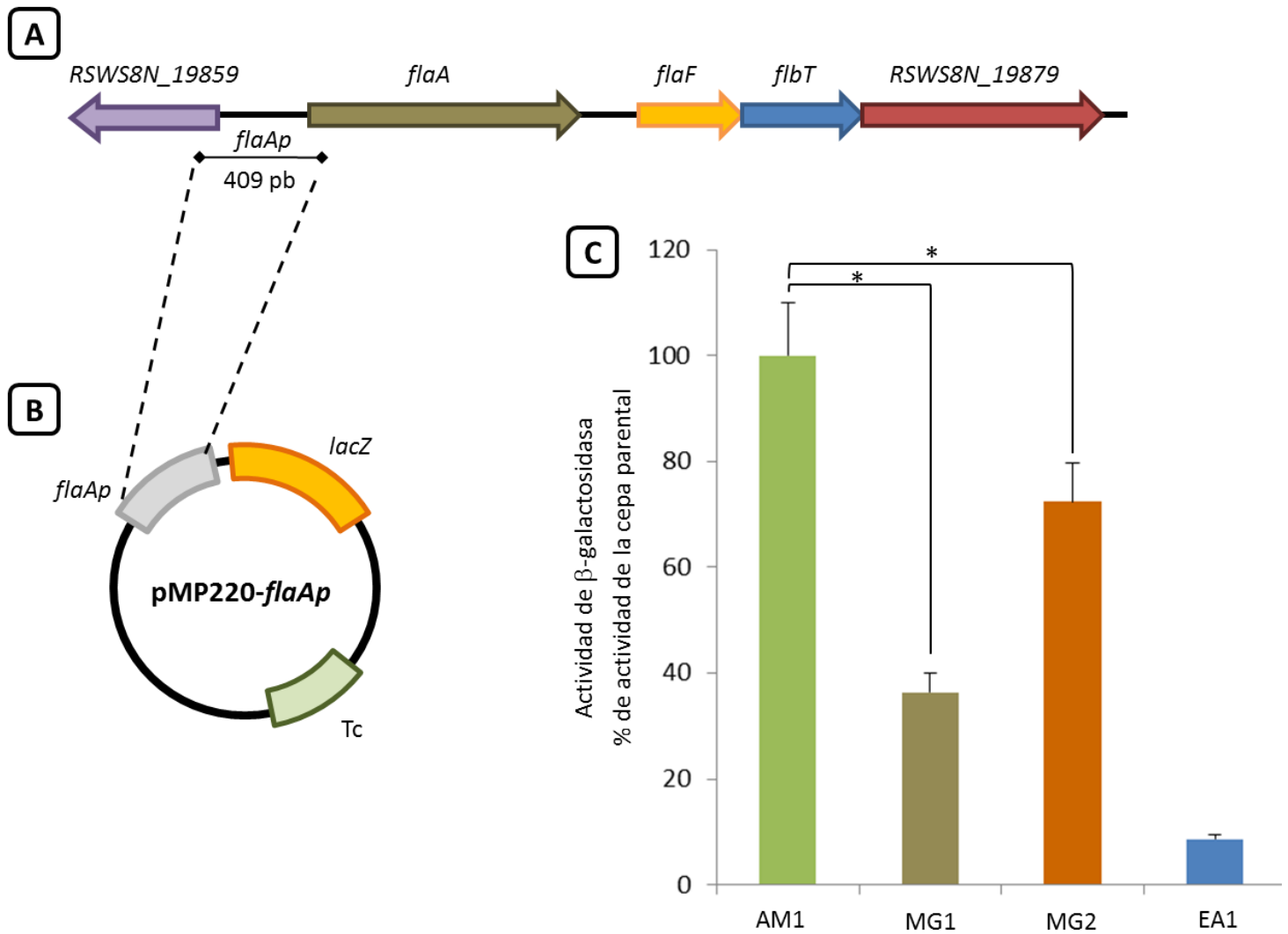


Figura 10. [A] Esquema del contexto genético del gen *flaA* señalando la región intercistrónica utilizada para la construcción de la fusión transcripcional *flaAp-lacZ*. [B] Esquema del plásmido reportero de la actividad transcripcional de *pflaA*. [C] Ensayos de actividad de β -galactosidasa realizados con extractos totales de las cepas indicadas cultivadas en condiciones de expresión del flagelo 2 (en anaerobiosis y con 100 μ M succinato como fuente de carbono). (*) Prueba t: $p < 0.05$. El valor promedio de la cepa parental fue de 1310 unidades Miller.

Mapeo del sitio de inicio de la transcripción del gen *flaA*

Para ubicar los posibles elementos reguladores en *cis* del gen *flaA* se realizaron ensayos de extensión del cebador para conocer el sitio de inicio de su transcripción. Dos ensayos independientes mostraron que el ácido ribonucleico (ARN) mensajero del gen *flaA* tiene una región 5' no traducida de 121 pares de bases (pb) de longitud (Fig. 11). El análisis de la secuencia mostró una zona rica en purinas a 8 pb de la metionina inicial, probablemente el sitio de unión a ribosoma. Adicionalmente, se encontró una adenina en la posición -10, y dos secuencias en las posiciones -132 y -35 que difieren únicamente en un nucleótido de la secuencia consenso reportada en *C. crescentus* para las cajas de reconocimiento de CtrA (Fig. 11).

Análisis de delección de la región 5' UTR del gen *flaA*

Para evaluar la presencia de elementos regulatorios en *cis* ubicados en la región 5' no traducida (5' UTR) del gen *flaA*, se construyó un segundo plásmido reportero de la actividad transcripcional del gen *flaA*. En este caso, se eliminaron 200 pb del extremo 5' que se ubica distal a la región codificadora de *flaA* (Fig. 12B) (el punto de inicio de esta construcción se indica con un asterisco en la secuencia nucleotídica de la Fig.11B).

Esta nueva construcción fue introducida a la cepa AM1 y la actividad de β -galactosidasa fue determinada en extractos totales obtenidos a partir de un cultivo crecido en condiciones que se sabe favorecen la expresión de los genes *fla2*, esto es, anaerobiosis y con succinato 100 μ M como fuente de carbono.

Como se observa en la Figura 12C, Se observó una notable reducción de la actividad promovida por el reportero que contenía la versión trunca de *flaAp* con respecto a la presentada por la construcción original. La actividad observada para el reportero con la versión trunca de *flaAp* era indistinguible de la observada en una cepa que contuviera únicamente el plásmido pMP220 carente de cualquier sección de la región promotora del gen *flaA* (Fig. 12C).

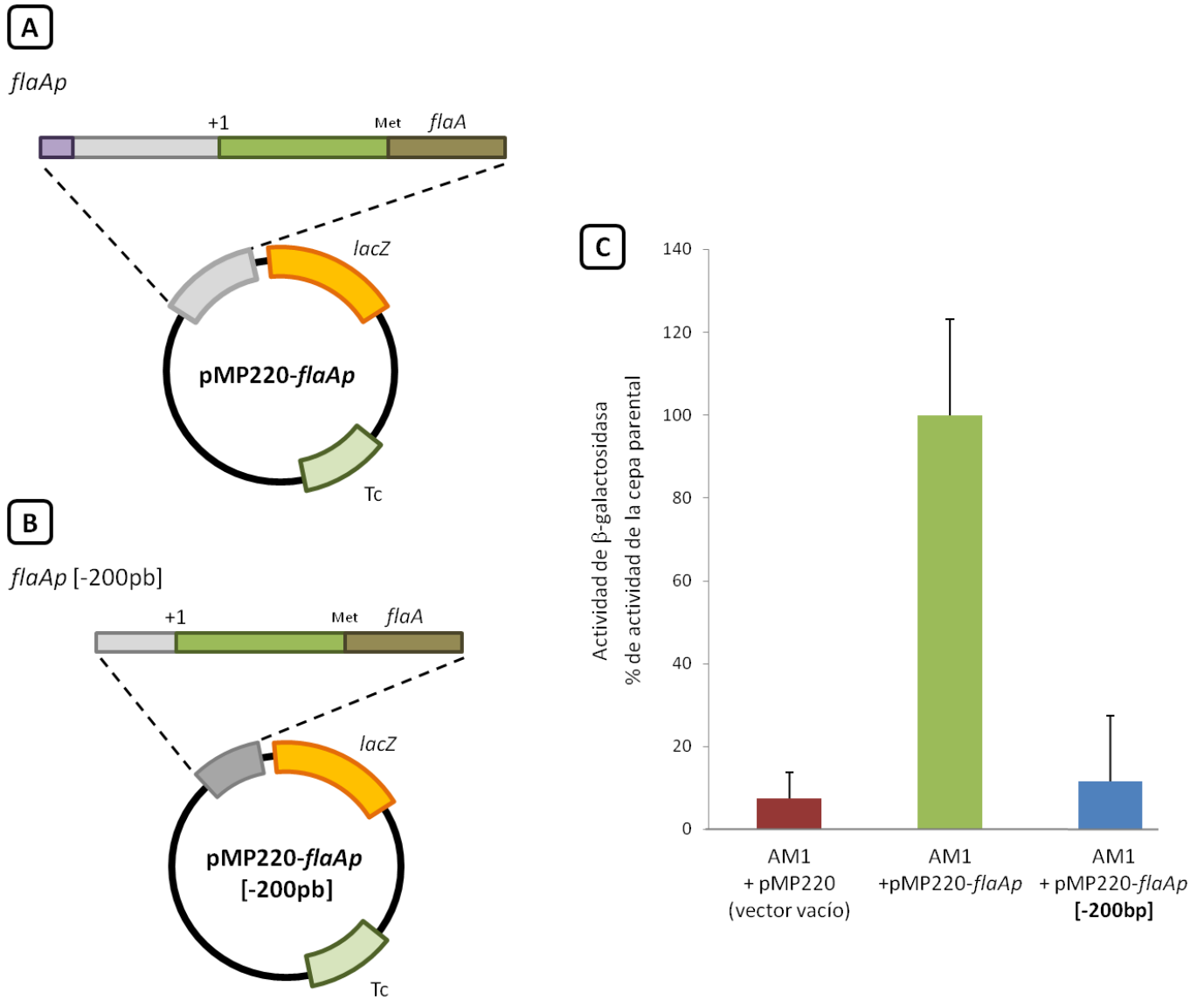


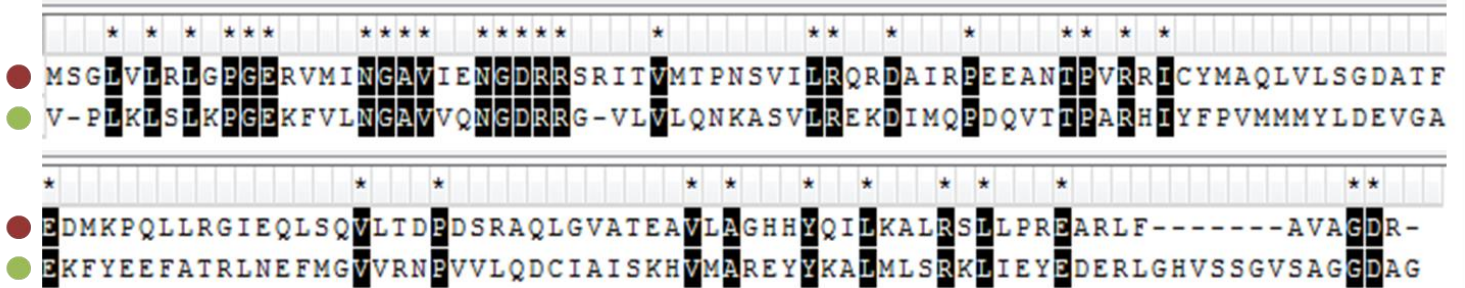
Figura 12. [A] Esquema del plásmido reportero de la actividad transcripcional de *flaA*. [B] Esquema del plásmido reportero de la actividad transcripcional de *flaA* que elimina doscientas pares de bases del extremo 5' distal a la zona codificadora de *flaA*. [C] Ensayos de actividad de β -galactosidasa realizados con extractos totales de las cepas indicadas cultivadas en condiciones de expresión del flagelo 2 (en anaerobiosis y con succinato 100 μ M como fuente de carbono).

Análisis bioinformático de los genes *flaF* y *flbT* de *Rhodobacter sphaeroides*

El mecanismo postranscripcional de regulación operado por FlbT y FlaF descrito en *C. crescentus* está basado en la estructura secundaria formada por 114 nucleótidos del extremo 5' del ARN mensajero de la flagelina. En el sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides*, la región 5' UTR de 121 pb de *flaA* tiene una longitud semejante con la reportada en los estudios de *C. crescentus*, por lo que se decidió evaluar el posible papel de los genes *flaF* y *flbT* en la regulación flagelar de *R. sphaeroides*. Como se mencionó en la introducción, en *B. melitensis* FlbT tiene un efecto sobre la expresión de flagelina opuesto al observado en *C. crescentus*. Como una aproximación simple para especular sobre la función de estos genes en *R. sphaeroides*, se realizó un alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas FlaF y FlbT de *R. sphaeroides* con sus homólogos en *C. crescentus* y *B. melitensis*. La proteína FlaF de *R. sphaeroides* guarda una identidad de 38% con su homóloga en *C. crescentus* y de 30% con la de *B. melitensis*. Por su parte, la proteína FlbT de *R. sphaeroides* tiene un porcentaje de identidad de 28% con su homóloga en *C. crescentus* y de 29% con la de *B. melitensis* (Fig. 13, 14).

A FlbT

● *R. sphaeroides* – ● *C. crescentus*



B FlbT

● *R. sphaeroides* – ● *B. melitensis*

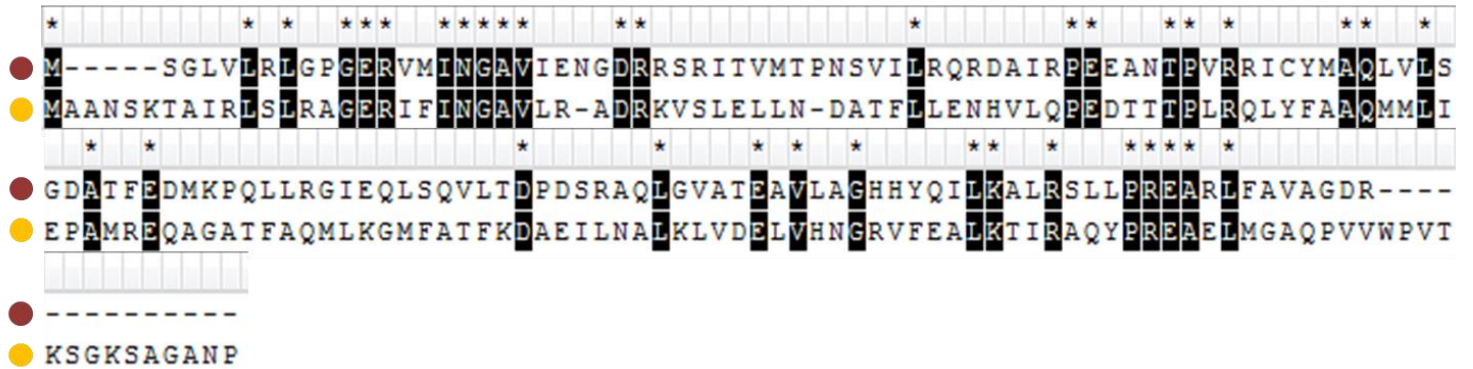


Figura 13. [A] Alineamiento realizado entre las secuencias de aminoácidos de FlbT de *R. sphaeroides* y de *C. crescentus*. [B] Alineamiento realizado entre las secuencias de aminoácidos de FlbT de *R. sphaeroides* y de *B. melitensis*

Aislamiento y caracterización de la cepa mutante MG3 ($\Delta flbT::Hygro$)

Para averiguar la posible función regulatoria del gen *flbT* sobre la síntesis de flagelina en *R. sphaeroides*, se aisló la cepa MG3, en la cual el alelo silvestre de *flbT* fue sustituido por una copia interrumpida con un casete no polar de resistencia a higromicina (Hygro) (Fig. 15A). La cepa resultante presentó defectos de motilidad en ensayos de nado en cajas de agar suave. Sin embargo, la capacidad de nado pudo ser recuperada al introducir en *trans* una copia del alelo silvestre de *flbT* (Fig. 15C).

Al evaluar la síntesis de flagelina a través de ensayos de Western blot, se observó que la cepa MG3 ($\Delta flbT::Hygro$) producía mucho menos flagelina que la cepa parental (Fig. 15B). Adicionalmente, al introducir en la cepa MG3 la construcción reportera de la actividad transcripcional del gen *flaA* se observó una reducción, de alrededor del 30%, con respecto a la actividad del mismo en la cepa parental (Fig. 15D). La importante reducción en la síntesis de flagelina observada en el Western blot en la cepa MG3 no refleja la modesta reducción en la actividad transcripcional del gen *flaA* (Fig. 15).

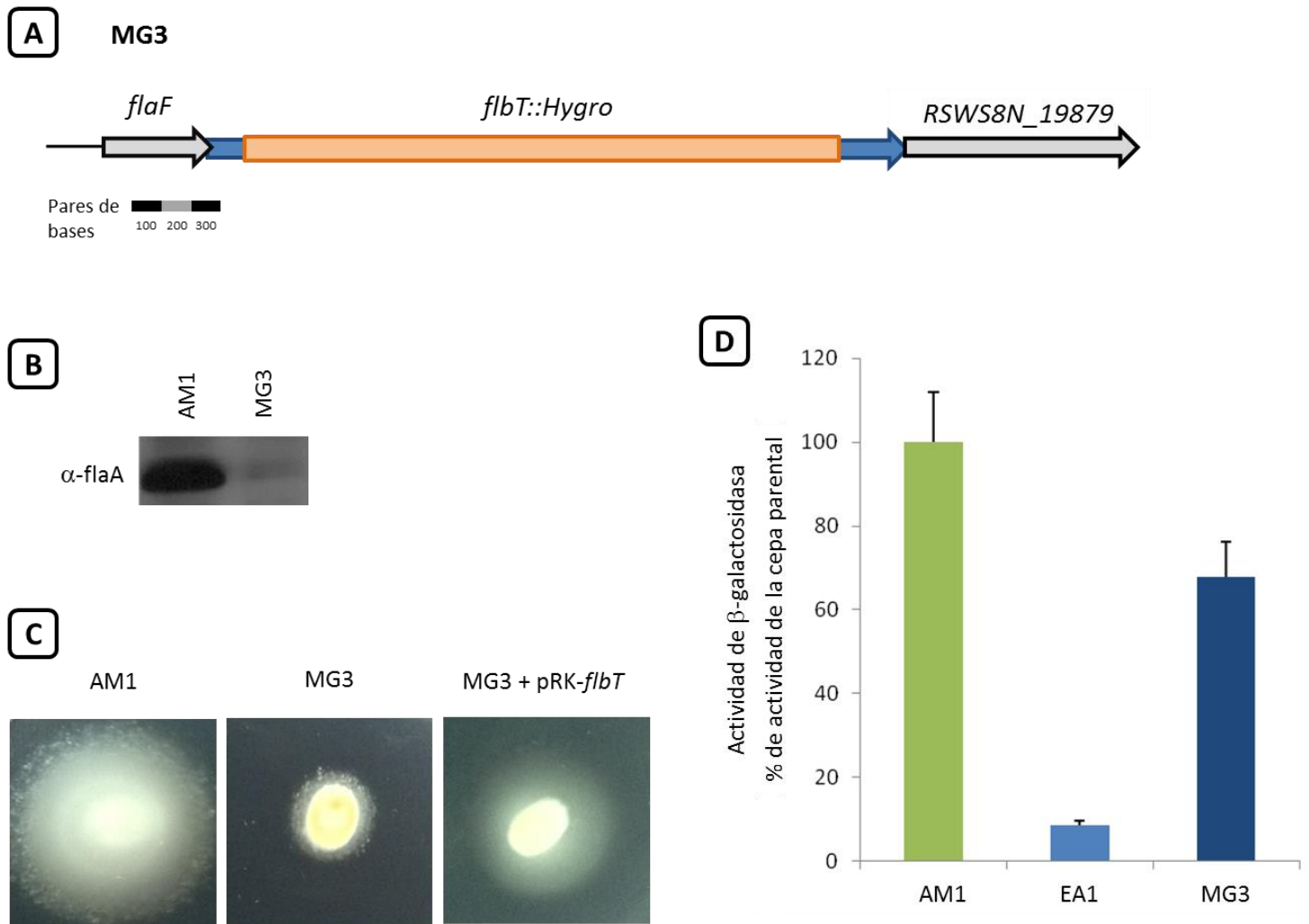


Figura 15. [A] Esquema del operón *flaF-flbT-RSWS8N_19879* en la cepa MG3 ($\Delta flbT::Hygro$) [B] Western blot α -FlaA realizado con extractos totales de las cepas indicadas cultivadas en condiciones de expresión del flagelo 2 (anaerobiosis y con 100 μ M de succinato como fuente de carbono). [C] Halos de nado en cajas de agar suave de la cepa MG3 ($\Delta flbT::Hygro$), su cepa complementada y la cepa parental. [D] Ensayos de actividad de β -galactosidasa realizados con extractos totales de las cepas indicadas cultivadas en condiciones de expresión del flagelo 2 (en anaerobiosis y con una fuente de carbono de succinato 100 μ M).

Al observar la cepa MG3 bajo el microscopio óptico se determinó que la gran mayoría de la población fue incapaz de desplazarse, sin embargo, unas cuantas células fueron capaces de nadar aunque a una velocidad mucho menor que la observada para las células móviles de la cepa

parental. Esto es consistente con lo observado en las cajas de nado donde la cepa MG3 forma un pequeño halo de nado, muy inferior al de la cepa AM1. Por otro lado, al observar algunas células de la cepa MG3 mediante microscopía electrónica de transmisión se detectaron únicamente células con ganchos ensamblados pero no filamentos (Fig. 16). La búsqueda de filamentos fue hecha sobre un número pequeño de campos y su ausencia puede ser resultado del sesgo inherente a una muestra demasiado pequeña.

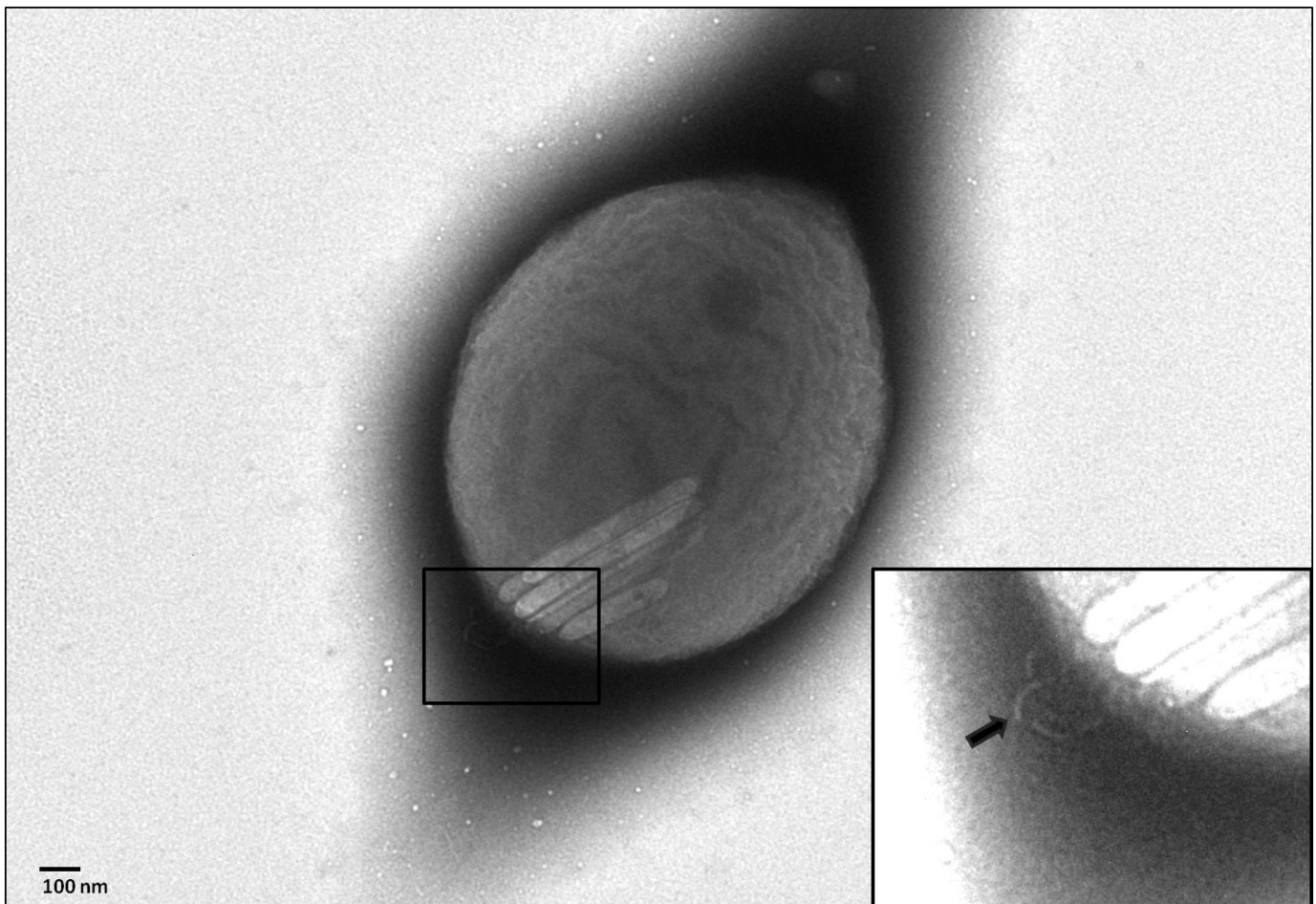


Figura 16. Micrografía electrónica de transmisión de una célula de la cepa MG3. El recuadro muestra una ampliación del área enmarcada. La flecha en el recuadro de detalle señala una de las estructuras identificadas como ganchos.

Aislamiento y caracterización de la cepa mutante MG4 ($\Delta flaF$)

Se aisló también una cepa con una mutación en el gen *flaF*. Para ello se sustituyó el alelo silvestre de *flaF* por una copia interrumpida con el casete *aadA*. La cepa obtenida presentaba defectos de motilidad en ensayos de nado en cajas de agar suave. No se ha tratado de rescatar el fenotipo silvestre de nado mediante la introducción en *trans* de un alelo silvestre. En ensayos de Western blot se observó una reducción en la síntesis de flagelina con respecto a la cepa parental (Fig. 17).

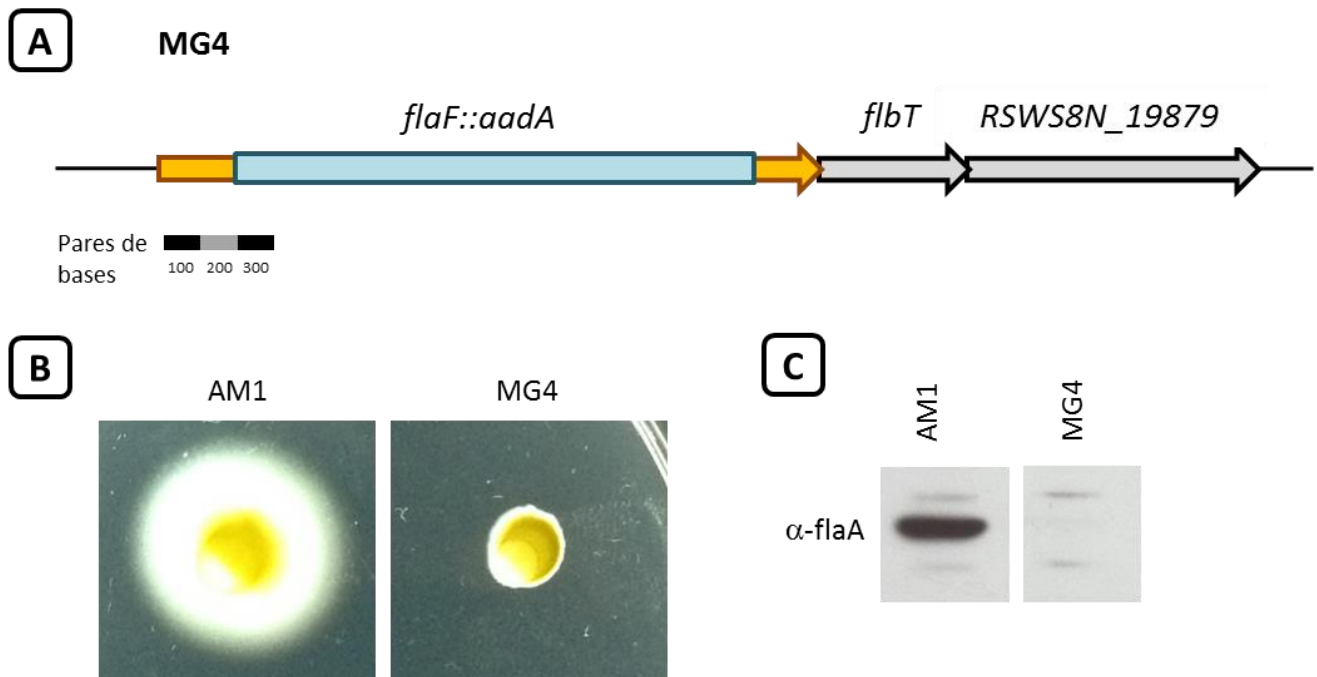


Figura 17. [A] Esquema del operón *flaF-flbT-RSWS8N_19879* en la cepa MG4 ($\Delta flaF::aadA$) [B] Halos de nado en cajas de agar suave de la cepa MG4 y la cepa parental. [C] Western blot α -FlaA realizado con extractos totales de las cepas indicadas cultivadas en condiciones de expresión del flagelo 2 (en anaerobiosis y utilizando 0.2% CAS aminoácidos como fuente de carbono).

Análisis bioinformático del marco de lectura abierto *RSWS8N_19879*

Como ya fue mencionado, junto a los genes *flaF* y *flbT*, en *R. sphaeroides* hay un tercer marco de lectura abierto, llamado *RSWS8N_19879*, que parece ser parte del mismo operón. Por este solo hecho es razonable suponer una posible función regulatoria del producto de *RSWS8N_19879* sobre la expresión del gen *flaA*. Un análisis de búsqueda de homólogos por arquitectura de dominios conservados (CDART) predijo que el marco de lectura *RSWS8N_19879* producía una proteína compuesta únicamente por dos repeticiones del dominio de función desconocida 1217 (DUF1217), este análisis reveló también que este dominio se encuentra presente en proteínas distribuidas entre varios órdenes de α -proteobacterias; dichas proteínas poseen de 1 a 12 repeticiones de este dominio. Análisis bioinformáticos posteriores sobre las proteínas que contenían el DUF1217 mostraron que hay un total de 175 especies, cuyo genoma completo ha sido publicado, en las cuales se encuentra presente. De estas, 120 pertenecen al orden Rhizobiales, 43 al orden Rhodobacterales y 12 al orden Rhodospirillales. Interesantemente, todas estas especies cuentan también con homólogos a *flbT* y *flaF*, mientras que no todas las especies que cuentan con homólogos a *flbT* y *flaF* cuentan con proteínas con el DUF1217, *C. crescentus* es un ejemplo de ésto último. Adicionalmente, de los genomas analizados, en todos los pertenecientes al orden Rhodobacterales las proteínas con el DUF1217 se encuentran en exactamente el mismo contexto genético que *RSWS8N_19879* en *R. sphaeroides*, no así en el orden Rhizobiales donde se encontraban entre varios contextos genéticos flagelares en la mayoría, pero no en todos los

casos. No parecía haber un contexto genético conservado entre las 12 especies analizadas del orden Rhodospirillales (Fig. 18).

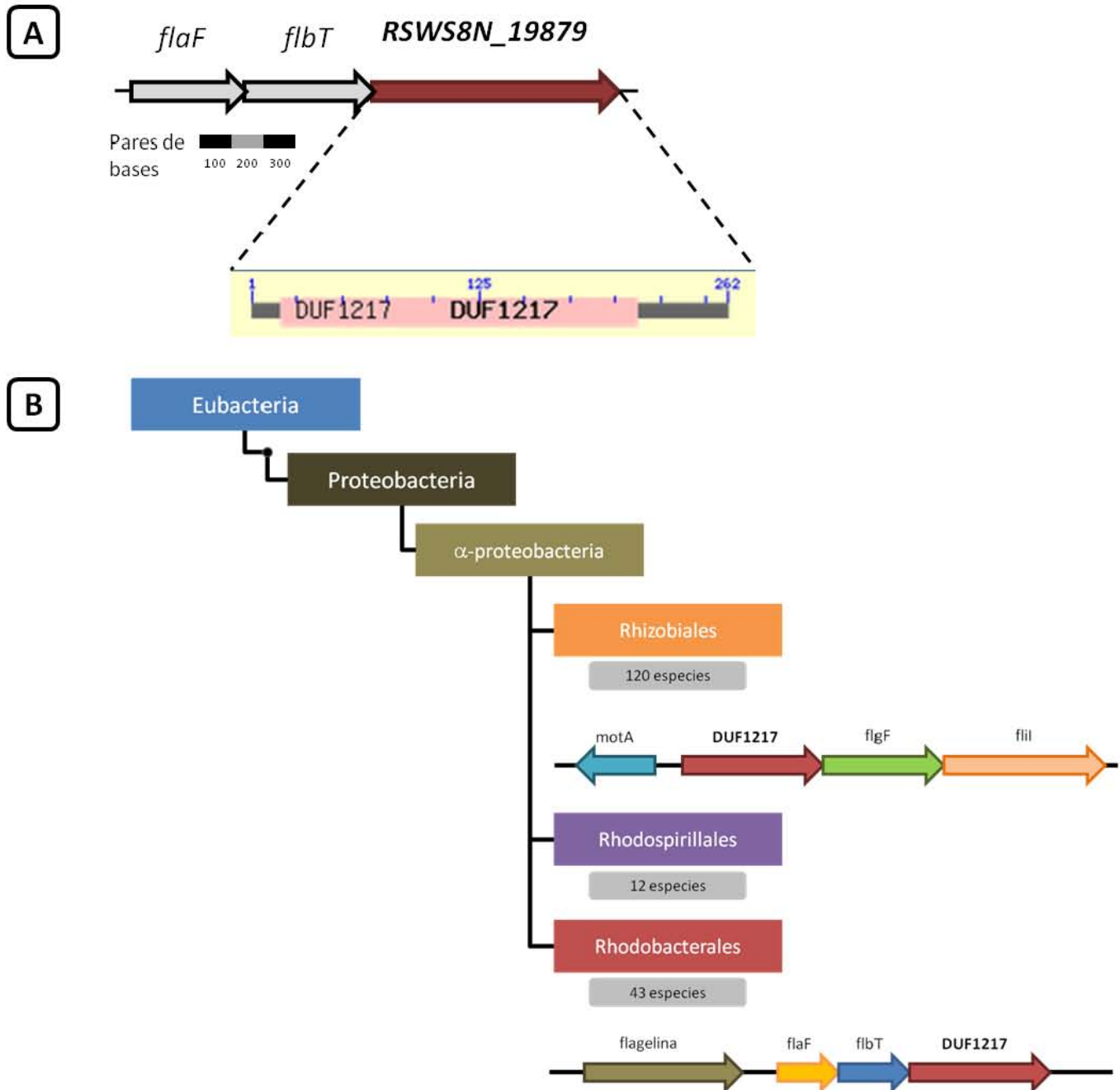


Figura 18. [A] Esquema del operón *flaF-flbT-RSWS8N_19879* con detalle de la composición de dominios conservados de *RSWS8N_19879* predicha por el algoritmo CDART [B] Distribución del DUF1217. Debajo del nombre de cada orden se indica el número de especies en las cuales se encontró al menos una proteína con al menos un DUF1217; se muestra también esquemas del contexto genético más común para tales proteínas.

Es relevante mencionar que *B. melitensis* también posee un gen cuyo producto predice contener el DUF1217 en un contexto genético flagelar. Este gen, llamado *BMEA_B0130* en la cepa ATCC 23457, forma presumiblemente un operón con los genes *flgF* y *flil*. La identidad entre las secuencias de aminoácidos de los genes *BMEA_B0130* de *B. melitensis* y *RSWS8N_19879* de *R. sphaeroides* es de 29% (Fig. 19A).

Adicionalmente, entre las Rhizobiales que poseen una proteína con el DUF1217 se encuentra la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* para la cual la estructura de la proteína, llamada *Atu0559*, que contiene el dominio ya ha sido determinada por cristalografía (Fig. 19B). Esta estructura no está asociada con ninguna publicación en revistas científicas indexadas y se encuentra disponible en el 'Protein Data Bank' (PDB) bajo el número de identificación de estructura 2O8S. La predicción de la estructura terciaria de las proteínas con el DUF1217 en *R. sphaeroides* y *B. melitensis* arroja modelos muy semejantes entre sí y al cristal de *Atu0559* (Fig. 19C, D).

A ● **RSWS8N_19879** (*R. Sphaeroides* WS8N) - ● **BMEA_B0130** (*B. melitensis* ATCC 23457)

```

* * * * *
● MSFQPVLP L TGYAGW R F LGR T M E R Q R D S H D Q S Q Q V Q R E V A M F A E K I D T V R T P E D L V S D Y R L L K V A L G A F G L G E A :
● M-----VDIMTSYRLIASNMTRSLQRVSKEPLVERETAVYKENIGNVKSVDLFMADTRLRFNYAMKAFGLIEDMI
* * * * *
● I N G K A L I R K V L N E G A A D K G A L A N R L S D K R N L A L A K A F D F G G A S G A G T G T A G F A D R I A G Q V R T Q S F E A A I G E V D A N L G L A L I
● A Y A K A F V R K I L T E S V I D E D A M A N K L I D K R Y K E F A I V F D F A S K G A Q A I Q S T A A Q Q G V I D K Y V R Q T L E K E A G S Q N E G V R L A L Y
* * * * *
● I L D R E M A T L A S D D M S E E A K W F S V L G S T S L R A V F D G A F G L P R E F A A L D L D R Q V E I Y Q D R I A R M F G S G S A S Q F A A E D K R E T L I
● Y F E R K A P S L I N -----A Y E I L G D K A L L T M V Q T T F G W P S T M S N A D I D K Q A K M I A D K I D -----F S K M S D P I Y V S K F I
* * * * *
● K T F L I R A D L G T M G P A P F G R I A L T L L G G -----
● S R F T A M H E M N N P T A S S P A S I A S F L L G G T S S I G I S M N I L A T L Q N F K P G G R

```

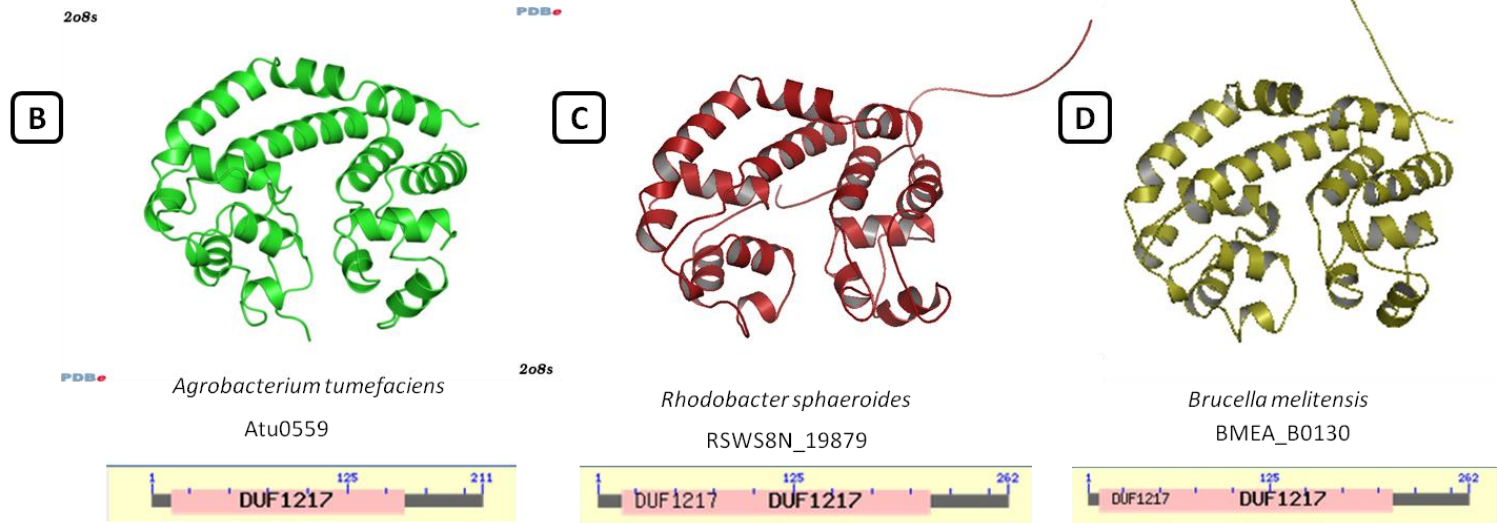


Figura 19. [A] Alineamiento realizado por BLAST de las secuencias de las proteínas RSWS8N_19879 de *R. sphaeroides* y BMEA_B0130 de *B. melitensis*. Ambos son los únicos marcos de lectura que contienen el DUF1217 en sus respectivas especies. [B] Estructura de la proteína Atu0559 de *A. tumefaciens* depositada en el PDB. [C] Predicción de la estructura terciaria de la proteína RSWS8N_19879 de *R. sphaeroides* por el servidor HHpred, modelado con PyMOL. [D] Predicción de la estructura terciaria de la proteína BMEA_B0130 de *B. melitensis* por el servidor HHpred, modelado con PyMOL.

Aislamiento y caracterización de la cepa mutante MG5 ($\Delta RSWS8N_{19879}$)

Se aisló la cepa con una mutación en el locus *RSWS8N_19879*, en ésta se sustituyó el alelo silvestre por una copia interrumpida con el casete *aadA*. La cepa resultante llamada MG5 mostró defectos de motilidad en ensayos de nado en cajas de agar suave (Fig. 20B). La cantidad de flagelina sintetizada detectada en ensayos de Western blot fue menor con respecto a lo detectado en la cepa parental. Sin embargo, al introducir la construcción reportera de la actividad transcripcional de *flaA* se observó que la cepa MG5 ($\Delta RSWS8N_{19879}::aadA$) presentaba una actividad estadísticamente indistinguible a la detectada para la cepa parental (Fig. 20). Al introducir la copia silvestre de *RSWS8N_19879* en la cepa mutante se observó una recuperación parcial de la capacidad del nado. La motilidad podía recuperarse a niveles semejantes a los observados para la cepa parental si se introducía en *trans* una región del operón que contiene tanto a *RSWS8N_19879* como a *flbT* (Fig. 20).

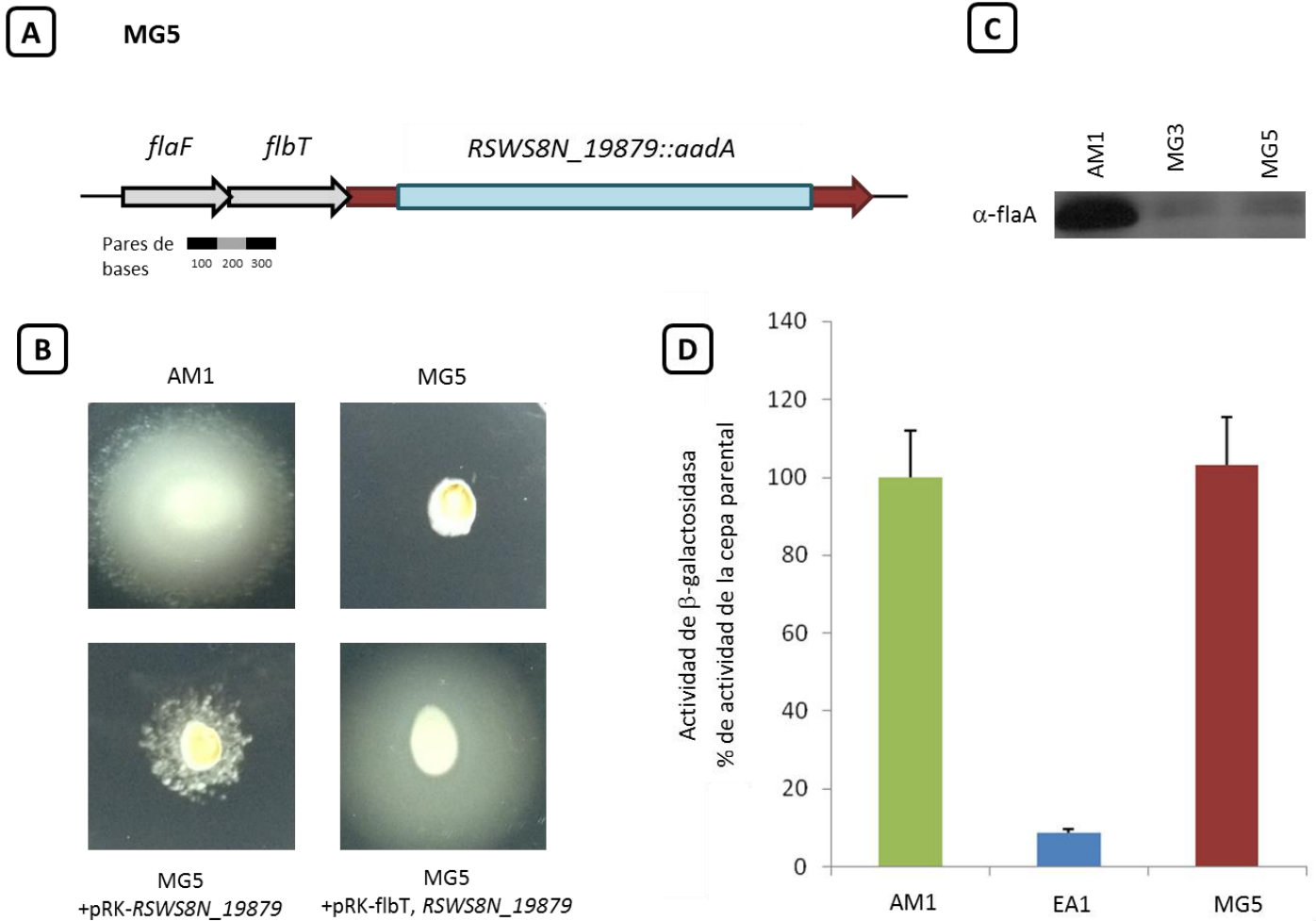


Figura 20. [A] Esquema del estado del operón *flaF-flbT-RSWS8N_19879* en la cepa MG5(Δ *RSWS8N_19879::aadA*) [B] Halos de nado en cajas de agar suave de la cepa MG5, la cepa parental, y las cepas complementadas únicamente con *RSWS8N_19879* o con *flbT* y *RSWS8N_19879*. [C] Western blot α -FlaA realizado con extractos totales de las cepas indicadas cultivadas en condiciones de expresión del flagelo 2 (anaerobiosis y 100 μ M de ácido succínico como fuente de carbono). [D] Ensayos de actividad de β -galactosidasa realizados con extractos totales de las cepas indicadas cultivadas en condiciones de expresión del flagelo 2 (anaerobiosis y 100 μ M de ácido succínico como fuente de carbono).

Al observar la cepa MG5 bajo el microscopio electrónico de transmisión se encontraron células que habían sintetizado únicamente el gancho pero no

el filamento (Fig. 21). Esta observación es consistente con el fenotipo de ausencia de nado observado para la cepa en las cajas de agar suave.

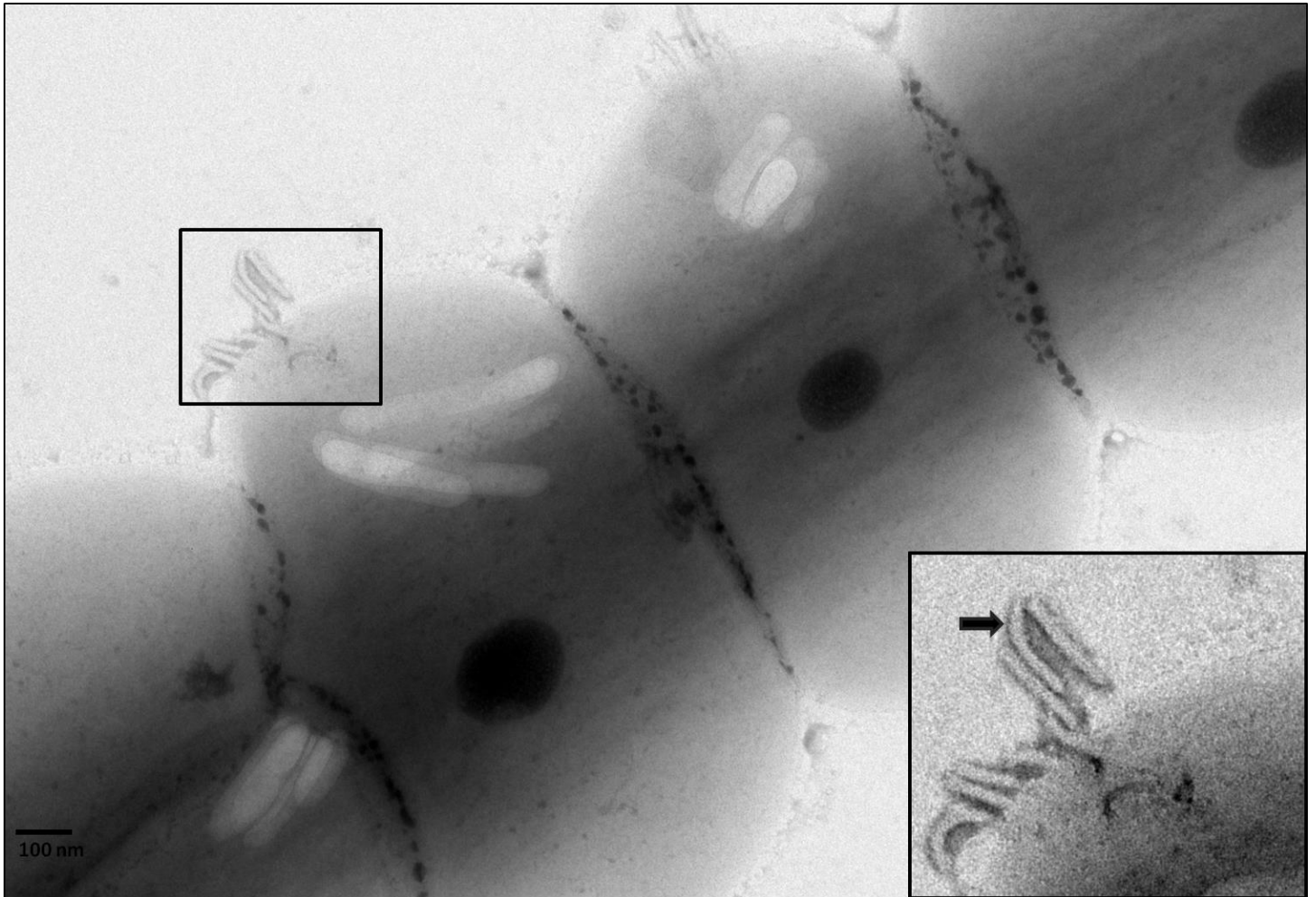


Figura 21. Micrografía electrónica de transmisión de varias células de la cepa MG5. El recuadro muestra una ampliación del área enmarcada. La flecha en el recuadro de detalle señala una de las estructuras identificadas como ganchos.

Aislamiento y caracterización de la cepa doble mutante MG6 ($\Delta flbT::Hygro$ $\Delta RSWS8N_{19879}::aadA$)

Para investigar una posible interacción de las funciones regulatorias sobre la síntesis de flagelina de los genes *RSWS8N_19879* y *flbT* se aisló una

cepa interrumpida en ambos genes, *RSWS8N_19879* con el casete *aadA* y *flbT* con el casete Hygro. La cepa resultante, MG6, fue incapaz de desplazarse en cajas de agar suave y la cantidad de flagelina detectada en ensayos de Western blot era menor a la de la cepa parental y similar a la presente en la mutante sencilla $\Delta RSWS8N_19879::aadA$ o $\Delta flbT::Hygro$. La deficiencia en motilidad de la cepa doble mutante MG6 pudo ser subsanada introduciendo en *trans* un fragmento del operón *flaF-flbT-RSWS8N_19879* que incluye la secuencia completa de los genes *flbT* y *RSWS8N_19879*. Al introducir a la cepa únicamente una copia del alelo *flbT* no se veía recuperación alguna de la capacidad de nado. No así cuando se introducía únicamente una copia del gen *RSWS8N_19879*, ya que en este caso, la cepa mostró un pequeño halo de nado semejante a lo observado en la mutante sencilla MG3 ($\Delta flbT::Hygro$) (Fig. 22).

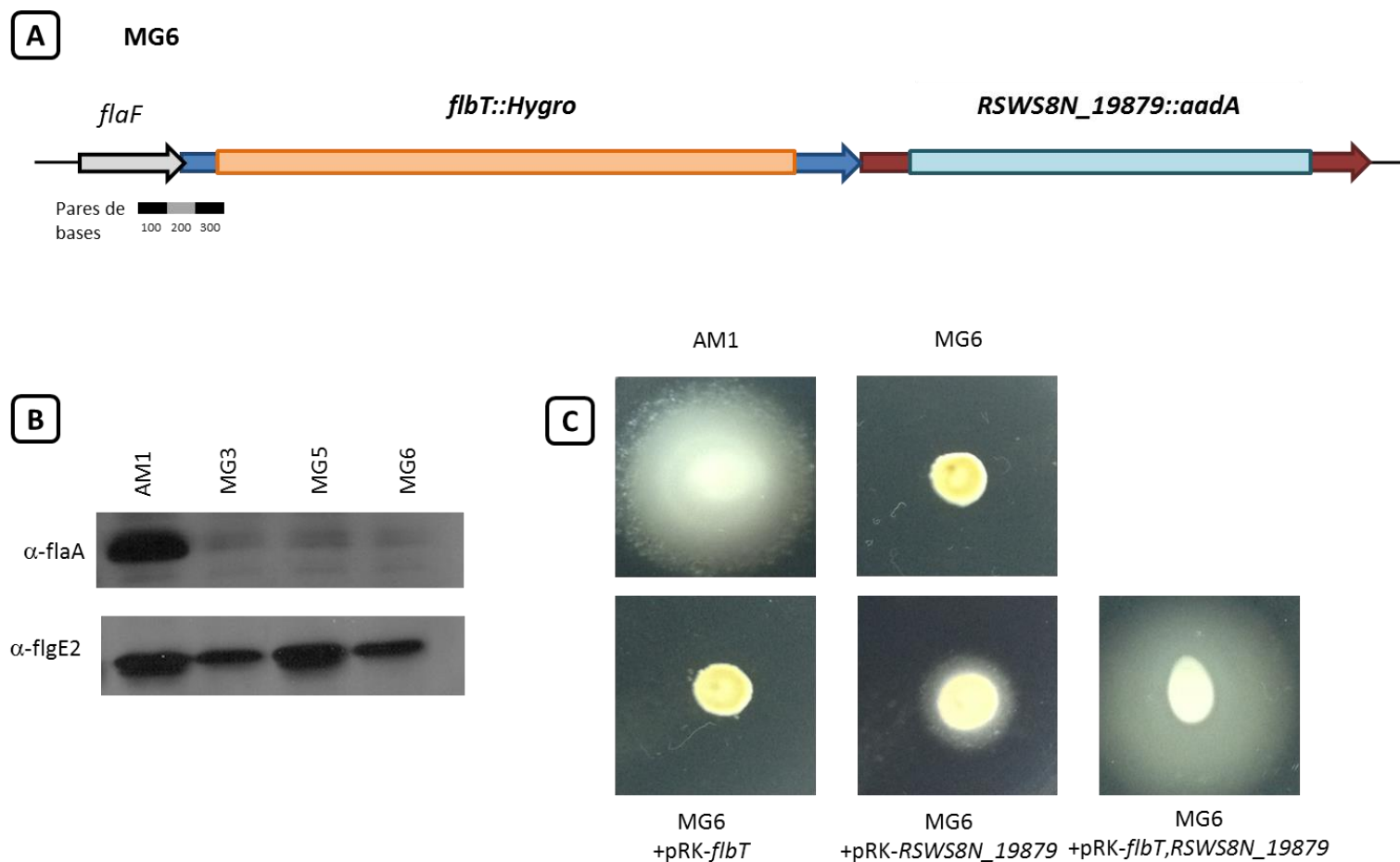


Figura 22. [A] Esquema del estado del operón *flaF,flbT,RSWS8N_19879* en la cepa MG6($\Delta flbT::Hygro\Delta RSWS8N_19879::aadA$) [B] Western blot α -FlaA realizado con extractos totales de las cepas indicadas cultivadas en condiciones de expresión del flagelo 2 (anaerobiosis y 100 μ M succinato como fuente de carbono). [C] Halos de nado en cajas de agar suave de la cepa MG6, la cepa silvestre, y las cepas complementadas únicamente con *RSWS8N_19879*, únicamente con *flbT* o con *flbT* y *RSWS8N_19879*.

Al observar la cepa MG6 bajo el microscopio electrónico de transmisión se encontraron células que habían sintetizado el gancho pero no el filamento (Fig. 23). Este fenotipo es semejante al observado en las respectivas micrografías electrónicas de las cepas $\Delta RSWS8N_19879::aadA$ y $\Delta flbT::Hygro$. Es notable como la síntesis de los componentes tempranos flagelares permanece prácticamente inalterada por la falta de FlaA.

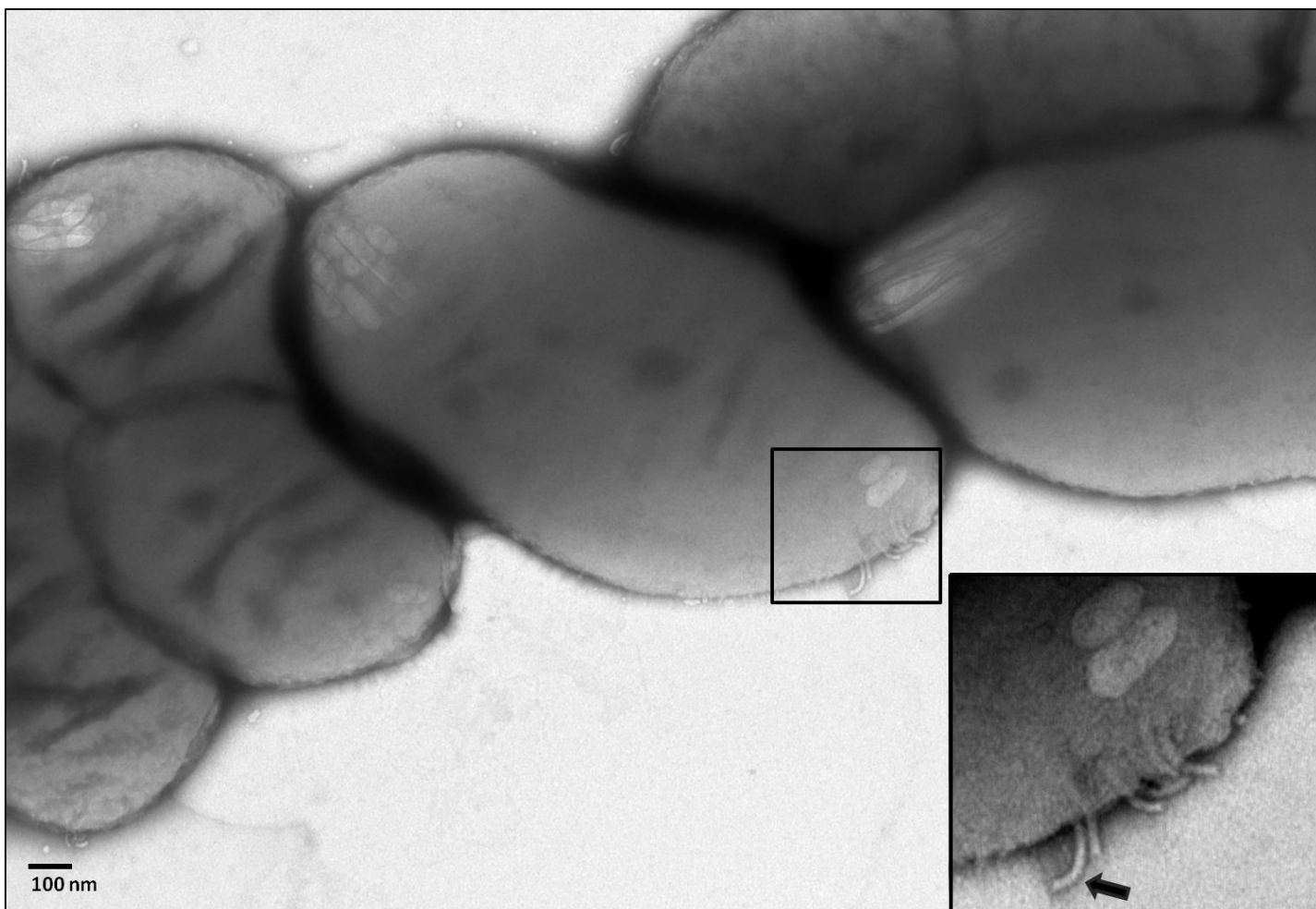


Figura 23. Micrografía electrónica de transmisión de varias células de la cepa MG6($\Delta fibT::Hygro\Delta RSWS8N_{19879}::aadA$). El recuadro muestra una ampliación del área enmarcada. La flecha en el recuadro de detalle señala una de las estructuras identificadas como ganchos.

Discusión

El gen *flaA* se encuentra bajo regulación transcripcional dependiente de la expresión de los genes flagelares tempranos

La disminución en la actividad del reportero transcripcional del gen *flaA* observada en las cepas MG1 ($\Delta fliF2$) y MG2 ($\Delta flhA$) sugiere que hay un nivel de regulación transcripcional presente en el sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides* que es dependiente de la presencia de elementos estructurales tempranos como el anillo MS o la integridad del aparato de exportación.

No obstante, las actividades del reportero transcripcional de *flaA* obtenidas en las cepas con mutaciones en los genes *fliF2*, *flhA*, *flbT* y *RSWS8N_19879* siempre fueron superiores a la observada para la cepa EA1 ($\Delta ctrA::aadA$), lo que sugiere que la expresión de *flaA* podría ser dependiente de *ctrA*. De esta forma, la transcripción de los genes flagelares tempranos y tardíos ocurriría de forma simultánea, pero en ausencia de FliF o FlhA, la expresión de *flaA* y/o la estabilidad de su mensajero se reduce de forma drástica. Esto implica la presencia de mecanismos regulatorios adicionales a CtrA que modulan la expresión del gen *flaA*.

Los ensayos realizados con el plásmido reportero de la actividad transcripcional de *flaAp* en el que se eliminaron 200 pb del extremo 5' distal al inicio de *flaA*, revelaron que hay elementos regulatorios en *cis* presentes en esa región. Los elementos presentes en esta zona tienen una función reguladora positiva, pues la ausencia de esta región resultó en la pérdida total de actividad específica de la construcción reportera. En esta zona, específicamente en la posición -132 con respecto al sitio de inicio

de la transcripción, se encuentra una secuencia similar a la caja de reconocimiento de CtrA. Es factible suponer que la eliminación de ésta en la construcción *flaAp[-200]-lacZ* haya provocado la pérdida de actividad del gen reportero.

El análisis de la región de control mostró la existencia de una segunda secuencia similar al sitio de reconocimiento para CtrA, la cual se ubica en la posición -35, sin embargo ésta última no parece ser funcional o suficiente para llevar a cabo la transcripción del gen reportero.

Además de la localización de una de estas cajas en la posición -35, no se identificaron más elementos putativos canónicos del promotor de *flaA* mediante simple análisis de la secuencia.

El ensayo de extensión del cebador reveló que el gen *flaA* tiene una región 5' no traducida de 121 pb, que es una longitud suficientemente extensa para postular la existencia de un mecanismo regulatorio postranscripcional mediado por la estructura secundaria del ARN mensajero tal y como ha sido propuesto para el gen *fljK* en *C. crescentus* [2].

El gen *flaA* se encuentra bajo regulación postranscripcional mediada por los productos de los genes *flbT*, *flaF* y *RSWS8N_19879*

Las mutantes MG3 ($\Delta flbT::Hygro$), MG4($\Delta flaF::aadA$), y MG5($\Delta RSWS8N_19879::aadA$) mostraron, todas, una deficiencia en el nado atribuible a una marcada reducción en la síntesis de flagelina. En el caso de las mutantes MG3 y MG5, en las cuales se introdujo el reportero de la

actividad transcripcional de *flaAp*, se pudo observar que tal reducción parecía ser operada postranscripcionalmente pues la actividad transcripcional del promotor *flaAp* fue indistinguible entre la cepa AM1 y la cepa MG5; mientras que entre la cepa AM1 y la cepa MG3 se observó una modesta reducción de aproximadamente 30%. Esta regulación postranscripcional, considerada junto con la longitud de la región 5' del gen *flaA*, es reminiscente del mecanismo descrito en *C. crescentus*, con la diferencia de que, al igual que en *B. melitensis*, en *R. sphaeroides*, FlbT parece tener una función activadora y no represora. Otra semejanza notable es que tanto *R. sphaeroides* como *B. melitensis* poseen proteínas con el dominio de función desconocida 1217. El DUF1217 se encuentra únicamente en proteínas presentes en especies de los órdenes Rhizobiales, Rhodobacterales, Rhodospirillales y generalmente se encuentra rodeado de otros genes flagelares. A pesar de que su estructura ya ha sido determinada previamente por cristalografía no hay ningún reporte previo de su función. Este trabajo es el primero en atribuirle una función específica en el control postranscripcional de la flagelina.

Por otro lado, la mutante MG4 (Δ *flaF::aadA*) también presenta defectos de motilidad y una notable reducción en la síntesis de flagelina. Esto es inusual pues tanto en *C. crescentus* y en *B. melitensis*, sólo uno de los elementos del par FlbT/FlaF actúa como promotor de la síntesis de flagelina, con el otro actuando como represor. En *R. sphaeroides* los resultados hasta ahora obtenidos podrían ser consistentes con un sistema de control en el que FlbT y FlaF, ambos, desempeñan un papel de regulación positiva Obedeciendo una dinámica distinta a la previamente reportada para las otras dos especies. Tampoco puede descartarse la

posibilidad de que el casete de resistencia en la mutante $\Delta flaF$ ejerza un efecto polar sobre los genes río abajo: *flbT* y *RSWS8N_19879*.

Los resultados obtenidos durante la introducción en *trans* en la cepa MG6 ($\Delta flbT::Hygro\Delta RSWS8N_19879::aadA$) de un plásmido conteniendo únicamente una copia de alguno de los genes interrumpidos mostraron que aparecía un pequeño halo de nado cuando se utilizaba *RSWS8N_19879* pero no cuando se introducía el gen *flbT*. Tal halo recuerda al observado en la mutante sencilla MG3, lo que podría indicar que el nado observado en ausencia de *flbT* es dependiente de la presencia de *RSWS8N_19879*. La actuación en paralelo de FlbT y *RSWS8N_19879* sobre el transcrito de *flaA*, ambos con una función reguladora positiva, explicaría lo observado. Alternativamente, podría ser posible que ambos genes actúen sobre una misma vía de regulación, a niveles distintos, con uno de los reguladores afectando sólo parcialmente la expresión de flagelina o siendo mutuamente dependientes de la presencia del otro para promover la síntesis de flagelina en grandes cantidades [Fig. 24].

Vale la pena mencionar que la recuperación de la capacidad de nado de la mutante sencilla MG5 ($\Delta RSWS8N_19879::aadA$) a niveles semejantes a los de la cepa AM1 sólo fue posible introduciendo un fragmento que contuviera a los genes *flbT* y *RSWS8N_19879*. Ya que en el genoma de *R. sphaeroides* el gen *RSWS8N_19879* se encuentra río abajo del gen *flbT* no es posible que la presencia de *flbT* en la complementación fuera necesaria por causa de un efecto polar de la interrupción de *RSWS8N_19879*. Sin embargo, es razonable suponer que la causa de este resultado puede

serla necesidad una expresión proporcional del producto de RSWS8N_19879 con respecto a FlbT. Esto apoyaría la idea de que FlbT y RSWS8N_19879 podrían estar acoplados traduccionalmente. No obstante queda por demostrar que el plásmido de complementación da lugar a la correcta expresión del producto de RSWS8N_19879.

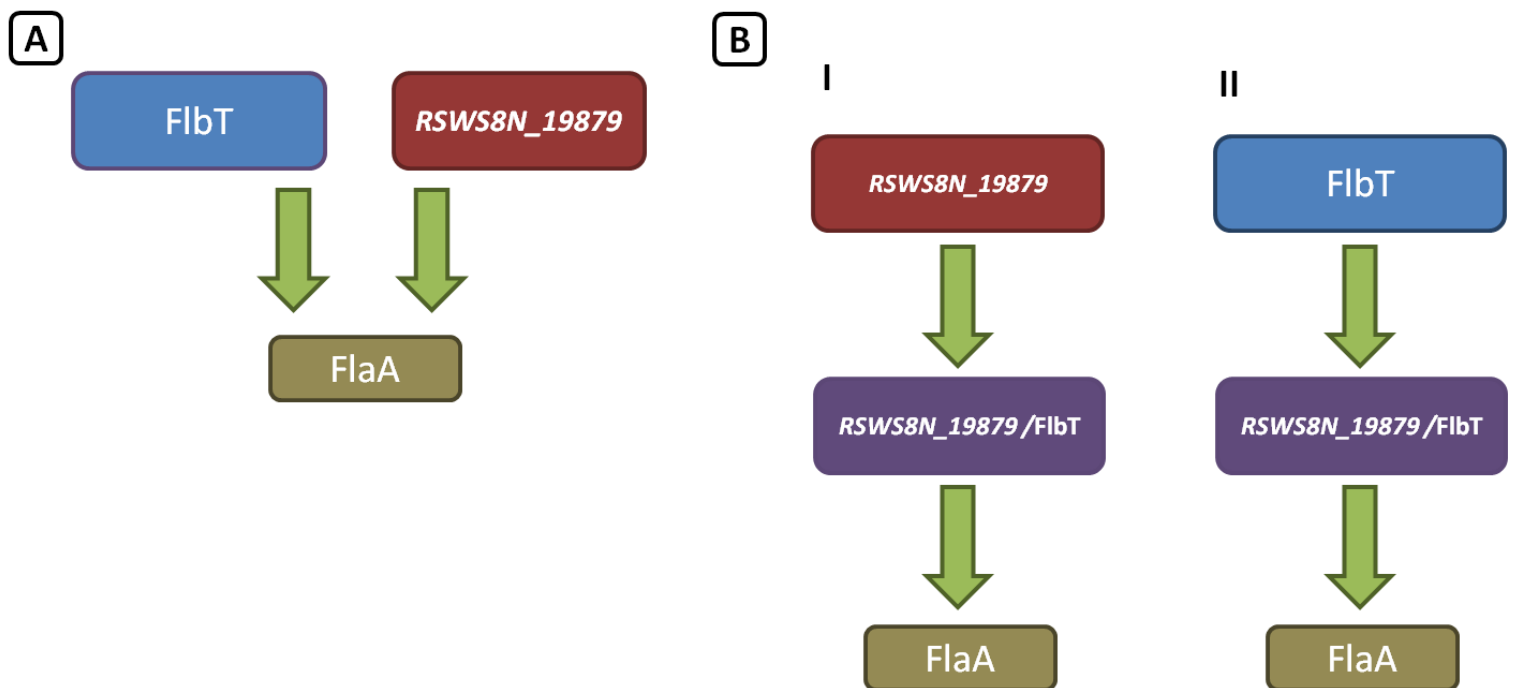


Figura 24. [A] Esquema de un sistema regulatorio de FlaA con una función paralela y entre FlbT y RSWS8N_19879. [B] Esquema de posibles sistemas reguladores de FlaA con una función en serie entre FlbT y RSWS8N_19879, formando una sola vía de regulación.

Perspectivas

Caracterización de los elementos reguladores de la transcripción del gen *flaA*

En este trabajo se identificó la presencia de un elemento regulador positivo ubicado en la región de -200 a -85 pb río arriba del inicio del mensajero de *flaA*. Una caracterización más detallada mediante mutagénesis dirigida es necesaria para revelar los elementos funcionales específicos y sus características tales como extensión y composición. Un enfoque similar podría utilizarse para evaluar la relevancia de las dos cajas similares a la secuencia consenso de reconocimiento de CtrA. Adicional al enfoque de mutagénesis, debería demostrarse el reconocimiento directo entre estas secuencias y la proteína CtrA mediante ensayos de entrecruzamiento o ensayos de protección a deoxiribonucleasas.

Evaluar la participación de la región 5' no traducida del gen *flaA* en la regulación postranscripcional del gen *flaA*

La región 5' no traducida del transcrito del gen *flaA* de *R. sphaeroides* podría estar sujeta a un mecanismo de regulación postranscripcional semejante al propuesto en *C. crescentus*. Emulando el trabajo realizado en *C. crescentus*, una primera aproximación podría consistir en la predicción de las estructuras de plegamiento de la secuencia 5' no traducida del gen *flaA*. Análisis de la localización relativa de la secuencia Shine-Dalgarno en las estructuras secundarias predichas de mayor estabilidad podría servir para identificar bases críticas para la formación de dichas estructuras. La

mutagénesis dirigida de tales bases, con miras a alterar localmente el plegamiento del mensajero, mostraría la importancia de tales estructuras para la regulación postranscripcional del gen *flaA*. Los efectos de las mutaciones podrían evaluarse utilizando un reportero traduccional del gen *flaA*.

Caracterizar detalladamente el papel de los genes *flbT*, *flaF* y *RSWS8N_19879* en la regulación postranscripcional del gen *flaA*

Se ha demostrado en *C. crescentus* que FlaF y FlbT forman parte de un solo punto de control postranscripcional de la flagelina. Los experimentos presentados en este trabajo demuestran que en *R. sphaeroides* los productos de los genes *flbT* y *flaF* también juegan un papel regulatorio y, al menos en el caso de *flbT*, que esta regulación parece ser postranscripcional y de función opuesta a la reportada en *C. crescentus*. Adicionalmente se identificó, en *R. sphaeroides*, al gen *RSWS8N_19879* como un nuevo participante en este mecanismo. Se determinó que este gen está distribuido en tres clados de α -proteobacterias, lo cual hace que su función pueda ser similar en un número importante de bacterias. Dado que la función bioquímica de ninguno de estos reguladores ha sido esclarecida, cobra especial relevancia el investigar la existencia de interacciones directas entre FlaF, FlbT y *RSWS8N_19879* que podrían ser evaluadas mediante ensayos de doble híbrido en *Saccharomyces cerevisiae* o *E. coli*. El uso de un sistema de sobreexpresión para obtener las tres proteínas purificadas de permitiría la obtención de anticuerpos; mismos que permitirían evaluar las interacciones proteína-proteína mediante ensayos de

co-precipitación, de entrecruzamiento o de Far Western blot. Realizar ensayos de retardo junto con el mensajero del gen *flaA*, revelaría si alguna de estas proteínas es responsable de la interacción directa con el ARN.

Por otro lado, la medición de los niveles de ARN mensajero del gen *flaA* en las cepas $\Delta flaF$, $\Delta flbT$, $\Delta RSWS8N_{19879}$ mediante Northern blot utilizando ensayos cuantitativos de las reacciones acopladas de transcriptasa reversa y amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (qRT-PCR), nos permitiría evaluar directamente el mensajero de *flaA*, y se averiguaría así si es mediante la alteración de la vida media del mensajero del gen *flaA* que los reguladores ejercen su efecto.

Finalmente, es de gran relevancia determinar si el casete de resistencia utilizado en la cepa $\Delta flaF$ tiene un efecto polar sobre los genes *flbT* y *RSWS8N_{19879}*. Esto permitiría esclarecer si los elementos de regulación postranscripcional de la flagelina en *R. sphaeroides* son funcionalmente distintos a los hasta ahora reportados en otras especies de α -proteobacterias.

Materiales y Métodos

Medios

Medio Luria-Bertani (LB) [43]

Preparado con 1% (p/v) de bacto triptona, 1% (p/v) de cloruro de sodio y 0.5% (p/v) de extracto de levadura disueltos en agua bidestilada. Esterilizado en autoclave.

Para la preparación de medio sólido se añadió 1.5% (p/v) de bactoagar.

Para los protocolos de mutagénesis mediante plásmido suicida las cajas se adicionaron con 5% (p/v) de sacarosa.

Medio Mínimo de Sistro (SIS) [44]

Contiene 34 mM de ácido succínico, 0.67 mM de ácido glutámico, 0.25 mM de ácido aspártico, 8.5 mM de cloruro de sodio, 20 mM de fosfato dibásico de potasio, 3.78 mM de sulfato de amonio, 1.04 mM de ácido nitriloacético, 1.2 mM de sulfato de magnesio, 0.23 mM de cloruro de calcio, 7 μ M de sulfato ferroso, 0.16 mM de molibdato de amonio y 0.1 mL/L de solución madre de elementos traza, el pH era ajustado a 7.0 con hidróxido de potasio. Esterilizado en autoclave. Al medio esterilizado y templado se le adicionó 0.1 mL/L de solución madre de vitaminas. Para la preparación de medio sólido se añadió 1.5% (p/v) de bactoagar. Para la preparación de agar suave para ensayos de nado (medio de nado) se añadió 0.22% (p/v) de bactoagar

Solución Madre de Elementos Traza

Contiene 4.7 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 38 mM de sulfato de zinc, 18 mM de sulfato ferroso, 9 mM de sulfato de manganeso, 1.5 mM de sulfato cúprico y 1.8 mM de ácido bórico disueltos en agua bidestilada.

Solución Madre de Vitaminas

Preparada con 1% (p/v) de ácido nicotínico, 0.5% (p/v) de tiamina y 0.01% de biotina disueltos en agua bidestilada.

Medio 100 μ M

Idéntico al medio SIS con la salvedad de que durante su preparación se establecía la concentración final de ácido succínico en 100 μ M en vez de 34mM.

Medio CAS

Idéntico al medio SIS con la salvedad de que carece de ácido succínico y en vez se le adiciona una solución de CAS aminoácidos hasta una concentración final de 0.2% (v/v)

Solución de CAS aminoácidos

Preparada con 10% (p/v) de CAS aminoácidos (Gibco) en agua bidestilada. Esterilizado en autoclave. Los CAS aminoácidos son el liofilizado del resultante de la hidrólisis ácida de la caseína.

Condiciones de crecimiento

Cepas de *Escherichia coli*

Se crecieron a 37°C en oscuridad. En caso de usar medio líquido, los cultivos se inoculaban en tubos de ensayo y se sometían a una agitación constante de 200 rpm.

Cepas de *Rhodobacter sphaeroides*

Condiciones de quimioheterotrofia aeróbica

Se crecieron a 30°C en oscuridad. En caso de usar medio líquido, los cultivos se inoculaban en tubos de ensayo y se sometían a una agitación constante de 200 rpm.

Condiciones de fotoheterotrofia anaeróbica

Se crecieron a una temperatura de 29°C en presencia de luz artificial a aproximadamente 20 cm de 2 o 3 focos de 80 W cada uno. Los cultivos líquidos se inoculaban en viales de 4.8 mL de capacidad que se llenaban hasta el tope con medio y se sellaban con una tira de película plástica de parafina marca 'Parafilm'. Los cultivos en medio sólido o en medio de nado se inoculaban en cajas de Petri que eran después introducidas en el contenedor del sistema de cultivo anaeróbico Gas Pak™ e incubadas a 29°C en presencia de luz artificial a aproximadamente 20 cm de 2 o 3 focos de 80 W cada uno.

Sistema GasPak™ de Becton, Dickinson y Compañía (BD)

Consiste en un cilindro de policarbonato con capacidad para 15 cajas Petri que puede ser sellado herméticamente. Junto con las cajas inoculadas a incubar se introduce en el cilindro una bolsa GasPak™ antes de sellarlo. La bolsa GasPak™ contiene carbonato inorgánico, carbón activado, ácido ascórbico y agua. En presencia de un catalizador adecuado, el carbonato, el ácido ascórbico y el agua reaccionan con el oxígeno atmosférico para producir hidrógeno molecular, dióxido de carbono, citrato de sodio y agua. El sistema está diseñado para dejar una atmósfera completamente anaeróbica y con aproximadamente 10% de dióxido de carbono.

En casos pertinentes los medios de cultivo se adicionaron con los siguientes antibióticos a las concentraciones especificadas.

Antibióticos

	Para <i>Escherichiacoli</i>	Para <i>Rhodobactersphaeroides</i>
Kanamicina	50µg/mL	25 µg/mL
Espectinomicina	50 µg/mL	50 µg/mL
Tetraciclina	10 µg/mL	1 µg/mL
Ampicilina	100 µg/mL	-
Higromicina		
Medio sólido	200 µg/mL	200 µg/mL
Medio líquido	40 µg/mL	40 µg/mL
Gentamicina	30 µg/mL	30 µg/mL
Ácido Nalidíxico	-	25 µg/mL

Cepas y plásmidos

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron las cepas y plásmidos especificados en las siguientes tablas:

Cepas utilizadas

Escherichia coli

TOP10	Cepa para clonación	Invitrogen
S17	<i>recA endA thi hsdR RP4-2-Tc::Mu::Tn7; Tp^r Sm^r</i>	[36]

Rhodobacter sphaeroides

WS8N	Cepa silvestre, Nal ^r espontánea	[35]
AM1	Derivada de WS8N; $\Delta fleQ::Kan^r cckA_{L391F}$	[25, 33]
MG1	Derivada de AM1; $\Delta fliF2::aadA$	Este trabajo
MG2	Derivada de AM1; $\Delta flhA2::aadA$	Este trabajo
EA1	Derivada de AM1; $\Delta ctrA2::aadA$	[33]
MG3	Derivada de AM1; $\Delta flbT::Hygro$	Este trabajo
MG4	Derivada de AM1; $\Delta flaF::aadA$	Este trabajo
MG5	Derivada de AM1; $\Delta RSWS8N_{19879}::aadA$	Este trabajo
MG6	Derivada de AM1; $\Delta flbT::Hygro\Delta RSWS8N_{19879}::aadA$	Este trabajo

Plásmidos utilizados

pCR2.1	Vector de clonación; Ap ^r Kan ^r	Invitrogen
pCR_fliF2	pCR2.1 conteniendo una copia del gen <i>fliF2</i>	Este trabajo
pCR_flhA2	pCR2.1 conteniendo una copia del gen <i>flhA2</i>	Este trabajo
pCR_flbT	pCR2.1 conteniendo una copia del gen <i>flbT</i>	Este trabajo
pCR II Blunt-TOPO	Vector de clonación; Ap ^r Kan ^r	Invitrogen
pCR II_RSWS8N_19879	pCR II Blunt-TOPO conteniendo una copia de <i>RSWS8N_19879</i>	Este trabajo
pIJ963	Vector fuente del casete Hygro; Hyg ^r	[37]
pJQ200	Vector suicida en Gram-negativas; Gm ^r	[38]
pJQ_fliF2::aadA	pJQ200 llevando el alelo <i>fliF2::aadA</i>	Colección del laboratorio
pJQ_flhA2::aadA	pJQ200 llevando el alelo <i>flhA2::aadA</i>	Colección del laboratorio
pJQ_flbT::Hygro	pJQ200 llevando el alelo <i>flbT2::Hygro</i>	Este trabajo
pJQ_flaF::aadA	pJQ200 llevando el alelo <i>flaF::aadA</i>	Este trabajo
pJQ_RSWS8N_19879::aadA	pJQ200 llevando el alelo <i>RSWS8N_19879::aadA</i>	Este trabajo
pMP220	Vector reportero con el gen <i>lacZ</i> y sin promotores propios; Tc ^r	[39]
pMP_flaAp	pMP220 conteniendo la región intercistronica previa al gen <i>flaA</i>	Este trabajo
pMP_flaAp [-200pb]	pMP_flaAp con 200 pb del extremo 5' de <i>flaAp</i> truncadas	Este trabajo
pRK415	Usado para expresión estable en <i>R. sphaeroides</i> ; Tc ^r	[40]
pRK_fliF2op	Derivado de pRK415 expresando el operón <i>fliFHNP</i>	Colección del laboratorio
pRK_flhA2	Derivado de pRK415 expresando <i>flhA2</i>	Este trabajo
pRK_flbT	Derivado de pRK415 expresando <i>flbT</i>	Este trabajo
pRK_RSWS8N_19879	Derivado de pRK415 expresando <i>RSWS8N_19879</i>	Este trabajo
pRK_flbT, RSWS8N_19879	Derivado de pRK415 expresando <i>flbT</i> y <i>RSWS8N_19879</i>	Este trabajo
pTZ19R	Vector de clonación; Ap ^r	Pharmacia
pTZ19R BamHI-	Derivado de pTZ19R, sin el sitio BamHI	Colección del laboratorio
pTZ_flbT	pTZ19R BamHI- llevando <i>flbT</i>	Este trabajo
pTZ_flbT inv	Recircularización del producto de PCR inverso de pTZ_flbT usando los oligos flbT3 y flbT4	Este trabajo
pTZ_flbT::Hygro	pTZ19R BamHI- llevando <i>flbT::Hygro</i>	Este trabajo
pTZ_flaF	pTZ19R BamHI- llevando <i>flaF</i>	Este trabajo
pTZ_flaF inv	Recircularización del producto de PCR inverso de pTZ_flaF usando los oligos flaF3 y flaF4	Este trabajo
pTZ_flaF::aadA	pTZ19R BamHI- llevando <i>flaF::aadA</i>	Este trabajo
pTZ_RSWS8N_19879	pTZ19R BamHI- llevando <i>RSWS8N_19879</i>	Este trabajo
pTZ_RSWS8N_19879 inv	Recircularización del producto de PCR inverso de pTZ_RSWS8N_19879 usando los oligos flgF3InvRev y flgF3InvFwd	Este trabajo
pTZ_RSWS8N_19879::aadA	pTZ19R BamHI- llevando <i>RSWS8N_19879::aadA</i>	Este trabajo

Oligonucleótidos usados

Para obtener las cepas mutantes utilizadas en este trabajo se ocuparon como cebadores los oligonucleótidos cuya secuencia se especifica en la siguiente tabla:

Oligonucleótidos utilizados

FlaA-p1	5'-GCGAATTCGCCGAAAGCCCGTAGAGAA -3'
FlaA-p2	5'-GCCTGCAGGCGCTGGTGTGGTCAGAA-3'
FlaAp6	5'-GCGAATTCGCACAAATGAGAAGGAGGACC-3'
FliF2 rev1	5'-CTGAGACTCGTCCAACCTGCCGGAAGGCG-3'
FliF2 rev2	5'-CTGAGATCTGTGGTCACCGTGACGCTCGC-3'
flhA2 SF3	5'-CGGAATTCCTCAACTGAACAACCGCTGGCATG-3'
flhA2 Sr1	5'-GCTCTAGACGCGGAACAGATCCTGCG-3'
FlbT1	5'-GCAAGCTTATCGAGCAGAACCGCAAGC-3'
FlbT2	5'-GCTCTAGACGAAGCTCTGCGTGCGATA-3'
FlbT3	5'-GCAGATCTGGATCGAGCAGCTGAGCCAG-3'
FlbT4	5'-GCAGATCTCTGGCGCAGGATGACGGAAT-3'
FlaF1	5'-GCGAGCTCCGACTTCGAGGCCAACGTCA-3'
FlaF2	5'-GCTCTAGATCATGACCGTGATCCGCGA-3'
FlaF3	5'-GCAGATCTGCGGTGCGTCTCCTCAGG-3'
FlaF4	5'-GCAGATCTACGAGATCGTCCAGCAGCATT-3'
flgF3 Rev	5'-GCGAGCTCCCCGGCTGCCGCTTCCACAC-3'
flgF3 Inv Rev	5'-GCTCTAGACGCGCTGACGCTCCATCGTG-3'
flgF3 Inv Fwd	5'-GCTCTAGAATCGCGAGATGGCGACGCTC-3'
FlaA UTR2	5'-GCTGTTGATGCTGCGCAGGGTCTG -3'

Obtención del plásmido reportero de la actividad transcripcional de *flaA*

El plásmido reportero se obtuvo amplificando, a partir de ADN genómico de *R. sphaeroides* WS8N, un fragmento de 429 pb que contenía 409 pb que conforman la región intercistronica río arriba del gen *flaA*, 28 pb de *flaA* y 46 pb del marco de lectura RSWS8N_19859. Tras ser amplificado el fragmento quedó flanqueado por sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción EcoRI y PstI. Utilizando estos sitios fue clonado en el plásmido pMP220, río arriba del gen *lacZ*. La construcción resultante fue transformada en células TOP10 electrocompetentes de *E. coli* y estas última fueron posteriormente conjugadas con *R. sphaeroides* AM1. Para obtener el reportero trunco se siguió el mismo procedimiento utilizando en la amplificación inicial los oligonucleótidos *flaAp6* y *flaAp2*.

Obtención de cepas mutantes

La cepa MG3($\Delta flbT$) se obtuvo amplificando por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento de 1034 pb utilizando ADN genómico de *R. sphaeroides* WS8N como sustrato de amplificación. Se usaron como cebadores los oligonucleótidos FlbT1 y FlbT2. El fragmento resultante contenía 219 pb del gen *flaF*, las 408 pb de la secuencia del gen *flbT* y 407 pb del gen *RSWS8N_19879*. El fragmento fue digerido con las enzimas de restricción HindIII y XbaI, y subclonado en el plásmido pTZ19R BamHI- para dar lugar al plásmido pTZ_flbT. Este último se utilizó como sustrato para una reacción de PCR inversa que usó como cebadores los oligonucleótidos FlbT3 y FlbT4. Este proceso resultó en la remoción de 119 pb de secuencia intermedia de *flbT* y en la inserción de un sitio BglII entre los extremos resultantes. El plásmido fue recircularizado y en el sitio BglII se insertó un fragmento BglII de ~1900 pb proveniente del plásmido pUC963 que contenía un casete de resistencia a higromicina. Posteriormente el alelo *flbT::Hygro* fue extraído mediante una digestión con las enzimas HindIII y XbaI, y subclonado en el plásmido pJQ para dar lugar al plásmido pJQ_flbT::Hygro. Una alícuota de células TOP10 electrocompetentes de *E. coli* fue transformada con esta última construcción y posteriormente conjugadas con *R. sphaeroides* AM1. Para la complementación de la cepa mutante se utilizó un fragmento de 1036 pb amplificado por los oligonucleótidos flbT1 y flbT2. El fragmento estaba flanqueado por sitios de reconocimiento para las enzimas HindIII y XbaI y aprovechando estos sitios, se insertó en el plásmido pRK415 para dar lugar a la construcción pRK_flbT.

La cepa MG2 ($\Delta flhA2$) fue obtenida transformando pJQ_flhA2::aadA, construcción preexistente en la colección del laboratorio, en una alícuota de células TOP10 electrocompetentes de *E. coli*. Estas células posteriormente fueron conjugadas con *R. sphaeroides* AM1. La cepa fue complementada con la construcción pRK-flhA2, la cual se obtuvo insertando con extremos EcoRI y XbaI en el pRK415 un fragmento de 2462 pb que contenía el alelo silvestre de flhA2.

La cepa MG1 ($\Delta fliF2$) fue obtenida transformando pJQ_fliF2::aadA, construcción preexistente en la colección del laboratorio, en una alícuota de células TOP10 electrocompetentes de *E. coli*. Estas células posteriormente fueron conjugadas con *R. sphaeroides* AM1. La mutante se complementó con pRK_fliF2Op construcción, obtenida por la Dra. Clelia Domanzain, que contenía un fragmento de ~3200 pb que incluía al operón *fliFHNP2*.

La cepa MG5($\Delta RSWS8N_19879$) se obtuvo amplificando por PCR un fragmento de 1860 pb desde ADN genómico de *R. sphaeroides* WS8N. Se usaron como

cebadores los oligonucleótidos flbT1 y flgF3 Rev. El fragmento resultante contenía toda la secuencia de los genes RSWS8N_19879 y *flbT*, además de 219 pb de *flaF* y 454pb de la región intercistrónica río abajo de *RSWS8N_19879*. El fragmento fue digerido con las enzimas de restricción HindIII y SacI, y clonado en el plásmido pTZ19R BamHI- para dar lugar al plásmido pTZ_RSWS8N_19879. Este último se utilizó como sustrato para una reacción de PCR inversa que usó como cebadores los oligonucleótidos flgF3 Inv Rev y flgF3 Inv Fwd Este proceso resultó en la remoción de 429 pb de secuencia intermedia de *RSWS8N_19879* y en la inserción de un sitio XbaI entre los extremos resultantes. El plásmido fue recircularizado y en el sitio XbaI se insertó el casete *aadA*. Posteriormente el alelo *RSWS8N_19879::aadA* fue extraído mediante una digestión con las enzimas HindIII y SacI, y subclonado en el plásmido pJQ200 para dar lugar al plásmido pJQ_RSWS8N_19879::aadA. Una alícuota de células TOP10 electrocompetentes de *E. coli* fue transformada con esta última construcción y posteriormente conjugadas con *R. sphaeroides*AM1. Para la complementación de la cepa mutante se utilizó un fragmento de 1401 pb amplificado por los oligonucleótidos flbT3 y flgF3 Rev. El fragmento estaba flanqueado por sitios de reconocimiento para las enzimas BglII y SacI, aprovechando estos sitios se insertó en el plásmido pRK415 para dar lugar a la construcción pRK_RSWS8N_19879.

La cepa MG6($\Delta flbT$, $\Delta RSWS8N_19879$) fue obtenida conjugando la cepa MG3 ($\Delta flbT$) con células TOP10 con la construcción pJQ_RSWS8N_19879::aadA, plaqueando en medio selectivo y purificando las colonias resultantes. La complementación de la cepa MG6 se realizó amplificando un fragmento de 1860 pb con los oligonucleótidos flbT1 y flgF3 Rev como cebadores. El fragmento estaba flanqueado por sitios HindIII y SacI, y con estos fue clonado en el plásmido pRK415 para dar lugar a la construcción pRK_flbT, RSWS8N_19879.

Semejantemente a la obtención de la cepa MG3($\Delta flbT$), la cepa MG4 $\Delta flaF$ fue obtenida amplificando el alelo desde ADN genómico usando los oligonucleótidos FlaF1 y FlaF2 como cebadores. El fragmento resultante tenía 884 pb de longitud y estaba flanqueado por sitios SacI y XbaI. Incluía toda la secuencia codificante de *flaF*, 99 pb del gen *flbT*, toda la región intercistrónica río arriba de *flaF* y 333 pb del gen *flaA*. El fragmento fue clonado en el plásmido pTZ19r BamHI- para dar lugar a la construcción pTZ_flaf. Posteriormente se realizó un PCR inverso con los oligonucleótidos FlaF3 y FlaF4, esto resultó en la remoción de 138 pb de la secuencia de *fliF* y en la inserción de un sitio BglII. En este sitio se introdujo el casete *aadA* de 1414 pb. El alelo $\Delta flaF::aadA$ se obtuvo digiriendo pTZ_flaf::aadA con las enzimas SacI y XbaI. El fragmento resultante fue subclonado en pJQ200 para dar lugar a la construcción pJQ_flaf::aadA. Una alícuota de células TOP10

electrocompetentes de *E. coli* fue transformada con esta última construcción y posteriormente conjugadas con *R. sphaeroides*AM1.

Transformación de cepas de *Escherichiacoli*

Por choque térmico

Preparación de células competentes

A partir de un cultivo saturado se inoculó un matraz con 10 mL de medio LB que fue incubado hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial media ($A_{600} = 0.6 - 0.8$). Posteriormente las células se mantuvieron en hielo durante 10 minutos para después ser cosechadas mediante centrifugación durante 5 min a una velocidad de 5000 rpm. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 5mL de una solución acuosa de cloruro de calcio 100mM estéril. Una vez resuspendidas se les incubó en hielo durante 30 minutos para después ser centrifugadas nuevamente bajo los mismos parámetros de centrifugación. Se decantó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida nuevamente en 1mL de la solución de cloruro de calcio. Una vez resuspendidas se les incubó en hielo entre una y treinta horas.

Transformación

El ADN a transformar fue mezclado con 200 μ L de células competentes. La mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo tras lo cual se sumergieron inmediatamente en agua a 42°C durante 2 minutos e inmediatamente después fueron puestas de nuevo en hielo durante 10 minutos. Al término de este periodo se agregó a la mezcla 800 μ L de medio LB y se incubaron a 37°C durante al menos 45 minutos. Finalmente las células fueron plateadas en medio sólido de selección e incubadas hasta la aparición de colonias visibles

Por electroporación

Preparación de células competentes

Alícuotas de células electrocompetentes preparadas previamente por el personal técnico del laboratorio fueron utilizadas para la transformación por electroporación de cepas de *E. coli*. El protocolo para preparar dichas alícuotas es el siguiente: A partir de un cultivo saturado se inocula un matraz con 10 mL de medio LB que se incuba hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial media ($A_{600} = 0.6 - 0.8$). Posteriormente las células se mantienen en hielo durante 15 minutos para después ser cosechadas mediante centrifugación durante 5 min a una velocidad

de 5000 rpm. El sobrenadante es removido sin perturbar la pastilla. Posteriormente un volumen de glicerol al 10% equivalente al volumen original de células centrifugadas es agregado y la pastilla es completamente resuspendida en él. Las células son centrifugadas drenadas de líquido, y resuspendidas en glicerol 10% una vez más. Una vez centrifugadas de nuevo, se decanta el glicerol y se resuspende la pastilla en el remanente. Del remanente se toman alícuotas de 50 μL y se congelan en hielo seco durante 15 minutos. Finalmente las alícuotas son trasladadas a un ultracongelador de -80°C para su almacenaje a largo plazo.

Transformación

El ADN a transformar fue mezclado con una alícuota de 50 μL de células competentes previamente descongeladas en hielo. La mezcla se trasladó a una celda de electroporación fría y se sometió a un único pulso de 1.8 kV, añadiéndosele inmediatamente después 800 μL de medio LB y se trasladó la mezcla a un tubo 'eppendorf' donde se incubó a 37°C durante al menos 60 minutos. Finalmente las células fueron plateadas en medio sólido de selección e incubadas hasta la aparición de colonias visibles

Conjugación

Las cepas a conjugar son crecidas hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial media en medio líquido de selección. Al llegar a la densidad poblacional buscada, se cosechan mediante centrifugación y son resuspendidas en medio LB para remover los antibióticos de selección. Se centrifugan y resuspenden nuevamente en medio LB fresco al menos dos veces más. Tras la última centrifugación las células se resuspenden en un volumen pequeño de medio LB y las cepas se mezclan en proporción 1:1 en un solo contenedor. La mezcla es depositada en un rectángulo de nitrocelulosa y éste sobre una caja de medio LB. La caja es incubada a 30°C durante al menos 4 horas. Posteriormente se recupera el trozo de nitrocelulosa y se sumerge y resuspende en 1 mL de medio LB, las células son cosechadas y plateadas en medio sólido selectivo.

Purificación de ácidos nucleicos

Minipreparados de ADN plasmídico

De un cultivo saturado se toman 2mL que son centrifugadas, decantadas y resuspendidas en 300 μL de solución STET. Se añaden 25 μL de lisozima y se someten a un baño de agua hirviente durante 50 segundos. Posteriormente se centrifuga durante 20 minutos. El sobrenadante resultante es recuperado y mezclado con 300 μL de isopropanol. Se incuba la mezcla en hielo durante 30 minutos y posteriormente es centrifugada a 4°C a 14000 rpm durante 15 minutos.

La pastilla resultante es lavada con etanol y se deja secar al ambiente. Finalmente la pastilla es resuspendida en 30 μ L de agua bidestilada.

Solución STET

Solución acuosa que contiene 8% sacarosa, 5% del detergente Tritón, 50 mM de EDTA y 50 mM de Tris-HCl (pH 8.0).

Purificación de ADN cromosomal

De un cultivo saturado se cosechan 5 mL que son resuspendidos en 567 μ L de solución amortiguadora TE adicionada con 30 μ L de una solución de SDS 10% y 12 μ L de una solución de proteinasa K (20 mg/mL). La mezcla resultante es incubada a 37°C durante 2 horas. Se agrega después un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico de 24:1 (v/v) y se centrifuga a 14000 rpm durante 15 minutos. Al finalizar, se toma la fase acuosa resultante y se transfiere a un nuevo recipiente donde se le agrega un volumen de cloroformo: fenol: alcohol isoamílico de 25:24:1 (v/v/v). Se mezcla vigorosamente por inversión hasta emulsificar la mezcla. Posteriormente se centrifuga a 14000 rpm durante 15 minutos. La fase acuosa es recuperada y adicionada con 0.6 volúmenes de isopropanol. Una hebra blanquecina se vuelve visible. La hebra es recuperada con un pipeta pasteur modificada *ex profeso* y se deja secar al ambiente. Finalmente, una vez seca, la hebra es resuspendida en 40 μ L de agua bidestilada.

Solución amortiguadora TE

Contiene 10mM de Tris-HCl y 1mM de EDTA. El pH es ajustado a 8.0

Purificación de ADN plásmido

Para la purificación de ADN plasmídico se utilizó el paquete “QIAprep Spin Miniprep Kit” de la compañía QUIAGEN, siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante.

Purificación de ARN

La purificación de ARN total se llevó a cabo usando el paquete “RiboPure™ RNA Purification Kit” de la compañía Life Technologies siguiendo las instrucciones especificadas en el mismo.

Ensayo de extensión del cebador

Inicialmente el oligonucléotido a usar como cebador es marcado radioactivamente usando la enzima T4 polinucleótido cinasa y 10 μ Ci de [γ -P³²] ATP. La reacción de

fosforilación se incubaba durante una hora a 37°C y se detiene adicionando 2 µL de EDTA 0.5 M y 50 µL de solución amortiguadora TE.

El cebador marcado (3.5 µL) fue incubado con el ARN total extraído (10 µL) en un baño María a 65°C y posteriormente templado a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió mezcla de reacción hasta alcanzar un volumen final de 30 µL y fue incubado por una hora a 42°C.

Para detener la reacción se agrega ARNasa a la reacción y se incubaba durante 15 minutos a 37°C. El ADN remanente es precipitado, lavado con etanol 70% (v/v) y resuspendido en agua o solución amortiguadora de carga. Finalmente, el producto es sometido a electroforesis en un gel de secuenciación (9% acrilamida, 7M urea) y revelado por autoradiografía.

Mezcla de reacción

Para preparar 61 µL se mezclan 1.8 µL de Tris-HCl 1M (pH 8.3), 1.8 µL de cloruro de magnesio 0.5M, 0.5 µL de DTT (ditiotreitól) 1M, 13.5 µL de actinomicina D (1mg/mL), 3 µL de mezcla de DNTPs 5mM, 40 µL de agua bidestilada tratada con inhibidores de ARNasas y 0.4 µL de reverso transcriptasa (25 U/ µL).

Ensayo de Western blot

Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Los extractos celulares se resuelven mediante electroforesis discontinua. Primeramente por el gel concentrador y después por el gel de resolución. El gel de resolución es preparado con 2 mL de una solución de acrilamida-bisacrilamida (0.8:30), 1.9 mL de una solución de Tris 1M (pH 8.8), 1 mL de agua bidestilada, y 50 µL de una solución acuosa de dodecilsulfato sódico (SDS) 10% (v/v). La polimerización de la matriz de acrilamida es iniciada y catalizada añadiendo a la mezcla anterior 40 µL de una solución de persulfato de amonio 10% (p/v) y 5 µL de tetrametiletilendiamina (TEMED). El gel de apilamiento es preparado con 340 µL de una solución de acrilamida-bisacrilamida (0.8:30), 310 mL de una solución de Tris 1M (pH 6.8), 1.8 mL de agua bidestilada, y 25 µL de una solución acuosa de dodecilsulfato sódico (SDS) 10% (v/v). La polimerización de la matriz de acrilamida es iniciada y catalizada añadiendo a la mezcla anterior 20 µL de una solución de persulfato de amonio 10% (p/v) y 3 µL de tetrametiletilendiamina (TEMED). Las muestras, previamente resuspendidas en una solución de carga. Usando la solución amortiguadora de corrida, las muestras se someten a una

corriente constante de 30 mA hasta que el tinte de carga llega a la parte inferior del gel.

Inmunodetección

Primeramente se transfieren las proteínas separadas por SDS-PAGE. Para ello el gel se pone en contacto con una membrana de nitrocelulosa. Ambos son sumergidos en solución amortiguadora de transferencia y sometidos a una corriente constante de 200 mA durante al menos una hora. Posteriormente la membrana es incubada en agitación en solución amortiguadora TBS adicionada con 1% (p/v) de leche en polvo durante al menos una hora. La membrana se lava con TBS-T y después es incubada durante una hora con un anticuerpo primario α -FlaA disuelto en solución TBS-T en una proporción 1:50000. La membrana es lavada con TBS-T fresco repetidamente. La membrana después es incubada durante una hora con un anticuerpo secundario α -ratón acoplado a fosfatasa alcalina de rábano disuelto en TBS-T en una proporción 1:50000. La membrana es lavada con TBS-T fresco repetidamente. Finalmente la membrana se incuba con un sustrato quimioluminiscente y le es expuesta una placa fotosensible. Los tiempos de exposición varían para cada caso y varias pruebas son necesarias para lograr una visualización clara de las bandas de interés.

Solución amortiguadora de corrida

Solución acuosa que por cada medio litro contiene 1.5g de Tris Base, 7.2g de glicina y 5 mL de una solución de SDS 10%(v/v).

Solución amortiguadora de transferencia

Solución acuosa que por cada litro contiene 0.84 g de fosfato monohidrogenado de sodio, 0.32 g de fosfato dihidrogenado de sodio y 200 mL de metanol.

Solución amortiguadora TBS

Solución acuosa que contiene 50 mM de Tris-HCl y 150 mM de cloruro de sodio.

Solución amortiguadora TBS-T

Idéntica a la solución TBS pero adicionada con un 0.1% (v/v) del detergente Tween-20.

Ensayo enzimático

Determinación de la actividad específica de β -galactosidasa [45]

Extractos totales de las cepas a evaluar se obtienen mediante la sonicación de 3ml de cultivo incubado previamente en condiciones favorables para el nado

(fotoheterotrofia anaeróbica en medios CAS o 100 μ M). Las células son cosechadas y resuspendidas en 300 μ L de solución amortiguadora Z. Cada resuspensión fue sometida a 5 periodos de sonicación de 10 segundos, interrumpidos por descansos de 15 segundos en hielo entre cada uno. En tubos de vidrio aptos para ensayos enzimáticos se colocan 40 μ L del extracto en 460 μ L de Buffer Z. Para iniciar la reacción se agregan 100 μ L de ONPG (ortonitrofenil- β -galactósido) preparado al momento a una concentración de 4mg/ml. La reacción se deja progresar durante un tiempo predeterminado, incubada a 37°C y se detiene adicionando 250 μ L de carbonato de sodio (1M). Posteriormente se realizan mediciones espectroscópicas de la muestra a 420 nm y éstas son normalizadas mediante la cuantificación de la proteína total en cada extracto por reactivo de Bradford. La actividad específica se calculaba promediando las absorbancias a 420 nm de las distintas repeticiones de cada muestra. El promedio resultante se le dividía entre el tiempo durante el que se dejó proceder la reacción. La cantidad resultante se promediaba con las cantidades, igualmente normalizadas a tiempo, de las reacciones que corrieron a tiempos diferentes. A este valor de absorbancia se le restaba la absorbancia registrada para las reacciones control. El valor final de absorbancia resultante se dividía entre la concentración total de proteína obtenida según cuantificación por reactivo de Bradford. El resultante se expresaba como un porcentaje del valor obtenido para la cepa AM1 en ese experimento.

Repeticiones e independencia de las muestras entre ensayos

Los ensayos enzimáticos fueron repetidos al menos media docena de veces para cada valor, se utilizaron tres líneas independientes por cada mutante y se usaron triplicados para cada parte del proceso en aras de reducir el error metodológico. Los extractos usados para los ensayos enzimáticos y los extractos utilizados en los ensayos de Inmunodetección por Western blot a pesar de ser de la misma cepa no provenían del mismo cultivo fuente, no obstante los valores obtenidos en los ensayos eran repetibles y las relaciones proporcionales entre las cepas observadas mostraban poca variabilidad.

Solución amortiguadora Z

Contiene 60 mM de fosfato monohidrogenado de sodio, 40 mM de fosfato dihidrogenado de sodio, 10 mM de cloruro de potasio, 1mM de sulfato de magnesio heptahidratado y 50 mM de β -mercaptoetanol. El pH es ajustado a 7.0.

Cuantificación de proteína por reactivo de Bradford

Una alícuota de 40 μ L del extracto celular total es colocada en un tubo de vidrio junto con 50 μ L del reactivo de Bradford 5x (Bio-RAD). Se agregan 110 μ L de agua bidestilada y se mezcla enérgicamente. Se mide la absorbancia de la

muestra a 595 nm y la medición obtenida es intrapolada a una cantidad de proteína correlacionándola a una curva de estandarización realizada previamente con diluciones de albumina de concentraciones conocidas.

Ensayos de nado en cajas de agar suave

Para evaluar la capacidad de nado de las cepas de *R. sphaeroides*, una alícuota de 3 μ L de cada cepa era inoculada sobre una caja conteniendo medio de nado (SIS, 100, CAS con 0.22% de bactoagar). Posteriormente las cajas eran incubadas en condiciones de fotoheterotrofia anaeróbica o en condiciones de quimioheterotrofia aeróbica durante 60 horas.

Microscopía

Microscopía óptica

Las observaciones se realizaron con un microscopio Nikon E600 usando objetivos de 10x y 40x usando iluminación de campo oscuro.

Microscopía electrónica de transmisión

Todas las imágenes de microscopía electrónica de transmisión fueron cortesías de parte de la Dra. Clelia Domenzain Reyna.

Recursos para análisis *in silico*

BLAST

Para la búsqueda de homólogos de las proteínas mencionadas en este trabajo se utilizó la 'Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamientos Locales' (BLAST) hospedada en los servidores de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América y accesible en la liga: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

MEGA6

Los alineamientos entre proteínas presentados en este trabajo se realizaron utilizando el software MEGA 6.0, propiedad de Koichiro Tamura, Glen Stecher, Daniel Peterson, y Sudhir Kumar, y disponible gratuitamente en la liga: <http://www.megasoftware.net>. Los alineamientos se realizaron utilizando el algoritmo ClustalW con los siguientes parámetros:

Penalidad por apertura de brecha en alineamiento por pares: 10

Penalidad por extensión de brecha en alineamiento por pares: 0.1

Penalidad por apertura de brecha en alineamiento múltiple: 10

Penalidad por extensión de brecha en alineamiento múltiple: 0.2

Matriz de valores para proteínas: Gonnet

CDART

La búsqueda de proteínas homólogas por conservación de la arquitectura de dominios se llevó acabo usando la “Herramienta de Recuperación de Arquitectura de Dominios Conservados” (CDART) hospedada en los servidores de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América y accesible en la liga: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi>

HHpred

Las predicciones de estructura terciaria presentadas en este trabajo se obtuvieron suministrando la secuencia de aminoácidos de las proteínas de interés al servidor HHpred (“Detección de Homología y Predicción de Estructura por comparación HMM-HMM”) que forma parte de las herramientas bioinformáticas disponibles en los servidores de la Sociedad Max Planck. El servicio es accesible en la liga: <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>

Referencias

1. Aldridge P. & K. T. Hughes. Regulation of flagellar assembly. *Current Opinion in Microbiology*. 2002. 5:160-165
2. Anderson P. E. & J. W. Gober. FliB, the post-transcriptional regulator of flagellin synthesis in *Caulobacter crescentus*, interacts with the 5' untranslated region of flagellin mRNA. *Molecular Microbiology*. 2000. 38: 41-52
3. Anderson D. K. & A. Newton. Posttranscriptional Regulation of *Caulobacter* Genes by a Late Flagellum Assembly Checkpoint. *Journal of Bacteriology*. 1997. 179: 2281-2288
4. Berg H. C. & R. A. Anderson. Bacteria Swim by Rotating their Flagellar Filaments. *Nature*. 1973. 245: 380-382
5. Biondi E. G., S. J. Resinger, J. M. Skerker, M. Arif, B. S. Perchuk, K. R. Ryan & M. T. Laub. Regulation of the bacterial cell cycle by an integrated genetic circuit. *Nature*. 2006. 444: 899-904
6. Chevance F.V. F. & K. T. Hughes. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nature Reviews Microbiology*. 2008. 6:445-465
7. Davis N. J. & P.H. Viollier. Probing flagellar promoter occupancy in wild-type and mutant *Caulobacter crescentus* by chromatin immunoprecipitation. *FEMS Microbiology Letters*. 2011. 319: 146-152
8. DeRosier D. J. The Turn of the Screw: The Bacterial Flagellar Motor. *Cell*. 1998. 93: 17-20
9. E. K. Mangan, J. Malakooti, A. Caballero, P. Anderson, B. Ely & J. W. Gober. FliB Couples Flagellum Assembly to Gene Expression in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*. 1999. 181: 6160-6170
10. Ferooz J. & J. Letesson. Morphological analysis of the sheathed flagellum of *Brucella melitensis*. 2010. *BMC Research Notes*. 3: 333.
11. Ferooz J.; J. Lemaire & J. Letesson. Role of FliB in flagellin production in *Brucella melitensis*. 2011. *Microbiology*. 157:1253-1262
12. Ferooz J., J. Lemaire, M. Delory, X. De Bolle & J. Letesson. RpoE1, an extracytoplasmic function sigma factor, is a repressor of the flagellar system in *Brucella melitensis*. *Microbiology*. 2011. 157: 1263-1268
13. Fraser G. M., T. Hirano, H. U. Ferris, L. L. Devgan, M. Kihara & R. M. Macnab. Substrate specificity of type III flagellar protein export in *Salmonella* is controlled by subdomain interactions in FliH. *Molecular Microbiology*. 2003. 48: 1043-1057
14. Fretin D., A. Fauconnier, S. Köhler, S. Halling, S. Léonard, C. Nijskens. J. Ferooz, P. Lestrade, R. M. Delrue & others. The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiology*. 2005. 7: 687-698.

15. Ikeda T., M. Homma, T. Iino, S. Asakura & R. Kamiya. Localization and stoichiometry of hook-associated proteins within *Salmonella typhimurium* flagella. *Journal of Bacteriology*. 1987. 169: 1168-1173
16. Ikeda T., S. Asakura & R. Kamiya. "Cap" on the tip of *Salmonella* flagella. *Journal of Molecular Biology*. 1985. 184: 735-737
17. Jenal U. Signal transduction mechanisms in *Caulobacter crescentus* development and cell cycle control. *FEMS Microbiology Reviews*. 2000. 24: 177-191
18. Jones C. J., R. M. Macnab, H. Okino & S. Aizawa. Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Molecular Biology*. 1990. 212: 377-387
19. Keen N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi & D. Trollinger. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene*. 1988. 70: 191-197 PRK415!!!
20. Kojima S. & D. F. Blair. Solubilization and purification of the MotA/MotB complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 43: 26-34
21. Léonard S., J. Ferooz, V. Haine, I. Danese, D. Fretin, A. Tibor, S. de Walque, X. De Bolle & J. Letesson. FtcR Is a New Master Regulator of the Flagellar System of *Brucella melitensis* 16M with Homologs in the *Rhizobiaceae*. *Journal of Bacteriology*. 2007. 189: 131-141
22. Llewellyn M., R. J. Dutton, J. Easter, D. O'Donnol & J. W. Gober. The conserved flaF gene has a critical role in coupling flagellin translation and assembly in *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology*. 2005. 57(4): 1127-1142
23. Macnab R. M. How Bacteria Assemble Flagella. *Annual Review of Microbiology*. 2003. 57: 77-100
24. Marsh J. L., M. Erfle & E. J. Wykes. The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene*. 1984. 32: 481-485
25. Martínez del Campo A., T. Ballado, J. de la Mora, S. Poggio, L. Camarena & G. Dreyfus. Chemotactic Control of the Two Flagellar Systems of *Rhodobacter sphaeroides* Is Mediated by Different Sets of CheY and FliM Proteins. *Journal of Bacteriology*. 2007. 189: 8397-8401
26. McCarter L. L. Regulation of flagella. *Current Opinion in Microbiology*. 2006. 9:180-186
27. Ohnishi K., Y. Ohto, S. Aizawa, R. M. Macnab & T. Iino. FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 176: 2272-2281
28. Petersen E., P. Chaudhuri, C. Gourley, J. Harms & G. Splitter. *Brucella melitensis* Cyclic di-GMP Phosphodiesterase BpdA Controls Expression of Flagellar Genes. *Journal of Bacteriology*. 2011. 193: 5683-5691

29. Poggio S., C. Abreu-Goodger, S. Fabela, A. Osorio, G. Dreyfus, P. Vinuesa & L. Camarena. A Complete Set of Flagellar Genes Acquired by Horizontal Transfer Coexists with the Endogenous Flagellar System in *Rhodobacter sphaeroides*. 2007. *Journal of Bacteriology*. 189: 3208-3216
30. Poggio Ghilarducci, Sebastián. Caracterización de la Jerarquía flagelar de *Rhodobacter sphaeroides*. 2007. (Tesis de Doctorado – Universidad Nacional Autónoma de México)
31. Quandt J. & M. F. Hynes. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene*. 1993. 127: 15-21
32. Terashima H., N. Li, M. Sakuma, S. Kojima, M. Homma & K. Imada. Insight into the assembly mechanism in the supramolecular rings of the sodium-driven Vibrio flagellar motor from the structure of FlgT. *PNAS*. 2013. 110: 6133-6138
33. Vega-Baray B., C. Domenzain, A. Rivera, R. Alfaro-López, E. Gómez-César, S. Poggio, G. Dreyfus & L. Camarena. The flagellar set Fla2 in *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the CckA pathway and is repressed by organic acids and the expression of Fla1. *Journal of Bacteriology*. 2014.
34. Zygmunt M.S., S.D. Hagius, J. V. Walker & P. H. Elzer. Identification of the *Brucella melitensis* 16M genes required for bacterial survival in a caprine host. 2006. *Microbes and Infection*. 8: 2849-2854
35. Packer H. L. & J. P. Armitage. The Chemokinetic and Chemotactic Behavior of *Rhodobactersphaeroides*: Two Independent Responses. 1994. *Journal of Bacteriology*. 176: 206-212
36. Simon R., U. Priefer & A. Pühler. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. 1983. *Biotechnology* 1:784-791
37. Garbe T. R., J. Barathi, S. Barnini, Y. Zhang, C. Abou-Zeid, D. Tang, R. Mukherjee & D. B. Young. Transformation of mycobacterial species using hygromycin resistance as selectable marker. 1994. *Microbiology*. 140: 133-138
38. Quandt J. & M. F. Hynes. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. 1993. *Gene*. 127: 15-21
39. Spaink H. P., R. J. H. Okker, C. A. Wijffelman, E. Pees & B. J. J. Lugtenberg. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobiumleguminosarum* Sym plasmid pRLJI. 1987. *Plant Molecular Biology*. 9: 27-39
40. Keen N.T., S. Tamaki, D. Kobayashi & D. Troilinger. Improved brood-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. 1988. *Gene*. 70: 191-197
41. Mackenzie C., M. Choudhary, F. W. Larimer, P. F. Predki, S. Stilwagen, J. P. Armitage, R. D. Barber, T. J. Donohue, J. P. Hosler, J. E. Newman, J. P. Shapleigh, R. E. Sockett, J. Zeilstra-Ryalls & S. Kaplan. The Home Stretch, a First Analysis of the nearly Completed Genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. 2001. *Photosynthesis Research*. 70: 19-41

42. Armitage J. P. & R. M. Macnab. Unidirectional, Intermittent Rotation of the Flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. 1987. *Journal of Bacteriology*. 169: 514-518
43. Bertani G. Studies on Lysogenesis. The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*. 1951. *Journal of Bacteriology*. 62: 293-300
44. Sistrom W. R. The Kinetics of the Synthesis of Photopigments in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. 1962. *Journal of General Microbiology*. 28: 607-616
45. Miller J. H. *Experiments in Molecular Genetics*. 1972. Cold Spring Harbor. ISBN: 0879691069