



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**La exportación de los componentes flagelares y
su relación con la división celular en
*Caulobacter crescentus***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A

DIANA GABRIELA ESPADAS ZITA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, 2017



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.

1. Datos del alumno
 - Apellido Paterno: Espadas
 - Apellido Materno: Zita
 - Nombre (s): Diana Gabriela
 - Teléfono: 58811386
 - Universidad: Universidad Nacional Autónoma de México
 - Facultad: Facultad de Ciencias
 - Carrera: Biología
 - Número de cuenta: 306286928
2. Datos del tutor
 - Grado: Doctora
 - Nombre (s): Rosa Laura
 - Apellido paterno: Camarena
 - Apellido materno: Mejía
3. Datos del sinodal 1
 - Grado: Doctor
 - Nombre (s): Sebastián
 - Apellido paterno: Poggio
 - Apellido materno: Ghilarducci
4. Datos de sinodal 2
 - Grado: Doctor
 - Nombre (s): Georges
 - Apellido paterno: Dreyfus
 - Apellido materno: Cortés
5. Datos del sinodal 3
 - Grado: Doctor
 - Nombre (s): Luis
 - Apellido paterno: Servín
 - Apellido materno: González
6. Datos del sinodal 4
 - Grado: Maestra en Ciencias
 - Nombre (s): Georgina
 - Apellido paterno: Nieto
 - Apellido materno: Castañeda
7. Datos del trabajo escrito
 - Título: La exportación de los componentes flagelares y su relación con la división celular de *Caulobacter crescentus*
 - Número de páginas: 65
 - Año: 2017

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por abrirme sus puertas y brindarme sus recursos para mi formación y educación.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por permitirme utilizar sus instalaciones para la realización de este trabajo.

A mi asesora, la Dra. Rosa Laura Camarena Mejía, agradezco profundamente el apoyo, asesoramiento y enseñanzas recibidas durante la realización de este trabajo.

A la Q.F.B. Aurora Ventura Osorio Franco, por el apoyo técnico en la realización de este trabajo.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM. El desarrollo de este proyecto fue parcialmente financiado por los apoyos de PAPIIT/UNAM IN204317 y CONACyT CB-2014-235996.

Gracias también...

A mis mentores, todos ustedes, quienes me enseñan cómo caminar por cualquier sendero:

A mis padres, quienes siempre han confiado en mí y me han acompañado en todas mis aventuras, por más diversas que sean: arqueología, literatura, biología o mercadeo. Gracias por darme siempre un espacio lleno de amor, ciencia y libertad.

A ti, Gerardo, por enseñarme la vida desde otros ojos (*negros, piel canela*); por ser esposo, amigo, *coach* y profesor.

A mis hermanos, por no dejarme ganar en el Turista Mundial y prepararme para el mundo real. Pero sobre todo por cuidarme.

A mis amigos, Andrea y Juan Pablo, por ser confidentes, apoyo y permanecer. Gracias monitos.

A Laura y Sebastián, por enseñarme a hacer ciencia, por retarme y hacerme aprender... y por la paciencia.

Soy afortunada de tenerlos en mi vida. Gracias por todo.

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras.....	págs.6-7
Resumen.....	pág.8
Introducción.....	págs.9-22
Hipótesis.....	pág.23
Objetivo general.....	pág.23
Objetivos particulares.....	pág.23
Materiales y Métodos.....	pág.24
Resultados	
Generación de mutantes en <i>flil</i> por delección.....	págs.34-43
Caracterización fenotípica de cepas Ccr Δ flil (UPDO) Ccr Δ flil::aadA (UPaadDO)	págs.43-52
Aislamiento y caracterización del fenotipo de cepas que expresan versiones de Flil mutantes en los dominios de hidrólisis y unión del ATP.....	págs.52-56
Discusión.....	págs.57-58
Conclusiones.....	pág.59
Perspectivas.....	pág.60
Referencias.....	pág.61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfogénesis de <i>C. crescentus</i>	pág.9
Figura 2. Representación circular del genoma de <i>C.crescentus</i>	pág.10
Figura 3. Expresión de los reguladores maestros DnaA, GcrA, CtrA, SciP y CcrM en función del desarrollo del ciclo celular de <i>C. crescentus</i>	pág.11
Figura 4. Eventos celulares asociados con el desarrollo de <i>C. crescentus</i>	pág.12
Figura 5. Estructura general del flagelo bacteriano.	pág.14
Figura 6 A y 6B. Componentes del motor flagelar y del rotor.	pág.15
Figura 7. Esquema del aparato de exportación flagelar.....	pág.16
Figura 8. Mecanismo para la exportación de las proteínas flagelares	pág.17
Figura 9 Jerarquía flagelar de <i>Caulobacter crescentus</i>	pág.19
Tabla 1. Cepas y vectores utilizados.	pág.25-28
Tabla 2. Oligonucleotidos utilizados en este trabajo.	pág.29
Figura 10. Esquema general que ilustra los eventos de recombinación necesarios para lograr el remplazamiento alélico.	pág.35
Fig. 11. Esquema de la región cromosomal aledaña a <i>fliI</i>	pág.36
Fig. 12. Productos de PCR UP y DO.	pág.37
Fig. 13 Producto de PCR de los fragmentos ligados UP y DO.	pág.37
Fig. 14. Análisis de los plásmidos pTOPO-UPDO.	pág.38
Fig. 15. Análisis del plásmido pTZ19RBamHI- UPDO.	pág.39
Figura 16. Esquema del mapa final correspondiente al plásmido pNTPS138 UPaadDO.	pág.40

Fig. 17. Análisis del producto de PCR de la región del gen <i>fliI</i>	pág.42
Figura 18. Análisis por PCR del genoma de la cepa Ccr $\Delta fliI::aadA$ (UPaadDO).	pág.43
Figura 19. Microscopía de contraste de fases de las células silvestre y mutante en <i>fliI</i> (Ccr $\Delta fliI::aadA$ (UPaadDO).	pág.44
Figura 20. Microscopía de contraste de fases de las células silvestre y mutante en <i>fliI</i> (Ccr $\Delta fliI::aadA$ (UPaadDO)	pág.45
Figura 21. Caja Petri con inóculos para evaluar el nado	pág.46
Figura 22. Nado de las cepas silvestres y mutantes en <i>fliI</i> en cajas de agar suave....	pág.46
Figura 23. Nado de las cepas complementadas con el gen <i>fliI</i> en cajas de agar suave.....	pág.46
Figura 24. Morfología de la cepa Ccr $\Delta fliI$ (UPDO) pXfiiI.	pág. 49
Figura 25. Nado de las cepas mutantes $\Delta fliI$ y sus derivados con el alelo <i>ftsZ-yfp</i> (pvan) en cajas de PYE con agar suave y xilosa.....	pág.50
Figura. 26. Observación del anillo FtsZ-YFP en las cepas con la mutación $\Delta fliI$ y $\Delta fliI::aadA$	pág.51
Figura 27. Búsqueda de dominios conservados en FliI de <i>C. crescentus</i>	pág 53
Fig. 28. Morfología de la cepas que expresan FliI, FliID254N y FliIK170N	págs.54-55

RESUMEN

Caulobacter crescentus ha sido objeto de estudio principalmente debido a su peculiar ciclo celular asimétrico, con dos formas celulares: flagelada y prostecada. La célula prostecada tiene una forma de vida sésil y es la única de las formas celulares con capacidad replicativa, generándose una sola célula hija flagelada por ciclo. La síntesis flagelar de este organismo diverge en varios aspectos del mismo proceso en otras bacterias. La diferencia más notable es que existe un alto grado de sincronización entre la síntesis flagelar y la replicación celular. Los genes responsables de la síntesis flagelar se expresan jerárquicamente y se dividen en cuatro clases (Clases I a IV) con dos puntos de control (checkpoints), que funcionan como vínculo entre la replicación y la formación del flagelo. Concretamente, los genes de Clase II corresponden a aquellos que son parte del aparato de exportación y de los anillos MS y C; una vez formados estos elementos que funcionan como el primer punto de control, la proteína FliX, respondiendo a una señal desconocida, se disocia de la proteína activadora FliD, lo que resulta en la activación transcripcional de los genes dependientes del factor σ^{54} (Clase III) y posteriormente, ocurre la expresión de los genes de Clase IV (Gober *et al.*, 1995). Estudios realizados con mutantes afectadas en la expresión de los genes de Clase II demostraron que estas células exhiben una inhibición en la citocinesis con lo que la interdependencia de la replicación celular y la síntesis flagelar, se hace evidente. Dentro de los elementos que forman parte de los genes de clase II, se encuentra FliI, componente del aparato de exportación que se encarga de la hidrólisis del ATP, aportando energía al sistema y logrando la secreción de sustratos al lumen del flagelo naciente (Anderson *et al.*, 2010). En este trabajo, se pretende analizar el papel que FliI podría jugar sobre la citocinesis. Se quiere determinar si la señal que activa la expresión de los genes de clase III tiene que ver con la presencia de un elemento estructural que es *sensado*, o bien, con la exportación de algún sustrato hasta ahora desconocido. El análisis morfológico de cepas que expresen variantes de *fliI* con cambios puntuales que provoquen una reducción de la hidrólisis de ATP y que por ende afecten la exportación, dará indicios sobre si la secreción es esencial para evitar la inhibición de la citocinesis.

INTRODUCCIÓN

Generalidades

Caulobacter crescentus es una bacteria Gram negativa perteneciente al grupo de las alfa-proteobacterias, pertenece a la familia Caulobacteraceae la cual se distingue por presentar, en algún momento de su ciclo celular, una proyección no ramificada en forma de tallo llamada prosteca cuya pared es continua con la de la célula (Pointdexter, 1964a). *Caulobacter crescentus* se distribuye ampliamente en ambientes oligotróficos acuáticos y se adhiere al sustrato mediante la prosteca ubicada en uno de los polos de la célula. (Pointdexter, 1981)

C. crescentus se divide asimétricamente y presenta dos formas celulares: una forma flagelada móvil y una forma sésil prostecada. De ellas, sólo la forma prostecada posee capacidad replicativa y en cada división se genera una célula hija con un solo flagelo polar. La célula flagelada nada por un período corto de tiempo para después perder su flagelo de manera concomitante a la formación de la prosteca. (Fig. 1) (Pointdexter, 1964b).

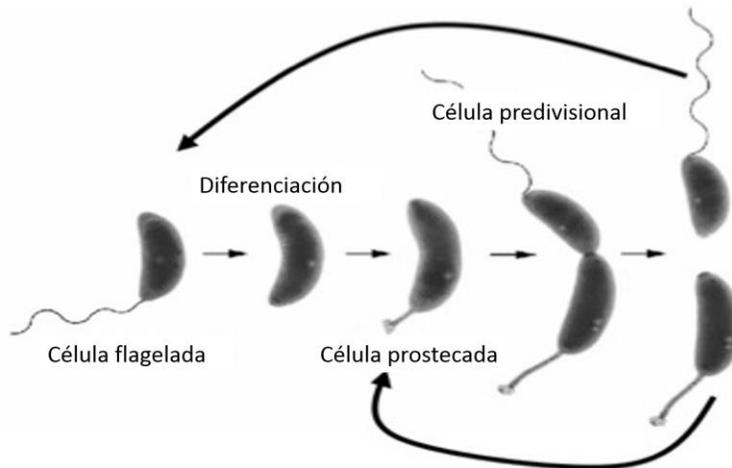


Figura 1. Morfogénesis de *C. crescentus*.

El genoma de *C. crescentus* CB15 (cepa silvestre) consiste de un solo cromosoma circular de 4,016,942 pares de bases (pb), con un contenido de G+C promedio del

67.2%, en el cual se han identificado 3,767 genes (**Fig 2**) (Nierman *et al.*, 2001). Mediante mutagenesis hiper-saturante por transposón acoplada a secuenciación masiva se determinó el genoma esencial a 8 pb de resolución, identificándose 480 ORFs, 402 secuencias regulatorias y 130 elementos no codificantes que incluyen 90 regiones intergénicas de función desconocida. El circuito esencial transcripcional para su crecimiento en medio rico incluye 10 factores de transcripción, 2 factores sigma de la RNA polimerasa y un factor anti-sigma. (Christen, *et al.*, 2011).

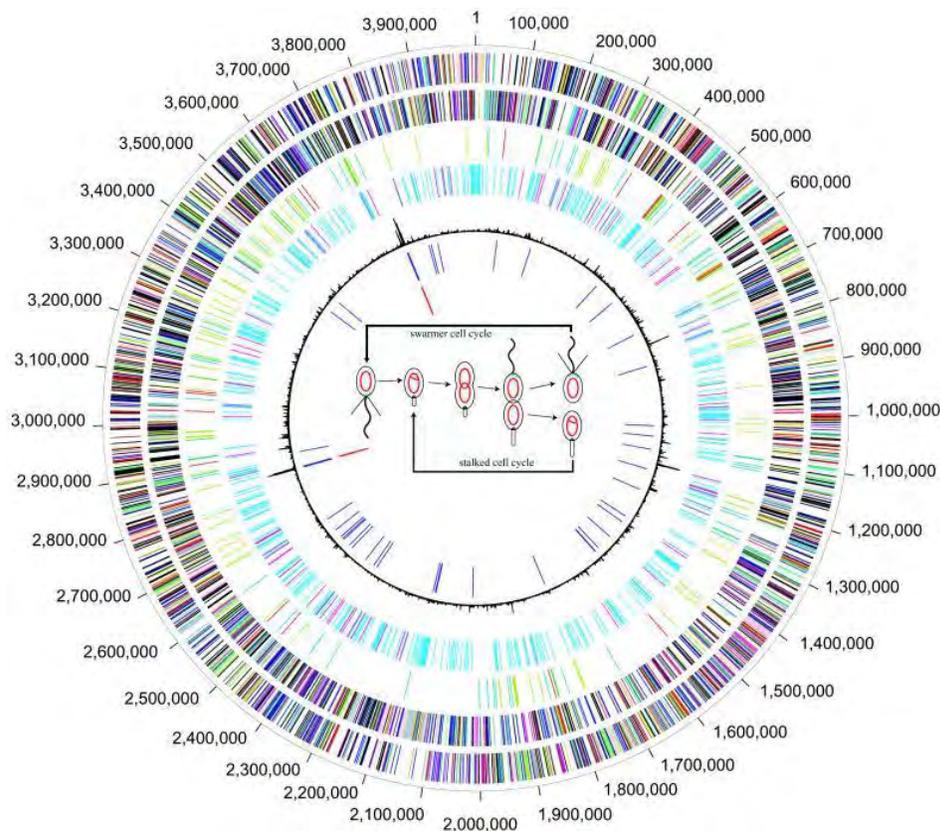


Figura 2. Representación circular del genoma de *C. crescentus*. Las coordenadas en la parte exterior del círculo están expresadas en pares de bases (pb). El primer círculo de afuera hacia adentro representa las regiones codificantes en la cadena sentido; el segundo círculo en la cadena antisentido. El tercer círculo indica los genes involucrados en motilidad y quimiotaxis. El cuarto círculo, los genes regulados por el ciclo celular. El quinto círculo la composición de nucleótidos. El sexto círculo representa los tRNAs. El séptimo círculo, representa los rRNAs (Nierman *et al.*, 2001).

Ciclo celular

El control del ciclo celular en *C. crescentus* involucra cinco proteínas reguladoras de las llamadas “maestras”: DnaA, GcrA, CtrA, SciP, y CcrM. Las cuatro proteínas son sintetizadas de manera sucesiva para permitir que ocurra un determinado patrón de expresión genética que controla los eventos característicos asociados a la progresión del ciclo celular (**Fig. 3**).

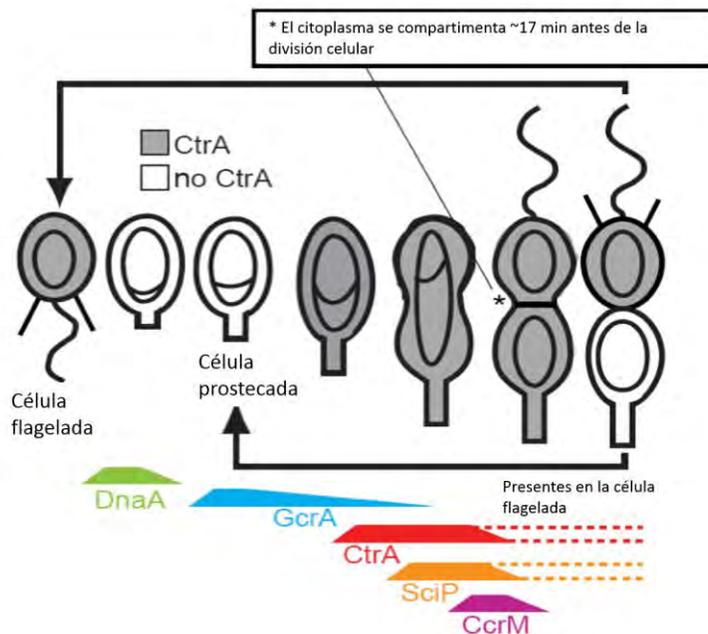


Figura 3. Expresión de los reguladores maestros DnaA, GcrA, CtrA, SciP y CcrM en función del desarrollo del ciclo celular de *C. crescentus*.

Además, el control del ciclo celular incluye una gran cantidad de proteínas regulatorias y mecanismos de tipo epigenético que proveen de señales de retroalimentación para completar cada uno de los procesos celulares (construcción del flagelo, replicación, metilación del cromosoma, división celular, etc.) (Laub *et al.*, 2007). En el ciclo de esta bacteria la célula flagelada es incapaz de iniciar la replicación del DNA (fase G1). Después de un periodo como células no-replicativas, las células flageladas pierden los pili y el flagelo y se diferencian en células prostecadas, dando inicio la replicación del DNA y la división celular (fase S). La célula prostecada se elonga para producir los dos tipos celulares y la célula hija

inicia el ensamblaje de su flagelo (Amick y Brun, 2001). Al final de la fase G2 se activa la rotación del flagelo y se completa la separación celular (citocinesis). Las células hijas flageladas deben diferenciarse antes para poder iniciar la replicación del DNA, mientras que las células prostecadas pueden replicarse inmediatamente después de la división celular (**Fig. 4**). La célula prostecada representa un tipo celular diferenciado terminalmente pues no se ha registrado a la fecha una reversión hacia el tipo celular flagelado (Curtis y Brun, 2010).

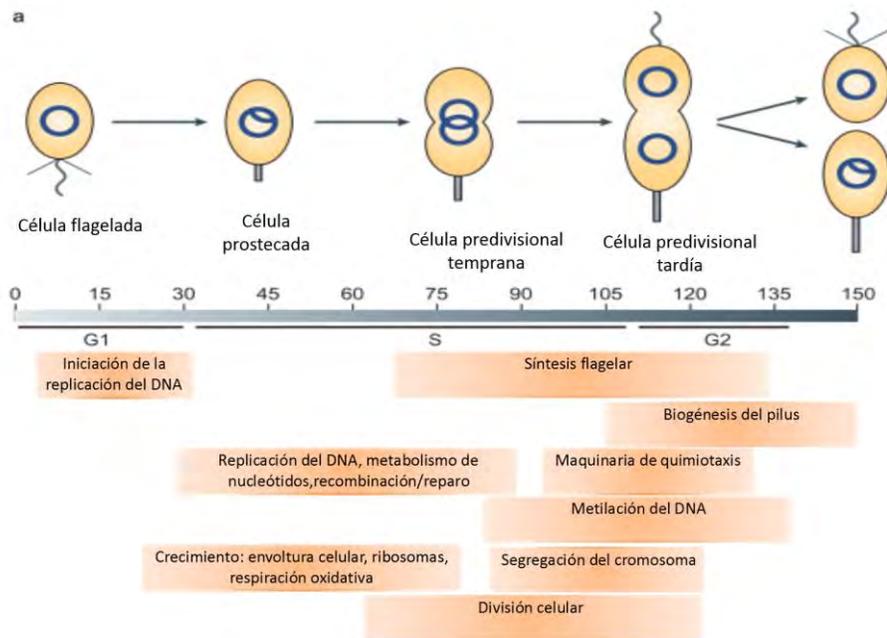


Figura 4. Eventos celulares asociados con el desarrollo de *C. crescentus*. Skerker y Laub, 2007.

La diferenciación celular, el establecimiento de la polaridad de la célula, la topología del cromosoma en sus diferentes estadios celulares y los patrones de metilación de éste, permiten hablar de un desarrollo celular, un término hasta hace poco exclusivo de los eucariontes; incluso, para *Caulobacter crescentus*, se habla de dos programas de desarrollo: el cíclico, correspondiente a la célula replicante y el acíclico, correspondiente la célula flagelada (Curtis y Brun, 2010).

Síntesis flagelar

Durante el estadio estadio predivisional se sintetiza el flagelo. El flagelo se extiende desde el citoplasma hasta el espacio extracelular y funciona, a la vez como un organelo de movilidad y un sistema de exportación de proteínas. La mayoría de los estudios de este apéndice se han realizado en *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*, a partir de dichos estudios se han construido modelos que parecen reflejar apropiadamente el funcionamiento y la arquitectura de los flagelos de eubacterias.

La estructura del flagelo consiste de las siguientes partes: El cuerpo basal, compuesto por el anillo MS, localizado en la membrana interna, el aparato de exportación, el eje que atraviesa el espacio periplásmico, y los anillos P y L, localizados en el espacio periplásmico y la membrana externa, respectivamente; el gancho, que es la primera estructura extracelular, adopta una estructura cilíndrica que funciona como una bisagra y el filamento, cuyas subunidades se empaquetan diferencialmente, permitiéndole adoptar su estructura helicoidal (**Fig. 5**).

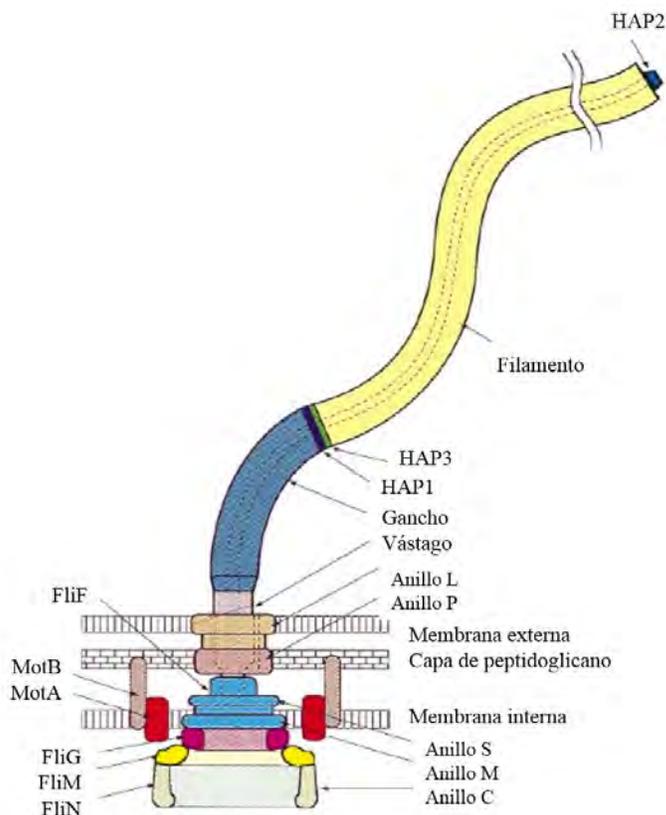


Figura 5. Estructura general del flagelo bacteriano. El cuerpo basal se expande desde el citoplasma hasta la membrana externa. El gancho (en azul) es la primera estructura extracelular y sobre esta estructura se ensambla el filamento helicoidal (amarillo). Modificado de Minamino et al.(2008).

El motor flagelar, se conforma por el estator y el rotor. El estator está formado por los complejos MotA/MotB que se arreglan alrededor de la estructura flagelar y se presume que dichos complejos se encuentran asociados a la pared de peptidoglicano (Fig 6A). En la parte citoplásmica del anillo MS, se localizan las proteínas FliG, FliM, y FliN, las cuales junto con las proteínas MotA/B participan en la generación del torque (Macnab, 2003). (Fig. 6B)

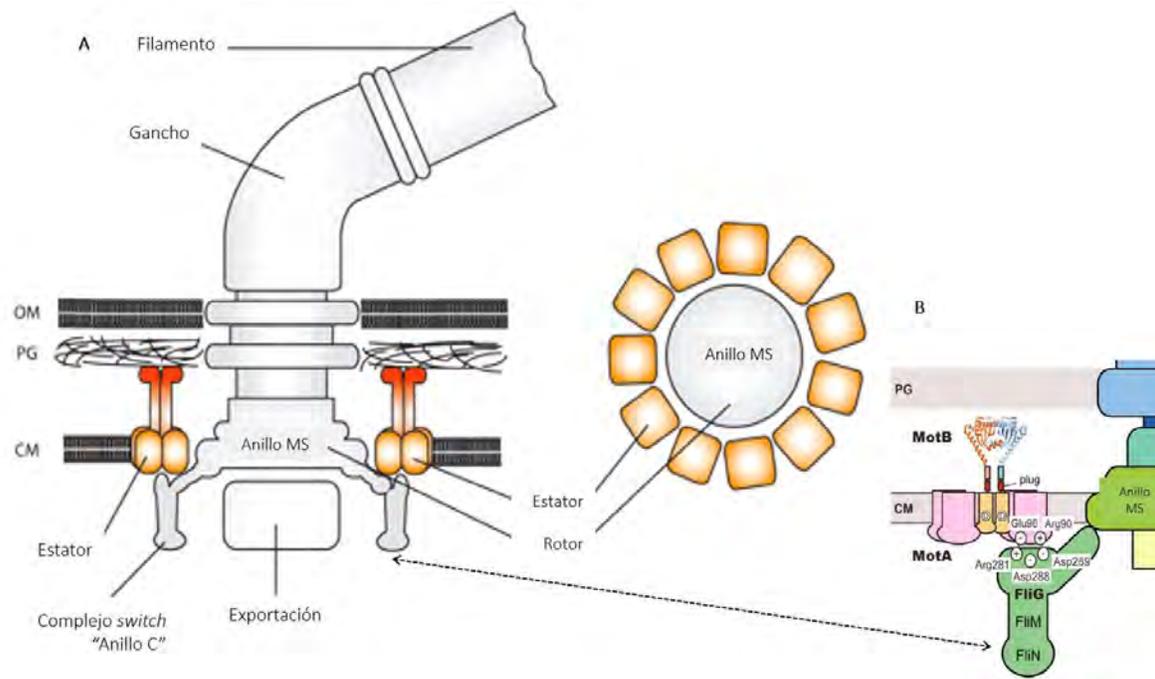
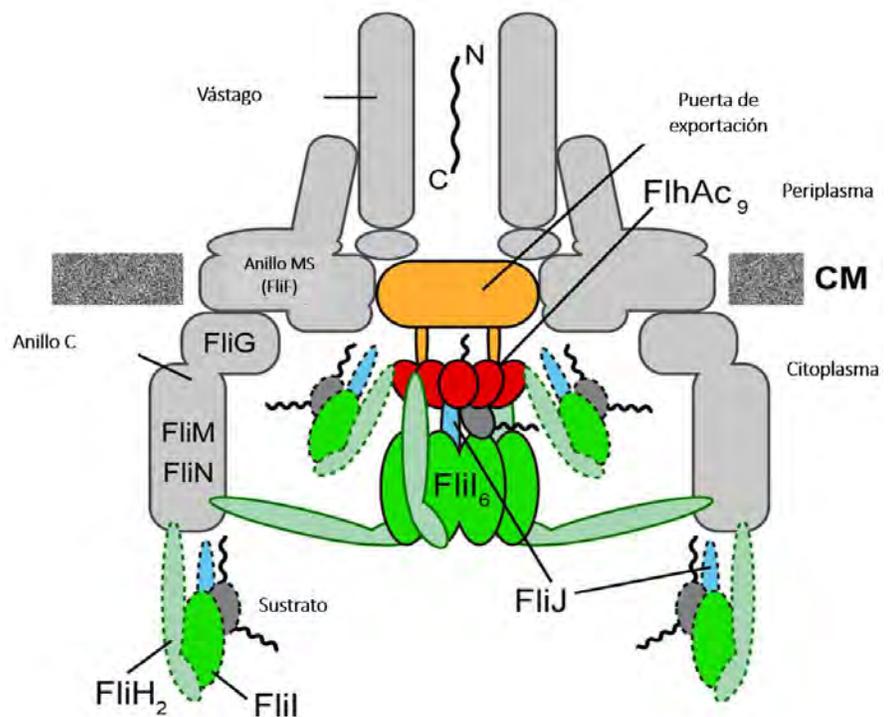


Figura 6 A. Componentes del motor flagelar, en amarillo y naranja se representan las proteínas MotA y MotB que conforman el estator y que como se muestra a la derecha, once complejos MotA/MotB rodean al anillo MS. (B) Esquema que muestra los componentes del rotor involucrados en la generación de torque; de particular importancia para dicho proceso son los residuos cargados presentes en la interfase MotA-FliG. Modificado de Thormann, K. M., & Paulick, A. (2010)

La mayoría de las proteínas que forman la estructura flagelar son exportadas por un sistema de exportación especializado que pertenece a los sistemas de exportación tipo III. El aparato de exportación consiste en una porción ubicada en la membrana, compuesta por seis proteínas: FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ y FliR; y una porción soluble, compuesta por FliH, FliI y FliJ (Imada *et al.*, 2006). Los componentes membranales se localizan en la parte central del anillo MS y de esta forma, los sustratos de exportación son dirigidos hacia el canal central que recorre toda la estructura flagelar (Fig. 7). Durante el ensamblaje, las nuevas subunidades son translocadas hacia la parte más distal de la estructura flagelar creciente, donde con ayuda de chaperonas especializadas, adoptan la conformación plegada.

Figura 7. Esquema del aparato de exportación flagelar que muestra los componentes solubles (FliH, FliI, FliJ) asociados al anillo C a través de la proteína FliN. Los componentes membranales del aparato de exportación se representan como un tapón en la base del flagelo (export gate), y la región C-terminal de la proteína FlhA se extiende hacia el centro del anillo C donde interactúa con el complejo FliI/FliJ/FliH. Modificado de Bai *et al.*, 2014



La secreción de los sustratos es dependiente tanto de la fuerza protón-motriz así como de la hidrólisis de ATP catalizada por la proteína FliI (Minamino y Namba, 2008; Paul *et al.*, 2008). Se piensa que el complejo de proteínas membranales funciona como un cotransportador protón-proteína, y que la fuerza protón-motriz dirige la salida de las proteínas a través del canal central. Previamente, había sido considerado que el papel de las proteínas citoplásmicas del aparato de exportación

(FliH, FliI, FliJ) consistía en reconocer los complejos sustrato-chaperona, remover la chaperona asociada, y desnaturalizar o mantener en dicho estado a las proteínas que serían dirigidas hacia el componente membranal del aparato de exportación (Thomas *et al.*, 2004). No obstante, recientemente la evidencia experimental sugirió que la hidrólisis de ATP en realidad parece ser requerida para provocar la activación de la compuerta de salida del aparato de exportación, lo que involucra un cambio en la conformación de los componentes membranales, mediado por las proteínas FliI y FliJ (Figura 8) (Minamino, 2014). Este cambio de conformación hace más eficiente el proceso de formación del flagelo.

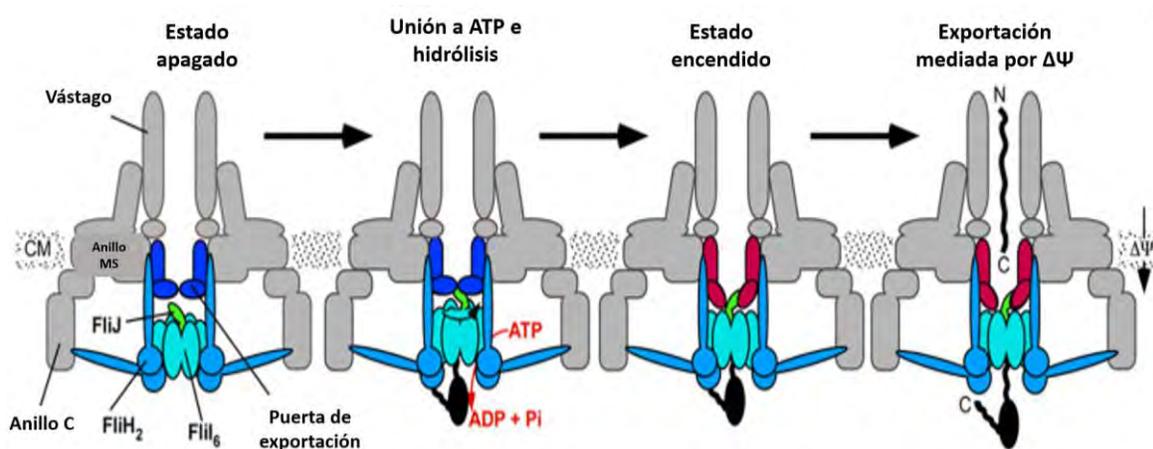


Figura 8. Mecanismo para la exportación de las proteínas flagelares basado en la hidrólisis de ATP como forma de activación de los componentes membranales del aparato de exportación, que en dicho estado, son competentes de llevar a cabo la exportación mediante la fuerza protón-motriz. Modificado de Bai *et al.*, (2014)

En *Salmonella enterica*, la proteína flagelar FliI consta de 456 aminoácidos (50 kDa), y presenta dos dominios conservados de tipo Walker (Brown *et al.*, 2009): el motivo A, que es un sitio de unión a ATP, y el motivo B, relacionado con la unión a Mg²⁺ (Walker *et al.*, 1982). La proteína FliI presenta homología con las subunidades α y β de la F₀F₁-ATP sintasa (Imada *et al.*, 2006). Sin embargo, a diferencia de las subunidades α y β de la ATP sintasa que forman un hetero-hexámero, FliI forma un homo-hexámero; en esta conformación la actividad de ATPasa es fuertemente estimulada (Claret, *et al.*, 2003), de acuerdo a lo anterior, se observó que *in vitro*, la unión de ATP-Mg promueve la formación del hexámero de FliI, mientras que la

hidrólisis de ATP y la liberación de ADP desestabiliza la estructura (Kazetani, *et al.*, 2009.). Sin embargo, recientemente fue observado que *in vivo* el uso de versiones de FliI con defectos en la hidrólisis de ATP no altera el número de moléculas (FliI-YFP, *yellow fluorescent protein*) asociadas al filamento-cuerpo basal, ni la tasa de recambio de estas, lo cual indica que la hidrólisis de ATP no dirige el ciclo de asociación-disociación de FliI a la estructura flagelar (Bai, *et al.*, 2014).

La proteína FliI puede interactuar con dos proteínas flagelares adicionales, FliJ, la cual se une al centro del hexámero de FliI lo que favorece y estabiliza dicha estructura (Fig. 8) (Ibuki T., 2011). Sin embargo, además del hexámero, FliI también forma un heterotrímero con un dímero de la proteína flagelar FliH, la cual inhibe su actividad de ATPasa (Okabe *et al.*, 2009; Minamino y Macnab, 2000). Dado que este complejo une los sustratos que serán exportados, se considera que el complejo FliH₂FliI lleva o entrega los sustratos del citoplasma hacia el aparato de exportación (Thomas *et al.*, 2004 y Minamino *et al.*, 2012) lo cual es favorecido por la interacción de FliH con FliN (Fig. 8) (Minamino *et al.*, 2009).

En el genoma, de *Salmonella* y en el de *C. crescentus*, inmediatamente después del gen *fliI*, se encuentra *fliJ*, y forman una sola unidad transcripcional (Stephens *et al.*, 1997).

En *Caulobacter crescentus*, al igual que ocurre en muchas otras bacterias, la formación del flagelo depende de una serie de genes que se expresan de manera jerárquica. En esta bacteria la jerarquía flagelar consta de cuatro clases de genes (**Fig. 9**). La primera clase incluye al regulador maestro CtrA que, en su forma fosforilada, forma un dímero con gran afinidad por el DNA. La forma activa de CtrA se une a cinco sitios de la región del *Cori* (origen de replicación) previniendo la unión de DnaA y de IHF y manteniendo así, la replicación arrestada en la célula flagelada (Curtis y Brun, 2010). Asimismo, CtrA-P activa directamente la transcripción de los genes flagelares de la clase II; en este nivel de la jerarquía se encuentran los genes que codifican para los componentes del aparato de exportación, FliF (anillo MS) y las proteínas FliM, FliN y FliG, así como las proteínas regulatorias FliX y FliD. Con la formación del anillo MS, FliX se disocia de FliD respondiendo a una señal

desconocida. Posteriormente, la fosforilación de FlbD resulta en la activación transcripcional de los genes de la clase III y clase IV, que son dependientes del factor σ^{54} y FlbD-P (Gober *et al.*, 1995). FliX y FlbD vinculan la síntesis del flagelo con la división celular, pues se ha observado que mutantes en *flbD* o en los genes flagelares de clase II exhiben un retraso en la citocinesis (Anderson *et al.*, 2009).

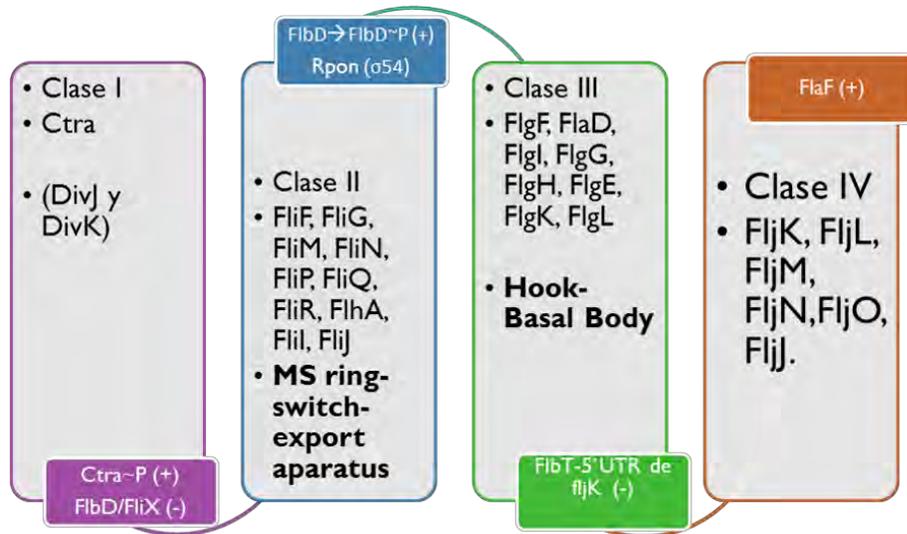


Figura 9 Jerarquía flagelar de *Caulobacter crescentus*

Interdependencias y puntos de control del ciclo celular

C. crescentus exhibe una alta complejidad en la regulación de su ciclo celular y la progresión de éste requiere de la precisa coordinación temporal de eventos morfológicos y celulares. Se sabe que la división celular depende de la replicación y segregación exitosa del cromosoma (Collier y Shapiro, 2007). Para explicar los mecanismos moleculares de estas dependencias existen dos modelos: 1) relación de sustrato-producto y 2) puntos de control.

El mecanismo de sustrato-producto se refiere a aquellos procesos en los que cada paso metabólico resulta en la formación de un sustrato esencial para la adición o síntesis del siguiente. El orden en que se ensamblan los distintos elementos de un

proceso de este tipo, es controlado por las interacciones fisicoquímicas entre proteínas y por los cambios conformacionales que se derivan del correcto ensamblaje. En el caso del ensamblaje del bacteriófago T4 por ejemplo, la adición de una subunidad causa un cambio conformacional que hace disponibles sitios activos para la adición de la siguiente subunidad. En este mecanismo, un proceso complejo puede estar precisamente ordenado sin necesidad de factores extrínsecos, pues los componentes del proceso mismo tienen ya interacciones intrínsecas (Skerker y Laub, 2004).

Por otra parte, el mecanismo mediado por puntos de control puede dominar la ejecución de diferentes eventos del ciclo celular. Un punto de control del ciclo celular se define como un mecanismo de vigilancia, que en caso de no terminarse el evento A, regula negativamente el evento B. Este sistema es ajeno a los eventos mismos, porque los componentes del punto de control no están involucrados directamente en la ejecución de cualquiera de los eventos. Por ejemplo, si los cromosomas replicados son substratos esenciales para la mitosis, entonces la dependencia se debe a un mecanismo substrato-producto; por otro lado si la dependencia se debe a un inhibidor de la mitosis producido en respuesta a cromosomas sin replicar, entonces hablaríamos de un mecanismo que involucra un punto de control (Hartwell y Weinert, 1989).

C. crescentus tiene un programa de desarrollo con eventos no aislados uno del otro, sino que funcionan como procesos interdependientes. De forma que varios puntos de control deben ocurrir para asegurar la correcta progresividad del ciclo celular y los eventos de desarrollo. Existen redes de transducción de señales que regulan dichos procesos integrando señales de la replicación celular, división celular y desarrollo; así como regulando en el tiempo la expresión génica y controlado la localización espacial dinámica de las diferentes proteínas en los diferentes estadios del desarrollo.

Acoplamiento de la síntesis flagelar al ciclo celular.

En *C. crescentus* la expresión de los genes flagelares está organizada en una jerarquía que consta de cuatro clases. En la clase I se encuentra el regulador maestro, CtrA, que controla la expresión de los genes flagelares de la clase II. Dado que CtrA es un regulador global que a su vez es controlado mediante señales generadas durante el ciclo celular, resulta claro entender como el inicio de la expresión de los genes flagelares ocurre en un punto determinado del desarrollo. Los genes de la clase II codifican en su mayor parte para proteínas de la estructura de la membrana interna y el aparato secretor; cepas con mutaciones en alguno de los genes de la clase II no forman flagelo y exhiben defectos en la citocinesis (Dingwall *et al.*, 1992; Gober *et al.*, 1995; Zhuang y Shapiro, 1995). No obstante, mutaciones puntuales que simulan el estado fosforilado o activo de FlbD (activador transcripcional de los genes de la clase III), suprimen el defecto en la citocinesis y restauran la expresión de los genes de clase III y IV, aún en ausencia de los componentes de clase II (Mangan *et al.*, 1995; Muir y Gober, 2002).

A partir de lo anterior, se ha considerado que la formación y el funcionamiento del aparato de exportación podría ser parte de la señal que permite la activación de FlbD. La proteína FlbD es un activador transcripcional de la RNA polimerasa asociada al factor sigma 54 (Ramakrishnan y Newton, 1990). Los activadores de σ^{54} , usualmente son activados por fosforilación en su dominio N-terminal (Studholme y Dixon, 2003). Sin embargo, FlbD no parece ser fosforilado y se ha involucrado a la proteína FliX como un modulador de la actividad de FlbD (Muir y Gober, 2004). Las cepas mutantes en *fliX* presentan el fenotipo característico de las cepas mutantes en los genes de clase II, esto es, no ensamblan flagelo, no expresan los genes de clase III/IV, y muestran defectos en la citocinesis (Mohr *et al.*, 1998). Dado que, mutaciones secundarias en *flbD* restauran la expresión de los genes de clase III/IV en el fondo genético *fliX*, se ha propuesto que FliX es un regulador que impide la activación de FlbD pero que a su vez es necesario para su activación (Muir *et al.*, 2001). Se ha demostrado que FliX se une a FlbD e inhibe la activación de los promotores flagelares de clase III y IV (dependientes de σ^{54}) en ausencia de la

estructura formada por las proteínas codificadas en la clase II, pero en presencia de dicha estructura, FliX estimula la actividad transcripcional de FliB favoreciendo la formación de oligómeros, los cuales representan la forma funcional para mediar la activación del factor σ^{54} (Dutton *et al.*, 2005).

A la fecha se desconocen los mecanismos que vinculan la formación y/o el funcionamiento del aparato de exportación con la activación de FliX/FliB y por ende con el control de la citocinesis. Una primera aproximación para discernir si la estructura misma o su funcionamiento eran responsables de los defectos de división observados en las mutantes de clase II, consistió en aislar tres mutaciones puntuales en el gen *fliI*, las cuales presumiblemente afectarían la actividad de ATPasa y por ende se contaría con una estructura completa pero inactiva. Los resultados publicados establecen que las versiones mutantes de *fliI* no restauran la capacidad de nado. Sin embargo, en dicho estudio no se realizó un análisis detallado del fenotipo de las células, y no fue reportada la morfología de las células que expresaron los alelos mutantes del gen *fliI* (Stephens *et al.*, 1997).

Recientemente, fue reportado que en *Campylobacter jejuni*, es necesaria la formación de la estructura correspondiente al anillo MS acoplado a las proteínas del rotor, principalmente, FliG y las del aparato de secreción, para lograr la activación de la cinasa FlgS, la cual enciende la transcripción de los genes flagelares involucrados en la formación del eje, el gancho, etc. En este trabajo se demostró que FlgS inmunoprecipita con FliG y FliF, pero de forma dependiente del sistema de secreción, lo que sugiere que la formación de la estructura misma es la señal que activa la expresión de los genes flagelares ubicados abajo de este nivel en la jerarquía (Boll y Hendrixson, 2013).

Una situación similar ocurre en *Helicobacter pylori*, en donde la cinasa FlgS interactúa con los primeros 25 residuos de la proteína FliA, aunque esta interacción no promueve la autofosforilación de la proteína. Estos resultados apuntan a que la interacción directa de la cinasa FlgS con la estructura flagelar podría ser la señal, o parte de ésta, para estimular la autofosforilación de FlgS y continuar con la expresión de los genes flagelares de clase III (Tsang *et al.*, 2015)

En este punto vale la pena mencionar que FliX no se encuentra presente en *H. pylori*, ni en *C. jejuni*, lo que hace suponer que el mecanismo de activación de la cinasa FliD, puede ser completamente distinto. FliX se encuentra conservado en algunas α -proteobacterias de los géneros *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Methylobacterium*, etc.

Por lo anterior, consideramos necesario evaluar en este trabajo, si en *Caulobacter crescentus* la formación de la estructura ensamblada a partir de la expresión de los genes de clase II, o el funcionamiento del aparato de exportación son indispensables para la consecución de la citocinesis.

HIPÓTESIS

La expresión de los genes flagelares de clase III (y por ende, el éxito en la división celular), depende de la funcionalidad del aparato de exportación.

OBJETIVO GENERAL

Establecer si la expresión de los genes flagelares de Clase III está determinada por la formación de la estructura flagelar compuesta por las proteínas de clase II o bien, por la funcionalidad del sistema de secreción.

OBJETIVOS PARTICULARES

Aislar y caracterizar cepas de *Caulobacter crescentus* mutantes por delección del gen *fliI* que sean incapaces de sintetizar la proteína.

Aislar y caracterizar cepas de *Caulobacter crescentus* con mutaciones puntuales en el gen *fliI* que abatan la capacidad de la proteína para hidrolizar ATP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y plásmidos

En el curso de este trabajo se utilizaron las cepas bacterianas y vectores descritos en la siguiente tabla:

Tabla 1. Cepas y vectores utilizados.		
Cepa/vector	Genotipo/Descripción	Referencia
CB15N	<i>C. crescentus</i> silvestre	Evinger y Agabian, 1977
E. coli TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 nupG recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15</i> <i>galK16 rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> λ -	Invitrogen™
Ccr Δ <i>fliI</i> (UPDO)	CB15N Δ <i>fliI</i>	Este trabajo
Ccr Δ <i>fliI::aadA</i> (UpaadDO)	CB15N Δ <i>fliI::aadA</i>	Este trabajo
Ccr Δ <i>fliI</i> (UPDO) <i>pxyl-fliI</i>	Ccr \square <i>fliI</i> complementada con pXTCYC5 <i>fliI</i> ⁺ (oligos desde metionina inicial TTG) inducible por xylosa.	Este trabajo

Ccr $\Delta flil::aadA$ UPaadADO pxyl- <i>flil</i> ⁺	Ccr $\square flil::aadA$ complementada con PXTCYC5 <i>flil</i> ⁺ (oligos desde metionina inicial TTG) inducible por xylosa.	Este trabajo
CB15N 3229 pvan-ftsZ- YFP	Cepa donadora para seguimiento del anillo Z	Trabajos anteriores del laboratorio
Ccr $\Delta flil$ (UPDO) pvan-ftsZ-yfp		Este trabajo
Ccr $\Delta flil::aadA$ (UPaadDO) pvan-ftsZ-yfp		Este trabajo
Ccr $\Delta flil$ (UPDO) pvan-ftsZ-yfp pxyl- <i>flil</i> ⁺		Este trabajo
Ccr $\Delta flil::aadA$ (UPaadDO) pvan-ftsZ-yfp pxyl- <i>flil</i> ⁺		Este trabajo
Ccr $\Delta flil$ (UPDO) Φ pxyl- <i>flil</i> D254N	Mutante puntual. Asp-254 sustituido por Asn.	Este trabajo
Ccr $\Delta flil::aadA$ (UPaadDO) pxyl- <i>flil</i> D254N	Mutante puntual. Asp- 233 sustituido por Asn	Este trabajo
Ccr $\Delta flil$ (UPDO) pxyl- <i>flil</i> K170E	Mutante puntual. Lys- 170 sustituido por Glu.	Este trabajo

Ccr $\Delta fliI::aadA$ (UPaadADO) pxyl- <i>fliI</i> K170E	Mutante puntual. Lys-170 sustituido por Glu.	Este trabajo
pCR 2.1 TOPO	3931 pb. Vector de clonación diseñado para clonar productos de PCR. Resistencia para Kanamicina y Ampicilina	Invitrogen™
pXCTCYC-5	Plasmido integrativo en el locus de xylosa de 6238 pb. Promotor de Xilosa. Tetraciclina resistente.	Thanbichler <i>et al.</i> , 2007
pXCTCYC-5 <i>fliI</i>	Construcción con <i>fliI</i> nativo para la evaluación de la complementación en las mutantes $\Delta fliI$	Este trabajo
pNTPS-138	5361 pb. Plásmido suicida que contiene region de multiclonación con selección para α -complementación, <i>oriT</i> , <i>sacB</i> . Kan ^R	Dickon Alley sin publicar.
pNTPS-138 $\square fliI$ (UPDO)		Este trabajo
pNTPS-138 $\Delta fliI::aadA$ (UPaadDO)		Este trabajo

pTZ19R BamH1 ⁻	Plásmido de clonación de 2863 pb, sin sitio de restricción para BamHI	Trabajos anteriores del laboratorio.
ΦCR30	Fago para transducción general en <i>Caulobacter crescentus</i> .	Ely y Johnson, 1977
ΦCR30 pXTCYC5-flil	Fago propagado en la cepa con el plásmido pXTCYC5- <i>flil</i> ⁺ integrado (en el locus de xylosa).	Este trabajo
ΦCR30 pXTCYC5- flil K170E	Fago propagado en la cepa con el plásmido pXTCYC5- <i>flil</i> K170E integrado (en el locus de xylosa)	Este trabajo
ΦCR30 pXTCYC5-flil D254N	Fago propagado en la cepa con el pXTCYC5 <i>flil</i> D254N integrado (en el locus de xylosa)	Este trabajo

Tabla 2. Oligonucleotidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia
fliUP1	5' GCG AATTC CTACAAGGACCAGAGCCGCG 3'
fliUP2	5' GCG GATCCC GCGCACCTCGATCAGCAGC 3'
fliDO1	5' GCG GATCCC GATGACTCTTTCTGGGATGC 3'
fliDO2	5' GCG AATTC CAGATTGTCCGGTCCAGGCCG 3'
fliInde	5' CATATGCGTAGCCTCATCGCCGCC 3'
fliCooh	5' GAATTCGACCTCGTGGTTGGAGAT 3'
fli K170E Fw	5' GCTCGGGCGTCCGGC GAG TCCGGTGCTGCTGTC 3'
fli K170E Rv	5' GACAGCAGCACCGACTCGCCGACGCCCGAGC 3'
fli D254N Fw	5' GTGCTGTGCCTGATG AAC TCCGGTCACCCGCTTC 3'
fli D255N Rv	5' GAAGCGGGTGACCGAGTTCATCAGGCACAGCAC 3'
AAD1Bam	5' GCGGATCCCCTGAAGCCAGGGCAGATCCG 3'
AAD2Bam	5' GCGGATCCTCATGATATATCTCCCAATTTG 3'

Preparación de medios de cultivo.

E. coli fue crecida en medio LB, (Para 1 L: 10 g de bactopectona, 5 g de extracto de levadura y 10 g NaCl). Para cultivos en medio sólido se agregaron 15 g/l de bacto-agar. Se añadieron los antibióticos necesarios, en las siguientes concentraciones: ampicilina 150 µg/ml, kanamicina 50 µg/mL y gentamicina 30 µg/mL. Los cultivos se incubaron a 37°C.

C. crescentus fue crecida en medio PYE y M2G dependiendo del protocolo a seguir. Para el medio PYE (1 l: 2 g Bactopectona, 1 g de extracto de levadura, 1 ml de MgSO₄ 1M, y 0.5 ml de CaCl₂ 1M). Para cultivos en medio sólido se agregaron 15 g/l de bacto-agar. Para las cajas de nado se agregó 0.25% de bacto-agar. Medio M2G (sales 1× M2, 0.5 mM MgSO₄, 0.5 mM CaCl₂, 10 µM FeSO₄, 10 µM EDTA, 0.2% w/v glucosa). Para ensayos específicos se agregó ácido vanílico 150 mM final o bien, kanamicina 5 µg/mL (medio líquido) y 20 µg/mL (medio sólido), espectinomomicina 25 µg/mL (medio líquido) y 100 µg/mL (medio sólido), tetraciclina

3 µg/mL y 3.3 µg/mL, gentamicina 2 µg/mL y 5 µg/mL. Los cultivos de *C. crescentus* fueron incubados a 30°C.

Conservación de las cepas en glicerol.

Las cepas bacterianas de interés se conservaron en viales con glicerol al 65% (Buffer MgSO₄ 0.1M y Tris Base 0.025 M pH 8.0) estéril con 750 µL de cultivo en fase estacionaria. El vial se agita por inversión y se congela en hielo seco para almacenarse a -70°C.

Métodos de genética molecular

Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de oligonucleótidos se ubicaron las regiones de interés con el programa Artemis (Rutherford *et al.*, 2010) para luego seleccionar las secuencias que formarían los oligonucleótidos. Con la ayuda del programa DNAMAN se revisó la temperatura de alineamiento, procurando que los pares de oligonucleótidos tuvieran una temperatura similar. También se verificó la ausencia de estructuras secundarias y la ausencia de hibridación entre los pares.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para un volumen final de 50 µL se utilizaron: 25 µL de amortiguador 2x; 6 µL de dNTPs 2 mM, oligonucleótidos: 1 µL oligonucleótido forward 100 pmoles/µL, y 1 µL de oligonucleótido reverse 100 pmoles/ µL, 1 µL de Taq polimerasa; 1 µL de DNA cromosomal de la cepa CB15N a 100 ng/ µL y 14 µL de agua. El programa de PCR incluyó los siguientes pasos, 2 minutos a 92°C; 30 ciclos consistentes en: 94°C por 35 segundos, 56°C por 15 segundos, 72°C por 1 minuto (el tiempo de elongación varía de acuerdo al fragmento a amplificar).

Obtención de plásmido a pequeña escala

Se tomaron 1.5 ml de un cultivo crecido toda la noche, para centrifugarlo durante 1 minuto a 3000 rpm. El paquete celular se resuspendió en 300 µl de solución STET. Se agregaron 25 µl de lisozima (10 µg/mL) e inmediatamente después el tubo se dejó en agua hirviendo por 45 segundos. Se centrifugó 15 minutos a máxima velocidad. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo limpio. Se mezcló bien con 300 µl de isopropanol en hielo. Se centrifugó 20 minutos a máxima velocidad a una temperatura de 4° C. El precipitado se lavó con 700 µL etanol al 70% (frío) y se secó en termoblock con la tapa abierta del tubo. La pastilla se resuspendió en 40 µl de agua estéril.

Purificación de plásmido.

Se utilizó el estuche comercial, Qiagen Plasmid Mini Kit se siguieron las instrucciones del proveedor, con las siguientes modificaciones: se centrifugan 15 mL del cultivo de interés que fue crecido toda la noche, durante 10 minutos a 4000 rpm. Se resuspende el paquete celular en 0.9 del buffer P1 para después añadir 30 µL de RNAsa. El volumen se transfiere luego a tres tubos nuevos para añadir a cada tubo 0.3 ml de buffer P2, mezclando suavemente por inversión de 3 a 5 veces. Se deja incubar a temperatura ambiente durante no más de 5 minutos. Se añaden 350 µL de buffer N3 y se invierte de 3 a 5 veces. Se centrifuga a máxima velocidad a 4°C durante 15 minutos. el sobrenadante se transfiere a un tubo limpio y se recentrifuga 5 min a máxima velocidad. El sobrenadante se pipetea y transfiera a la columna azul para centrifugar nuevamente 1 minuto, se descarta el líquido. Se agregan 500 µL de buffer PB, se centrifuga durante 1 minuto y se descarta. Se añaden 750 µL de buffer PE, se centrifuga durante 1 minuto para volver a descartar. Se realiza una última centrifugación para quitar el exceso de buffer. Después, se pasa la columna a un tubo de 1.5 ml limpio. Se eluye con 50 -35 µL de buffer EB o bien, agua. Se deja reposar 1 minuto y se centrifuga.

Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Se utilizó el estuche comercial de Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit y se siguieron las instrucciones del fabricante

Transformación de *E. coli* mediante electroporación

La celda de electroporación debe enfriarse diez minutos antes de proceder con la transformación. Se añaden 25 ng del DNA de interés a las células electrocompetentes. Se colecta la mezcla de células y DNA y se coloca en la celda (0.2 cm), procurando que la mezcla esté al fondo de la celda. La celda se pone en el electroporador y se le da un pulso eléctrico de 1.8 kV. Inmediatamente debe agregarse 1 ml de medio LB, se colectan las células y se dejan recuperar durante 45 minutos a 37° C. Pasado este tiempo, las células se centrifugan para concentrarlas. Las células se platean en medio selectivo.

Clonación y transformación en *E. coli* de productos de PCR

Se utilizó el estuche comercial TOPO® TA Cloning (Life Technologies) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La Taq polimerasa añade una deoxiadenosina (A) al extremo 3' de los productos de PCR. El vector TOPO®TA se encuentra linearizado con una T sobresaliente en el extremo 3', así el amplicón se liga eficientemente al vector. El vector cuenta además con la topoisomerasa I unida covalentemente al grupo 3'fosfato de la T sobresaliente. El enlace entre la Tyr-274 de la topoisomerasa I y el grupo 3' fosfato es susceptible de ser atacado por el grupo 5'OH del DNA que será clonado. La energía del enlace phospho-Tyr se emplea para ligar el fragmento con el vector y liberar la enzima.

Transformación de *C. crescentus* mediante electroporación

La celda de electroporación debe enfriarse diez minutos antes de proceder con la transformación. Se añaden 500 ng de DNA a las células electrocompetentes. Se colecta la mezcla de células y DNA y se coloca en la celda procurando que la mezcla esté al fondo de ésta. La celda se pone en el electroporador y se da un pulso eléctrico de 1.6 kV. Inmediatamente se agrega 1 mL de medio PYE para dejar recuperar las células durante 1 hora a 30° C en agitación. Pasado este tiempo, las células se colectan y se platean en medio selectivo.

Propagación de bacteriófago Φ CR30 y transducción

Se deja crecer la cepa donadora hasta una DO_{660} de 0.4 a 0.6. En un tubo estéril se agregan 2 μ l del bacteriófago (el volumen puede variar) a 200 μ L de células donadoras, se hace una dilución en serie. Se deja incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se funde agar suave (0.3% agar en PYE) durante 5 minutos en el autoclave, y una vez que disminuye la temperatura de éste, se añaden 4 ml a las células infectadas, y se agita vigorosamente (vórtex). La mezcla se vierte en una caja con PYE. Se deja cuajar en horizontal y se incuba a 30° C. Al siguiente día debe buscarse en las cajas la dilución que muestra lisis confluyente, de ésta, se rasca el agar suave y se vierte en un tubo con tapa, la caja se lava con 4 ml de PYE, y el lavado se vierte en el mismo tubo. Se añaden 100 μ l de cloroformo y se vortexea. Se deja en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifuga 10 minutos a 8000 rpm. Se recupera el sobrenadante y se le añaden 100 μ L de cloroformo, se vortexea. Se almacena a 4°C.

Para la transducción, el fago obtenido, debe irradiarse con UV 1 ml durante 1 minuto. Posteriormente, se mezclan 200 μ l de células receptoras en fase estacionaria con 20 y 50 μ l de fago. Se incuba 30 minutos a temperatura ambiente. Se platea en medio selectivo y se incuba a 30°C.

Mutagénesis dirigida.

Se diseñaron los oligonucleótidos de acuerdo a las recomendaciones del fabricante en el manual del estuche QuikChange® Site-directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). Este procedimiento incorpora los cebadores con la mutación deseada en un plásmido durante una PCR convencional. Después de la PCR, la reacción se digiere con la enzima DpnI que corta el DNA metilado y semimetilado por lo que el DNA parental es eliminado y el amplicón (no metilado) conteniendo la mutación se conserva. Finalmente, se transforma en células competentes. En nuestro caso se transformó en células TOP10 (Invitrogen) y se utilizó la polimerasa HS Primestar (Takara).

Uso del microscopio de fluorescencia

Para la observación de las células se elaboran camas de agarosa. Las camas (5 ml sales M2 1X con 1.2% agarosa) se preparan colocando 550 μ l de la solución de agar entre dos portaobjetos, separados por 2 cubreobjetos apilados unos sobre otros, una vez que la agarosa cuaja, se retira el segundo portaobjetos y los cubreobjetos. Sobre la cama de agarosa se colocan 2 μ l del cultivo a una DO_{600} de 0.3, dicho cultivo se concentra previamente 1:100. Las muestras se observan en contraste de fases y en fluorescencia utilizando el objetivo de 100x. Las imágenes se procesan en el programa Wasabi. Para la observación de las células *in vivo* durante el ciclo celular la cama se realiza con medio M2G. La cama se sella con un cubreobjetos y Valop (vaselina-lanolina-parafina). Para cepas con el promotor p_{Van} (inducible), los cultivos de toda la noche se resiembran en medio líquido para alcanzar una DO_{600} de 0.3 y se inducen durante 3 horas con ácido vanílico a una concentración final de 300 μ M.

RESULTADOS

Generación de mutantes en *flil* por deleción

Como primer objetivo particular nos planteamos aislar una cepa mutante en el gen *flil*, la cual posteriormente pudiéramos complementar con los alelos mutantes del gen que dieran lugar a la síntesis de una proteína con una hidrólisis de ATP disminuida. Para ello, se decidió aislar una cepa en la cual el gen *flil* cromosomal fuera remplazado por un casete de resistencia, y además una cepa que solo llevase la deleción del gen. Ambas cepas fueron construidas mediante una estrategia de doble recombinación utilizando el plásmido suicida pNTPS138. En la figura 10 se esquematizan los eventos que ocurren para lograr el reemplazamiento alélico. En el primer paso, después de transformar el plásmido en la bacteria de interés, las colonias resistentes a kanamicina (resistencia del plásmido) representan aquellas en las cuales se llevó a cabo el primer evento de recombinación. A partir de una de estas colonias, se selecciona el segundo evento de recombinación a través de la selección negativa de la presencia del gen *sacB* (**Fig. 10**) (Ried y Collmer, 1987).

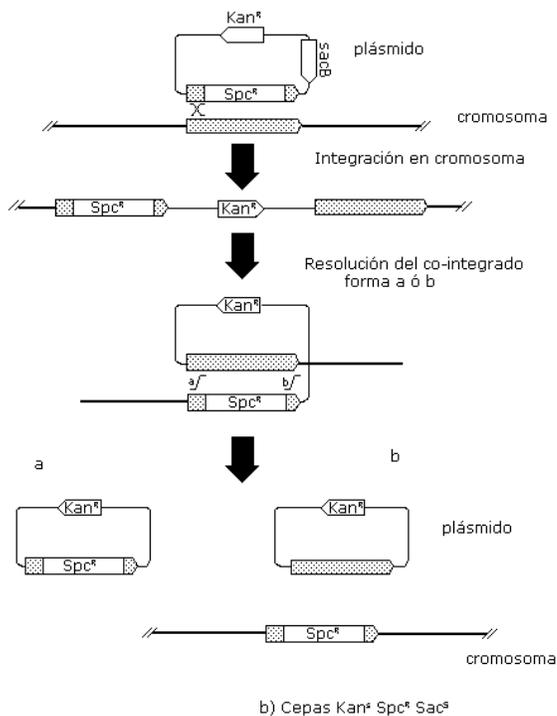


Figura 10. Esquema general que ilustra los eventos de recombinación necesarios para lograr el reemplazamiento alélico. Después del segundo evento de recombinación solo se representa el cromosoma y el plásmido generado siguiendo la ruta D.

Se procedió entonces al diseño de dos pares de oligonucleótidos (fliiUP1/fliiUP2; y fliiDO1/fliiDO2, Tabla 2) los cuales nos permitirían la amplificación de las regiones aledañas a *flii* tanto río arriba como río abajo con una longitud aproximada de 1000 pb cada una. El diseño de los oligonucleótidos incluyó sitios de restricción para EcoR1 y BamH1, de la forma en la que se muestra en la figura 11. Se nombró al amplicón de la región río arriba, *upstream*, de *flii*, como UP y aquel de la región río abajo, *downstream*, DO. Estos amplicones tienen una longitud de 875 y 992 pares de bases (pb), respectivamente (**Fig. 11**).

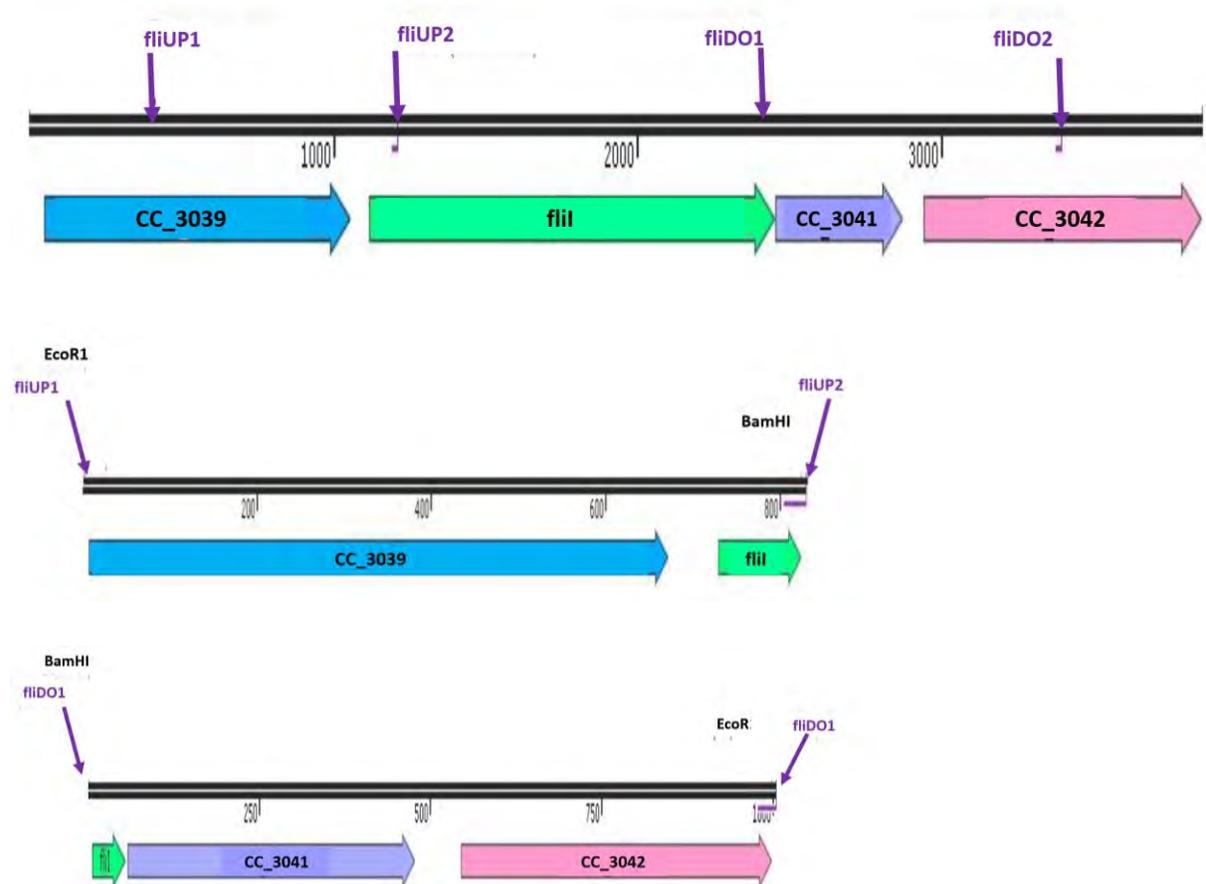


Figura. 11. Esquema de la región cromosomal aledaña a *flii*. Arriba: representación esquemática del gen nativo *flii* (verde) y sus regiones aledañas, en la línea negra superior, se indica la posición de los oligonucleótidos utilizados. Abajo: representación de los fragmentos UP (875 pb) y DO (992 pb), obtenidos con los oligonucleótidos FliiUP1- FliiUP2 y FliiDO1 - FliiDO2, respectivamente. Se indica la posición de los sitios de restricción para EcoR1 y BamH1.

Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 1% (**Fig. 12**). Posteriormente, éstos se purificaron y se obtuvo un rendimiento del producto UP de 8.8 ng/ μ L y DO de 71 ng/ μ L.

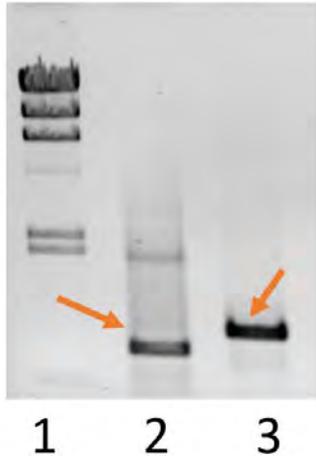


Figura. 12. Productos de PCR UP y DO. Los productos de PCR fueron sujetos a electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se indican con flechas rojas los fragmentos esperados UP (875 pb) (carril 2) y DO (992 pb) (carril 3). El carril 1 corresponde al marcador λ -HindIII (fragmentos observados de arriba hacia abajo, 23130, 9416, 6,557, 4361, 2322, 2027, 564 pb).

Posteriormente ambos productos, UP y DO fueron digeridos con BamH1 para después ser ligados entre sí. A partir de una alícuota de la reacción de ligación, se realizó una nueva PCR utilizando los oligonucleótidos más distales, esto es, flilUP1 y flilDO2 y el ciclado se programó para 2 minutos de extensión, ya que se esperaba un producto de 1867 pb. El producto de esta reacción se analizó en un gel de agarosa al 1% y se purificó (**Fig.13**).

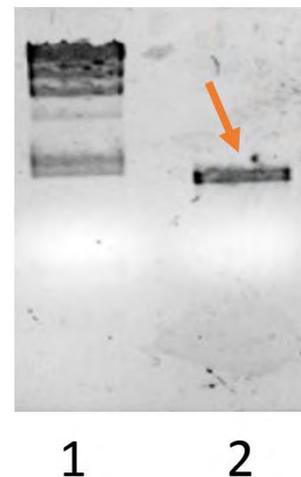


Figura. 13 Producto de PCR de los fragmentos ligados UP y DO. El producto de PCR UPDO (ligado) fue sujeto a electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Carril 1, marcador de peso molecular Δ -HindIII; carril 2, producto de PCR UPDO ligado, indicado con flecha roja.

El producto de PCR purificado, fue denominado como fragmento UPDO y este se clonó con el estuche comercial TOPO®TA Cloning (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido pCR2.1 utilizado en este estuche de clonación posee dos sitios EcoRI, los cuales flanquean el sitio donde el producto de PCR será clonado.

Las colonias obtenidas de la transformación fueron seleccionadas en presencia de ampicilina. Posteriormente, se seleccionaron algunas colonias para extraer el plásmido en pequeña escala para su digestión con EcoRI y verificar la presencia del fragmento UPDO. Como se observa en la **figura 14**, el inserto UPDO de 1867 pb está presente en las dos preparaciones de plásmido analizadas (carriles 3 y 4). Una vez corroborada la presencia del inserto se purificó el plásmido obteniéndose una concentración de 91.3 ng/μl.

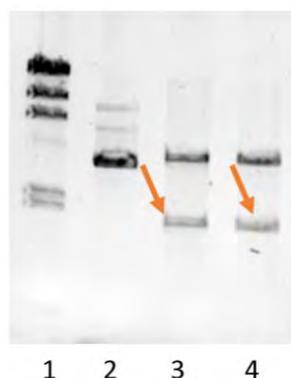


Figura 14. Análisis de los plásmidos pTOPO-UPDO. Los plásmidos pTOPO-UPDO fueron digeridos con EcoRI y analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (carriles 3 y 4). Carril 1, marcador λ -HindIII (23130, 9416, 6,557, 4361, 2322, 2027, 564 pb); carril 2, plásmido sin digerir; indicado con flechas rojas, en carril 3 y 4, plásmido de una clona independiente digerido con la enzima EcoRI.

El plásmido purificado pTOPO-UPDO fue digerido nuevamente con EcoRI para la obtención y recuperación del fragmento UPDO (concentración final 7.7 ng/μl). Simultáneamente, el plásmido pTZ19RBamHI^r (de 2,900 pb) fue digerido con EcoRI para linealizarlo. Se realizó una nueva ligación utilizando el vector pTZ19RBamHI^r y fragmento UPDO; la reacción se transformó en células TOP10 mediante electroporación; las células fueron plateadas en medio LB con Ampicilina y Xgal. Las colonias seleccionadas fueron sembradas para la extracción del plásmido en

pequeña escala, y con ellos se realizaron las correspondientes digestiones EcoRI y BamHI para corroborar la presencia del inserto (**Fig. 15**). Una vez verificada la presencia del inserto, se extrajo el plásmido pTZ19RBamHI-UPDO y se obtuvo un rendimiento de 85.5 ng/ μ l.

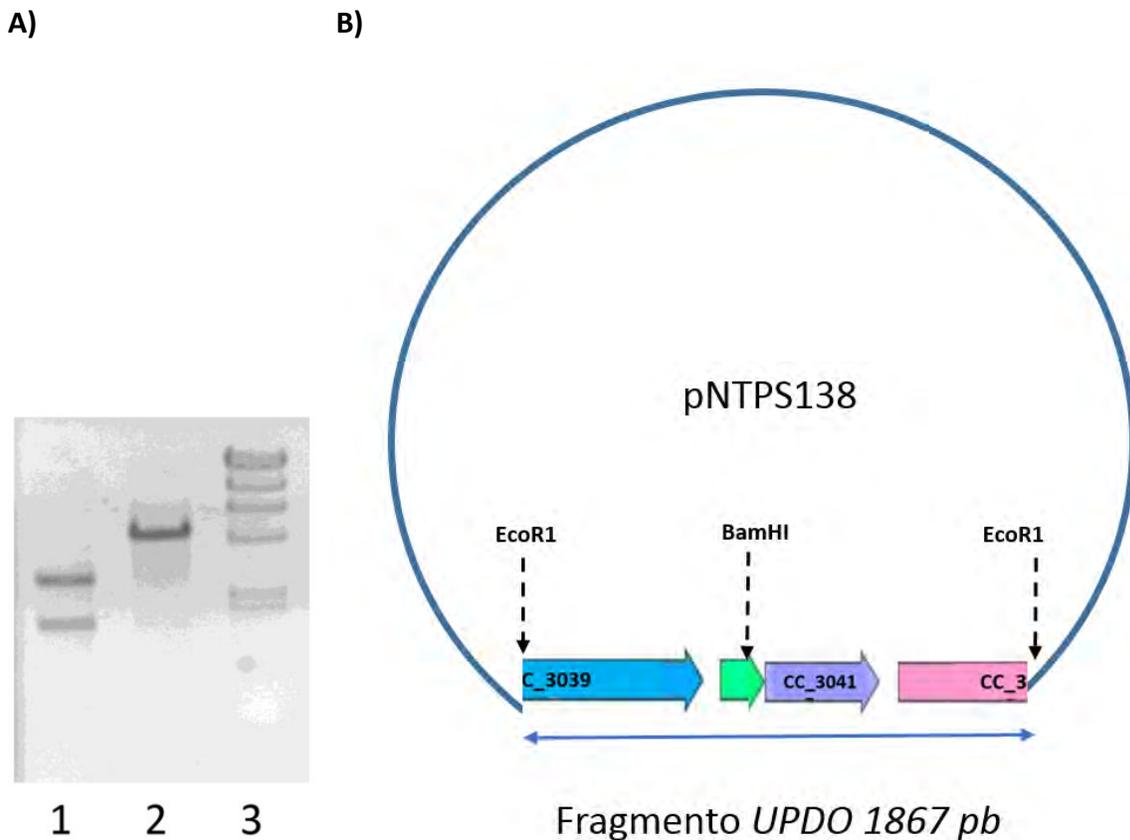


Figura 15. Análisis del plásmido pTZ19RBamHI-UPDO. A) El plásmido fue digerido con las enzimas apropiadas y analizado por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Carril 1, plásmido pTZ19RBamHI-UPDO digerido con EcoRI; Carril 2, plásmido pTZ19RBamHI-UPDO digerido con BamHI. Carril 3, marcador λ -HindIII (23130, 9416, 6,557, 4361, 2322, 2027, 564 pb). B) Esquema del plásmido pTZ19RBam-UPDO.

La construcción pTZ19RBamHI^r UPDO fue digerida con BamHI para la inserción de un cassette (1414 pb) de resistencia a espectinomicina (Spc), conferida por la expresión del gen *aadA*, el cual codifica para la enzima aminoglicosido-3 adeniltransferasa. Este cassette se insertó entre el fragmento UP y DO, generándose la construcción pTZ19RBamHI^r UP*aad*DO. El fragmento Up*aad*DO, de 3281 pb, se recuperó del plásmido original mediante una digestión EcoRI. Por el otro lado, el fragmento UPDO (sin el cassette de resistencia), fue recuperado del plásmido pTZ19RBamHI^r UPDO, mediante una digestión EcoRI.

Finalmente, tanto UPDO (1867 pb) como UP*aad*DO (3281 pb) fueron ligados al plásmido suicida pNTPS138 (5361 pb) y transformados en *E.coli* para su posterior análisis y purificación (**Fig. 16**).

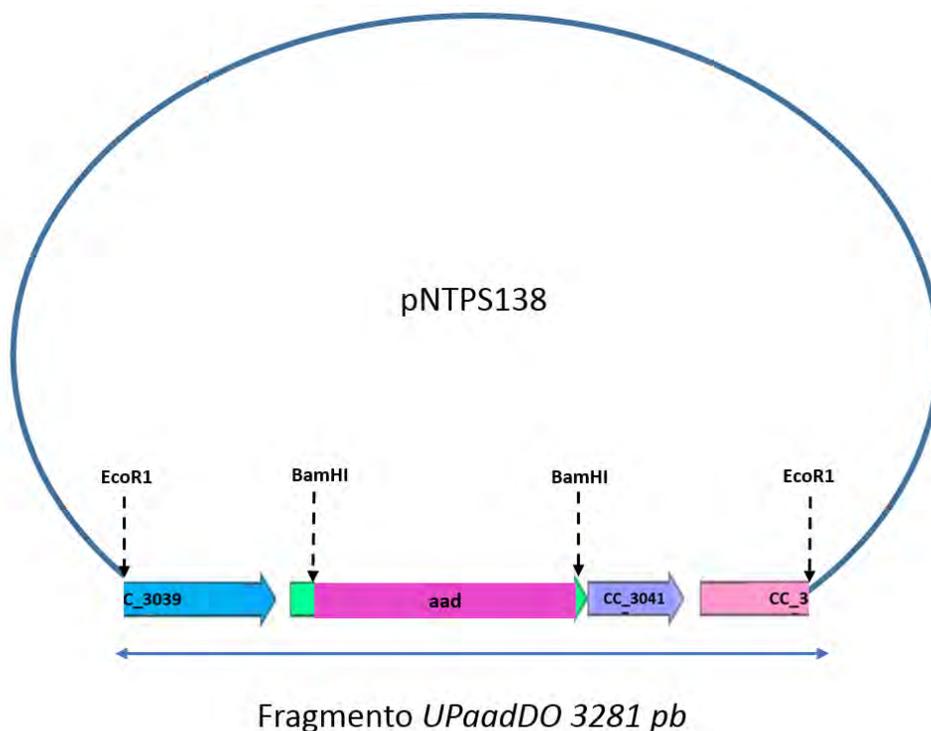
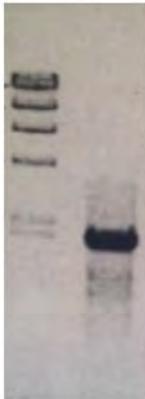


Figura 16. Esquema del mapa final correspondiente al plásmido pNTPS138 UPaadDO.

Los plásmidos purificados pNTPS-UPDO (177.1 ng/μl) y pNTPS-UPaadDO (120.9 ng/μl) fueron transformadas en *C. crescentus* mediante electroporación de acuerdo al protocolo descrito en la sección de material y métodos. El plásmido pNTPS138 es incapaz de replicarse en *C. crescentus* y contiene el gen *ntpI* para selección por kanamicina y el gen *sacB* cuyo producto es tóxico para las bacterias Gram-negativas en presencia de sacarosa. Es así, que, siguiendo el protocolo de Fiebig *et al.*, 2010, las colonias fueron inicialmente seleccionadas en medio PYE sólido adicionado con kanamicina para pNTPS-UPDO y Kan/Spc para pNTPS-UPaadDO. Dichas transformantes fueron luego crecidas toda la noche en medio PYE líquido no selectivo para después ser plateadas en medio PYE con sacarosa al 3%, lo que permitió la selección de las cepas en las cuales el plásmido hubiera sido escindido en un segundo evento de recombinación. Se confirmó que las colonias seleccionadas fueran sensibles a kanamicina.

Para confirmar la presencia de las mutaciones en el genoma de las cepas seleccionadas, se procedió a amplificar el gen *fliI* mediante PCR utilizando el DNA cromosomal de las cepas mutantes. Así, para la evaluación de la mutante Ccr $\Delta fliI$ (UPDO) se utilizaron los oligonucleótidos flilUP1 y flilDO2, esperándose un fragmento de 1867 pb (**Fig. 16**), mientras que estos mismos oligonucleótidos amplifican un producto de 3,853 pb al utilizar el DNA genómico de la cepa silvestre (dato no mostrado).



1 2

Figura 17. Análisis del producto de PCR de la región del gen *fliI*. El producto de PCR (1867 pb) obtenido con los cebadores *fliI*UP1 y *fliI*DO2 y el DNA cromosomal de la cepa *Ccr ΔfliI* (UPDO), fue analizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% (carril 1). Carril 1, marcador λ – HindIII (23130, 9416, 6,557, 4361, 2322, 2027, 564 pb).

Para la evaluación de la mutante *Ccr ΔfliI::aadA* (UP*aadDO*) se realizaron 2 reacciones de amplificación, utilizando en una el par de oligonucleótidos *fliI* UP1 y *aad2*; y en la otra, *fliI*UP1 y *aad1*. Esta combinación de cebadores además de indicar la presencia de la mutación, también nos indicaría la orientación del cassette de resistencia. Se valoró la presencia del fragmento UP-*aad* (2289 pb) tanto en el DNA cromosomal de la cepa mencionada y en el fragmento purificado UP*aadDO*. De forma paralela, utilizando los oligonucleótidos *aad1* y *aad2*, se hizo la PCR del plásmido pBOR que contiene el cassette *aadA*. Como se puede observar en la **figura 18** (marcado con flechas), el producto esperado de 2289 bp (conformado por el fragmento UP de 875 pb y el fragmento *aadA* de 1414 pb) se observó únicamente en la reacción de PCR con los oligonucleótidos *fliI*UP1 y *aad1* (carriles 2 y 3) lo que indica que el cassette *aadA* se insertó en la orientación contraria en la cual se transcribe *fliI*.

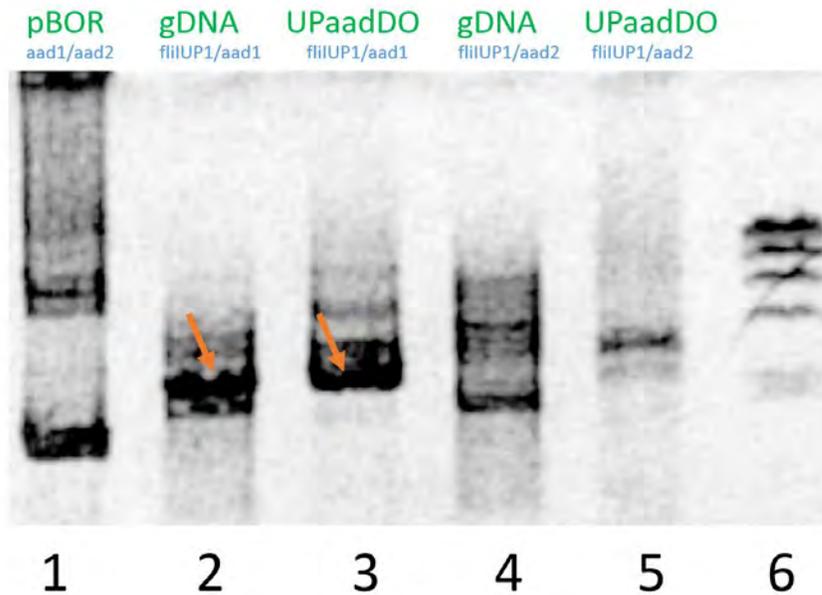


Figura 18. Análisis por PCR del genoma de la cepa *Ccr ΔfliI::aadA* (UPaadDO). Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Carril 1, PCR del gen *aadA* del pBOR, fragmento 1414 pb; Carriles 2 y 4, amplificación del DNA genómico de la cepa *Ccr Δ fliI::aadA* (UPaadDO). Carriles 3 y 5 amplificación del fragmento puro UPaadDO. Oligonucleótidos *fliiUP1* y *aad1* (carriles 2 y 3). Oligonucleótidos *fliiUP1* y *aad2* (carriles 4 y 5). Carril 6 marcador λ -HindIII (fragmentos observados de arriba hacia abajo, 23130, 9416, 6,557, 4361, 2322, 2027, 564 pb).

Caracterización fenotípica de cepas *Ccr ΔfliI* (UPDO) *Ccr ΔfliI::aadA* (UPaadDO)

A) Microscopía de campo claro

Inicialmente se observaron las cepas con el objetivo 40X a partir de cultivos en fase exponencial. A diferencia de la cepa silvestre, que es altamente móvil y pequeña las cepas mutantes no presentaron trayectorias de desplazamiento y se apreció que las células eran de un tamaño mayor al de las células silvestres (datos no mostrados). Para determinar la morfología de las cepas mutantes, se realizaron observaciones al microscopio con el objetivo 100X en contraste de fases. Como se puede apreciar en la **figura 19 B**, las células de la cepa *Ccr ΔfliI* UPDO presentan

un fenotipo filamentado, en comparación a la cepa silvestre (**Fig.19A**), y se observa un defecto en la citocinesis, la cual frecuentemente no alcanza a completarse.

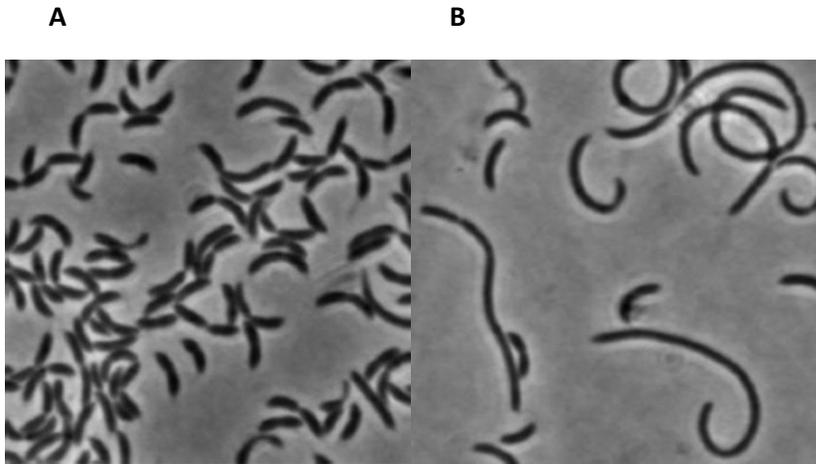
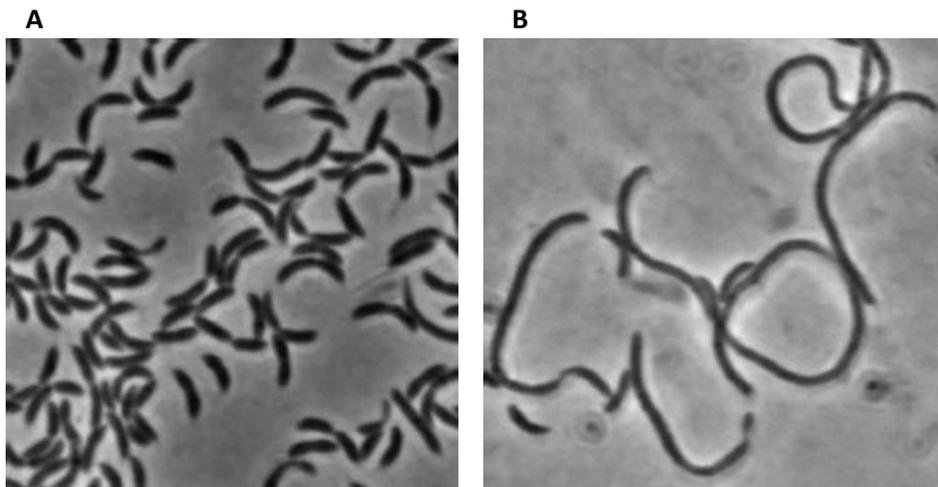


Figura 19. Microscopía de contraste de fases de las células silvestre y mutante en *fliI* (*Ccr* Δ *fliI*). Panel A, imagen representativa de la cepa silvestre, en la cual se observa que las células completan las citocinesis. Panel B, imagen representativa de la cepa *Ccr* Δ *fliI* (UPDO), en donde las células muestra un fenotipo filamentado.

En el caso de las células de la cepa *Ccr* Δ *fliI::aadA* (UP*aadDO*) (**Fig. 20 B**) los filamentos formados por células no escindidas unas de otras son más largos que en el caso de los observados en la cepa *Ccr* Δ *fliI* (UPDO).



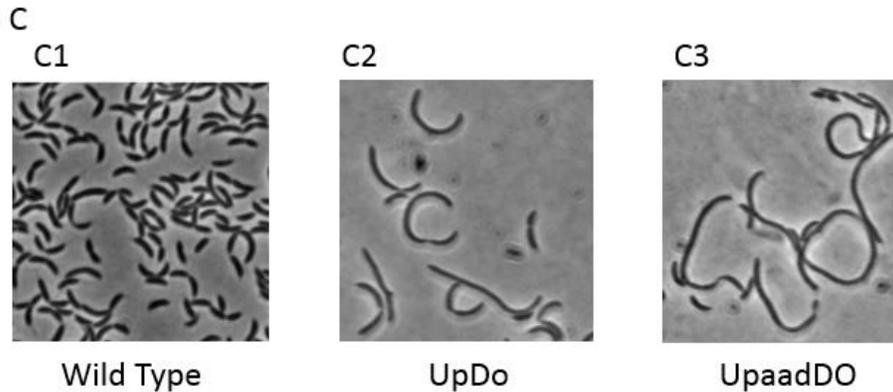


Figura 20. Microscopía de contraste de fases de las células silvestre y mutante en *fliI* (*Ccr* Δ *fliI::aadA* (UPaadDO). Panel A, imagen representativa de la cepa silvestre. Panel B, imagen representativa de la cepa *Ccr* Δ *fliI::aadA* (UPaadDO), en donde las células muestra un fenotipo filamentado. En el Panel C se comparan los tres fenotipos.

B) Evaluación del nado en cajas con agar suave

Las cepas con las mutaciones en el gen *fliI* fueron crecidas en medio PYE durante la noche. Al día siguiente se inocularon 2 μ L sobre una caja de Petri que contiene PYE con agar suave. La caja se incubó toda la noche a 30°C en una cámara húmeda y al día siguiente se evaluó la capacidad de las bacterias para desplazarse a partir del punto de inóculo (**Fig.21**)

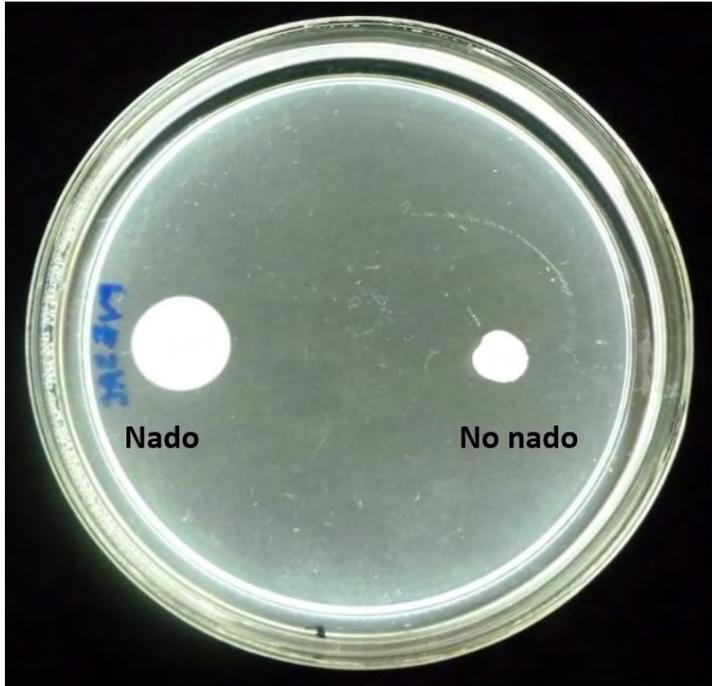


Figura 21. Caja Petri con inóculos para evaluar el nado

De acuerdo a las observaciones de los cultivos líquidos, ninguna de las cepas mutantes fue capaz de desplazarse a través del agar suave (**Fig. 22**)



A

B

C

Figuras 22A, 22B y 22C. Nado de la cepas silvestre y mutantes en *fliI* en cajas de agar suave. 22A : cepa silvestre. 22B: cepa $Ccr \Delta fli$ (UPDO). 22C: cepa $Ccr \Delta fliI::aadA$ (UPaadADO).

Complementación de las cepas mutantes en *fliI*

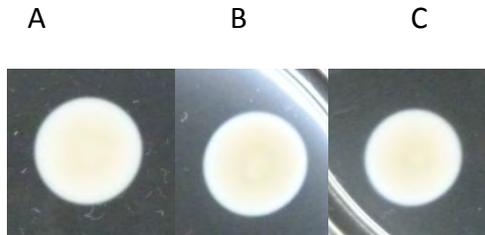
Una vez caracterizadas el fenotipo de las cepas con las mutaciones $\Delta fliI$ y $\Delta fliI::aadA$, restaba averiguar si la expresión del gen *fliI* nativo en las mutantes podía reestablecer el fenotipo silvestre. Por lo tanto, se decidió introducir en ambas mutantes, el gen *fliI* silvestre en el vector pXTCYC-5. Este plásmido integrativo, lleva la región regulatoria del gen de utilización de xilosa *xyiX* así como 2Kbp río arriba de este gen, y como su nombre lo indica, permite la integración del plásmido en este locus; y además, al clonar un gen río abajo de esta región, su expresión es inducible por xilosa.

Como se ha descrito, las células con la mutación $\Delta fliI$ presentan problemas en la citocinesis y en general un ritmo de crecimiento poblacional más lento, por lo que no eran candidatas para convertirlas en células competentes. Así, se prefirió llevar a cabo la integración del plásmido en la cepa silvestre y posteriormente transferir el alelo *fliI*⁺ a las cepas mutantes por medio de transducción.

Se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar el gen *fliI* silvestre, desde la metionina inicial, pues el vector pXTCYC-5, ya cuenta con un sitio de unión de ribosomas. Adicionalmente, al oligonucleótido *forward* se le agregó un sitio de restricción NdeI y al oligonucleótido *reverse*, se le agregó un sitio EcoRI. Una vez amplificado el gen *fliI*, se clonó en TOPO para después ser recuperado y clonado en pXTCYC-5, obteniéndose el plásmido pXTCYC *fliI*.

El plásmido pXTCYC *fliI* se electroporó en *C. crescentus* CB15N y se seleccionaron las colonias Tc^R, las cuales presumiblemente llevan el plásmido integrado en el locus de xilosa. Una de estas colonias fue infectada con el fago Φ CR30. Cuando hubo lisis confluyente, se recuperó el fago y fue almacenado a 4°C con unas gotas de cloroformo. Como cepas receptoras se utilizaron las dos mutantes en el gen *fliI* que se crecieron hasta fase estacionaria para la transducción. El fago fue irradiado en un horno UV durante un minuto y mezclado con las células receptoras. La mezcla fue plateada en medio PYE con tetraciclina. Las transductantes fueron purificadas

y su fenotipo de nado fue evaluado en cajas de agar suave en presencia de xilosa (**Fig. 23**).



Figuras 23A, 23B y 23C. Nado de las cepas complementadas con el gen *fliI* silvestre. Derecha WT. Centro Ccr $\Delta fliI$ (UPDO) pXfII. Derecha Ccr $\Delta fliI::aadA$ (UpaadDO) pXfII.

Dado que el gen *fliI* fue capaz de revertir los defectos en el nado de las cepas Ccr $\Delta fliI$ y Crr $\Delta fliI::aadA$, concluimos que la alteración del fenotipo en las cepas mutantes es debido a la ausencia de la proteína FliI. No obstante, el fenotipo filamentado es más fuerte en las cepas con cassette *aadA*, lo que discutiremos más adelante.

Al observar las células Ccr $\Delta fliI$ (UPDO) mediante microscopía de contraste de fases, se determinó que la morfología de la cepa Ccr $\Delta fliI$ (UPDO) complementada con el plásmido pXfII es similar a la de la cepa silvestre, indicando que la falta de FliI es responsable del defecto observado en la citosinesis (**Fig. 24**).

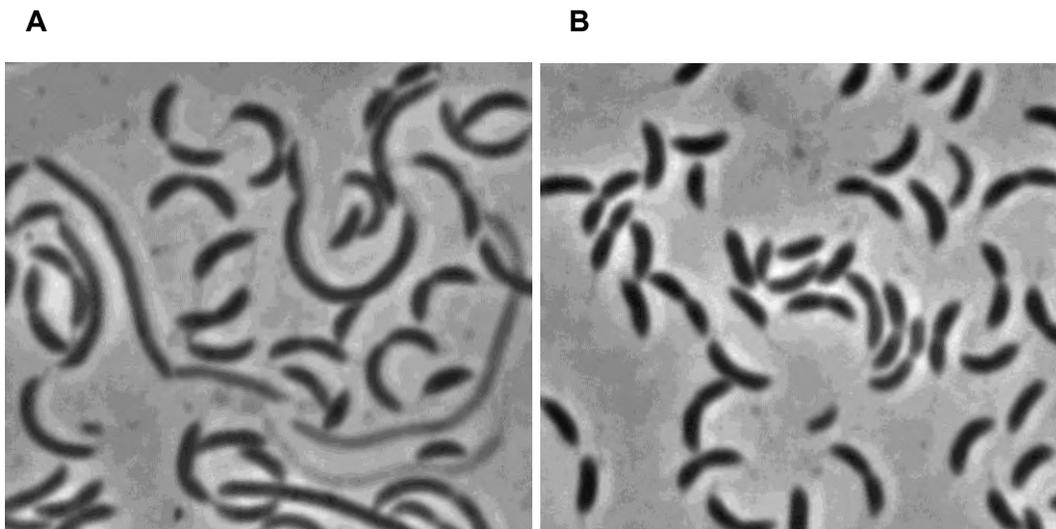


Fig 24A y 24B. Morfología de la cepa *Ccr ΔfliI* (UPDO) pXfliI. Fig 24A se observa una alícuota del cultivo en microscopia de contraste de fases usando el objetivo 100X de un cultivo en ausencia de xylosa, y por ende sin FliI. Fig.22A se observa la cepa proveniente de un cultivo crecido en presencia de xylosa, lo que lleva a la inducción del gen *fliI* silvestre presente en el plásmido.

Seguimiento de la formación del anillo Z

Para determinar si la falla de la división celular se debía a la falta de anillos de división o bien a un retraso en la citocinesis, se decidió evaluar la capacidad de formación del anillo FtsZ, dado que la formación de este representa el primer evento en la división celular. Para visualizar el anillo formado por la proteína FtsZ, se utiliza la fusión fluorescente FtsZ-YFP, la cual se expresa a partir del promotor *pvan* (localizado en el locus *van*) y por ende es inducida por ácido vanílico (150 mM).

Como primer paso para observar el anillo FtsZ-YFP en las cepas mutantes $\Delta fliI$, se llevó a cabo una transducción usando como cepa donadora aquella que expresa FtsZ-YFP, y como receptoras las cepas *CcrΔfliI* y *CcrΔfliI::aadA*. Las cepas fueron denominadas, *Ccr ΔfliI ftsZ-yfp* (*pvan*) y *Ccr ΔfliI::aadA ftsZ-yfp* (*pvan*).

Además, la fusión *ftsZ-yfp* fue también introducida a las cepas $\Delta fliI$ pero que ya expresaban *fliI* de forma inducible por xilosa (éstas se denominaron como, Ccr $\Delta fliI$ *ftsZ-yfp* (pvan) *fliI*⁺(pxyl) y Ccr $\Delta fliI::aadA$ *ftsZ-yfp* (pvan) *fliI*⁺(pxyl). Estas últimas cepas serían utilizadas para determinar si los anillos *ftsZ* pre-existentes eran capaces de completar la constricción una vez que se diera inicio a la expresión de *fliI*, añadiendo xilosa. Alternativamente, estos anillos podrían quedar bloqueados de forma permanente y la recuperación del fenotipo silvestre podría requerir de la formación de nuevos anillos.

Una vez obtenidas estas cepas, se evaluó el nado de las mismas en cajas de PYE con agar suave, incluyendo xilosa en el medio (**Fig. 25**).

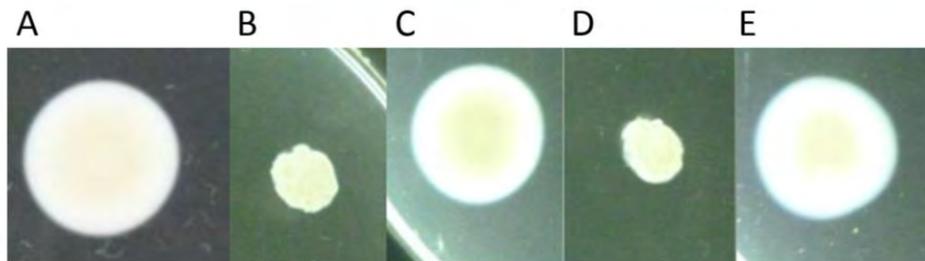


Figura 25. Nado de las cepas mutantes $\Delta fliI$ y sus derivados con el alelo *ftsZ-yfp* (pvan) en cajas de PYE con agar suave y xilosa. 25A cepa silvestre; 25B Ccr $\Delta fliI::aadA$ *ftsZ-yfp* (pvan); 25C Ccr $\Delta fliI::aadA$ *ftsZ-yfp* (pvan) *fliI*⁺(pxyl); 25D Ccr $\Delta fliI$ *ftsZ-yfp* (pvan); 25E Ccr $\Delta fliI$ *ftsZ-yfp* (pvan) *fliI*⁺(pxyl).

Para determinar la funcionalidad de las construcciones y la presencia de los anillos de FtsZ en las cepas mutantes en el gen *fliI*, se procedió a crecer en medio mínimo a las cepas Ccr $\Delta fliI::aadA$ *ftsZ-yfp* (pvan) y Ccr $\Delta fliI$ *ftsZ-yfp* (pvan), en presencia de ácido vanílico. Al alcanzar la fase exponencial, las células fueron observadas en el microscopio con el objetivo 100X, utilizando contraste de fases y fluorescencia.

Como se puede observar en la **figura 26**, los anillos de FtsZ se forman y se encuentran distribuidos a lo largo del filamento.

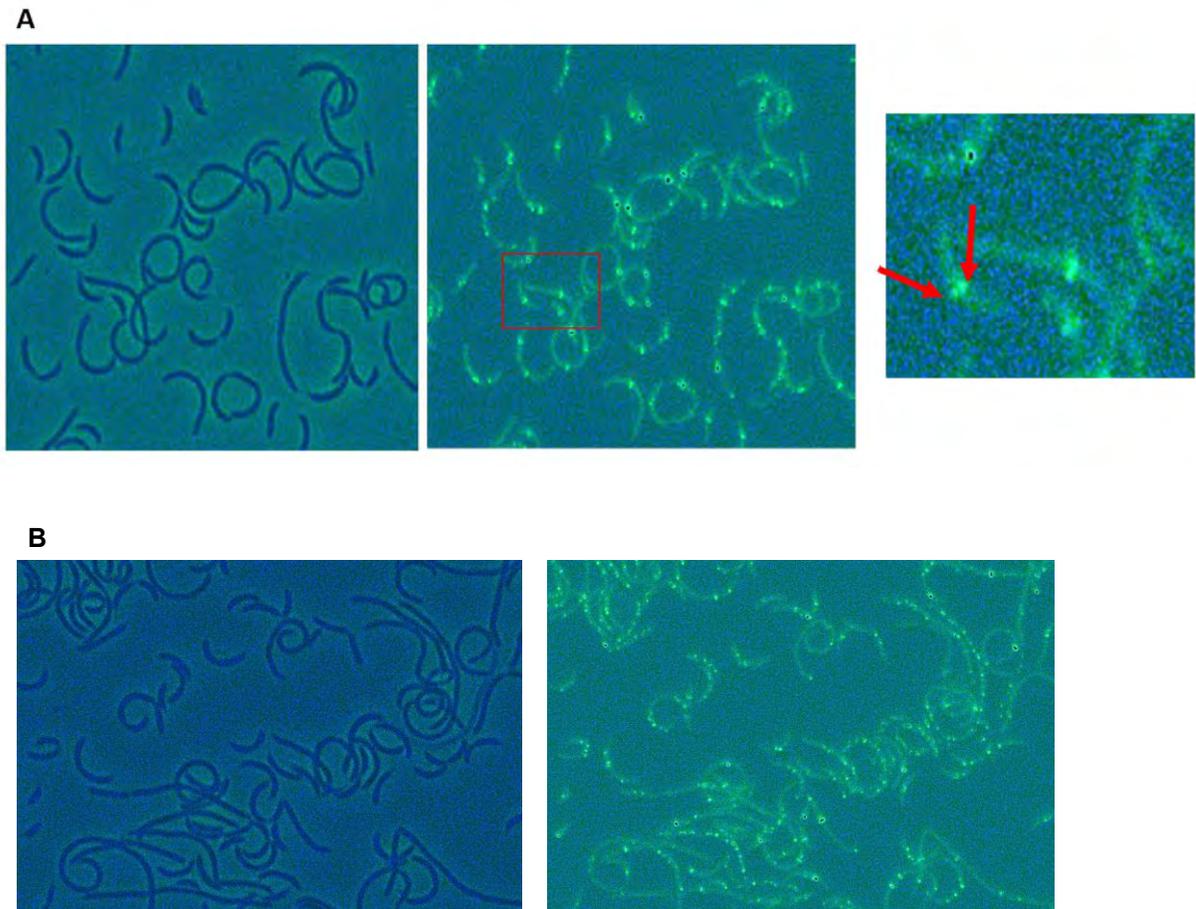


Figura. 26. Observación del anillo FtsZ-YFP en las cepas con la mutación Δ *fliI* y Δ *fliI::aadA*. En el panel A, se muestra un campo representativo de la cepa Ccr Δ *fliI* *ftsZ-yfp* (pvan) observado mediante contraste de fases (izquierda) y mediante epifluorescencia (derecha). Panel B, campo representativo de la cepa Ccr Δ *fliI::aadA* *ftsZ-yfp* (pvan). Se observa, indicado con flechas, la formación del anillo Z, y se distinguen las invaginaciones pero no se completa la constricción.

Finalmente, con el objeto de determinar si los anillos de FtsZ previamente formados aún eran capaces de constreñirse y lograr una correcta división, las cepas Ccr Δ *fliI* *ftsZ-yfp* (pvan) *pxyl-fliI*⁺ y Δ *fliI::aadA* *ftsZ-yfp* (pvan) *pxyl-fliI*⁺, fueron inducidas con ácido vanílico (de la misma forma en la cual se llevó a cabo el experimento anterior), y posteriormente se colocaron sobre camas de agar con xylosa. Las preparaciones

fueron observadas en el microscopio de fluorescencia, y los anillos FtsZ presentes en un determinado campo de observación fueron tomados como tiempo cero. Las imágenes del campo correspondientes a los tiempos 10, 20, y 40, mostraron que las células ya no fueron capaces de crecer (datos no mostrados) probablemente debido a la fototoxicidad relacionada a la técnica de microscopía de fluorescencia. Por lo anterior, la idea de probar si los anillos FtsZ pre-existentes aún eran capaces de continuar con la división al momento de que FliI fuera acumulada, no pudo ser probada.

Aislamiento y caracterización del fenotipo de cepas que expresan versiones de FliI mutantes en los dominios de hidrólisis y unión del ATP.

Como se mencionó, FliI forma parte de los componentes citoplásmicos del aparato de exportación flagelar. Se piensa que los componentes del aparato de exportación reconocen a los complejos sustrato-chaperona, remueven la chaperona asociada, y mantienen en estado desnaturalizado a las proteínas que serán exportadas; siendo la hidrólisis de ATP catalizada por FliI necesaria para activar eficientemente la compuerta del aparato de exportación. Previamente había sido demostrado que mutaciones en los dominios conservados de FliI en *Salmonella*, afectaban la hidrólisis de ATP y la flagelación. Se procedió a aislar el mismo tipo de mutantes en *fliI* de *C. crescentus*, que fueron reportadas en *Salmonella*, i.e K188E y D272N.

Como primer paso, la secuencia de aminoácidos de FliI de *C. crescentus*, se introdujo en el programa BLASTP en busca de dominios conservados. Se encontraron las dos regiones conservadas correspondientes a los dominios Walker A y B, típicos de este tipo de ATPasas (**Fig. 27**). Una vez ubicados los aminoácidos equivalentes a K188 y D272 se generaron oligonucleótidos K170E Forward y Reverse; y D254N Forward y Reverse prefiriendo los codones enlistados en la tabla de uso de codones para *C. crescentus* (<https://goo.gl/Me4pys>).

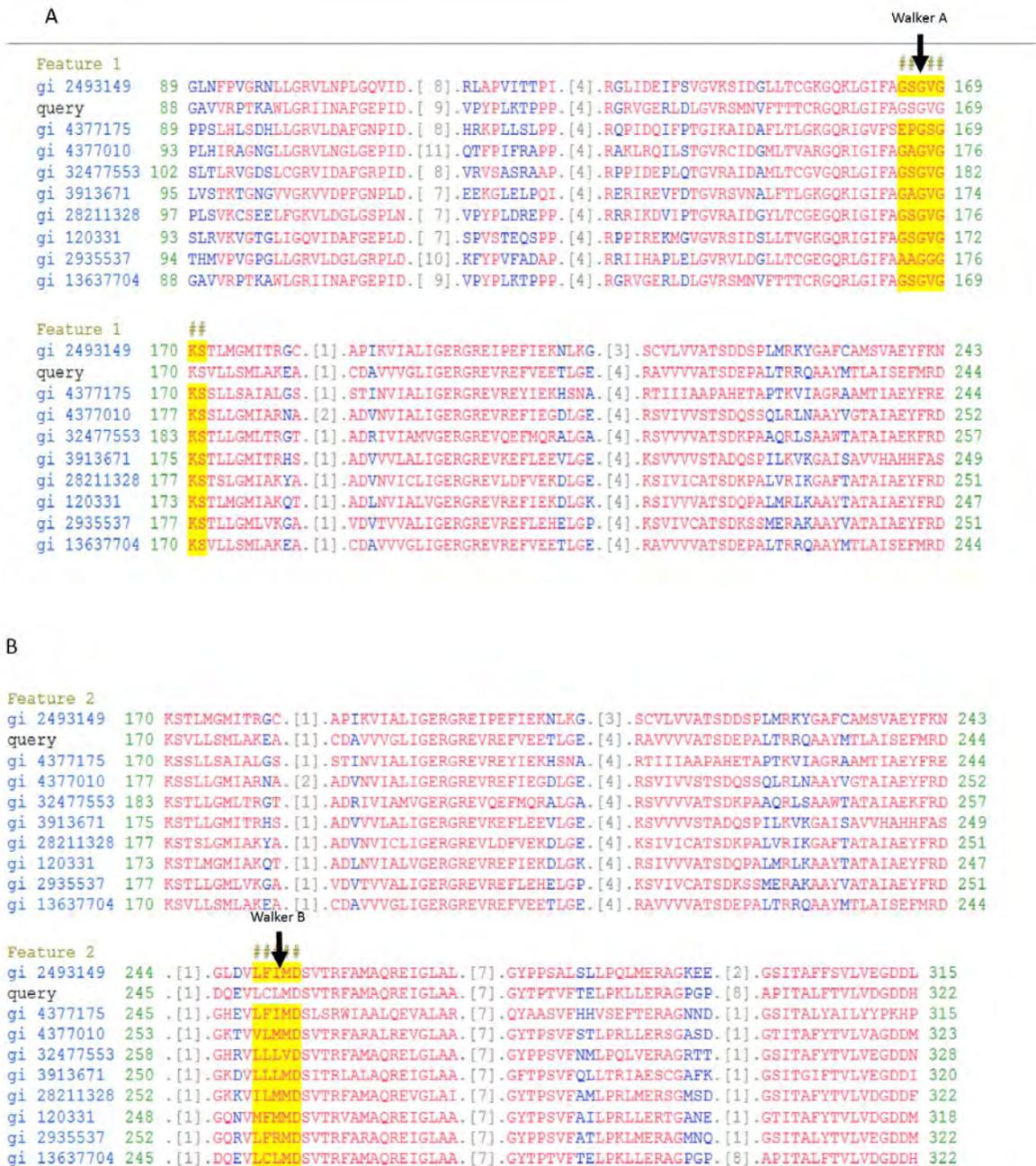
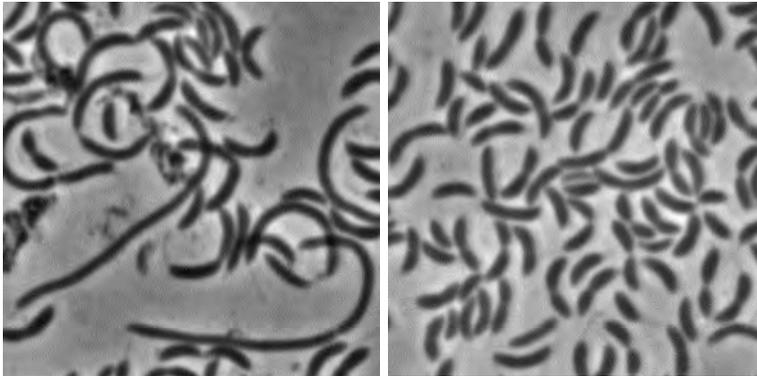


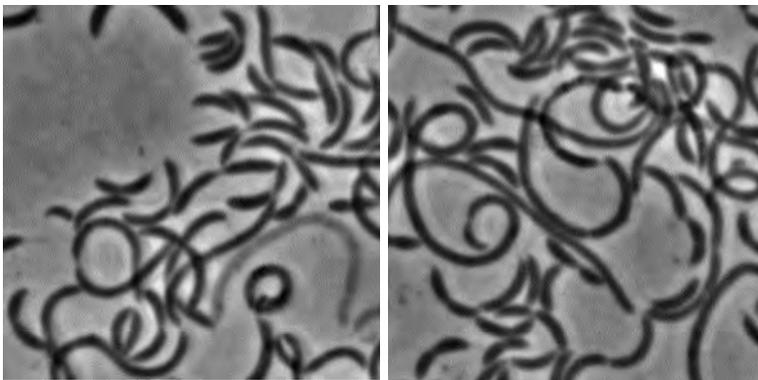
Figura 27. Búsqueda de dominios conservados en Flil de *C. crescentus*. La secuencia de Flil de *C. crescentus* se encuentra en la línea indicada como “query”. Se observa homología en los dominios de unión a ATP, entre las distintas proteínas Flil utilizadas en el alineamiento. En amarillo, Panel A, Walker A ((G/A)XXXXGK(T/S)); Panel B Walker B.

Se utilizó el plásmido pTOPO_flii como sustrato para las reacciones de mutagénesis. La presencia de la mutación K170E o D254N fue verificada mediante la digestión con NdeI/EcoR1, revisión en gel de agarosa para su posterior purificación y envío a secuenciación (resultados no mostrados). Los alelos de *flii* mutantes fueron subclonados en el plásmido pXTCYC5 para generar los plásmidos pXTCYC5 *flii* K170E y pXTCYC5 *flii* D254N, los cuales fueron transformados en la cepa $\Delta flii$. La morfología de las cepas resultantes fue evaluada mediante microscopía de contraste de fases (**Fig. 28**).

A



B



C

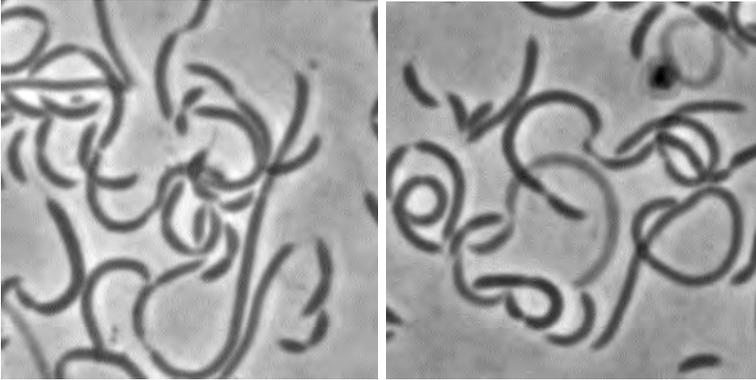


Fig. 28. Morfología de la cepas que expresan FliI, FliID254N y FliIK170N. Para todas las muestras, a la izquierda se observa una alícuota del cultivo en microscopia de contraste de fases usando el objetivo 100X de un cultivo en ausencia de xilosa, y a la derecha se observa la cepa proveniente de un cultivo crecido en presencia de xilosa. (A) Ccr $\Delta fliI$ (UPDO) pXfiiI. (B) Ccr $\Delta fliI$ (UPDO) pXfiiI D245N; (C) Ccr $\Delta fliI$ (UPDO) pXfiiI K170N.

DISCUSIÓN

El arresto de la citocinesis al afectar alguno de los genes flagelares de clase II, ya había sido reportado en trabajos anteriores (Jenal, 1999); sin embargo, la caracterización fenotípica completa de mutantes por delección y puntuales del gen *fliI*, realizada en este trabajo nos ha permitido discernir si el papel de dicha proteína en la progresión del ciclo celular tiene que ver con la función misma ATPasa o bien con la presencia de esta proteína en el complejo que conforma el aparato de exportación.

En este trabajo encontramos que el fenotipo de filamentación y de falta de motilidad, es el mismo en las mutantes por delección y puntuales. En las mutantes por delección, el fenotipo silvestre podía recuperarse mediante la complementación con el alelo *fliI*⁺, que reconstituía tanto a la cepa Ccr $\Delta fliI$ (UPDO) como a la Ccr $\Delta fliI::aadA$ (UpaadDO). Durante los experimentos con las mutantes por delección, encontramos que en aquellas con la mutación $\Delta fliI::aadA$ (UpaadDO), el fenotipo de filamentación se exacerbaba, lo cual fue interpretado como un posible efecto polar causado por el cassette de resistencia, *aadA*, que abatiría la expresión del gen *fliJ* (ubicado río debajo de *fliI*). No obstante debido a que ambas mutantes recuperan el fenotipo silvestre con solo expresar *fliI*, nos obliga a considerar otras posibilidades. Por ejemplo, es factible suponer que el efecto polar sea parcial y que esa baja concentración de FliJ sea suficiente para lograr la síntesis del flagelo cuando FliI está presente, pero en ausencia de FliI, el bajo nivel de FliJ exagera el defecto en la formación del flagelo.

Como ya se sabe, *Caulobacter* es un organismo único por la interdependencia entre la progresión en el ciclo celular y la formación de flagelo, cualquier mutación en los genes tempranos provoca la inhibición de la citocinesis. El análisis de las mutantes puntuales en los dominios de unión a Mg²⁺ y al ATP de la proteína FliI, reveló el mismo fenotipo filamentado e incapacidad de nado que muestran las cepas Ccr $\Delta fliI$ y $\Delta fliI::aadA$. Si bien en otros trabajos en *Yersinia* y *Salmonella* se ha reportado que la actividad ATPasa de FliI no es completamente necesaria para la exportación de los componentes flagelares y que puede ser compensada por la fuerza protón motriz

(Minamino, 2014), la evidencia en *Caulobacter*, parece sugerir que dicha actividad sí es requerida para la progresión del ciclo celular. En *S. enterica*, las mutantes puntuales de FliI (i.e. FliI K188I y FliI E211A) sí forman un complejo hexamérico que se asocia a la base del flagelo, y de ahí suponemos que en las cepas que expresan FliI K188E y D254N, son capaces de formar la estructura del aparato de exportación, pero la falta de la actividad ATPasa afecta la división celular. No obstante, será necesario evaluar en estas cepas el nivel de expresión y exportación de las proteínas flagelares de clase III y IV, y garantizar que en estas mutantes la deficiencia para ensamblar el flagelo es provocada por la falta de expresión de estos genes.

Recientemente, el estudio de la formación del flagelo en otros organismos tales como *C. jejuni* y *H. pylori*, (Boll, 2013) ha llevado a elucidar la existencia de un punto de control durante la morfogénesis flagelar, el cual implica la activación de una cinasa sensora a través de la formación del anillo MS (FliF) asociado a FliG y al aparato de exportación. La activación de la cinasa promueve la fosforilación de un regulador transcripcional que en el estado fosforilado activa la expresión de los genes flagelares subsecuentes en la jerarquía. En estos estudios se propone que la formación de la estructura misma es la que permite la activación de la cinasa. Los resultados obtenidos en *C. crescentus* sugieren un tipo de regulación análogo al propuesto en estos organismos; sin embargo, tomando en consideración el punto de control (check point) que ocurre en enterobacterias y que da lugar a la expresión de los genes de la clase III, en el cual el mecanismo implica no solo la formación de la estructura temprana sino además su funcionamiento, consideramos que este tipo de control representaría una ventaja adicional más allá de sensor solo la formación de la estructura. Nuestros resultados apuntan a que este puede ser el caso en *C. crescentus*, aunque se requiere de una mayor investigación para validar la formación del aparato de exportación en las mutantes puntuales.

Por otro lado, la inducción de las cepas *Ccr ΔfliI::aadA ftsZ-yfp* (pvan) y *Ccr ΔfliI ftsZ-yfp* (pvan) con ácido vanílico, nos permitió corroborar que la formación del anillo Z no se ve comprometida a pesar de la inhibición de la citocinesis; se observó que

en estas cepas, se forman las invaginaciones y el anillo Z se localiza, pero la constricción del anillo no se consigue. Dado que la formación del anillo Z es uno de los eventos más tempranos en la división celular, es lógico suponer que la inhibición de la división en estas cepas, ocurre en alguna de las etapas posteriores del ensamblaje y/o funcionamiento del divisoma. En el laboratorio contamos con versiones fluorescentes de varias proteínas que forman parte del divisoma, por lo cual es factible determinar si alguna de ellas no es reclutada al sitio de la división en ausencia de FliI.

Nuestros resultados al respecto de la formación del anillo Z en las cepas *Ccr ΔfliI::aadA ftsZ-yfp* (pvan) y *Ccr ΔfliI ftsZ-yfp* (pvan), contrastan con otros resultados previamente publicados, en donde se concluyó que la formación del anillo Z se reducía de forma considerable en las cepas con mutaciones en los genes de clase II (Muir y Gober, 2001). Suponemos que la razón de esta discrepancia obedece al hecho de que en dicho trabajo se utilizó inmunofluorescencia en lugar de la fusión de FtsZ con una proteína fluorescente, por lo cual, la capacidad de detección de FtsZ es dependiente de otros factores como por ejemplo, la afinidad de los anticuerpos, la eficiente permeabilización de las células, etc.

CONCLUSIONES

La falta de Flil provoca el retraso o inhibición de la citocinesis.

La formación del anillo Z no se encuentra afectada en las mutantes que carecen de Flil, por lo cual la inhibición de la citocinesis podría involucrar una proteína tardía del divisoma.

El fenotipo de las mutantes en Flil así como la falta de complementación con las mutantes puntuales de Flil sugieren que es la actividad del aparato de exportación y no la estructura la que determina el punto de control para la activación de los genes de clase III.

PERSEPECTIVAS

Analizar en la cepa Ccr $\Delta fliI$ el reclutamiento de otros componentes del divisoma mediante el uso de proteínas de división marcadas con la proteína verde fluorescentes.

Analizar el nivel de expresión de los genes flagelares de clase III y IV en las cepas mutantes Ccr $\Delta fliI::aadA$ y Ccr $\Delta fliI$, así como su capacidad de secretar componentes flagelares hacia el periplasma.

Analizar la fracción periplásmica de la cepa silvestre y de la cepa Ccr $\Delta fliI$ mediante espectroscopia de masas para identificar la presencia de algún componente que pudiera ser el presunto inhibidor de la citocinesis.

REFERENCIAS

- Anderson, J. K., Smith, T. G. & Hoover, T. R. (2011). Sense and sensibility: flagellum-mediated gene regulation. *Trends in Microbiology*. 18, 1–17.
- Bai, F., Morimoto, Y., Shinsuke D. Noritaka J., Kami-ike, N., Namba K., y Minamino T. (2014). Assembly dynamics and roles of Flil ATPase of the bacterial flagellar export apparatus. *Scientific reports*. 4, 6528; DOI:10.1038/srep06528.
- Boll, J. M., Hendrixson, D. R. (2013). A regulatory checkpoint during flagellar biogenesis in *Campylobacter jejuni* initiates signal transduction to activate transcription of flagellar genes. *MBio*. 4:e00432-13. DOI: 10.1128/mBio.00432-13.
- Christen, B. Abeliuk E, Collier JM, Kalogeraki VS, Passarelli B, Collier JA, Fero MJ, McAdams HH, Shapiro L. (2011). The essential genome of a bacterium. *Molecular Systems Biology*. 7: 528.
- Claret, L., Susannah, C. R., Higgins, M. & Huges, C. (2003). Oligomerisation and activation of the Flil ATPase central to the bacterial flagellum assembly. *Molecular Microbiology*. 48: 1349–55.
- Curtis, P. D. y Brun, Y. V. (2010). Getting in the loop: regulation of development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Rev. 74: 13–41.
- Dingwall, A., Zhuang, W. Y., Quon, K., Shapiro, L. (1992). Expression of an early gene in the flagellar regulatory hierarchy is sensitive to an interruption in DNA replication. *Journal of Bacteriology*. 174:1760-8.
- Dutton, R. J., Xu, Z., Gober, J. W. (2005). Linking structural assembly to gene expression: a novel mechanism for regulating the activity of a sigma54 transcription factor. *Molecular Microbiology*. 58: 743-57

- Evinger, M y Agabian M. (1977). Envelope- associated nucleid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *Journal of Bacteriology*. 1977 Oct;132(1):294-301.
- Fiebig, A., Castro Rojas, C., Siegal-Gaskins, D., Crosson, S. Interaction, specificity, toxicity, and regulation of a paralogous set of ParE/RelE-family toxin-antitoxin systems. *Molecular Microbiology*. 2010, 77 (1): 236-251
- Gober, J. W., Boyd, C. H., Jarvis, M., Mangan, E. K., Rizzo, M. F., Wingrove, J. A. (1995). Temporal and spatial regulation of fliP, an early flagellar gene of *Caulobacter crescentus* that is required for motility and normal cell division. *Journal of Bacteriology*. 177: 3656-67.
- Hartwell, L. H. & Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 246: 629–34.
- Ibuki, T. (2011). Common architecture of the flagellar type III protein export apparatus and F- and V-type ATPases. *Nature Structural & Molecular Biology*. 18: 277-82.
- Jenal, U. (2000). Signal transduction mechanisms in *Caulobacter crescentus* development and cell cycle control. *FEMS Microbiology Reviews*.; Apr;24(2):177-91.
- Kazetani, K., Minamino, T., Miyata, T., Kato, T. & Namba, K. (2009). ATP-induced Flil hexamerization facilitates bacterial flagellar protein export. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 388: 323–7.
- Laub, M. T., Shapiro, L. & McAdams, H. H. (2007). Systems biology of *Caulobacter*. *Annual Review of Genetics*. 41: 429–41.
- Macnab, R. M. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annual Review of Microbiology*. 57: 77–100.
- Mangan, E. K., Bartamian, M., Gober, J. W. (1995). A mutation that uncouples flagellum assembly from transcription alters the temporal pattern of flagellar

- gene expression in *Caulobacter crescentus*.. *Journal of Bacteriology* I. 177: 3176-84.
- Minamino T1, Imada K, Namba K. (2008) Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly. *Molecular Biosystems*, Nov;4(11):1105-15
- Minamino, T. & Macnab, R. (2000). FliH a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. *Molecular Microbiology* 37: 1494-1503.
- Minamino, T. & Namba, K. (2008). Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature*. 451:485-8.
- Minamino, T., (2014). The bacterial flagellar protein export apparatus processively transports flagellar proteins even with extremely infrequent ATP hydrolysis. *Scientific Reports*. 4, 7579; DOI:10.1038/srep07579.
- Minamino, T., Imada, K. & Namba, K. (2008). Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly. *Molecular Biosystems*. 4: 1105–15.
- Minamino, T., Kinoshita, M., Imada, K., Namba, K. (2012). Interaction between FliI ATPase and a flagellar chaperone FliT during bacterial flagellar protein export. *Molecular Microbiology*. 83:168-78.
- Minamino, T., Yoshimura, S. D., Morimoto, Y. V., González-Pedrajo, B., Kami-Ike, N., Namba, K. (2009). Roles of the extreme N-terminal region of FliH for efficient localization of the FliH-FliI complex to the bacterial flagellar type III export apparatus. *Molecular Microbiology*. 74:1471-83.
- Mohr, C. D., MacKichan, J. K., Shapiro, L. A. (1998). Membrane-associated protein, FliX, is required for an early step in *Caulobacter* flagellar assembly. *Journal of Bacteriology*. 180: 2175-85.
- Muir, R. E., Gober, J.W. (2001). Regulation of late flagellar gene transcription and cell division by flagellum assembly in *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology*.I. 2001 Jul;41(1):117-30.

- Muir, R. E., Gober, J. W. (2002). Mutations in FliB that relieve the dependency on flagellum assembly alter the temporal and spatial pattern of developmental transcription in *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology*. 43:597-615.
- Muir, R. E., Gober, J. W. (2004). Regulation of FliB activity by flagellum assembly is accomplished through direct interaction with the trans-acting factor, FliX. *Molecular Microbiology*. 54: 715-30.
- Muir, R. E., O'Brien, T.M., Gober, J. W. (2001). The *Caulobacter crescentus* flagellar gene, fliX, encodes a novel trans-acting factor that couples flagellar assembly to transcription Mol. *Molecular Microbiology* 39: 1623-37
- Nierman, W.C., Feldblyum T.V., Laub M.T., Paulsen IT, Nelson K.E., Eisen J.A., Heidelberg J.F., Alley M.R., Ohta N., Maddock J.R., Potocka I., Nelson W.C., Newton A., Stephens C., Phadke N.D., Ely B., DeBoy R.T., Dodson R.J., Durkin A.S., Gwinn M.L., Haft DH, Kolonay J.F., Smit J., Craven M.B., Khouri H., Shetty J., Berry K., Utterback T., Tran K., Wolf A., Vamathevan J., Ermolaeva M., White O., Salzberg S.L., Venter J.C., Shapiro L., Fraser C.M., Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus* *Proceedings of the National Academy of Sciences*, U S A. 2001 Mar 27;98(7):4136-41
- Paul K., Erhardt M., Hirano T., Blair D. F., Hughes, K. T. (2008). Energy source of flagellar type III secretion. *Nature*. 451:489-92.
- Poindexter, J. S. (1964). Biological Properties and Classification of the *Caulobacter* Group. *Bacteriology Reviews*. 28: 231–95.
- Poindexter, J. S. (1981). The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. *Microbiology Reviews*. 45: 123–79.
- Poindexter, S. y Bazire G. (1964) The structure to the of stalked family bacteria belonging to the family Caulobacteraceae, *The Journal of Cell Biology*. Dec 1; 23(3): 587–607

- Ramakrishnan, G., & Newton, A. (1990). FlbD of *Caulobacter crescentus* is a homologue of the NtrC (NRI) protein and activates sigma 54-dependent flagellar gene promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 2369-73.
- Rutherford K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. A. & Barrell, B. (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics.* Oxford, England. 16;10;944
- Skerker, J. M. & Laub, M. T. (2004). Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Nature Reviews of Microbiology.* 2: 325–37.
- Stephens, C., Mohr, C., Boyd, C., Maddock, J., Gober, J., Shapiro, L. (1997). Identification of the flil and fliJ components of the *Caulobacter* flagellar type III protein secretion system. *Journal of Bacteriology.* 179: 5355-65.
- Studholme, D. J., Dixon, R. (2003). Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. *Journal of Bacteriology* 185: 1757-67
- Thomas, J, Stafford G. y Hughes C. (2004). Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* USA. 101: 3945-50.
- Thomas, J., Stafford, G. P., Hughes, C. (2004). Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* USA. 101: 3945-50.
- Tsang, J., Hirano, T., Hoover, T. R., McMurry, J. L. (2015). *Helicobacter pylori* FlhA binds the sensor kinase and flagellar gene regulatory protein FlgS with high affinity. *Journal of Bacteriology.* doi:10.1128/JB.02610-14).
- Wu, J. & Newton, A. (1997). Regulation of the *Caulobacter* flagellar gene hierarchy; not just for motility. *Molecular Microbiology.* 24: 233–9.

- Xu, Z., Dutton, R. J. & Gober, J. W. (2011). Direct interaction of FliX and FliD is required for their regulatory activity in *Caulobacter crescentus*. *BMC Microbiology*. 11, 89.
- Yu, J., & Shapiro, L. (1992). Early *Caulobacter crescentus* genes fliL and fliM are required for flagellar gene expression and normal cell division. *J. Bacteriol Journal of Bacteriology*. 174:3327-38.
- Zhuang, W. Y., Shapiro, L. (1995). *Caulobacter* FliQ and FliR membrane proteins, required for flagellar biogenesis and cell division, belong to a family of virulence factor export proteins. *Journal of Bacteriology*. 177: 343-56.