

03062  
2  
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

CARACTERIZACION DEL GEN *fliM* DE  
*Rhodobacter sphaeroides*.

TESIS

Que para obtener el título de  
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

presenta

LIBB. NORMA ISABEL GARCIA CALDERON

Directora de Tesis: Dra. Rosa Laura Camarena Mejía.

México, D.F., Agosto de 1999.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

27 A 635



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.

Esta tesis está dedicada con todo cariño a:

Mi madre, por su ejemplo y apoyo incondicional.

Mario con quien construyo día a día el Castillo de la Vida.

Claudia, mi más entrañable y querida amiga de toda la vida.

Mis amigos de Biomédicas, con especial mención para Auro, Clelia, Clementina, Monse, Fabiola, Gaby, Chucho, Sofía y la generación, que aunque estemos dispersos nos une un sentimiento especial.

La Mafia, con quienes comparto el placer de la música y una gran amistad.

Los maestros Gabriel Saldívar y Lupita Campos, quienes me han permitido desarrollar mi otra mitad de la vida a través de la música.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, *alma mater quae nos educavit*.

A la Dra. Laura Camarena por su huella indeleble de enseñanzas en mi vida profesional.

A los miembros del jurado: Dra. Laura Camarena, Dr. Luis Servín, Dra. Alicia González, Dr. Roberto Coria y Dr. Guillermo Dávila, por su acertado juicio y crítica a este trabajo de tesis.

A Aurora Osorio, por su asesoría técnica durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) por su apoyo económico otorgado de enero de 1996 a enero de 1998.

## INDICE

<b>Resumen</b>	6
<b>Introducción</b>	7
<b>Objetivo</b>	26
<b>Antecedentes</b>	27
<b>Material y Métodos</b>	32
Cepas Bacterianas	32
Condiciones de cultivo	32
Microscopía electrónica	34
Métodos genéticos:	
Transformación por el método de cloruro de calcio	34
Transformación por el método “Simple y eficaz”	35
Conjugación Triparental	35
Conjugación Biparental	36
Métodos de Biología Molecular:	
Purificación de plásmidos por el método de mini-prep hervidos	37
Purificación de plásmidos por columna de Quiagen	37
Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	38
Extracción de DNA cromosomal	39

Hibridización DNA-DNA (Southern Blot)	40
Métodos enzimáticos:	
Determinación de la $\beta$ -glucuronidasa (GUS)	43
Determinación de proteína por el Método de Lowry	44
<b>Resultados</b>	45
Construcción de la mutante <i>fliM</i> de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	45
Caracterización de la cepa NG1.	48
Southern Blot de las cepas WS8 y NG1	48
Observaciones en cajas de agar suave	53
Observaciones al microscopio óptico	54
Observaciones en microscopio electrónico	55
¿Cuántos genes <i>fliM</i> hay?	56
Nivel de expresión del gen <i>fliM</i> utilizando el gen <i>uidA</i> como reportero	57
Complementación de la mutante NG1	59
<b>Discusión</b>	62
<b>Conclusiones</b>	72
<b>Apéndice 1.</b>	73
<b>Bibliografía</b>	79

## RESUMEN.

Se ha demostrado que la proteína CheY en su estado fosforilado une FliM y que esta interacción promueve la rotación CW del flagelo en enterobacterias. *Rhodobacter sphaeroides* tiene un solo flagelo subpolar que rota unidireccionalmente. En este caso, la respuesta quimiotáctica es modulada controlando la frecuencia de paro y la velocidad de los eventos de nado.

En este trabajo se caracterizó el gen que codifica para la proteína FliM de *R. sphaeroides*. Se aisló una mutante del gen *fliM* mediante la construcción de una cepa *fliM::uidA-aad1*, mediante técnicas de genética reversa. La cepa obtenida NG1 fue incapaz de desplazarse en medio líquido, y la observación de la misma en el microscopio electrónico, nos permitió asignarle fenotipo Fla<sup>-</sup>, esto es, sin flagelo. Asimismo se llevó a cabo la caracterización molecular de la mutante, dando por resultado que éste gen se encuentra codificado en una sola copia en el DNA cromosomal de *R. sphaeroides*. Finalmente, el análisis de la complementación de la cepa NG1 indica que la polaridad de la mutante sólo afectó a los genes *fliM* y *fliN*, por lo tanto se postula que *fliN* es el último gen del operón.

Vo.Bo.

---

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía  
Tutor principal.

## INTRODUCCION

Algunas bacterias se desplazan utilizando el único motor biológico rotatorio identificado a la fecha. Este motor, generalmente utiliza para rotar el gradiente de protones generado a través de la membrana citoplasmática. En el caso de *E. coli*, los flagelos (de 6 a 10 por bacteria) son capaces de rotar bidireccionalmente. La rotación en el sentido contrario de las manecillas del reloj (CCW) provoca que la estructura helicoidal de cada uno de los flagelos presente un movimiento conjunto en una sola trenza, este movimiento impulsa a la bacteria en una trayectoria lineal la cual es interrumpida cada 2 o 5 segundos por eventos en los cuales la bacteria no presenta ningún desplazamiento y más bien parece que se sacude en su lugar. Esta breve sacudida (*tumble*) es de aproximadamente 0.2 segundos de duración. Posteriormente, la trenza se regenera y la bacteria reinicia una nueva trayectoria lineal la cual ocurre en una nueva dirección elegida al azar.

Los eventos de sacudida son provocados cuando un cierto número de flagelos cambia la dirección de rotación de CCW a CW, el cambio de rotación altera la estructura helicoidal del filamento flagelar y el movimiento desorganizado de cada uno de los flagelos produce dicha sacudida. (Macnab, R., 1992)

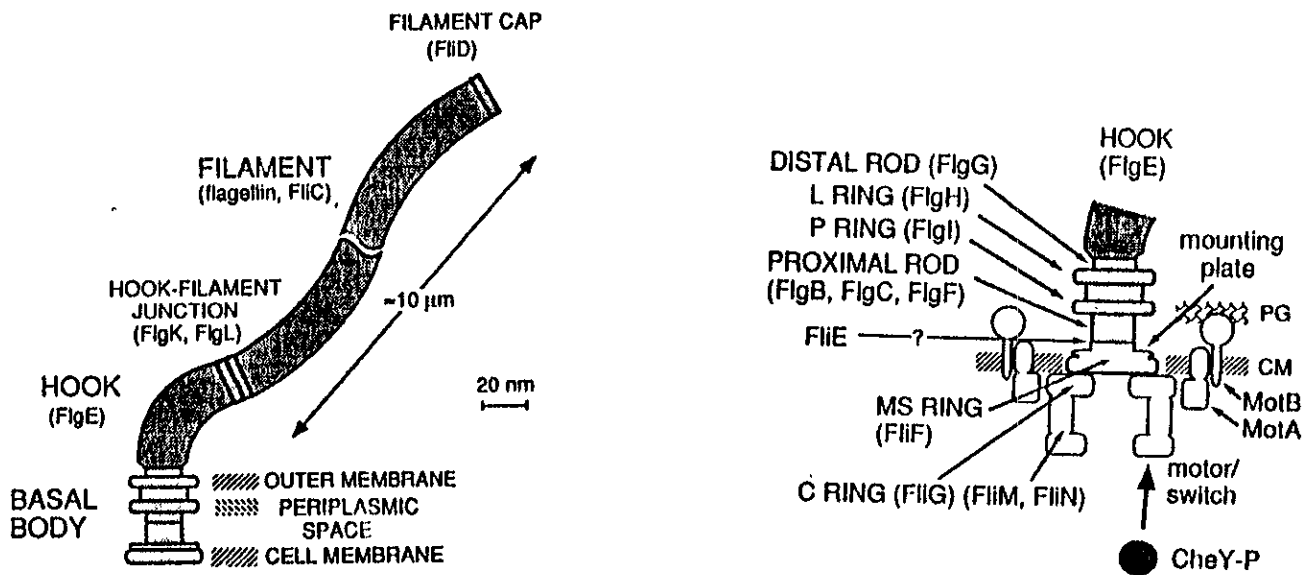
Las bacterias responden a cambios en la concentración química del medio, los niveles de oxígeno, el pH, la intensidad o la longitud de onda de la luz, etcétera, e integran estas señales para moverse hacia ellas o mantenerse en las condiciones óptimas de crecimiento y división. La existencia de una cascada de transducción de señales que permite a las bacterias adaptarse y



responder a los diferentes estímulos se denomina quimiotaxis y ha sido observada en una gran cantidad de bacterias, lo cual resulta obvio, dado el carácter adaptativo de dicha respuesta. Sin embargo, la mayor parte de nuestro conocimiento proviene de los estudios realizados con bacterias entéricas, y a pesar de que algunos rasgos aparecen compartidos para los diferentes grupos bacterianos, pueden observarse diferencias significativas en la motilidad y quimiotaxis entre los mismos (por. ej. *Caulobacter crescentus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Proteus*, etc.) (Armitage, J., 1992).

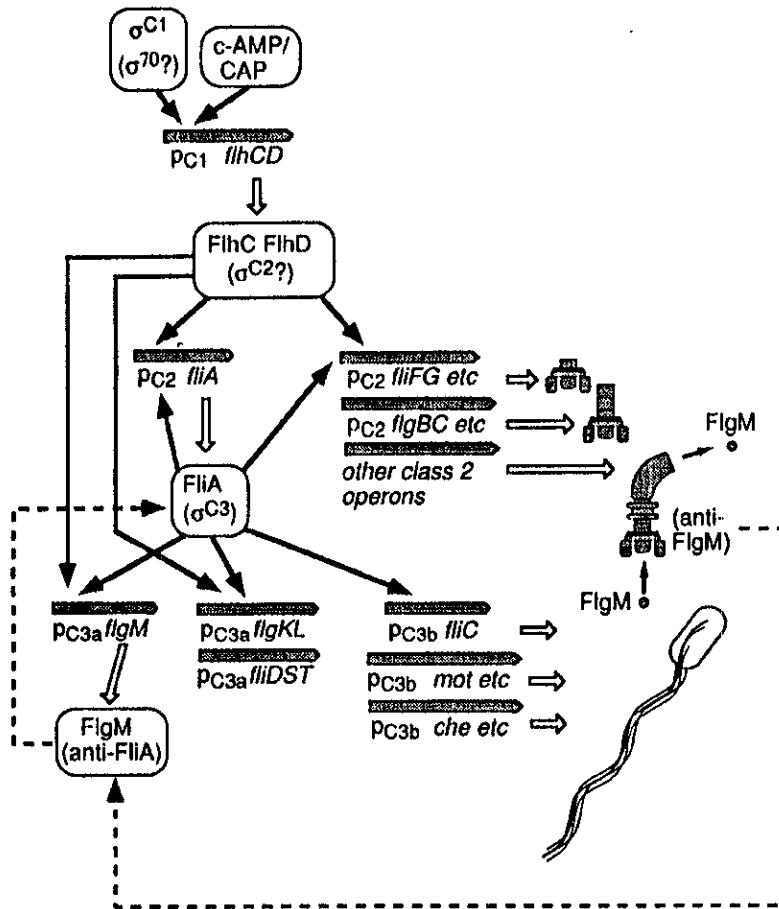
### **El flagelo.**

La estructura del flagelo está formada por el filamento, el gancho y un cuerpo basal, y está conservada en los procariontes. El filamento está constituido por una sola especie de proteína, la flagelina. El filamento se conecta al cuerpo basal o motor por medio de otra proteína polimerizada, el gancho. El gancho sirve como un engranaje entre el filamento y el cuerpo basal. Asimismo, el gancho ayuda a transmitir el cambio en la dirección de la rotación del motor para producir el cambio en la estructura de la hélice flagelar. En el cuerpo basal se pueden apreciar cuatro anillos unidos a las distintas capas de la membrana. El anillo L se encuentra en la capa de liposacáridos de la membrana externa. El anillo P en la capa de peptidoglicanos y los anillos S y M en la membrana citoplasmática. Asociadas a estos dos anillos se encuentran las proteínas del motor (MotA y MotB, generadoras del torque) y las proteínas del interruptor (FliG, FliM y FliN) (Figura 1) (Armitage, J., 1992).



**Figura 1.** Esquema del cuerpo basal y el flagelo. A) Ilustración del complejo de filamento-gancho-cuerpo basal de *E. coli* y *S. typhimurium*. B) Esquema actualizado del cuerpo basal, con las proteínas correspondientes a cada estructura, descritas hasta el momento. Cabe resaltar el anillo C, formado por el interruptor, y la unión de la proteína CheY-P a FlfM. (Tomado de Macnab, R., 1995)

Al menos 14 operones codifican para las proteínas necesarias para la motilidad y la quimiotaxis. Estos operones son expresados en un orden jerárquico de tres niveles. El primer nivel, incluye sólo al operón *flhD*, en este operón se encuentran los genes *flhD* y *flhC* cuyos productos son indispensables para la transcripción del resto de los genes del regulón. Este operón requiere de CRP y AMP cíclico para su expresión, así como del factor sigma 70. Una vez que el operón *flhD* se expresa, las proteínas FlhD y FlhC forman un complejo heterodimérico el cual activa la transcripción de los genes del segundo nivel. En los operones del segundo nivel se encuentran todos los genes relacionados con la formación del cuerpo basal (incluyendo al aparato de exportación), así como genes regulatorios cuyos productos controlan la expresión de los operones del tercer nivel. El gen *fliA* (nivel dos de expresión) codifica para un factor sigma alternativo que reconoce todos los promotores del nivel tres, sin embargo, el producto del gen *flgM* (nivel dos de expresión) es un factor anti-sigma que impide la actividad del factor sigma durante el periodo que tarda en construirse el cuerpo basal. Una vez que el cuerpo basal y el gancho han sido ensamblados, el factor anti-sigma es exportado por el aparato de exportación flagelar y el factor sigma, ahora dissociado de FlgM, es capaz de unirse a la RNA polimerasa (Iyoda, S., y Kutsukake, K., 1995). El último nivel expresión, incluye a los operones *fliC*, *motA* y *tar*. El operón *fliC* codifica para la flagelina, mientras que en los operones *motA* y *tar*, se encuentran los genes *motA* y *motB* y todos los genes involucrados en quimiotaxis (Figura 2) (Kutsukake, K., *et al.*, 1990; Aizawa, S., 1996; Macnab, R., 1992).



**Figura 2.** Regulación del sistema de genes flagelares. Los genes flagelares están ordenados en tres jerarquías de expresión. Los operones están marcados con líneas oscuras, los operones traducidos están marcados con líneas blancas, los reguladores positivos están marcados con flechas negras y los reguladores negativos están marcados con flechas punteadas. Los promotores de diferentes clases están marcados como pC1 (promotor de clase 1), pC2 (promotor de clase 2), etc. (Tomado de Macnab, R., 1992)

## **Quimiotaxis.**

Como se dijo anteriormente, las bacterias responden a los cambios en la composición del medio modificando su patrón de movimiento. En *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* esto se lleva a cabo modulando la dirección de la rotación del flagelo. Este proceso involucra una vía de transducción de señales compuesta por receptores unidos a la membrana (MCP) y proteínas citoplasmáticas.

Hay cuatro tipos de MCP (Tar, Tsr, Trg y Tap) que actúan como receptores por la unión directa de algunos aminoácidos. También actúan como transductores interactuando con proteínas periplásmicas cuya función es unir o transportar azúcares o dipéptidos. Los atrayentes que son percibidos por MCPs incluyen serina, alanina, glicina (Tsr); aspartato, glutamato, y maltosa (Tar); galactosa y ribosa (Tgr) y varios dipéptidos (Tap). Entre los repelentes, se encuentran, acetato, leucina, benzoato, indol (Tsr); cobalto y níquel (Tar). Como se puede observar, es fundamentalmente a través de estos receptores, que la célula obtiene la información de su medio ambiente (Armitage, J., 1992).

Los MCPs existen como homodímeros y poseen un dominio sensorial, dos segmentos transmembranales, y un dominio citoplasmático. La señal del medio ambiente es detectada por el dominio sensorial del receptor, y la información es transmitida al dominio citoplásmico mediante un cambio conformacional intramolecular entre los dominios transmembranales del receptor homodimérico. (Yang, Y., *et al.*, 1993)

Esta transferencia de señales, requiere de la presencia de CheW, la cual acopla (por un mecanismo desconocido) al receptor con la cinasa CheA. Así, en presencia de un atrayente, el receptor transmite una señal al complejo CheW-CheA, que provoca una disminución en la tasa de autofosforilación de CheA. Esta proteína es una histidin-cinasa homodimérica, capaz de fosforilar a las proteínas CheB y CheY (Bourret, R., *et al.*, 1993). Esta última proteína, en su estado fosforilado (CheY-P) es capaz de unirse al switch (o interruptor) del flagelo (específicamente a la proteína FliM) y provocar que el flagelo rote en el sentido de las manecillas del reloj (CW) lo que da por resultado un cambio en la dirección del nado de la bacteria (Welch, M., *et al.*, 1993 y 1994). La breve duración de esta respuesta, está garantizada por la inestabilidad del grupo fosfato en la proteína CheY. Esta inestabilidad es ocasionada por una actividad fosfatasa intrínseca en CheY, y además por la presencia de la proteína CheZ, la cual acelera la tasa de defosforilación de CheY-P por un factor de 100 (Wang, H., y Matsumura, P., 1996). En presencia de un atrayente, la disminución del nivel de autofosforilación de CheA provoca que los niveles de CheY-P disminuyan rápidamente y por lo tanto la bacteria aumenta la duración del nado en la dirección del atrayente (Sanna, M., *et al.*, 1995). Lo opuesto ocurre en presencia de un repelente, la señal transmitida a través del receptor provoca un aumento en la tasa de autofosforilación de CheA y en la tasa de fosfotransferencia hacia CheY; finalmente CheY-P se une a la proteína FliM ubicada en el *switch* flagelar, dando como resultado que el flagelo gire en el sentido de las manecillas del reloj y provocando la reorientación de la bacteria.

Adicionalmente, a la vía receptor-CheA-CheY (CheZ), la respuesta quimiotáctica es regulada por otras dos proteínas, una metil transferasa

(CheR) (Kleene, S., *et al.*, 1979) y una metil esterasa (CheB) (Kehry, M., y Dahlquist, F., 1992), las cuales metilan y desmetilan el receptor. De acuerdo al modelo, el estado conformacional del receptor provoca que este sea más o menos accesible a la reacción de metilación dependiendo si el receptor tiene unidos atrayentes o repelentes respectivamente. Por lo tanto, un incremento en la metilación progresivamente disminuye la señal del atrayente, hasta alcanzar el estado de señalización que poseía el receptor antes del estímulo. Esta fase de la respuesta se conoce como adaptación y permite a la bacteria “eliminar” la respuesta del estímulo anterior para estar lista para recibir nuevas señales de su medio ambiente. Asimismo se considera que el estado de metilación del receptor, le permite a la bacteria tener una cierta “memoria” temporal de las concentraciones de cualquier estímulo previamente detectado (Macnab, R., 1972; Springer, M., *et al.*, 1979; Russo, A., y Koshland, 1983).

### **Interruptor flagelar**

Como se mencionó previamente el flagelo posee una compleja estructura denominada cuerpo basal, en la cual se congregan varias funciones que permiten el ensamblaje, la exportación, la rotación y el control en el cambio de la dirección de rotación (switch).

La energía para la rotación flagelar está dada por la fuerza motriz del gradiente transmembranal de protones. Esta es una forma vectorial de energía, dirigida hacia el interior del citoplasma en condiciones fisiológicas, por lo cual no puede ser utilizada *per se* como el interruptor de la dirección de la rotación del flagelo como si fuera un molino de viento. Esto lleva a la hipótesis de que el motor contiene un interruptor binario.

Desde el punto de vista de la transducción de señales y el motor, las preguntas más importantes a nivel molecular son las siguientes: a) ¿Cuáles son los componentes del interruptor?; ¿Cuáles son las diferencias del interruptor entre los dos estados? y c) ¿Cómo se modulan los dos estados, por la proteína CheY-P?

Cuando se descubrió que la parte externa del flagelo era una estructura pasiva se asumió que el motor y el interruptor deberían estar localizados en la superficie celular, alrededor o en el anillo MS localizado en la membrana citoplasmática. En un principio se pensaba que el anillo mismo era parte del motor, pero después se comprobó que tenía una función meramente estructural. El anillo MS está conectado a un eje que atraviesa el espacio periplásmico; estas estructuras junto con los anillos P y L forman el cuerpo basal. En la parte externa de la célula, el eje se conecta con el gancho y éste con el filamento que es el que hace las funciones de hélice. (Macnab, R., 1995)

Los motores individuales cambian estocásticamente, aún en ausencia de estímulos ambientales, es decir, bajo un medio de condiciones constantes un motor en estado CCW tiene una probabilidad constante sobre unidad de tiempo para cambiar al estado CW, y un motor en el estado CW tiene una probabilidad constante de cambiar a CCW.

En condiciones en las cuales se liberan las interacciones mecánicas o hidrodinámicas de los flagelos, cada motor se comporta autónomamente, de tal manera que los eventos de cambio de dirección no tienen correlación entre cada flagelo. Este concepto es fundamental porque elimina la posibilidad de



que exista un controlador universal de los motores de manera coordinada. De tal manera que aunque en presencia de un estímulo las poblaciones celulares parecen responder simultáneamente, en realidad se debe a que en presencia de un atrayente la probabilidad de permanecer o de cambiar al estado CW es muy baja. Lo contrario ocurre en presencia de un repelente. Se sabe que la proteína CheY fosforilada es el modulador de la respuesta, así que probablemente cada motor/interruptor tiene un tiempo promedio de ocupación por el ligando y las probabilidades de cambio deberían corresponder al periodo de ocupación (Macnab, R., 1995).

Se ha considerado que las dos direcciones de la rotación parecen ser diferentes manifestaciones del mismo proceso más que dos procesos diferentes, porque el tiempo que permanece en una dirección no permanece en la contraria en vez de detenerse (aunque se han observado pausas en el motor, éstas se interpretan por algunos autores como eventos de *switching* interrumpidos) (Lapidous, I., *et al.*, 1988; Eisenbach, M., *et al.*, 1990). Generalmente no es posible incrementar el tiempo medio en un estado sin disminuir el tiempo en el contrario. Un modelo acorde a esta descripción sería una isomerización en la que la estabilidad absoluta de un estado isomérico del interruptor está inversamente relacionada con la estabilidad absoluta del otro, sin cambios en la etapa de transición (Eisenbach, M., *et al.*, 1990).

Para células con motores silvestres, el fenotipo nulo en genes de quimiotaxis es la ausencia de rotación CW es decir la bacteria presenta nado sin cambios de dirección, independientemente de la presencia o ausencia de repelentes. En experimentos con membranas celulares, CheY es capaz de sostener la rotación CW por sí mismo. A partir de estos resultados, se ha

asumido que el estado *default* de rotación es el CCW y que CheY es esencial para crear el estado CW. En mutantes en el interruptor con un fenotipo CW extremo este estado permanece aún en ausencia de CheY, por lo que el motor tiene la capacidad intrínseca para estar en ambos estados pero en condiciones silvestres esta probabilidad es muy baja (Macnab, R., 1995).

### **Componentes del interruptor.**

Para elucidar los componentes del interruptor se utilizaron métodos genéticos identificando mutantes que presentaron cambios anormales en la dirección de rotación. La mayoría de las mutaciones que afectan a los genes que codifican para proteínas flagelares estructurales fueron descartadas por este criterio de selección. Sólo tres genes (*fliG*, *fliM*, y *fliN*) dieron lugar a mutantes con defectos en el interruptor (Parkinson, J.S., *et al.*, 1983, Yamaguchi, S., *et al.*, 1986b). La búsqueda de otras proteínas ha sido exhaustiva y solo se han obtenido una gran variedad de mutantes en las mismas tres proteínas. Los genes *fliM* y *fliN* están adyacentes en el operón *fliL* sin que los otros genes estén involucrados en el interruptor, lo mismo sucede para *fliG* en el operón *fliF* (Kutsukake, K., *et al.*, 1988).

Dependiendo del tipo de mutación en *fliG*, *fliM* y *fliN*, las células no pueden ensamblar los flagelos (fenotipo Fla<sup>-</sup>); ensamblan flagelo pero no lo rotan (fenotipo Mot<sup>-</sup>); o pueden ensamblar el flagelo pero rota con desviaciones muy altas o muy bajas hacia CCW (fenotipo Che<sup>-</sup>) (Yamaguchi, *et al.*, 1986b). Así, FliG, FliM y FliN, son importantes estructuralmente permitiendo que se ensamble el flagelo, y funcionalmente, generando el

torque y determinando la dirección de rotación; por lo tanto, estas proteínas pueden ser descritas como componentes del motor y del interruptor (Kubori, T., et al., 1997). Finalmente, cabe mencionar que cepas mutantes con fenotipos extremos CCW o CW han sido aisladas en cualquiera de los genes que codifican para las proteínas del interruptor, este hecho ha llevado a considerar que no existen subunidades específicas para estas direcciones dentro del interruptor.

Además de las proteínas del interruptor hay dos proteínas relacionadas con la motilidad, MotA y MotB, las cuales son responsables del acarreo de protones y para anclar el motor en la superficie celular (MotB). Mutaciones en los genes *motA* o *motB* solo dan lugar a fenotipos paralizados (Mot<sup>-</sup>) y no alteran la tasa CW/CCW por lo que se cree que estas proteínas no tienen ningún papel en la interfase entre la transducción de señales y el interruptor (Blair, et al., 1990; Berg, et al., 1991).

### **Localización del interruptor.**

La ausencia de segmentos transmembranales en la secuencia de las tres proteínas del interruptor sugirió que éstas se encuentran localizadas en el citoplasma o periféricas a la membrana. (Kihara, M., et al., 1989). Adicionalmente, se hipotetizaba que si CheY era el modulador, el interruptor debería estar localizado en la parte citoplásmica del cuerpo basal (Yamaguchi, S., et al., 1986a). Sin embargo, al analizar los componentes del cuerpo basal no se encontraron los elementos del interruptor, y se supuso que era una estructura asociada débilmente al cuerpo basal. La primera evidencia experimental que permitió establecer que FliG estaba localizada en la parte

citoplasmática del anillo MS proviene del aislamiento de una mutante espontánea en *fliG* que contenía una pequeña delección de 7 pares de bases en su extremo 5' que lo dejaba en fase con el gen anterior *fliF* que codifica para la proteína del anillo MS creando una proteína de fusión FliF-FliG (Francis, N., *et al.*, 1992). Esta mutante era mótil y solamente presentaba un pequeño incremento en la tasa de rotación en dirección CW, de tal manera que la proteína de fusión tenía una función casi normal. Por inmunomicroscopía electrónica se identificó a la proteína FliG en la cara citoplásmica del anillo MS y si se complementaba la mutante con solo el gen *fliF* silvestre las células eran no flageladas, lo que demostraba que existía una relación estequiométrica 1:1 entre las proteínas FliF y FliG en células silvestres para obtener una estructura flagelar funcional, y que FliG no es funcional si no se localiza en la cara citoplásmica de la membrana.

Con el refinamiento de las técnicas para aislar cuerpos basales, se descubrió el anillo C, el cual se extiende a partir del anillo MS hacia el citoplasma, por inmunomicroscopía electrónica y el análisis de imágenes de estructuras con y sin el anillo C se estableció que FliG está localizada en la unión del anillo C y el MS, y se identificaron a las proteínas FliM y FliN, como componentes adicionales del anillo C (Francis, N., *et al.*, 1994).

En términos de la estructura del motor, junto a las proteínas del interruptor se encuentran las proteínas Mot, que están integradas a la membrana y se incorporan una vez que el flagelo ha sido sintetizado. Las pruebas de microscopía electrónica sugieren que estas proteínas están localizadas alrededor del anillo MS y cercanas al anillo C (Francis, N., *et al.*, 1994).

La evidencia bioquímica y genética ha permitido delinear un modelo en el cual, la rotación CW esta dada por la interacción de la proteína CheY-P con la proteína FliM, el cambio de conformación que provoca esta interacción es transmitido a las proteínas FliN y FliG, siendo esta última la que aparentemente juega un papel preponderante en la generación del torque. El cambio conformacional en FliG puede estar acompañado con un cambio en las cargas que se encuentran normalmente expuestas en el canal de protones y por ende, este cambio de atracción a repulsión entre las cargas del motor y del estator puede ser el mecanismo que permite llevar a cabo el cambio en la dirección de la rotación del flagelo (Lloyd, S., *et al.*, 1996).

Con el objeto de tener un modelo que describa el proceso del interruptor en enterobacterias se ha disectado la función de cada región de FliM (Marykawas, D., *et al.*, 1995; Toker, A., *et al.*, 1996). En estos trabajos se logró tener un mapa de las interacciones entre FliM y las otras proteínas del interruptor, así como entre FliM y CheY. Las regiones se localizaron de la siguiente manera: los primeros 60 aminoácidos de FliM son los encargados de la interacción con CheY-P, los segundos 50 aminoácidos y los últimos 60 aminoácidos son los encargados del ensamblaje del multímero de FliM en el anillo C, es decir, interacciones FliM-FliM. La región central, de los aminoácidos 101 a 260 están involucrados con la rotación del motor, y en un evento de *switching* correcto debido a la interacción FliM-FliG. La interacción con FliN está todavía en discusión, pero hay evidencias indirectas de que esta interacción involucra los últimos 52 aminoácidos del extremo C-terminal de FliM.

A pesar de que este modelo ha sido construido gracias a los estudios genéticos y bioquímicos desarrollados en *E. coli* y *S. typhimurium*; este aún sigue siendo un esquema fragmentado y con muchos aspectos teóricos aún por ser demostrado. Además, los modelos planteados anteriormente, que explican el control de la motilidad en enterobacterias, no parecen ser extensivos a la mayoría de los grupos bacterianos. De hecho, estudios recientes relacionados con el control de la motilidad en diferentes especies, indican, en la mayoría de los casos, que a pesar de existir un esquema general que parece ser compartido por una gran variedad de bacterias; la diversidad de los puntos de regulación en la motilidad así como los mecanismos que permiten a la bacteria sensor su medio ambiente, parecen alejarse bastante del esquema conocido para las enterobacterias.

#### *Rhodobacter sphaeroides.*

*Rhodobacter sphaeroides* pertenece al subgrupo- $\alpha$  de las proteobacterias. Este grupo se caracteriza por un alto contenido de G+C (arriba del 60%), incluye especies encontradas en una amplia variedad de ambientes y muestran una gran flexibilidad metabólica. Algunos otros miembros de este subgrupo son *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Caulobacter* y *Sinorhizobium*. De estas, la más cercana a las entéricas es *Caulobacter* y las más lejanas son *Sinorhizobium* y *Rhodobacter*.

A diferencia de las enterobacterias, muchos miembros del subgrupo- $\alpha$  muestran motores flagelares que solo giran en una dirección. *Rhodobacter sphaeroides* tiene un solo flagelo de ubicación subpolar. (Armitage, J., y

Macnab, R., 1987). Su flagelo generalmente gira CW, pero se han encontrado variantes CCW. (Packer, H.L. y Armitage, J., 1993).

Si se expone a la bacteria crecida en anaerobiosis a diferentes concentraciones de atrayentes, no hay cambios en la rotación del flagelo, en contraste, si se retira el atrayente del medio las células se detienen transitoriamente (Packer, H.L., *et al.*, 1996). Los datos anteriores sugieren que en lugar de nadar y reorientarse, *R. sphaeroides* nada y para, se reorienta durante la pausa, y sensea la reducción del atrayente (o su producto metabólico), al contrario de *E. coli*, que responde al aumento en la concentración de atrayente. Se ha observado que durante los episodios de paro el flagelo se encuentra relajado en su parte distal y se enrolla en dirección del cuerpo celular. Durante este periodo, la célula es reorientada y cuando el flagelo se desenrolla, la célula nada en una nueva dirección. Se asume que el movimiento browniano es el responsable de la reorientación de la bacteria durante los periodos de pausa. Las células desplazándose en un medio líquido de composición química constante muestran variaciones en la velocidad aún en condiciones no estimulantes, acelerando y desacelerando durante los periodos de nado y cambiando de dirección sin un periodo de pausa aparente (Packer, H.L., *et al.*, 1997). La velocidad media de *R. sphaeroides* es mucho más rápida que la de *E.coli*, siendo ésta de  $35 \mu\text{ms}^{-1}$  y  $20 \mu\text{ms}^{-1}$  respectivamente.

En presencia de atrayentes, *R. sphaeroides* aumenta la velocidad de nado hasta en un 25% y se reduce la frecuencia de paro. Este aumento se sostiene durante alrededor de 10 minutos y al parecer regresa a su velocidad

normal solo después que el efector ha sido metabolizado de alguna manera. (Armitage, J., y Schmitt, R., 1997), Se ha observado que los atrayentes para esta bacteria son metabolitos como succinato, acetato, azúcares y aminoácidos, pero aun no se han identificado repelentes. (Ingham, C., y Armitage, J., 1987, Poole, P.S., *et al*, 1993)

Hasta el momento no se sabe exactamente cual es la señal metabólica que controla el nado de *Rhodobacter*, pero han sido identificados algunos genes homólogos a las MCP de entéricas (Ward, *et al.*, 1995b), estos codifican para las proteínas denominadas Tlp. TlpA, pesa alrededor de 70kDa y tiene uno solo dominio que podría atravesar la membrana. Estudios con anticuerpos sugieren que es una proteína citoplásmica. La otra TlpB, pesa menos de 40kDa y tiene un solo dominio de señalamiento, homólogo a las MCPs con una pequeña región hidrofóbica de anclaje a la membrana. El que carezcan de un dominio sensor puede indicar que interactúan con alguna otra proteína posiblemente anclada a la membrana. Ambas proteínas son citoplásmicas y probablemente sensen intermediarios metabólicos específicos en el citoplasma. Cuando se muta TlpA, se reduce la quimiotaxis a varios de los compuestos utilizados como fuente de carbono pero sólo en condiciones aeróbicas, lo cual sugiere la existencia de una vía de transducción de señales alterna. TlpB se expresa en condiciones de anaerobiosis, pero su delección tiene poco efecto en el comportamiento en cualquiera de las dos condiciones de cultivo. La introducción de estos dos genes en una cepa *mcp<sup>-</sup>* de *E.coli* aunque no complementan la mutante, inhibieron la quimiotaxis en cepas silvestres, sugiriendo un efecto sobre la quimiosensibilidad de *E. coli* (Armitage, J., y Schmitt, R., 1997).



En cuanto a los genes de quimiotaxis, se han caracterizado a las bacterias del subgrupo- $\alpha$  y todas presentan una organización similar entre ellas y muy diferentes a *E.coli*. En los miembros del subgrupo estudiados hasta el momento, hay por lo menos dos genes *cheY*, pero no hay *cheZ*. En *Rhodobacter sphaeroides* se identificó primero un operón de genes de quimiotaxis constituido por los genes *tlpB*, *tlpA* (cuya función se explicó anteriormente), *cheY<sub>1</sub>*, *cheA*, *cheW*, *cheR*, *cheY<sub>2</sub>* y 4 ORFs. La funcionalidad de estos genes se demostró al introducir el gen *cheW* de *R. sphaeroides* en una mutante *cheW* $\Delta$  de *E. coli* y se observó un ligero incremento en la frecuencia de los eventos de rotación CCW (*switching*). Sin embargo, en *R. sphaeroides*, la mutación de este gen mantiene inalterada la respuesta quimiotáctica hacia los ácidos orgánicos débiles y se observó un ligero incremento en la respuesta a los azúcares. Asimismo, al hacer la delección del operón completo la respuesta a los quimioatrayentes principales como acetato y propionato sólo cambió ligeramente así como la respuesta a azúcares. Estos datos sugirieron que existe una vía alternativa de quimiotaxis en *R. sphaeroides* (Hamblin, P.A., *et al.*, 1997a). Posteriormente se identificó un segundo operón de genes flagelares funcionales, que presenta copias adicionales de los genes *cheA*, *cheW*, y *cheR*, una primera copia de *cheB*, un gen *tlpC* y una tercera copia de *cheY* (Hamblin, P.A., *et al.*, 1997b).

La existencia de varias copias de los genes quimiotácticos marca una diferencia importante del esquema planteado en enterobacterias. Una primera especulación ante la presencia de más de una copia de *cheY* sugiere una función particular para cada una de ellas, es decir, que cada CheY podría interactuar con diferentes partes del motor flagelar o que fueran utilizadas

diferencialmente en distintas vías de transducción de señales quimiotácticas (Ward, M. J., *et al*, 1995a).

Los puntos claves que controlan la motilidad de *Rhodobacter sphaeroides* son los periodos de rotación y paro del flagelo, estos muy probablemente están sujetos a un férreo control para que la bacteria sea capaz de alcanzar microambientes favorables.

Uno de los primeros aspectos interesantes es conocer la estructura que controla el proceso de rotación-paro del flagelo en esta bacteria. Como fue mencionado anteriormente, en las enterobacterias, el control CW-CCW está dado por la interacción de CheY-P la proteína FliM. En el caso de *Rhodobacter*, es factible plantear que el control de la rotación-paro ocurre por la interacción de alguna de las tres proteínas CheY con alguna proteína flagelar equivalente a FliM.

Además, como fue mencionado anteriormente, FliM, FliN y FliG están involucradas no solo en el proceso del control de la rotación, sino también son importantes para ensamblar el flagelo y generar el torque; en consecuencia, resulta lógico suponer la existencia de estas proteínas en *R. sphaeroides*. Aunque es posible esperar que estas proteínas presenten algunos cambios con respecto a sus contrapartes enterobacterianas, su identificación y estudio puede contribuir a elucidar algunos de los aspectos moleculares que controlan la quimiotaxis en estas bacterias.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Este estudio se centró en uno de los genes que codifican para las proteínas del interruptor del flagelo de *Rhodobacter sphaeroides*, la proteína FliM. Esta proteína es de suma importancia dado que es la conexión entre dos sistemas: por un lado el sistema de quimiotaxis y por otro lado el sistema flagelar. La unión de estos sistemas da por resultado una conducta de atracción o de repulsión hacia ciertas sustancias presentes en el medio. Dada la importancia de la proteína FliM como blanco del sistema quimiotáctico, el objetivo general de este trabajo es identificar, clonar y caracterizar el gen *fliM* de *R. sphaeroides*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

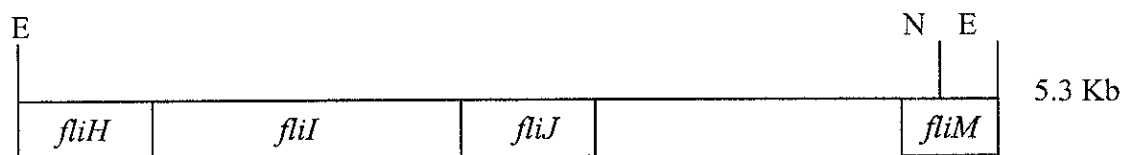
Elucidar la funcionalidad de la secuencia homóloga del gen *fliM* de *R. sphaeroides* por medio de una mutante por interrupción génica *fliM*.

Caracterizar el fenotipo de la mutante *fliM* por métodos genéticos y moleculares.

## ANTECEDENTES

Previamente se identificó y clonó una secuencia homóloga del gen *fliI* de enterobacterias en el cromosoma de *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. Este gen está localizado en un fragmento EcoRI de 5.3 Kb y está flanqueado por dos secuencias homólogas a los genes *fliH* y *fliJ* (Ballado, 1996).

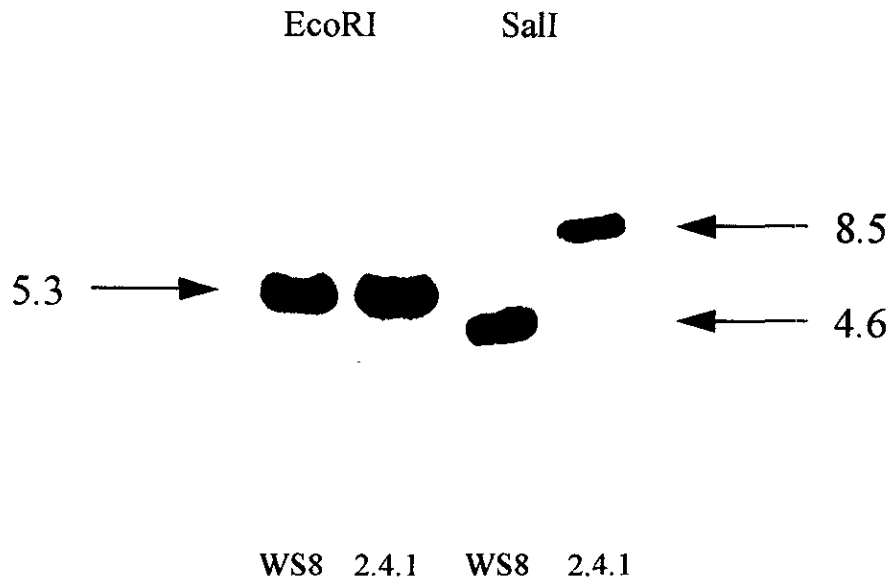
Al encontrarse un orden genético similar al de otras bacterias, surgió la posibilidad de que *fliM* se encontrara río abajo de los genes anteriores. Cuando se secuenció el extremo del fragmento EcoRI opuesto a *fliH* se encontró una secuencia homóloga al extremo 5' del gen *fliM* (ver Figura 3).



**Figura 3.** Esquema del fragmento EcoRI de 5.3 Kb de la cepa de *R. sphaeroides* 2.4.1 clonado en el vector pTZ19R. Enzimas de restricción: E: EcoRI; N: NcoI. El fragmento NcoI-EcoRI correspondiente al extremo 5' del gen *fliM* fue utilizado como sonda para localizar el gen *fliM* completo (recuadro sombreado)

Para obtener un fragmento de DNA que llevara el gen *fliM* completo, se hibridó el DNA cromosomal de las cepas silvestres WS8 y 2.4.1 con una sonda del extremo 5' de *fliM* obtenida a partir de la clona mencionada anteriormente. Como se puede observar en la Figura 4, se obtuvieron fragmentos EcoRI idénticos para ambas cepas, a diferencia de la digestión con SalI que dió

fragmentos de 4.6Kb para la WS8 y 8.5 Kb para la 2.4.1. Se decidió clonar el fragmento Sall de 4.6Kb en el vector pTZ19R para su secuenciación.



**Figura 4.** Southern Blot de las cepas WS8 y 2.4.1 de *Rhodobacter sphaeroides*. El DNA cromosomal total fue hibridado con una sonda que contiene el extremo 5' del gen *fliM* (ver figura 3).

La secuencia nucleotídica reveló un ORF cuya traducción conceptual predice un polipéptido de 310 aminoácidos; éste muestra un alto grado de similitud al compararlo con la proteína FliM de las enterobacterias, e incluso con otros marcos de lectura abiertos presentes en el cromosoma de las bacterias cuyo genoma ha sido completamente secuenciado (Tabla 1).

En la Figura 5 se muestra la alineación de algunas de éstas secuencias y es posible observar la presencia de algunos residuos invariables o altamente conservados, los cuales pueden ser importantes para la función de la proteína.

**Tabla 1**

Homología de FliM a nivel de identidad en diferentes especies

	FliM <i>Rs</i>
FliM <i>St</i>	26.99%
FliM <i>Ec</i>	26.99%
FliM <i>Bs</i>	21.47%
FliM <i>Bb</i>	23.00%
FliM <i>Cc</i>	21.32%

*Rs* = *Rhodobacter sphaeroides*

*St* = *Salmonella typhimurium*

*Ec* = *Escherichia coli*

*Bs* = *Bacillus subtilis*

*Bb* = *Borrelia burgdorferi*

*Cc* = *Caulobacter crecentus*

Así, el objetivo inicial de este trabajo fue ver si ésta secuencia homóloga correspondía efectivamente al gen *fliM* funcional en *Rhodobacter sphaeroides*.

```

          *           20           *           40
flim_ecoli : ~~~~~M GDS : 4
flim_salty : ~~~~~M GDS : 4
flim_bacsu : ~~~~~M SGE : 4
flim_rs : ~~~~~M AATPR : 6
flim_caucr : MADELDDQAAMAQWASENPPGGGEGVNEFGDFSGGMGGWDD : 41

```

```

          *           60           *           80
flim_ecoli : I I Q A I D L L N G D S -- E K D E P T A S V S G E S D P P P N T Q : 43
flim_salty : I I Q A I D L L N G D S -- D T K D E P T P G I A S D S D P P P N T Q : 43
flim_bacsu : V I Q N I D L L S A I S T G E D A E L K K E E K E K K V I F K R A : 45
flim_rs : K I S K I A L V G N L --- E A S E T S E N G L E P I A F G E N : 43
flim_caucr : G G G D G A S E R I L N O D E I D S L G F D L S G D G S D D R T G I R A I I N S : 82

```

```

          *           100          *           120
flim_ecoli : R R V V A E R I Q A L E I N E I A R H F F M G L F N L I R S E D I T G A : 84
flim_salty : R R V V A E R I Q A L E I N E I P R O F F M G L F N L I R S E D I T G A : 84
flim_bacsu : L R F S I D Q I R S L T R I H D N A R L L T T H F S A O T Y I H I S S S : 86
flim_rs : E L N Q L G D Y H A L R I N E I C R T A D V F L P I L Q R I S S F P P : 84
flim_caucr : A L V S Y E R I P M L E V F D L V R L M T T S L R N F T S D N V E V S D N : 123

```

```

          *           140          *           160
flim_ecoli : R I Q P Y H E F A R N V P T N L I H K E L R T G L V F S S I A I : 125
flim_salty : R I Q P Y H E F A R N V P T N L I H K E L R T G L V F S S I A I : 125
flim_bacsu : D Q V Y E E F I E S N M T I L N F D H E M E R I M M E Y N E T A I T : 127
flim_rs : E V R S F D D Y R S S Q D N F V S I T A S R E E L R N O M I V L P P F S I : 125
flim_caucr : S S I R F G D Y L N S L P G I L A F R A E E L D N Y G L L T W D S N I S : 164

```

```

          *           180          *           200
flim_ecoli : A I D N I E G G - D R F P T E G R E T H E C V I N F M K L A E G Y : 165
flim_salty : A I D N I E G G - D R F P T E G R E T H E C V I N F M K L A E G Y : 165
flim_bacsu : M D R M G G - I I S H N I D - - S L T E I E T I I S N L F E N A G N Y : 165
flim_rs : L T D S Y I G G - Q I R - H V P T T R T E T A T E E V I E L V T D R L N V A L : 164
flim_caucr : I I D V I L G G R R T A A M E G R P T T I E R V L V Q R M I D V V I H D L : 205

```

```

          *           220          *           240
flim_ecoli : S D A W K A I N F L E V E Y N R S E M Q V K E T N T T S N I V N T P F H : 206
flim_salty : S D A W K A I N F L E V E Y N R S E M Q V K E T N T T S N I V N T P F H : 206
flim_bacsu : K E A W Q S I A D I E P E M T E F E Y N P Q F V Q - V S N E T V V I S L N T : 205
flim_rs : Q V A W I D L M A L T F T V S R E E S M Q F A S F - V D G E M V N C S F M : 204
flim_caucr : K S A F E P L H E V S F S L D R L E T N P P F A A - A R A A A I L V K L R : 245

```

```

      *           260           *           280
flim_ecoli : IGGLEI--EFTICPESMIPL-RELEVNPPENSNEEDQ- : 244
flim_salty : IGGLEI--EFTICPESMIPL-RELEVNPPENSNEEDQ- : 244
flim_bacsu : IGETS--VINDICPHIVLPLIPKLSVHYWSDNEPKP : 245
flim_rs : LPTEPASFLIYLPLQTLKPISSCLRSR--SDFVDDDR : 243
flim_caucr : DMEI--RGRRIELLPYATLPIRKMLIQQ--FMGEFGRDN : 283

```

```

      *           300           *           320
flim_ecoli : NRKDNLVGVQHSLELVANFADISLRLELKLNGDVLPL : 285
flim_salty : NRKDNLVGVQHSLELVANFADIPLRLELKLKFGDVLPL : 285
flim_bacsu : EETKSLELRIMTALIPVVAELGTSELTIEFLSLEVGDCT : 286
flim_rs : SREKLEAAILSIPLTLSARLCEPEVPLRIMQMQFGDVLPL : 284
flim_caucr : IIEGHLATELWTTIMEVRAVLDEQCVPLRLINMOVGDITLM : 324

```

```

      *           340           *           360
flim_ecoli : IEK--PERIAHDEVPILTSOYGTLEGOYALAEHLINPI : 324
flim_salty : IEK--PERIAHDEVPILTSOYGTVEGOYALAEHLINPI : 324
flim_bacsu : LDKSVTEPTVLDGKPKFLGCAGRYRKQAVQ--LDHDT : 325
flim_rs : V--HLTEASLLTEQPFEAAPGERGQAAALNTRRHVRG : 323
flim_caucr : LNATSRQPGGARRRIPTRGRMGRRHSIAVRAEAPVDRR : 365

```

```

      *
flim_ecoli : LNSINEEQPK : 334
flim_salty : LNSINEEQPK : 334
flim_bacsu : RGEQGE~~~ : 332
flim_rs : ~~~~~~ : -
flim_caucr : KKA>VQKLK~~ : 373

```

**Figura 5.** Comparación de la secuencia de aminoácidos de FlIM entre las siguientes especies: ecoli (*Escherichia coli*), salty (*Salmonella typhimurium*), bacsu (*Bacillus subtilis*), rs (*Rhodobacter sphaeroides*) y caucr (*Caulobacter crescentus*). Los sombreados indican: aminoácidos idénticos o con un porcentaje de similaridad mayor o igual a 0.50% en todas las secuencias comparadas; aminoácidos idénticos o con un porcentaje de similaridad mayor o igual a 0.50% en el 80% de las secuencias comparadas; aminoácidos idénticos o con un porcentaje de similaridad mayor o igual a 0.50% en el 60% de las secuencias comparadas.



# MATERIALES Y METODOS

## Cepas Bacterianas

Cepas de *Escherichia coli*:

JM103:  $\Delta(lac-pro)$ , *thi*, *strA*, *supE*, *endA**sbcB*, *hsd R*<sup>-</sup>, F'*tra* D36, *proAB*, *lacI*<sup>q</sup>, *lacZ*  $\Delta$ M15.

HB101: F<sup>-</sup>, *hsdS*20(*r*<sub>B</sub><sup>-</sup>,*m*<sub>B</sub><sup>-</sup>), *recAB*, *ara-14*, *proA2*, *lacY1*, *gal* K2, *rpsL*20 (Sm<sup>r</sup>), *xyl-5*, *mtl-1*, E44,  $\lambda$ <sup>-</sup>.

XL1-Blue: F'<sup>+</sup>::Tn10, *proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup>, *lacI*<sup>q</sup>,  $\Delta(lacZ)$  M15/*recA1*, *endA1*, *gyrA*46, *thi*, *hsdR*17, *supE*44, *relA1*.

S17-1: Pro<sup>-</sup>, Res<sup>-</sup>, *recA*; plásmido integrado RP4-Tc::Mu-Kn::Tn7

Cepas de *Rhodobacter sphaeroides*:

WS8N: cepa silvestre con resistencia espontánea a ácido nalidíxico.

## Condiciones de cultivo.

Los medios de cultivo utilizados fueron:

Luria: que contiene 1% de bacto triptona, 0.5% de extracto de levadura y 1% de cloruro de sodio.

Medio mínimo de succinato (Sistrom, 1960): A una concentración 10X: 200mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 37.8 mM NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 340mM ácido succínico; 6.7mM L-glutámico; 2.5mM L-aspartico; 85mM NaCl; ácido nitriloacético; 12 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 2.3mM CaCl<sub>2</sub>; 0.07mM Sulfato ferroso; 1.6 mM Molibdato de amonio; 1 ml de Solución traza 10X (EDTA; 38mM ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 18 mM Sulfato ferroso; 9mM MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O; 1.5 mM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O; 1.8mM ácido bórico);

se ajusta el pH a 7.0 con KOH y se esteriliza por autoclave. Después se agrega una solución de vitaminas a una concentración final del 0.1% (ácido nicotínico, tiamina y biotina).

Medio selectivo para nado (Armstrong,1967) : 0.03% Bactotripton, 0.03% extracto de levadura y 0.3% de bactoagar. Se incuban las bacterias aeróbicamente durante 48 horas a 30°C.

Todos los medios se esterilizan por autoclave 22 minutos, a 15 lb y 121°C .

Para los cultivos en medios sólidos, se utilizaron los mismos medios, adicionándose 15 g/l de agar.

Las concentraciones de antibiótico para *E.coli* cuando eran requeridas fueron: ampicilina 100µg/ml, tetraciclina fueron 25 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml, estreptomycin 100µg/ml y espectinomicina 50µg/ml.

Las concentraciones de antibiótico para *R. sphaeroides* fueron: ácido nalidíxico, 25 µg/ml; tetraciclina 1 µg/ml; espectinomicina, 50 µg/ml.

Las cepas de *E. coli* se mantuvieron en tubos de agar inclinado con medio Luria, los cuales fueron resembrados a intervalos de un mes. Los cultivos líquidos se realizaron en Luria, a 37°C.

Las cepas de *R. sphaeroides* se mantuvieron en cajas de Petri con medio Sistroc crecidas en condiciones de anaerobiosis-fotosíntesis, y fueron resembradas cada mes. Los cultivos líquidos fueron en su mayoría aeróbicos a 30°C con agitación, en otras ocasiones fueron anaeróbicos a 30° con luz artificial.

## **Microscopía Electrónica**

A partir de un cultivo aeróbico de *Rhodobacter sphaeroides* se toman 10  $\mu$ l de células y se aplican a unas rejillas cubiertas de Formvar especiales para microscopio electrónico. Las muestras fueron teñidas negativamente con una solución de 1% de acetato de uranilo y se observaron en un microscopio electrónico JEM-1200EXII (Jeol, Tokio, Japón). Las micrografías fueron tomadas con un voltaje de aceleración de 80 kV.

## **Métodos Genéticos**

### **Transformación por el método de cloruro de calcio.**

A partir de un cultivo de la cepa deseada, inocular 10ml de Luria con 0.2 ml del cultivo. Crecer hasta una densidad óptica de 0.5 a 550nm. Dejar en hielo 10 minutos y centrifugar estéril en tubos de vidrio 4 minutos a 4500 rpm. Resuspender en 5 ml de  $\text{CaCl}_2$  100mM e incubar 15 minutos en hielo. Centrifugar 4 minutos a 4500 rpm y resuspender en 0.66 ml de  $\text{CaCl}_2$  100mM. Dejar en hielo 1 hora para posteriormente tomar 200 $\mu$ l de células y agregarlas a un eppendorf con plásmido (no más de 10 $\mu$ l de plásmido). Incubar 30 minutos en hielo y dar choque térmico a 42°C durante 2 minutos. Reposar otros 2 minutos en hielo y agregar 0.8ml de luria. Incubar a 37°C durante 45 minutos para que las células expresen la resistencia al antibiótico y centrifugar 20 segundos. Resuspender las células en lo que queda de decantar y platear todo en medio selectivo.

### **Transformación por el método "Simple y eficaz" (Inoue, H., 1990)**

Se inocula un matraz de 2 litros con 250 ml de SOB (2% Bactotripton; 0.5% extracto de levadura; 10mM NaCl; 2.5mM KCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM MgSO<sub>4</sub>) con 10 colonias de JM101 hasta una D.O. de 0.6 a una absorbancia A de 600nm y se incuba a 18 °C con agitación vigorosa. Se enfrían en hielo durante 10 minutos y se centrifugan a 3000 rpm 10 minutos a 4°C. Las células se resuspenden en 80 ml de TB (10 mM Pipes, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 15mM CaCl) se incuban en hielo 10 minutos y se vuelven a centrifugar a 3000 rpm 10 minutos a 4°C. Se resuspende en 20 ml de TB y se agrega con mucho cuidado DMSO hasta una concentración final de 7%. Se incuban en hielo durante 10 minutos y se guardan en tubos eppendorf en alícuotas de 0.2 ml. Las células se enfrían rápidamente en hielo seco y se guardan a -70°C.

Para transformar, las células se descongelan a temperatura ambiente y se pasan a hielo, se agregan 5 µl de plásmido y se incuban en hielo durante 30 minutos. Se da un choque térmico de 42°C durante 30 segundos y en hielo durante 2 minutos y se recuperan las células agregando 0.8 ml de SOC (SOB con 20mM de glucosa) incubándolas 1 hora a 37°C con agitación vigorosa. Finalmente se concentran las células y se platean en medio selectivo.

### **Conjugación Triparental.** (Donohue, T.J. y Kaplan, S., 1991).

Los sistemas de transformación tradicionales no son aplicables a *R. sphaeroides*, por lo que uno de los métodos para transferir genes es la conjugación triparental. Consiste en poner en contacto directo a las cepas donadoras y la cepa receptora y que por conjugación pase el DNA de plásmido de una a otra. Este procedimiento se lleva a cabo en presencia de

una cepa que contiene un plásmido ayudador que contiene los genes involucrados en el mecanismo de transferencia. En este trabajo la cepa donadora fue JM101/pRS133 (se describirá en Resultados), la cepa ayudante fue la HB101/pRK2013 y la cepa receptora es la WS8.

Todas las cepas se cultivan hasta fase estacionaria durante toda la noche. Al día siguiente se recultivan hasta que estén en fase exponencial y se toman los volúmenes equivalentes a  $5 \times 10^6$  células de las cepas donadora y ayudante y  $5 \times 10^8$  células de la cepa receptora. Se lavan en medio libre de antibióticos separadamente y se resuspenden en medio sin antibióticos. Posteriormente se mezclan las tres cepas en un tubo eppendorf estéril, se centrifugan y se resuspenden en 100  $\mu$ l de medio fresco. La mezcla se deposita sobre cuadritos de nitrocelulosa en una caja de petri con Luria semiseco. Las conjugantes se incuban durante 6 horas a 30°C y posteriormente se lavan los cuadritos en medio fresco y se eliminan los papeles. Se concentran las células y se resuspenden en 0.1ml de medio Sistro. Se plaquean en medio selectivo y se incuban a 30°C durante 3 días. Si al primer día se observan colonias el resultado es negativo.

### **Conjugación Biparental** (Donohue, T.J. y Kaplan, S.,1991).

Hacer cultivos de toda la noche de la mutante de *R. sphaeroides* (ver Resultados) y la cepa donadora S17-1 con el plásmido complementante donador pRK415 con el inserto de interés. Al día siguiente crecer a la *R. sphaeroides* hasta una densidad óptica de 0.6 a 600 nm y a S17-1 hasta fase exponencial. Se toman 0.5 ml de cada cultivo se centrifugan a 6000 rpm 3 minutos. Se lavan en 0.5 ml de medio fresco, se resuspenden en 100  $\mu$ l de Luria y se mezclan en un tubo. Ponerlas en nitrocelulosa en una caja de Petri

con Luria semiseco e incubarlas 6 horas a 30°C. Lavar las células y eliminar el papel, concentrarlas en 100 µl de medio y platearlas en medio selectivo. Incubar durante 3 días a 30°C.

### **Métodos de Biología Molecular.**

#### **Purificación de plásmidos por el método de mini-prep hervidos.-** (Holmes, D.S., Quingley, M., 1981)

A partir de 2 ml de un cultivo de toda la noche en medio selectivo, se pasan las células a un eppendorf donde se centrifugan 4 minutos. Se resuspenden en lo que quede de medio y se agregan 300µl de STET (8% sacarosa, 5% tritón, 50mM EDTA pH 8.0, 50mM tris-HCl pH 8.0) y 30µl de lisozima 10mg/ml. Se agitan vigorosamente 2 segundos, se hierven 45 segundos exactamente y se centrifugan a temperatura ambiente durante 12 minutos. Se toman 210µl de sobrenadante agregando después 230µl de isopropanol. Se precipitan a -70°C durante 15 minutos y posteriormente se centrifugan 10 minutos en frío. La pastilla se lava con etanol al 70% y se seca al vacío durante 15 minutos. La pastilla se resuspende en 27µl de agua y se corren 3µl en un gel de agarosa al 1%.

#### **Purificación de plásmidos por columna de Quiagen.**

Este método está basado en la lisis alcalina de bacterias (Birboim, 1979) modificado. El procedimiento ha sido condensado en tres pasos en combinación con la purificación en una columna de intercambio aniónico con una resina QUIAGEN que tiene una superficie hidrofílica de DEAE lo que produce una alta densidad de cargas en la superficie, que junto con un poro

grande permite un rango amplio de separación de diferentes tipos de ácidos nucleicos. La combinación adecuada de pH y concentración de cloruro de sodio, permite separar el plásmido de otras especies de ácidos nucleicos.

A partir de un cultivo amplificado de 100-500 ml, se lisan las bacterias en una solución de NaOH/SDS en presencia de RNasa A, este lisado es neutralizado añadiendo acetato ácido de sodio para precipitar los residuos celulares y el DNA cromosomal. Posteriormente el sobrenadante se pasa por una columna de QUIAGEN equilibrada por flujo de gravedad y se lava con cloruro de sodio 1M para eliminar los contaminantes residuales sin que el plásmido se despegue de la columna. Se eluye el DNA con un buffer de alta sal (1.25 M NaCl, pH 8.5) y por último se concentra y se desala por precipitación con isopropanol. La pastilla se resuspende en un volumen apropiado de agua.

### **Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.** (Vogelstein, B. y Gillespie, D., 1979).

Para este procedimiento se utilizó el kit de USBioclean™ MP, el cual es un método rápido para extraer DNA de geles de agarosa, elimina solventes orgánicos, concentra el DNA sin precipitación con etanol y se pueden obtener rendimientos de hasta el 80% de recuperación; el producto de este procedimiento es lo suficientemente puro como para llevar a cabo manipulaciones como marcaje con radioactividad, digestiones enzimáticas o secuenciación. Está basado en el método de Vogelstein y Gillespie, quienes aprovechan la capacidad del vidrio para atraer DNA por carga eléctrica.

El procedimiento inicia cortando las bandas justas de DNA del gel y ponerlas en un eppendorf. Añadir 3 volúmenes de yoduro de sodio 6M.

Incubar a 55°C aproximadamente 5 minutos hasta que se disuelva completamente la agarosa. Añadir 10µl de glass powder (polvo de vidrio) previamente agitado vigorosamente y mezclar bien. Incubar 30 minutos en hielo. Centrifugar 2 minutos a 3000 r.p.m. en frío y guardar el sobrenadante como precaución. Al tubo de la pastilla añadirle 500µl de buffer de lavado frío y agitar vigorosamente. Centrifugar 2 minutos a 3000 r.p.m., eliminar sobrenadante. Lavar 2 veces más eliminando el sobrenadante lo más posible. Resuspender en 30 µl de agua e incubar a 42°C durante una hora. Correr 3µl en un gel de agarosa al 1%. En caso de no ver la banda en el gel repetir el procedimiento con el sobrenadante que se guardó como precaución desde el punto donde se agrega el glass powder.

**Extracción de DNA cromosomal.** (Ausubel, F.M. *et al.*, 1989)

15 ml. de cultivo de *R. sphaeroides* se centrifugan y resuspenden en 567 µl de buffer TE pH 7.8 cuidadosamente. Se agregan 30 µl de SDS al 10% y 10 µl de proteinasa K 20mg/ml. Se incuba toda la noche a 37°C. Se agregan 100µl de cloruro de sodio 5M y se mezcla bien por inversión del tubo, se añaden 80 µl de una solución CTAB 10%/NaCl 0.7M se mezcla y se incuba 20 minutos a 65°C. Se extrae con un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), posteriormente con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y finalmente se precipita con 0.6 volúmenes de isopropanol. El precipitado se transfiere con una pipeta Pasteur a un tubo con etanol al 70% para lavar el DNA y se vuelve a transferir a un tubo eppendorf donde se resuspende con un volumen apropiado de agua.



## **Hibridización DNA:DNA (Southern Blot)**

### Procedimiento de Southern Blot.(Southern, 1975)

Se corre un gel de agarosa al 1% con las muestras de DNA cromosomal total digerido totalmente con distintas enzimas. Después de correr el gel se tiñó con bromuro de etidio y se sacó una fotografía.

#### Para desnaturalizar el gel:

Se remoja el gel en 5 volúmenes de HCl 0.25M con agitación suave, se quita todo el azul de bromofenol hasta que se ve una coloración amarilla en el gel, pero no debe prolongarse más de 15 minutos.

Inmediatamente se coloca el gel en 5 volúmenes de NaCl 1.5M y NaOH 0.5M por 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Este lavado se repite una vez más.

#### Para neutralizar el gel:

Neutralizar dos veces el gel en 5 volúmenes de una solución de Tris 1M pH 7.5 - NaCl 1.5M durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se verifica la eficiencia de la neutralización del gel, probando el pH. Si éste no es menor de 8.5, se repite el último lavado.

#### Para transferir el gel:

Se corta el filtro de nylon y se remoja en agua desionizada. Se monta una cámara de transferencia que contiene SSC 20X. Una vez transferido el DNA se fija el filtro con luz ultravioleta (autocrosslink).

#### Prehibridación del filtro:

El filtro se prehibrida durante 4 horas a 42°C con la siguiente solución:  
Para 16 ml. de solución

Formamida 100% 50% (v/v)		8.0 ml
SSPE 20X	6X	4.8 ml
(SSPE: NaCl 3M, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O 0.2M, Na <sub>2</sub> EDTA, 0.02, pH 7.4)		
Denhart 50X	5X	1.6 ml
SDS 10%	1%	1.6 ml

El DNA de timo (10mg/ml) se utiliza en un volumen de 20µl por cada ml de solución de prehibridación. Se hierve previamente durante 10 minutos y se caza en hielo durante 5 minutos.

Para hibridar el filtro:

A la solución de prehibridación se le agrega la sonda marcada hervida durante 10 minutos e incubada en hielo durante 5 minutos. Se deja a 42°C toda la noche.

Para lavar el filtro:

Lavar 2 veces con SSC5X y 0.5% SDS a 65°C durante 5 minutos.

Lavar 1 vez con SSC 0.1X y 1% SDS a 50°C durante 30 minutos.

Lavar una vez con SSC 2X a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Para unir el conjugado de estreptoavidina-fosfatasa alcalina (SA-AP):

Lavar el filtro en 46 ml de TBS-Tween20 (Tris base 100mM, NaCl 150mM, Tween 20 0.05% (v/v), pH 7.5 filtrar a través de una membrana de 0.45µm estéril) durante un minuto. No hay que dejar que se seque la membrana. Poner la membrana en una bolsa nueva de hibridación. Añadir 34 ml. de solución bloqueadora, precalentada a 65°C. Incubar una hora a 65°C con agitación suave. Por otro lado centrifugar el tubo del conjugado SA-AP durante 30 minutos en frío, tomar 3µl y llevarlo a 3 ml con TBS-Tween. Regresar la solución de bloqueo a su tubo y agregar el SA-AP diluido. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Cambiar de

bolsa de hibridización y enjuagar con 45 ml de TBS-Tween durante 15 minutos a temperatura ambiente. Enjuagar una hora con otros 45 ml de TBS-Tween. Lavar la membrana con la solución de lavado final 1X (4.5 ml de 10X *final wash buffer* (Tris base 100mM, NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 50 mM, pH 9.5) en 45 ml de agua), incubar una hora a temperatura ambiente. Poner la membrana en un folder y a lo largo de la orilla del lado en que cierra agregar 450µl de Reactivo de detección. Cerrar el folder y extender el reactivo a lo largo de la membrana sin dejar burbujas. Incubar durante 5 minutos. Poner a exponer una placa de radiografía durante 1- 5 minutos y revelar.

#### Elaboración de la sonda:

La sonda de *fliM* fue obtenida a partir de un producto de PCR de 1.2 Kb que abarca la totalidad del gen. Una segunda sonda se preparó con la digestión del plásmido pRS75 con *NcoI* y *EcoRI* dando un fragmento de 431pb. Se purificaron a partir de un gel de agarosa y se marcaron con el kit de BioPrime. Con este kit los primers se unen al templado de DNA desnaturalizado y se extiende con el fragmento Klenow en presencia de biotina-14-dCTP. Hay una amplificación de 10 a 40 veces de la sonda. Se puede iniciar con un mínimo de 25 ng de DNA, se agregan 20 µl de Solución de random primer. Se desnaturaliza durante 5 minutos y se pasa a hielo inmediatamente. Se agregan 5 µl de dNTPs y agua a un volumen total de 49 µl. Se mezcla y se añade 1 µl de Fragmento Klenow, después se incuba una hora a 37°C y se agregan 5 µl de buffer de parado. Se precipita dos veces con 1/10 de acetato de sodio y dos volúmenes de etanol absoluto y se resuspende en un volumen apropiado de agua.

## Métodos Enzimáticos

### Determinación de la $\beta$ -glucuronidasa (GUS) (Jefferson, R., 1986)

Este método fue adaptado para *R. sphaeroides* a partir de un protocolo diseñado para plantas de tabaco. A partir de 30 ml de un cultivo aeróbico de *R. sphaeroides* se tomaron cada hora 1.5 ml de cultivo y se centrifugaron 4 minutos a 6000 rpm. Se resuspendió la pastilla en 200  $\mu$ l de buffer de extracción (50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7; 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol; 10mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; 0.1% TritonX-100). Las muestras se congelan a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su utilización. Posteriormente se sonicán con dos pulsos de 10 segundos y se centrifugan a 14000 rpm durante 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Se transfiere el sobrenadante a otro eppendorf y se deja en frío. Por otro lado se prepara el Buffer de ensayo (1mM 4-metil umbeliferil  $\beta$ -D-glucoronido (MUG) en buffer de extracción), que antes de usarse se precalienta en alícuotas de 500  $\mu$ l a  $37^\circ\text{C}$ . A este buffer precalentado se le agregan 25  $\mu$ l de extracto de bacterias y se agitan para mezclarlos. Se toman alícuotas de 100  $\mu$ l y se agregan a 900 $\mu$ l de Stop buffer (0.2M de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a temperatura ambiente. Se para la reacción a tiempo 0 minutos y 15 minutos. Las muestras se cuantifican en un fluorómetro calibrado con una solución blanco de 100nM de metilumbeliferona (MU).

## Determinación de proteína por el Método de Lowry (Lowry, O.H., *et.al.*, 1951).

Se preparan las siguientes soluciones:

- Solución A, para 1 litro

NaOH 4 g

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20 g

- Solución B, para 100 ml:

Tartrato de sodio y potasio 2 g

- Solución C, para 100 ml:

CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1 g

- Solución de BSA, 1mg/ml, se separa en alícuotas y se guarda a -20°C.

- Solución mezcla:

Solución A 98 ml

Solución B 1 ml

Solución C 1 ml

- Solución Folín:

Dilución 1:3 de folín-ciocalteu en agua.

El blanco es 1 ml de agua destilada. La muestra control son 100µl de BSA en 900µl de agua destilada. La muestra problema son 100µl de extracto en 900µl de agua destilada.

A cada una de las muestras anteriores se le agregan 5 ml de la solución mezcla, se agita vigorosamente y se deja reposar por 10 minutos. Posteriormente se agregan 500µl de solución de folín, se agita vigorosamente y se deja reposar por 30 minutos. Se determina la cantidad de proteína leyendo a 625 nm en el espectrofotómetro.

## RESULTADOS.

### Construcción de la mutante *fliM* de *Rhodobacter sphaeroides*.

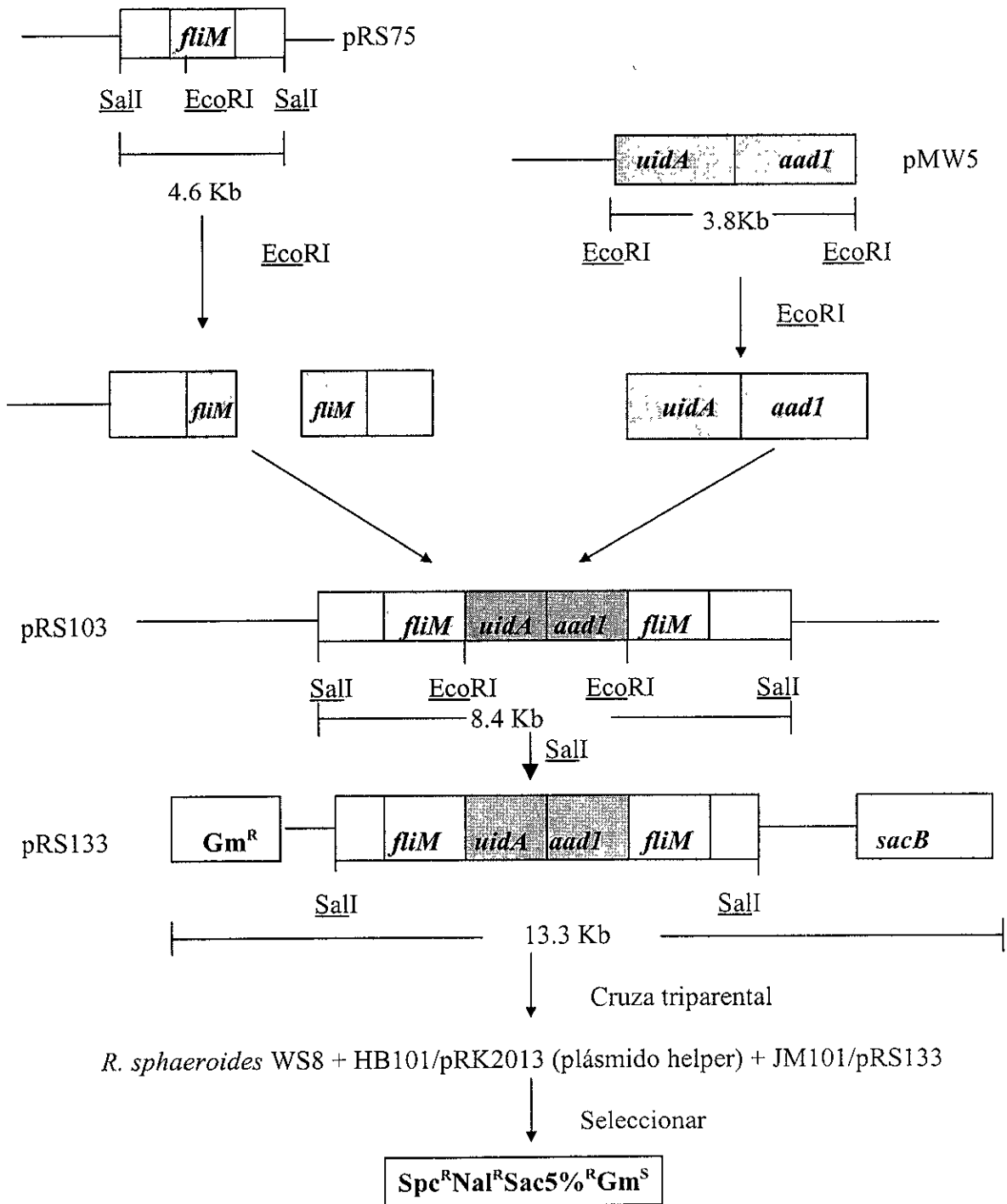
En base a los antecedentes se procedió a construir una cepa mutante *fliM* por disrupción génica. Como primer paso se subclonó el fragmento SalI de 4.6 Kb del plásmido pBG0405 en un vector pTZ18R, el cual fue previamente modificado con el objeto de eliminar el sitio EcoRI del polilinker. Este plásmido fue denominado pRS75 (Figura 6).

Como segundo paso se digirió el plásmido pRS75 con EcoRI, cuyo único sitio de reconocimiento se encuentra ubicado dentro de la región codificadora de *fliM*. En este sitio se insertó un cassette de 3.8Kb que contiene los genes *uidA*, y *aad1*, que codifican para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa y para la enzima aminoglicosido-3-adeniltransferasa a espectinomycinina respectivamente. El nuevo plásmido fue denominado pRS103. La digestión de éste último con la enzima SalI produce un fragmento de 8.4Kb el cual lleva el alelo *fliM::uidA-aad1*. Este fragmento fue posteriormente subclonado en el vector suicida pJQ200mp18, llamándosele pRS133.

El vector pJQ200mp18 ( $Gm^R$ ) tiene ciertas características especiales. Es incapaz de replicarse en *R. sphaeroides* y contiene el gen *sacB* de *Bacillus subtilis* cuya expresión en presencia de sacarosa es letal en bacterias gram-negativas de tal manera que es posible discriminar entre un evento de integración del vector completo (recombinación sencilla) y un evento de

doble recombinación. En este caso debido a que el alelo *fliM::uidA-aad1* está flanqueado por aproximadamente 2Kb de DNA a cada lado, hay una buena zona de homología para que se lleve a cabo la doble recombinación.

Una vez clonado el fragmento SalI de 8.4 Kb en el vector suicida, se llevó a cabo una conjugación triparental entre la cepa receptora WS8 de *Rhodobacter sphaeroides* la cepa HB101/pRK2013 que contiene un plásmido helper con los genes *tra* para ayudar a transferir el plásmido presente en la cepa JM101/pRS133 de *E. coli* a la WS8. (ver material y métodos). La selección de la mutante *fliM* se hizo en cajas de medio Luria-espectinomicina-sacarosa, al cual se le añadió ácido nalidíxico para contraseleccionar la cepa de *E. coli* que es resistente a espectinomicina. Las transconjugantes obtenidas se replicaron en cajas del mismo medio y en cajas con la misma combinación adicionadas con gentamicina. Se obtuvieron colonias Gm<sup>R</sup> Spc<sup>R</sup> Nal<sup>R</sup> SacB<sup>R</sup> las cuales pueden representar mutaciones en *sacB*. Asimismo se obtuvieron dos colonias Gm<sup>S</sup> Spc<sup>R</sup> Nal<sup>R</sup> SacB<sup>R</sup> lo que sugiere que ocurrió un evento de doble recombinación utilizando la secuencia cromosómica adyacente a *fliM*. A esta cepa se le denominó NG1 y se procedió a su caracterización.



**Figura 6.** Diagrama de construcción de la mutante NG1, *fliM::uidAaadI* en *R. sphaeroides*. Las cajas sombreadas representan a las regiones codificadoras indicadas. Las cajas abiertas sin texto indican las regiones de DNA cromosomal adyacentes al gen *fliM*. Las líneas delgadas representan el DNA de los vectores de clonación.



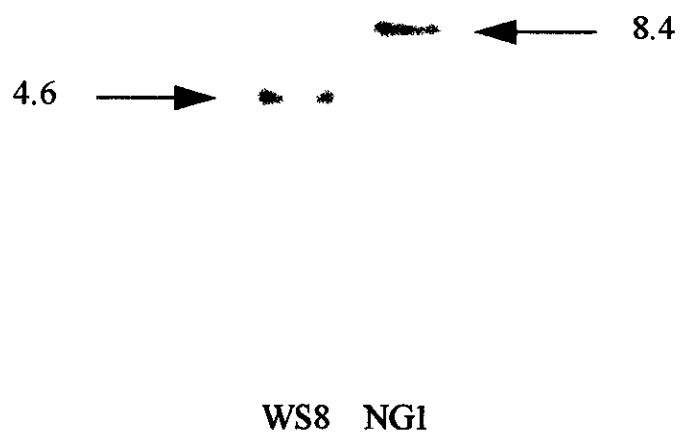
## Caracterización de la cepa NG1.

### Southern Blot de las cepas WS8 y NG1

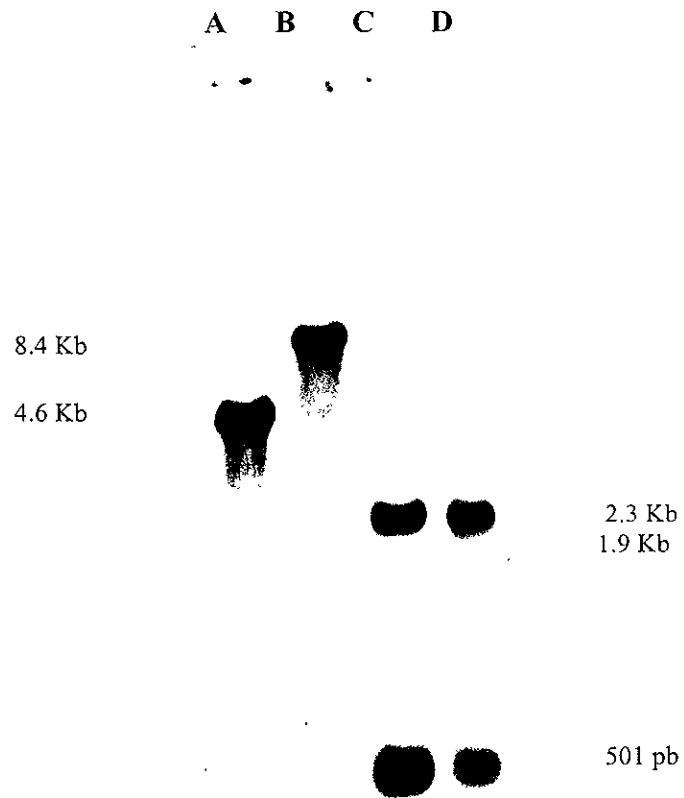
Para comprobar que el cassette de *uidA-aad1* se insertó en el cromosoma en la región homóloga a *fliM* se hizo un Southern Blot con DNA cromosomal de la cepa silvestre WS8 y la mutante NG1 digeridas totalmente con SalI e hibridadas con una sonda biotinilada de 431 pb extraída del plásmido pRS75 digerido con NcoI y EcoRI la cual abarca del codón del inicio de la traducción de *fliM* al sitio donde se insertó el cassette (Figura 7).

En la Figura 7 se observa una diferencia entre la cepa WS8 y la NG1 de 3.8 Kb, equivalente a la longitud del cassette insertado en *fliM*; además, en esta cepa tampoco se observa el fragmento correspondiente a *fliM* silvestre, por lo tanto, este resultado sugiere que el gen *fliM* silvestre fue reemplazado por el alelo mutante *fliM::uidA-aad1*.

Otra manera de comprobar la inserción del cassette sin pérdida de otras secuencias fue haciendo un Southern Blot pero ahora utilizando como sonda el gen *fliM* completo. En los dos primeros carriles de la figura 8A , el DNA cromosomal de las cepas WS8 y NG1 fue digerido con SalI (carriles A y B), una vez más se observan las bandas de 4.6 y 8.4 Kb; en los dos siguientes carriles (C y D) el DNA cromosomal fue digerido con la enzima PstI. (Figura 8)



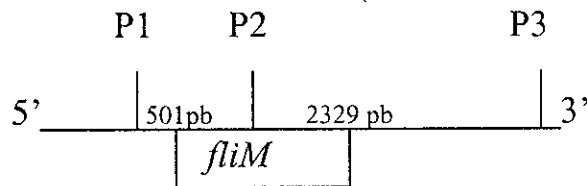
**Figura 7.** Hibridización DNA-DNA tipo Southern Blot de la mutante NG1 *fliM::uidA-add1* de *R. sphaeroides*. El DNA total de las cepas WS8 y NG1 fue digerido con SalI e hibridado con una sonda biotinilada de *fliM* (fragmento NcoI-EcoRI de 431 pb)



**Figura 8.** Hibridización DNA-DNA tipo Southern Blot de las cepas WS8 y NG1, hibridizadas con la sonda biotilizada de *fliM* de 931 pb. Carril A: WS8 digerida con Sall; carril B: NG1 digerida con Sall; carril C: WS8 digerida con PstI; carril D: NG1 digerida con PstI.

En la Figura 9A se muestra en un diagrama la digestión del DNA cromosomal de la cepa silvestre WS8 con PstI, que corresponde al carril C de la figura 8. Se señalan los sitios de corte de la enzima en las zonas aledañas al gen *fliM*, y que abarcan las bandas marcadas con la sonda biotinilada de 931pb que abarca al gen *fliM* completo. Existen tres sitios de corte, el primero (P1) está ubicado antes de *fliM* y se encuentra a 501 pb del siguiente sitio PstI presente en *fliM* (P2), esta zona corresponde a la banda inferior del carril C. El tercer sitio (P3) está localizado a 2329 pb del sitio P2, y corresponde a la banda superior del carril C.

La Figura 9B representa el diagrama de la digestión con PstI del DNA cromosomal de la cepa NG1, correspondiente al carril D de la Figura 8. En dicha región hay 5 sitios de corte de la enzima PstI. El primero (P1) está localizado antes del gen *fliM* y se encuentra a 437 pb del sitio 2. Este sitio 2 está presente al inicio del cassette *uidA-add1*, y corresponde a la banda inferior del carril D (Figura 8). El sitio 3 también corresponde al cassette *uidA-add1* y está ubicado a 1.9 kb del sitio 2. Esta banda no se aprecia en el gel debido a que no se revela con la sonda marcada. El sitio P2 corresponde al sitio interno presente en el gen *fliM* (ver P2 en la silvestre), y en el carril D se puede apreciar ligeramente una banda de 1967 pb. Cabe destacar que la señal es muy débil porque hibrida solo con 67 pb de la sonda biotinilada y el resto corresponde al gen *add1* del cassette. Por último, el sitio de corte P3 se encuentra a 2329pb del sitio P2 al igual que en la cepa silvestre, y corresponde a la banda superior del carril D. Por lo tanto a pesar de la inserción del cassette en *fliM*, no se observaron rearrreglos adicionales ni la presencia de secuencias extrañas en la región donde debió haber ocurrido la recombinación.

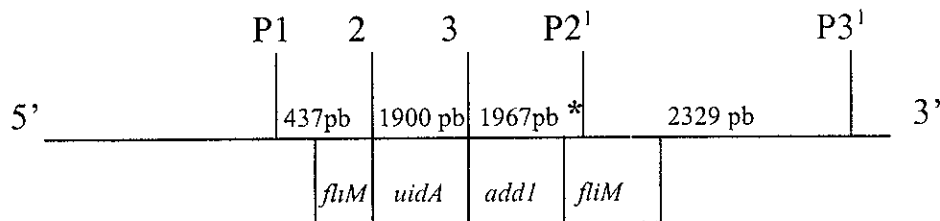


#### DISTANCIAS ENTRE LOS SITIOS DE CORTE

P1 a P2 = 501 pb (banda inferior del carril C, figura 8)

P2 a P3 = 2329 pb (banda superior del carril C, figura 8)

**Figura 9A.** Diagrama de la digestión con PstI de la cepa WS8.



#### DISTANCIAS ENTRE LOS SITIOS DE CORTE:

P1 a 2 = 437 pb (banda inferior del carril D, figura 8)

2 a 3 = 1900 pb (no está marcada con la sonda)

3 a P2 = 1967 pb (banda intermedia del carril D, figura 8, \* representa la zona marcada con la sonda lo que da lugar a la banda intermedia ligeramente clara de 1.9 kb)

P2 a P3 = 2329 pb (banda superior del carril D, figura 8)

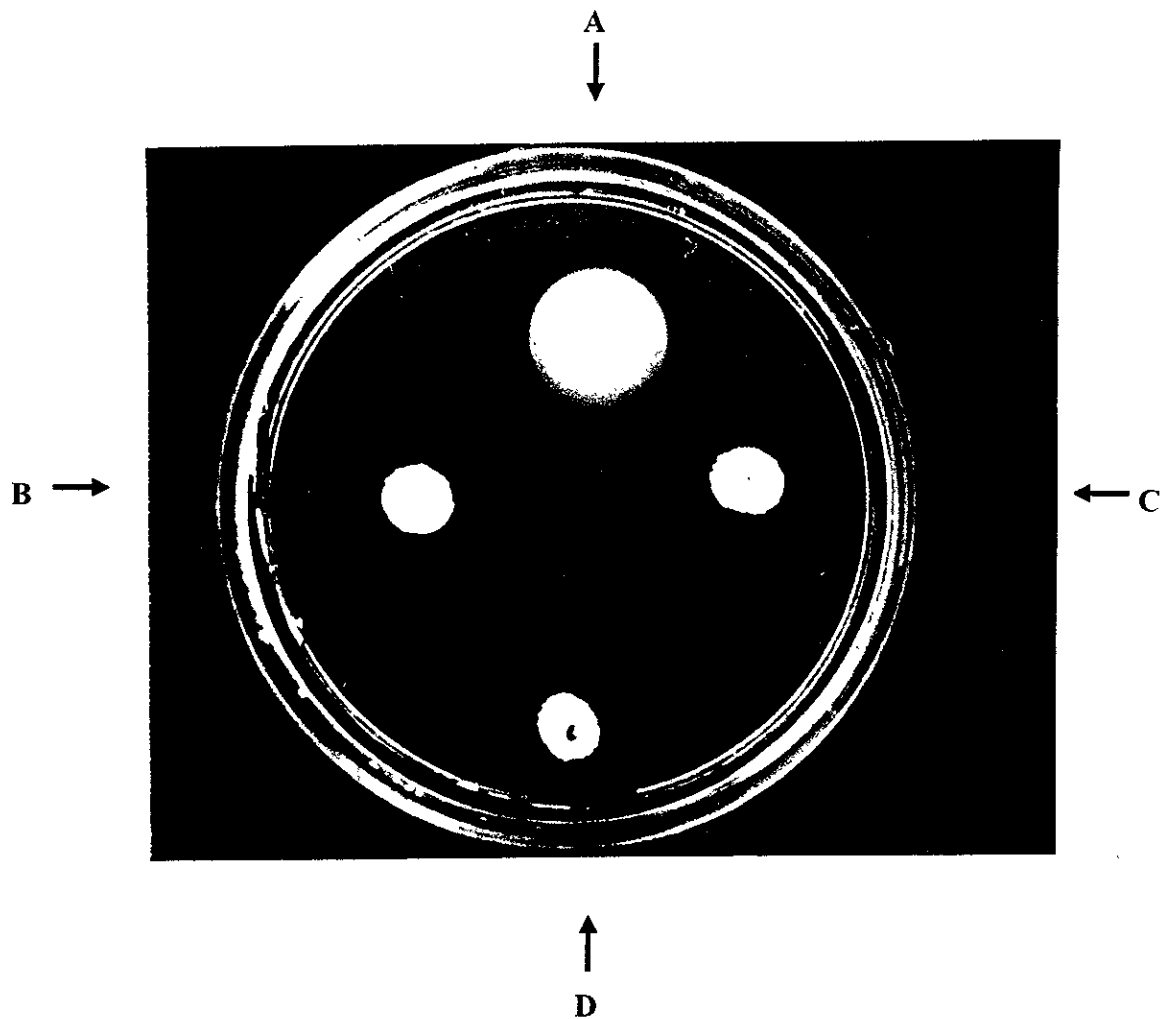
**Figura 9B.** Diagrama de la digestión con PstI de la cepa NG1.

<sup>1</sup> Las sitios de corte P2 y P3 son equivalentes a los sitios de corte P2 y P3 de la cepa silvestre (Figura 9A)

## **Fenotipo de la cepa NG1.**

### **Observaciones en cajas de agar suave.**

Una forma de detectar la motilidad bacteriana es observando el desplazamiento de la población a través de un medio semisólido. Esto ocurre dado que a partir del punto de inoculación las bacterias se dispersan cuando los nutrientes empiezan a ser limitantes. En estas condiciones se puede observar a simple vista la formación de halos de crecimiento que representan a las bacterias. Una bacteria no mótil es incapaz de desplazarse del punto de inoculación. En la Figura 10, se ve claramente la diferencia de motilidad entre la cepa silvestre WS8 (A) y la mutante NG1 (B y C) a las 24 horas de haber sido inoculadas. Como control negativo se usó una cepa no flagelada de *R. sphaeroides* (D). Esta prueba nos indica que la cepa NG1 es incapaz de nadar en cajas de agar suave a diferencia de la cepa silvestre WS8 que forma halos normales. La única conclusión que se obtiene de este ensayo es que la bacteria es incapaz de desplazarse hacia un medio ambiente favorable. Esto puede ser debido a que la cepa sea quimiotácticamente incompetente, esto se observa en cepas cuyo flagelo no responde a las señales quimiotácticas y a pesar de que pueden desplazarse en medio líquido, la falta de reorientación les impide formar anillos quimiotácticos en este ensayo. Alternativamente, la cepa NG1 puede simplemente no nadar por las razones que se mencionarán en la siguiente sección.



**Figura 10.** Caja de agar suave donde se muestra la diferencia de motilidad de la mutante NG1 con respecto a la WS8; y como control negativo, se utilizó una mutante Fla<sup>-</sup>. A) WS8; B y C) NG1; D) mutante Fla<sup>-</sup>.

### **Observaciones al microscopio óptico.**

Se analizaron alícuotas de la cepa NG1 obtenidas a partir de cultivos líquidos crecidos en condiciones aeróbicas en diferentes etapas de crecimiento. Al observar la mutante en la fase lag (60 unidades Klett), en la fase exponencial (80 unidades Klett) y en la fase exponencial tardía (120 unidades Klett), ésta no presentó fenotipo de nado. Este resultado descartaría que la cepa posea fenotipo Che<sup>-</sup>, con lo cual había dos posibilidades: una que fuera una mutante Mot<sup>-</sup>, es decir, que presentara un flagelo paralizado, y la segunda posibilidad es que fuese una mutante Fla<sup>-</sup>, sin flagelo. Para distinguir

cual fenotipo era el correspondiente a la mutante NG1 se decidió observarla al microscopio electrónico.

### **Observaciones en microscopio electrónico.**

Con el objeto de analizar la mutante NG1 en el microscopio electrónico, una muestra obtenida a partir de los halos de crecimiento en cajas de agar suave fue teñida y procesada como se describe en material y métodos. Como se puede observar en la fotografía, (Figura 11) la mutante NG1 no presenta flagelo. Se hicieron diversas sesiones de microscopía con cultivos purificados e independientes y en más de un 90% de los campos observados, las bacterias fueron Fla<sup>-</sup> (sin flagelo). Sólo en una pequeña proporción se observaron bacterias con flagelos cercanos pero separados del cuerpo principal, lo que podría indicar que son supresoras de la mutación *fliM* nula pero con un flagelo más corto y quizá más lábil.

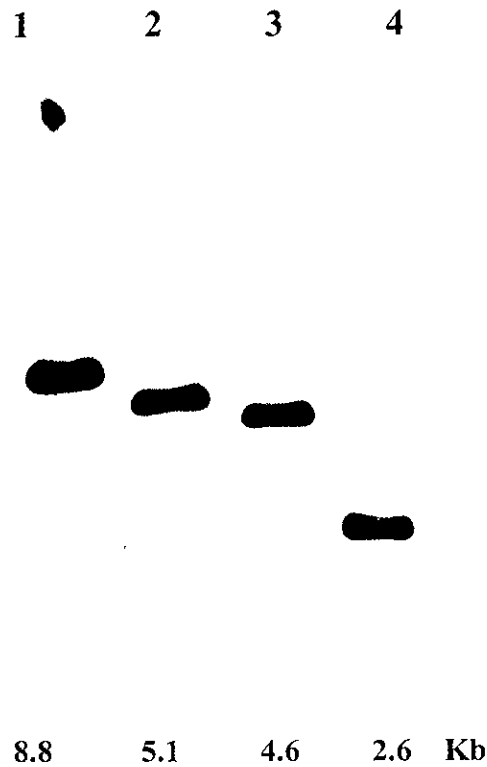


**Figura 11.** Micrografía de la mutante NG1 *fliM*.



## ¿Cuántos genes *fliM* hay?

Durante el desarrollo de este trabajo se publicaron dos artículos en donde se reporta la existencia de dos proteínas CheY funcionales, uno en *Rhizobium meliloti* (Sourjik, V., y Schmitt, R., 1996) y otro en *Rhodobacter sphaeroides* (Ward, M.J., et al., 1995a), posteriormente fue reportada una tercera proteína CheY en *R. sphaeroides* (Hamblin, P., et al., 1997). Estos resultados abrían la posibilidad de que existiese más de una copia de *fliM* en el cromosoma. Con el objeto de tratar de identificar una posible copia del gen ya clonado, se hizo un Southern Blot con el DNA cromosomal de la cepa silvestre WS8 digerido con varias enzimas de restricción. Se utilizó la sonda NcoI-EcoRI de *fliM* y condiciones de hibridización y lavado que garantizaron un 70% de homología. En la Figura 12, se observa una sola banda de hibridización para todas las digestiones, por lo tanto, consideramos que es muy poco probable la existencia de otra copia de *fliM* en el genoma de *R. sphaeroides*, que sea al menos 70% homóloga. Se discutirán posteriormente las implicaciones de este resultado con relación a la existencia de tres proteínas CheY.



**Figura 12.** Hibridización DNA-DNA tipo Southern Blot de la cepa de *R. sphaeroides* WS8. Carriles 1 a 4: DNA cromosomal digerido con diferentes enzimas. Carril 1: ClaI; Carril 2: EcoRI; Carril 3: SalI; Carril 4: BamHI. Este filtro fue hibridado con una sonda de 431 pb biotinilada (fragmento NcoI-EcoRI de *fliM*). En la parte inferior de cada carril se indica el tamaño de los fragmentos en Kb.

### Nivel de expresión del gen *fliM* utilizando el gen *uidA* como reportero.

Para medir la transcripción de genes existen diferentes métodos. Entre ellos, el Northern Blot, el primer extension, o el RT-PCR cuantitativo.

En el caso de los genes flagelares de *R. sphaeroides*, no se han podido detectar transcritos por Northern Blot, esto puede deberse a que la

transcripción de los genes flagelares es muy baja y la sensibilidad del método no es suficiente para detectarlos.

Aprovechando que el cassette utilizado para construir la mutante NG1 lleva el gen *uidA* para ser utilizado como gen reportero, esto es sin promotor, se determinó la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa en la cepa NG1. En la literatura no se ha reportado la existencia del gen *uidA* en *Rhodobacter sphaeroides*, pero como control negativo se midió la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa en la cepa silvestre en condiciones aeróbicas. No se detectó actividad enzimática en dicha cepa en las condiciones utilizadas, por lo que asumimos que la actividad detectada en la mutante es debida a la presencia del cassette y es reflejo de la actividad del promotor del cual *fliM* es expresado.

En la Figura 13 se observa la curva de crecimiento de las cepas WS8 y NG1. La actividad específica de la  $\beta$ -glucuronidasa durante las primeras etapas de crecimiento es baja, pero a partir de la fase lag tardía (50 unidades Klett) empieza a aumentar considerablemente. Si uno observa al microscopio a las bacterias a lo largo de la curva de crecimiento la cepa silvestre empieza a nadar levemente al final de la fase lag (50 unidades Klett) y en fase exponencial (80 unidades Klett) son completamente móviles. El punto más importante de este experimento es que la secuencia encontrada en *Rhodobacter sphaeroides* es transcripcionalmente activa y en un momento dado la actividad del gen reportero podría ser utilizada como un marcador de selección para buscar genes de una jerarquía transcripcional superior.

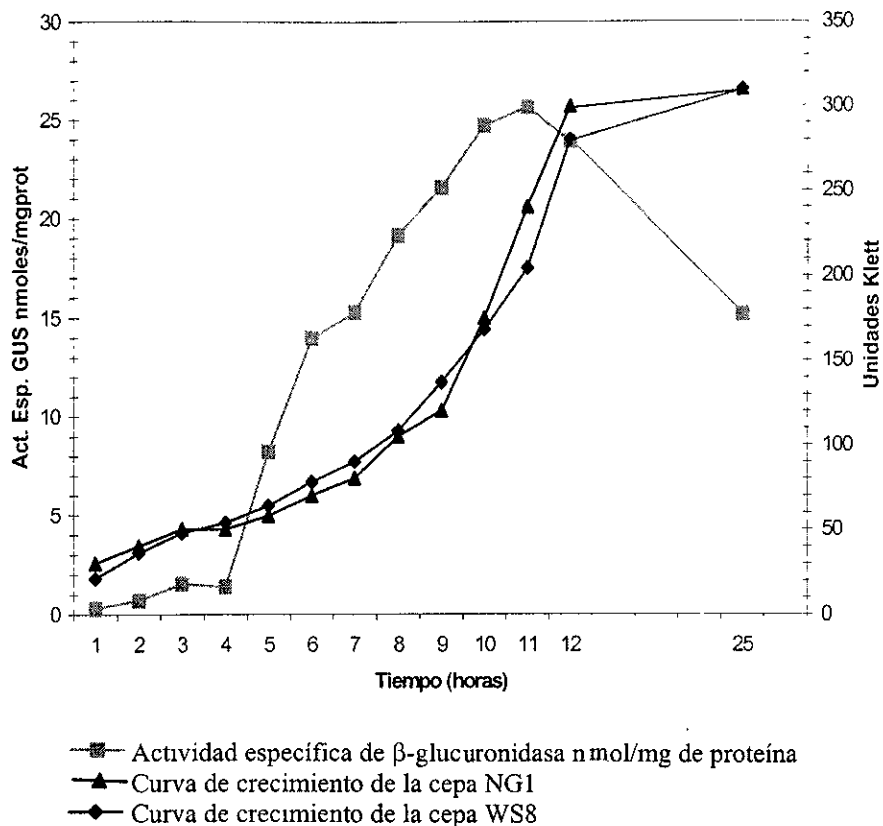


Figura 13. Curvas de crecimiento de las cepas WS8 y NG1 y actividad específica de  $\beta$ -glucuronidasa.

### Complementación de la mutante NG1.

Los estudios de complementación son muy importantes ya que dan información valiosa con respecto a la naturaleza de la mutación y pueden sugerir la presencia o ausencia de promotores. En este trabajo se hicieron varias pruebas, utilizando desde un fragmento de 4.6 Kb hasta el gen *fliM* solo. Para ello, se utilizó el fragmento SalI de 4.6 Kb clonado en el vector pRK415; este vector puede ser transferido por conjugación de *E. coli* a *R. sphaeroides*. El fragmento fue clonado en sus dos orientaciones, una el

pBG0404 con los genes orientados de la siguiente manera: *fliLMNOP* con respecto a los promotores *tet* y *lac* del vector y el pBG0406 con los genes en la orientación opuesta con respecto a los promotores. La primera construcción si restaura el fenotipo silvestre en la mutante, pero la segunda no complementa (Figura 14). Este resultado nos indica que al menos en la zona previa a *fliM*, es decir después del sitio SalI no hay ningún promotor funcional y la transcripción del operón al cual pertenece *fliM* proviene de algún promotor localizado río arriba del sitio SalI.

Una forma de comprobar la polaridad de la mutación es complementándola sólo con el gen *fliM*. Si se restaurara el fenotipo silvestre sería indicativo de una mutación no polar. Para probar el efecto polar que el cassette pudiese ejercer sobre los genes ubicados río abajo, se clonó un fragmento de 1.2 Kb, el cual contiene la parte final del gen *fliL*, *fliM* completo y la parte inicial de *fliN* bajo el control de los promotores presentes en el plásmido pRK415. Esta construcción no complementa a la mutante NG1, por lo tanto, el cassette *uidA-add1* tiene un efecto polar sobre la expresión de los genes posteriores a *fliM*. Más adelante se discutirá la polaridad de la mutante junto con resultados adicionales obtenidos en el laboratorio.

**Complementaciones**

**Resultado**

a) Plásmido pBG0405



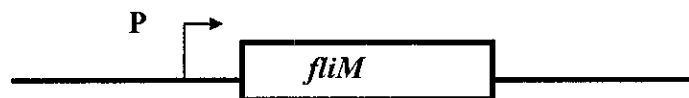
+

b) Plásmido pBG0406



-

c) Fragmento de 1.2 Kb de *fliM* wt clonado en pRK415



-

**Figura 14.** Estudios de complementación de la mutante NG1. Símbolos: +, se restaura el fenotipo silvestre; -, no se complementa la mutación. Las flechas indican la dirección de la transcripción a partir de los promotores lac y tet del vector pRK415.

## DISCUSION

En este trabajo se comprobó la funcionalidad de una secuencia homóloga del gen *fliM* de otras bacterias, en *Rhodobacter sphaeroides*. Para ello se construyó una mutante por inserción de un cassette de espectinomicina junto con el gen reportero *uidA* que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa.

La caracterización de la mutante fue en varios pasos, primero en cajas de agar suave, donde no se observaron halos de nado, lo que en un principio ya daba la pauta para que fuese una mutante con fenotipo Mot<sup>-</sup> o Fla<sup>-</sup> o Che<sup>-</sup>; posteriormente, a nivel de microscopio óptico, donde se observó que las bacterias no presentaban un fenotipo de nado sugiriendo fenotipo Mot<sup>-</sup> o Fla<sup>-</sup>. La diferencia entre ambos fenotipos fue discernida mediante la observación de las bacterias en el microscopio electrónico, una mutante Mot<sup>-</sup> presentaría flagelos en todas las células, pero si la mutación afectara la morfogénesis del flagelo, sería Fla<sup>-</sup>. Este último fue el caso de la mutante NG1, se observaron varias alícuotas de cultivos independientes y la población de células no flageladas fue de más de un 90%, pero en algunas ocasiones se observaron pequeños flagelos separados de los cuerpos celulares, lo que en caso de que la cepa no estuviera purificada podrían ser contaminantes silvestres. Al ser una cepa pura, lo que indicaba este resultado es que alguna pequeña porción de la población estaba formada por supresoras de la mutación, que de todos modos no presentaban una morfología normal, ya que los flagelos observados eran mucho más cortos comparados con la cepa silvestre y a pesar de que las muestras fueron tratadas con mucho cuidado, aparentemente eran muy lábiles

y se separaban del cuerpo principal. El que exista esta pequeña población de células flageladas nos lleva a especular que tal vez el gene que codifica para la proteína FliG, la cual interactúa con FliM y FliF, haya mutado y entonces sea capaz de suplir parcialmente la función de FliM cambiando su conformación para simular una especie de anillo C que permitiría la formación de un aparato de exportación incompleto y de esta manera se pudiera estar formando una célula con gancho y filamento aunque no totalmente funcionales.

En cuanto a la caracterización molecular de la mutante, había varios puntos que aclarar. Uno de ellos era comprobar que el alelo *fliM* llevaba la inserción *uidA-aad1*. Esto fue resuelto por medio de un Southern Blot hibridando el DNA de la mutante NG1 con una sonda biotinilada de *fliM*. La diferente migración de las bandas fue indicativo de que el alelo de la mutante era *fliM::uidA-aad1*. Otro punto importante era ver si se había afectado de alguna manera la región cromosomal después de la inserción. La Figura 8 del capítulo de resultados nos indica que la inserción fue producto de un evento de doble recombinación y que no quedaron residuos extras del vector suicida.

Para comprobar que la secuencia homóloga a *fliM* era transcripcionalmente activa hubo varios inconvenientes. No se pudo determinar por medio de Northern Blot porque tal vez no había suficiente transcrito para ser detectado por este método. Se intentó localizar a la proteína por medio de anticuerpos anti-FliM de *Salmonella typhimurium*, pero el resultado también fue negativo, es posible que los anticuerpos no reconocieran a la proteína de *Rhodobacter* y por lo tanto tampoco se pudo determinar la presencia de la proteína por esta metodología. El otro recurso a



emplearse fue medir la actividad del gen reportero *uidA*, por medio del ensayo fluorométrico de la  $\beta$ -glucuronidasa. En las condiciones utilizadas (aerobiosis), la cepa silvestre no presentó actividad enzimática, en cambio la cepa NG1 presentó un patrón de actividad muy interesante. En la Figura 13 está ejemplificado el patrón de actividad enzimática, donde al parecer existe una relación entre el crecimiento del cultivo y la expresión del gen reportero. Comparando las curvas de crecimiento de la cepa silvestre y la mutante, se ve que tienen un comportamiento similar. Al observar al microscopio óptico a la cepa silvestre, se ve que las células empiezan a nadar al final de la fase lag (50 unidades Klett), que coincide con el principio de la actividad enzimática, la cual continúa en ascenso hasta alcanzar su máximo al final de la fase logarítmica, que es cuando la cepa silvestre disminuye su nado. Algo importante de este gen reportero, es que puede ser utilizado para identificar otros genes de jerarquías superiores. Hay varios ejemplos de esto, K. Kutsukake (Kutsukake, K., *et al.*, 1988, 1990) utiliza dobles mutantes no sólo para localizar nuevos genes, sino para ordenarlos dentro de la jerarquía de expresión los genes flagelares. Al utilizar la cepa NG1, se le puede hacer mutagénesis al azar, por ejemplo por inserción de transposones, de tal manera, que si uno afecta un gen flagelar de una jerarquía superior, la cepa NG1 pasará de GUS+ a GUS-, asegurándose siempre que el transposón no afecte el alelo *fliM::uidA-aad1* o río arriba del mismo.

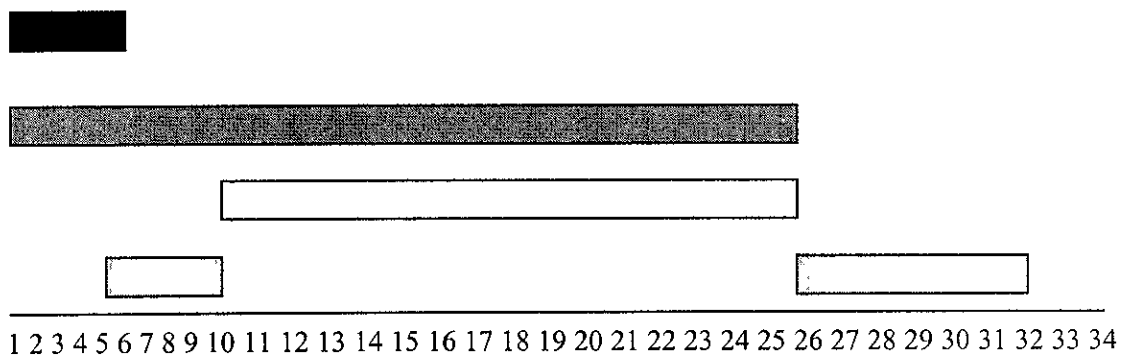
En varios sistemas se han encontrado más de un gen *cheY*, sobre todo en las proteobacterias del subgrupo- $\alpha$ , al que pertenece *R. sphaeroides*. En esta bacteria se han encontrado tres genes *cheY*, y se inició la caracterización de dos de ellos, *cheY1* y *cheY2* (Ward, *et al.*, 1995a). En enterobacterias, se

sabe que CheY es el aceptor final de la cascada de quimiotaxis y transmite la señal al *switch*, uniéndose a FliM (Macnab, R., 1995). Al haber dos proteínas CheY en *R. sphaeroides*, se planteó la posibilidad de que cada CheY interactuaba con partes diferentes del motor, o que pudiesen ser efectores de vías de transducción de señales separadas (Hamblin, P.A., *et al.*, 1997). Estas especulaciones llevaron a pensar que tal vez hubiese más de un gen *fliM* en el cromosoma, por lo que se hicieron varias hibridaciones con el fin de averiguarlo. En la hibridación de la sonda de *fliM* contra el DNA cromosomal de la cepa silvestre digerido con varias enzimas, en todas las digestiones solo hibridó una banda, lo cual sugiere que bajo las condiciones de hibridación utilizadas, en las cuales se asegura un mínimo de 70% de homología entre la secuencia de la sonda y la del cromosoma, sólo hay una copia en el genoma, y que la mutación de ese alelo es responsable del fenotipo observado en la cepa NG1.

Por otro lado, al analizar la secuencia de aminoácidos de FliM y compararla con las proteínas presentes en otras bacterias (ver Figura 4 en antecedentes), se observan regiones conservadas a todo lo largo de la misma. En enterobacterias se ha disectado la función de cada región de FliM (Marykawas, *et al.*, 1995; Toker, *et al.*, 1996). En estos trabajos se logró tener un mapa de interacciones entre FliM y las otras proteínas del *switch*, CheY y posiblemente FliF. Las regiones se separaron de la siguiente manera: los primeros 60 aminoácidos son los encargados de la interacción con CheY-P, los 50 aminoácidos centrales y los últimos 60 aminoácidos son los encargados del ensamblaje del multímero de FliM en el anillo C, es decir, interacciones FliM-FliM. La región central, de los aminoácidos 101 a 260, está involucrada en la rotación del motor, y en el correcto switching debido a

la interacción FliM-FliG. La región de FliM que interactúa con FliN está todavía en discusión, pero evidencias indirectas apuntan hacia los últimos 52 aminoácidos del extremo C-terminal (Marykawas, D., *et al.*, 1996). Sin embargo, otro trabajo sugiere que la interacción con FliN se lleva a cabo entre los residuos 260 y 300 (Mathews, M., *et al.*, 1998).

Comparando estos datos con la secuencia de *R. sphaeroides*, una de las regiones más conservadas es la amino-terminal, es decir la de interacción con CheY-P, y no se presenta ninguna otra región para una posible unión con otra CheY.



**Figura 15.** Modelo de las regiones funcionales de la proteína FliM de *Salmonella typhimurium*. El eje horizontal muestra segmentos de 10 aminoácidos de la proteína. Las regiones funcionales se indican con barras sobre la secuencia de FliM (■ interfase CheY-FliM; ▨ interruptor; □ interfase FliG-FliM, □ interacción FliM-FliM) (Toker, A., *et al.*, 1996)

Toda esta información nos lleva a especular que la existencia de una sola proteína FliM y varias CheYs permite una competencia por el sitio de unión que puede estar dada a nivel de afinidad de las proteínas CheY por FliM. Además de que la expresión de las diferentes proteínas CheY pudiese estar afectada dependiendo de las condiciones metabólicas, alternativamente, podrían existir vías de quimiotaxis alternas según las condiciones de cultivo (Harrison, D., *et al.*, 1999). Lo que se ha observado, es que el nado en

*Rhodobacter* es de velocidad variable (Packer, *et al.*, 1996) en estado no estimulado. En presencia de un estímulo existe un aumento en la velocidad hasta de un 25% y una reducción de la frecuencia de paro, así que tal vez la competencia de CheY por FliM es reflejada en las velocidades variantes de nado en presencia de estímulo.

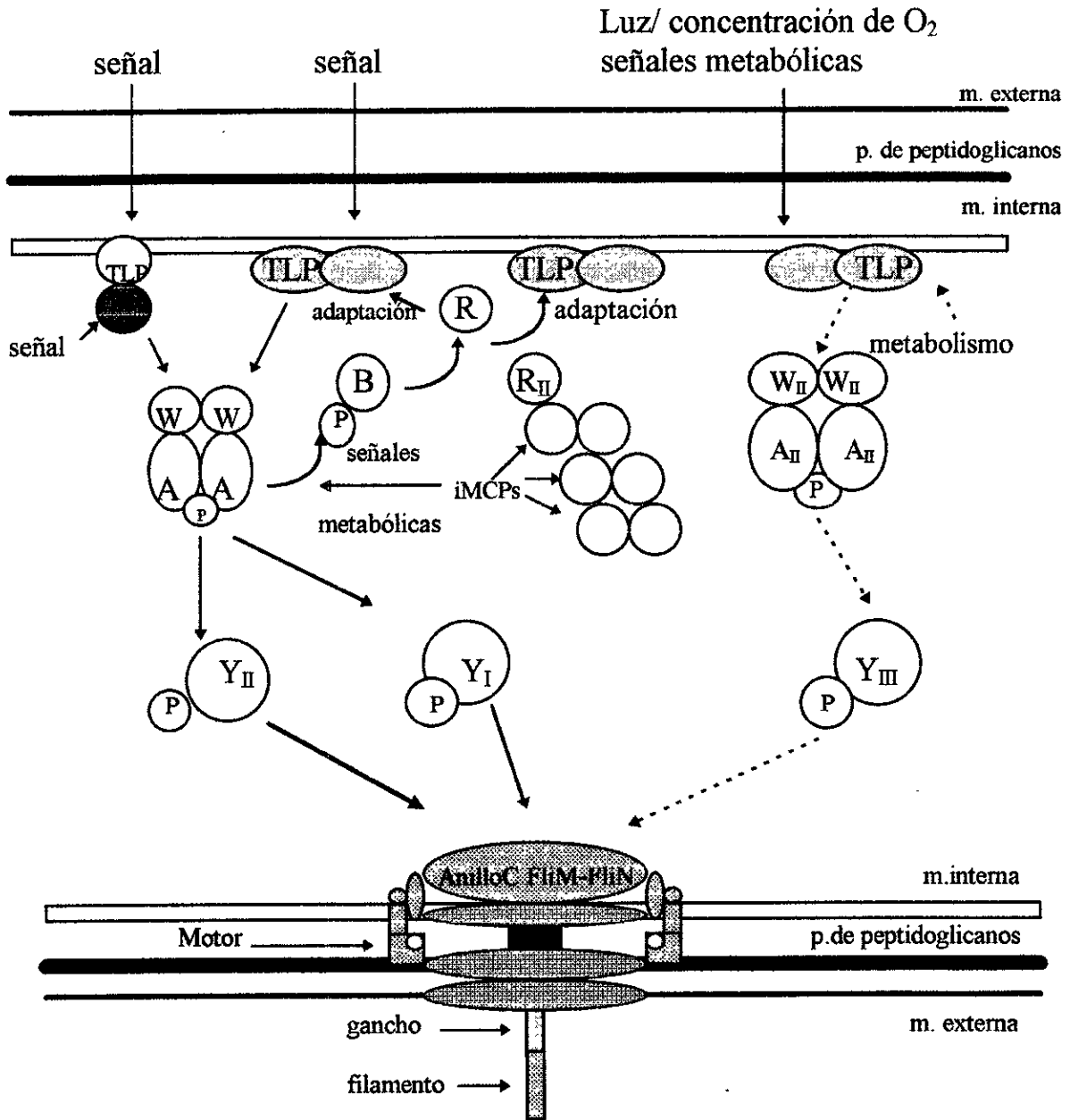
En cuanto a la polaridad de la mutante, el cassette *uidA-aad1* tiene características especiales. Las regiones aledañas al gen *aad1* que es el que confiere la resistencia a espectinomicina, forman estructuras secundarias que sirven como terminadores de la transcripción en ciertos sistemas (Metcalf, W.W., y Wanner, B. L., 1993). Este caso no fue la excepción, la inserción del cassette le confirió polaridad a la mutación, por lo tanto quedó afectada la expresión de los genes ubicados río abajo de *fliM*.

Los ensayos de complementación de la cepa NG1 en este trabajo, sugieren que la unidad transcripcional comienza antes de *fliL*, dado que cuando se complementa con el plásmido pBG0405, en el cual el inserto SalI de 4.6Kb está en la orientación directa del promotor del vector, si se restaura el fenotipo flagelado y el nado, mientras que con el plásmido pBG0406, en el cual el mismo inserto está en dirección opuesta al promotor del plásmido, no se restaura el fenotipo flagelado. Esto indica que el promotor del operón al que pertenecen *fliLMN* se ubica antes de *fliL* y por lo tanto no hay un promotor interno. Cuando se complementa la cepa NG1 con un fragmento que contiene al gen *fliM* solo, no se restaura el fenotipo flagelado, lo que confirma la polaridad de la mutante.

Paralelamente a este trabajo, se secuenciaron los genes posteriores a *fliM*: *fliN*, *fliO*, *fliP*, *fliQ*, *fliR* y *flhB* (García, *et al.*, 1998. Ver Apéndice 1), el análisis de la secuencia sugiere que hay un promotor entre los genes *fliN* y *fliO*. En experimentos de complementación, la mutante NG1 es complementada con un fragmento BamHI, que comprende el gen *fliL* truncado y los genes *fliM* y *fliN* completos, de tal manera que la mutación es polar solamente a *fliN* y el fenotipo observado para la cepa NG1, en realidad es el causado por la ausencia de *fliM* y *fliN*. También se complementó la mutante con un fragmento PstI-BamHI que contiene el extremo 3' de *fliM* y el gen *fliN* completo, y el fenotipo obtenido es Fla<sup>-</sup>, con lo que se asume que el fenotipo de NG1 complementado con este plásmido es el fenotipo de *fliM*, en conclusión, no flagelado.

Integrando los datos que hasta ahora se han obtenido de la quimiotaxis y el flagelo de *R. sphaeroides* se presenta el siguiente modelo (Figura 16): el inicio de la quimiotaxis en este sistema está dado por las señales metabólicas provenientes del exterior (Poole, P.S., *et al.*, 1993) o por los productos metabolizados dentro de la bacteria (Ingham, C., *et al.*, 1987) y todo esto sería sentido por las proteínas intracelulares Tlp ancladas a la membrana (Ward, M.J., *et al.*, 1995b) o las proteínas tipo MCP internas (iMCP) que sensarían el estado metabólico de la bacteria expresándose todas ellas bajo diferentes condiciones. Estas proteínas mandarían su señal a las proteínas CheA, CheW y CheR por medio de una cascada de fosforilaciones. Se asume que existen dos vías de transducción de señales: una a cargo de las proteínas CheA, CheW, CheR y la otra a cargo de las proteínas CheA<sub>II</sub>, CheW<sub>II</sub> y CheR<sub>II</sub>. La primera vía tendría como aceptores finales de la cascada de fosforilación a las

proteínas CheY<sub>II</sub> y CheY<sub>I</sub>, siendo la primera la que muestra una mayor fosforilación y hasta el momento se cree que es la proteína con una



**Figura 16.** Modelo de quimiotaxis en *R. sphaeroides*. Abreviaturas: m. interna: membrana interna; p. de peptidoglicanos: pared de peptidoglicanos; m. externa: membrana externa; TLP: proteína tipo transductor (transducer-like protein); B: CheB; R: CheR; R<sub>II</sub>: CheR<sub>II</sub>; Y<sub>I</sub>: CheY<sub>I</sub>; Y<sub>II</sub>: CheY<sub>II</sub>; Y<sub>III</sub>: CheY<sub>III</sub>; W: CheW; W<sub>II</sub>: CheW<sub>II</sub>; A: CheA; A<sub>II</sub>: CheA<sub>II</sub>; P: fosfato; iMCP (proteínas tipo MCP internas): (Modificado de Armitage, J.P. y Schmitt, R, 1997).

participación principal en la interacción con el *switch* (Armitage, J.P., and Schmitt, R., 1997). La segunda vía tendría como aceptor final a la proteína CheY<sub>III</sub>, de hecho, si se deleta el operón completo que contiene los genes de quimiotaxis de esta vía se ve afectada no sólo la quimiotaxis (Hamblin, P., *et al.*, 1997), sino además la aerotaxis y la respuesta a luz de la bacteria (Romagnoli, S., and Armitage, J.P., 1999). El aceptor final de las diferentes proteínas CheY es la proteína FliM localizada en el anillo C del *switch* flagelar. El mecanismo exacto de interacción es desconocido, pero existen varias hipótesis: una es que las proteínas CheY tengan una afinidad diferente por el sitio de unión a FliM y que esto module la respuesta quimiotáctica de la bacteria. Otra hipótesis es que la proteína CheY<sub>I</sub> actúe como un atrapador de fosfato y que esto regule la forforilación de CheY<sub>II</sub> como se sugiere que ocurre en *R. meliloti* (Sorjik, V., and Schmitt, R., 1996), o que en un momento, todas las proteínas CheY puedan actuar como aceptores de fosfato y que predomine una de las proteínas CheY para su interacción con el *switch* en una condición dada.

Este trabajo presenta perspectivas interesantes. A nivel de regulación genética, es muy importante saber donde empieza el operón al que pertenecen los genes *fliLMN*, ya que todavía no existen secuencias consenso de promotores descritas para este sistema. La caracterización del operón siguiente también es un punto importante, ya que hay una disyuntiva en enterobacterias acerca del inicio de la transcripción de *fliO* (García, N., *et al.*, 1998). El estudio de los límites de ambos operones, proveerá de información importante acerca de la expresión de dichos genes flagelares, que como se ha observado en otros sistemas, es probable que sea muy diferente a lo planteado en enterobacterias.

A nivel del estudio de *fliM*, sería muy importante tener una mutante no polar de *fliM*. Esto podría lograrse con la inserción de un cassette no polar. Una estrategia a seguir es utilizando el mismo cassette de espectinomicina, pero eliminando tanto al gen reportero, como a las secuencias aledañas al gen *aad1*, ya sea por sitios de restricción, como por PCR diseñando oligos para amplificar la región reguladora y el marco de lectura del gen. El hecho de tener una mutante no polar, nos permitiría hacer estudios de mutagénesis dirigida, utilizando plásmidos para complementar con los distintos cambios con el fin de encontrar los sitios importantes para la función de *switch*, ya que sería lógico pensar que debe haber una diferencia importante con respecto a las enterobacterias para la función de paro, y una opción es buscarlas en *fliM*. También serviría para probar la teoría de la competencia de las diferentes CheYs por el sitio putativo de unión a FliM y ver en qué condiciones se lleva a cabo.



## CONCLUSIONES

- En este trabajo se identificó una secuencia homóloga al gen *fliM* en el cromosoma de *Rhodobacter sphaeroides*.

- Los resultados obtenidos sugieren la presencia de una sola copia del gen *fliM* en el cromosoma de la cepa WS8.

- La inactivación del gen *fliM* provoca un fenotipo Fla<sup>-</sup>, sugiriendo que su producto está involucrado, directa o indirectamente, en la morfogénesis flagelar.

- La expresión del gen *fliM*, evaluada por la actividad del gen reportero *uidA*, muestra que la expresión del mismo sigue un patrón similar a la curva de crecimiento.

- Los estudios de complementación de la cepa NG1 (*fliM:: uidA-aad1*) sugieren que la inserción del cassette *uidA-aad1*, provoca un efecto polar sobre la expresión de los genes ubicados río debajo de *fliM*, por lo tanto, *fliM* no es el último gen de la unidad transcripcional. Asimismo, estos estudios apoyan la idea de que al menos los genes *fliK*, *fliL*, *fliM* y *fliN* conforman un operón, cuyo promotor se ubicaría en algún punto río arriba del sitio SalI de *fliK*.

## APENDICE 1.

García Norma, Andrés Campos, Aurora Osorio, Sebastián Poggio, Bertha González-Pedrajo, Laura Camarena and Georges Dreyfus. (1998) “The Flagellar Switch Genes *fliM* and *fliN* of *Rhodobacter sphaeroides* are Contained in a Large Flagellar Gene Cluster”. *J. Bacteriol.* **180**:3972-3982.

## The Flagellar Switch Genes *fliM* and *fliN* of *Rhodobacter sphaeroides* Are Contained in a Large Flagellar Gene Cluster

NORMA GARCÍA,<sup>1</sup> ANDRÉS CAMPOS,<sup>1</sup> AURORA OSORIO,<sup>1</sup> SEBASTIAN POGGIO,<sup>1</sup>  
BERTHA GONZÁLEZ-PEDRAJO,<sup>2</sup> LAURA CAMARENA,<sup>1\*</sup>  
AND GEORGES DREYFUS<sup>2</sup>

*Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas,<sup>1</sup> and Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular,<sup>2</sup> UNAM, México 04510 D.F., Mexico*

Received 6 February 1998/Accepted 22 May 1998

**In this work, the genes that encode the FliM and FliN proteins of *Rhodobacter sphaeroides* were characterized. These genes are part of a large flagellar gene cluster in which six additional open reading frames encoding products homologous to FliL, FliO, FliP, FliQ, FliR, and FliB proteins from other bacteria were identified. The inactivation of the *fliM* gene gave a nonflagellate phenotype (Fla<sup>-</sup>), suggesting that FliM is required for flagellar assembly. Complementation analysis of this *fliM* mutant indicated that *fliM* and *fliN* transcription starts beyond the 5' end of *fliK* and terminates after *fliN*.**

Flagellar rotation alternates between the clockwise (CW) and counterclockwise (CCW) directions in some peritrichous species, like *Escherichia coli*. When flagella rotate in the CCW direction, the filaments coalesce in a bundle that acts as a propeller to push the bacterial cell body in a linear trajectory known as smooth swim. When the flagella reverse their direction of rotation, the bundle flies apart and the bacteria tumble; tumbling occurs every 2 to 5 s. In the presence of an attractant, the tumble frequency decreases and bacteria swim in the favorable direction. Ultimately, this behavior is controlled by the chemotactic protein CheY, which, in its phosphorylated form, binds to FliM, promoting the switch from CCW to CW rotation (for recent reviews, see references 13 and 24). Although the molecular details of switching are unknown, it is thought that the interaction between CheY-P and FliM is the first step in the control of this phenomenon (19, 30-32).

Interestingly, some bacteria rotate their flagellum in only one direction; consequently, reorientation at the end of a run is achieved by Brownian motion, which randomizes the direction of the next run. This kind of motility is observed in *Rhodobacter sphaeroides* (1). In the presence of an attractant, *R. sphaeroides* increases the duration of a run and, in contrast to enteric bacteria, also increases its swimming velocity. This phenomenon is known as chemokinesis (18).

Several chemotactic genes homologous to *cheA*, *cheW*, and *cheR* from other bacteria have been identified in *R. sphaeroides* (28, 29). Two *cheY* genes were found in the same operon. The deduced amino acid sequences of these genes showed that both putative CheY proteins carried residues D13, D57, and K109, which are essential for CheY function (4, 5, 28). This fact suggests that both putative CheY proteins may be functional.

Although in *R. sphaeroides* some flagellar genes have been characterized (2, 9, 21, 22), no information is available about the target of CheY in the cell. Our aim was to identify the *fliM* gene from this bacterium. We have previously reported the presence of a *fliL* homolog in *R. sphaeroides*. This gene is located in a 5.3-kb *EcoRI* fragment and is flanked by two open

reading frames (ORFs) that show homology to *fliH* and *fliJ* from enteric bacteria (2). This gene arrangement encouraged us to search for the *fliM* gene downstream of *fliJ*. The sequence of the end of the 5.3-kb *EcoRI* fragment opposite to *fliH* revealed the 5' end of *fliM*. A 4.6-kb *SalI* fragment carrying the complete *fliM* coding region was identified by Southern blot analysis (data not shown). This fragment was cloned in pTZ19R after digestion of WS8 chromosomal DNA with *SalI*. A positive clone was identified by colony hybridization and named pRS75. The sequence of this clone revealed the presence of *fliM* together with *fliN*, *fliO*, and part of *fliP*. To complete the sequence of *fliP*, we then cloned an *EcoRI* fragment of 4.4 kb in pTZ19R and performed colony hybridization with a *fliP* fragment as a probe. The new clone, pRS205, was then sequenced.

The analysis of pRS75 and pRS205 sequences was carried out with the Genetics Computer Group software package in conjunction with an *R. sphaeroides* codon usage table (7). Eight ORFs were identified (Fig. 1) and were then subjected to a BLAST search. As shown in Table 1, good homology between the flagellar proteins FliL, FliM, FliN, FliO, FliP, FliQ, FliR, and FliB of different bacterial species was found.

The highest degree of identity was obtained when these ORFs were compared to those obtained from *Salmonella typhimurium*, with the exception of FliN and FliO, which showed a higher identity to their homologs from *Borrelia burgdorferi* and *Caulobacter crescentus*, respectively.

Figure 1 and Table 1 show that the frequency of codon usage for all these ORFs is in good agreement with that observed for *R. sphaeroides* genes with the exception of *fliN* and *fliO*; in the *fliO* ORF, 11.7% of the codons are unusual ones like ATT, TTT, CTT, and ACA.

The start codons for the *fliL*, *fliM*, and *fliN* ORFs are located only a few bases downstream of, or overlapping, the stop codon of the preceding ORF, suggesting that these genes belong to the same transcriptional unit. We also found that the putative ribosome binding site for *fliL* overlaps the stop codon of the recently reported *fliK* gene (9); this result suggests that *fliK* is part of this putative operon.

Also shown in Fig. 1 is the arrangement of *fliO*, *fliP*, *fliQ*, *fliR*, and *fliB*. These genes seem to form a single operon, given that the start codon overlaps the preceding stop codon in an ATGA or TGATG arrangement, which are the first and the

\* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, Apdo Postal 70-228, 04510 México, D. F., Mexico. Phone: (525) 622 38 24. Fax: (525) 622 38 91. E-mail: rosali@servidor.unam.mx.

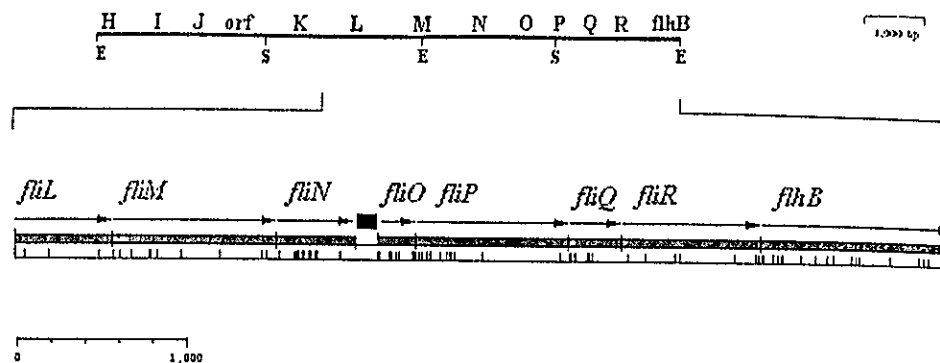


FIG. 1. Organization of the *R. sphaeroides* flagellar cluster. At the top is shown the general gene arrangement for this region (2, 9). The flagellar genes reported in this work are shown below; each ORF is represented as a shaded box. The arrows indicate the direction of transcription. A black square in the middle of *fliN* and *fliO* indicates a noncoding region containing a putative  $\sigma^{54}$  promoter sequence. Vertical bars below the schematic ORFs indicate the presence of rare codons. This analysis was done with CODONPREFERENCE from the Genetics Computer Group Wisconsin software package with a *R. sphaeroides* codon usage table (7)

second most frequent stop-start overlaps in *E. coli* (3). The initiation codons that could be used to translate the *fliO* mRNA are TTG or GTG, which predict a protein of 85 or 60 amino acids, respectively. Alignment of the NH<sub>2</sub> end of FliO sequences from *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. crescentus*, and *R. sphaeroides* shows a number of conserved residues in all these species (Fig. 2); however, if the *R. sphaeroides* FliO started at the GTG codon, some of these conserved residues would be missing. This fact allows us to conclude that the TTG codon is the most probable initiation site. Furthermore, a good ribosome binding site is located 7 bp upstream of this codon. The use of TTG as start codon, together with the high content of unusual codons in *fliO*, suggests a particular translational control of *fliO* that could maintain its product at a low molar concentration compared to the other genes of the operon.

Detailed sequence analysis did not reveal a good match with the consensus promoter sequence known for sigma 70 ( $\sigma^{70}$ ). However, a putative  $\sigma^{54}$  promoter sequence was located 83 bp downstream of the stop codon for *fliN*. This sequence (GGC ACN<sub>2</sub>TTGC) matches 9 of 10 bp of the  $\sigma^{54}$  consensus promoter sequence (10). No inverted repeated sequences were found 100 bp upstream of this putative  $\sigma^{54}$  promoter. Although this may argue against its functionality, it is known that transcriptional activation of  $E\sigma^{54}$  still occurs if the activator binding sites are moved 2,000 bp upstream or downstream the  $\sigma^{54}$  promoter (16). Therefore, the possibility that remote activation sites exist to promote initiation of this putative promoter still remains.

**Construction and characterization of an *R. sphaeroides* mutant with a *fliM* mutation.** To test the functionality of these genes, we decided to isolate a *fliM* mutant strain. For this purpose, a *Spc*<sup>r</sup> cassette, '*uidA-aad* (*uidA* encodes  $\beta$ -glucuronidase, and *aad* encodes the aminoglycoside-3:adenyltransferase and confers *Spc*<sup>r</sup>) (15), was cloned in the middle of *fliM* in plasmid pRS75. The resulting fragment, carrying *fliM::uidA-aad*, was subcloned into the *Sal*I site of pJQ200mp18 (*Gm*<sup>r</sup>) (20), which is unable to replicate in *R. sphaeroides*. This new plasmid was then transferred to *R. sphaeroides* by mating (8), and *Spc*<sup>r</sup> *Gm*<sup>s</sup> transconjugants were selected. One colony was purified and named NG1.

That a successful double recombination event had occurred to yield NG1 was confirmed by a Southern blot experiment (data not shown). To test if the *fliM::uidA-aad* allele affected cell motility, NG1 cells were plated on tryptone motility plates and incubated at 30°C in a humid chamber. After 48 h, these cells were unable to swarm, in contrast to the wild-type cells (Fig. 3). It should be noted that these strains showed similar growth rates; therefore, the difference in swarming behavior cannot be explained by growth differences. To rule out the possibility that this mutant could still swim in liquid medium, an aliquot from a NG1 culture grown under aerobic and anaerobic conditions was observed directly under the microscope; swimming was not detected after growth under either condition. To determine if the inability to swim or swarm could be ascribed to a Fla<sup>-</sup> or paralyzed (Mot<sup>-</sup>) phenotype, an aliquot of NG1 cells was negatively stained and observed under

TABLE 1. Comparison of encoded proteins of *R. sphaeroides* flagellar genes with those of other bacterial species

Gene	Function	Size of product (amino acids) <sup>a</sup>	% of unusual codons	% Homology (identity/similarity) to the gene from:			
				<i>S. typhimurium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. crescentus</i>	<i>B. burgdorferi</i>
<i>fliL</i>	Unknown	190	1.5	28/48	23/61	18/43	16/45
<i>fliM</i>	Motor switch	323	3.4	26/48	21/45	21/44	23/48
<i>fliN</i>	Motor switch/export	152	9.0	38/64	—	31/61	44/72
<i>fliO</i>	Unknown	85	11.7	21/51	—	34/58	—
<i>fliP</i>	Unknown <sup>c</sup>	301	5.3	53/74	48/71	46/68	38/66
<i>fliQ</i>	Unknown <sup>c</sup>	88	5.6	44/70	33/57	31/56	32/66
<i>fliR</i>	Unknown <sup>c</sup>	269	2.6	29/55	29/58	23/52	23/56
<i>flhB</i>	Unknown <sup>c</sup>	>376	—	43/64	30/56	—	28/58

<sup>a</sup> Number of amino acids deduced from the conceptual translation.

<sup>b</sup> —, not determined.

<sup>c</sup> Suspected to be involved in flagellum assembly; the product shows homology to virulence proteins (13).

FliO <sub>RS</sub>	:	-----MDILRPDQIL-TGLFGLGL-LWLWV	:	26
FliO <sub>CC</sub>	:	-----MDLIESIRALAALFTLGLIGLAAWALR	:	28
FliO <sub>EC</sub>	:	-----MSGALIAITALILAAAWLVK	:	20
FliO <sub>ST</sub>	:	MMKTEATVSQPTAPAGSPLMQVSGALIGIITALILAAAWVIK	:	41

FIG. 2. Alignment of the NH<sub>2</sub>-end sequences of FliO from *E. coli* (GenBank accession no. L22182 and L21994) (FliO<sub>EC</sub>), *S. typhimurium* (L49021) (FliO<sub>ST</sub>), and *C. crescentus* (U20387) (FliO<sub>CC</sub>) with the deduced sequence of FliO from *R. sphaeroides* (FliO<sub>RS</sub>) starting from the TTG codon. The second possible start codon encodes V25. Identical and similar residues present in all the species are shaded. The difference in length between *E. coli* and *S. typhimurium* corresponds to the controversy between the actual translation start codon for FliO (for details, see references 14 and 17).

the electron microscope. Since no flagellar structure was visible in more than 90% of cells in the sample, Fla<sup>-</sup> was the phenotype assigned to NG1. A few cells showed a small filament-like structure clearly different from the wild-type filament. These cells may represent secondary suppressors of the *fliM::uidA-uid* allele.

Full motility was recovered when pRK415 (11) carrying the 4.6-kb *Sal*I fragment was introduced into the mutant strain NG1. Both swimming and swarming were indistinguishable from wild-type behavior (Fig. 4). However, when this DNA fragment was cloned in the opposite orientation, complementation of NG1 cells was not observed (Fig. 4). In this last construction, the fragment containing *fliLMNOP'* was in the opposite orientation to the direction of transcription from the *lac* and *tet* promoters (*lacp* and *tepp*) of pRK415. The fact that this *Sal*I fragment was able to complement NG1 in just one orientation suggests that *fliM* does not have a promoter in this fragment and that its transcription depends on the *lac* and *tet* promoters of pRK415. This result strongly suggests that *fliM* expression is dependent on a promoter located upstream of *fliK*.

It has been previously shown that the *uidA-uid* fragment is highly polar in *E. coli* as well as in other bacteria (15). Therefore, we decided to determine if the *uidA-uid* cassette inserted in *fliM* exerted a polar effect on the transcription of downstream genes. For this, a 1.3-kb *Sac*II fragment and a PCR product, both containing *fliM*, were each cloned in pRK415 in the proper orientation to allow its expression from *lacp* and *tepp*. The resulting plasmids, pRS14 and pRS10, respectively, did not complement NG1 cells, indicating that the Fla<sup>-</sup> phenotype observed in the NG1 strain was caused by inactivation of the *fliM* gene, which in turn caused lack of transcription of downstream genes.

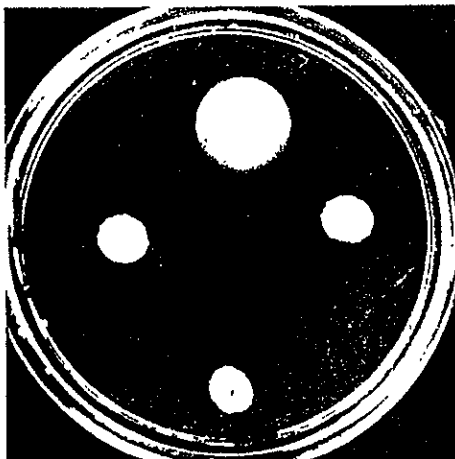


FIG. 3. Motility plates showing the phenotype of NG1 cells. WS8 was included as a control (top). The negative control (bottom) corresponds to strain PG2 (*fliK::Tnpho.1*) (9). NG1 cells were spotted twice (middle row).

Since the polar effect of the *uidA-uid* cassette will affect only genes that belong to the same transcriptional unit, we introduced into NG1 cells a 2.3-kb *Bam*HI fragment in pRK415. This fragment includes the *fliLMN* genes under control of the pRK415 promoters. We observed that this construction restored the swimming and swarming abilities of NG1 cells. This result suggests that *fliN* must be the last gene of a single transcriptional unit. In consequence, *fliOPQR* and *fliH* may form an independent operon. Alternatively, it is possible that *fliOPQR* and *fliH* are not functional genes; however, we consider this explanation less probable given that we have isolated a mutant with an *fliR* mutation that showed the nonmotile phenotype (6).

Finally, to determine the phenotype of a strain carrying a lesion in *fliM*, we introduced into NG1 cells a 980-bp *Pst*I-*Bam*HI fragment cloned in pRK415. This fragment contains the 3' end of *fliM* and the complete *fliN* gene. The phenotype of NG1 carrying this plasmid should correspond to a *fliM* mutant, avoiding any polar effect on *fliN*. Phenotypic characterization of NG1 cells carrying this construction shows that they have the Fla<sup>-</sup> phenotype (data not shown). This result suggests that FliM plays some role in the export of flagellar components. It was recently shown that FliM and FliN proteins require each other for their integration into the switch structure (12). In this regard, Vogler et al. (27) showed that a temperature-sensitive *fliN* mutant cannot export flagellar pro-

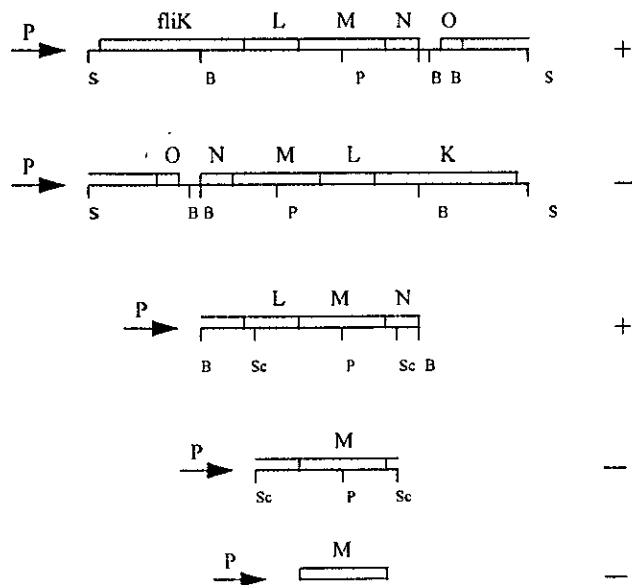


FIG. 4. Complementation analysis of NG1 cells with the 4.6-kb *Sal*I fragment and subclones. Some of the relevant restriction sites are indicated. S, *Sal*I; B, *Bam*HI; P, *Pst*I; Sc, *Sac*II. Restoration of swimming behavior is recorded by +; no complementation is indicated by -. The arrows indicate the direction of transcription starting from the *lac* and *tet* promoters located in the pRK415 vector.

```

FliMRs : KLSKKEVAALVGNLMEASE-----STSLNGLVVRPYA 39
FliMSt : ILSQAETDALL---NGDSDTKDEP-----TPGIASDSDIRPYD 39
FliMEc : ILSQAETDALL---NGDSEVKDEP-----TASVSGESDIRPYD 50
FliMBs : VLSQNEIDALLLSAISTGEMDAEE-----LKKEEKEKKVKVYD 40
FliMTp : VLSQDEIDQLLTAISSGDA-SIED-----ARPISDTRKITLYD 41
FliMBb : ALSQDDIDSLLESINSSESLSLDESLSNVISSPTGKKQKVKVYD 41
FliMHp : ILSQEEIDALLEVVDENVDIQNVQ-----KKDIIPQRSVTLTYD 41
FliMCc : ILNQDEIDSLLGFDLSGDSDDRTGIRAINSA-----LVSYE 88

```

FIG 5. Alignment of the first 39 amino acids of FliM from *R. sphaeroides* with FliM sequences of other bacterial species. Identical and similar residues conserved in all the sequences are shaded (The GenBank accession numbers are as follows: U46011 and U00096, FliM<sub>Ec</sub> [*E. coli*], M24465, FliM<sub>St</sub> [*S. typhimurium*], L75945, FliM<sub>Bp</sub> [*B. burgdorferi*], U28219, FliM<sub>Tp</sub> [*T. pallidum*], M37691, FliM<sub>Bb</sub> [*B. subtilis*], AE000611 FliM<sub>Hp</sub> [*H. pylori*], M85232 FliM<sub>Cc</sub> [*C. crescentus*])

teins at the restrictive temperature. These data suggest that the switch complex may contribute to the stability of the export apparatus. Nevertheless, the role of the switch complex in the export process has yet to be solved.

Is a single copy of *fliM* present in *R. sphaeroides*? The presence of two *cheY* genes in the chromosome of *R. sphaeroides*, as well as the high degree of conservation of some residues involved in CheY functionality such as D13, D57, and K109 (28) in both *cheY* products, raises the question whether more than one copy of the *fliM* gene would be necessary to form a switch complex carrying two different species of FliM protein. Using the complete *fliM* gene as a probe, we carried out a Southern blot experiment under low hybridization stringency and gentle washing conditions. We did not find evidence for a second *fliM* gene in the chromosomal DNA of *R. sphaeroides*, suggesting that CheY-mediated chemotaxis control may be achieved by competition between the two different CheY proteins for FliM or for CheA binding, as has been suggested for *Rhizobium meliloti* (23). Alternatively, it is possible that a gene encoding a protein carrying just the CheY-P binding site could not be detected by Southern blotting.

On the other hand, it has been shown that CheY binds to the first 40 to 50 amino acids of FliM (25, 26). Alignment of our deduced FliM sequence with seven other FliM sequences shows some highly conserved residues among the first 50 amino acids, i.e., a tyrosine approximately 40 residues from the N terminus, and the presence of an LN<sub>2</sub>(E/D)N<sub>3</sub>L(L/V) motif, which predicts an  $\alpha$ -helix (Fig. 5). The importance of these conserved amino acids in the function of FliM is currently under investigation in our laboratory.

It will be interesting to understand the interactions between FliM and both CheY proteins as well as FliG in order to understand how chemokinesis and the stop-start processes are controlled in this organism.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The DNA sequences of the *R. sphaeroides* *fliL*, *fliM*, *fliN*, *fliO*, *fliP*, *fliQ*, *fliR*, and *fliB* genes have been deposited in the GenBank data base under accession no. AF044254 and AF044580.

#### ADDENDUM

In the course of this work, the sequences of the *R. sphaeroides* *fliM* and *fliN* genes appeared in the GenBank database (9a). A comparison of these sequences with ours showed an inversion of GC to CG in the *fliM* sequence, producing a change of a cysteine (C152) for a valine (V152) in our sequence.

We are indebted to Luis Servín and Laura Velázquez for helpful discussions and critical review of the manuscript. We thank T. Ballado for technical assistance. We also thank M. West and E. Silva-Herzog for their comments and helpful discussions and J. Sepúlveda for technical support with electron microscopy. We also thank the Unidad de

Biología Molecular (IFC) for the synthesis of some oligonucleotides used in this work.

This work was supported in part by CONACyT grants 4739-N9406 to L.C. and 3290P-N9607 to G.D.

#### REFERENCES

- Armitage, J. P., and R. M. Macnab. 1987. Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 169:514-518.
- Ballado, T., A. Campos, L. Camarena, and G. Dreyfus. 1996. Flagellar genes from *Rhodobacter sphaeroides* are homologous to genes of the *fliF* operon of *Salmonella typhimurium* and to the type-III secretion system. *Gene* 170:69-72.
- Blattner, F. R., G. Plunkett III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-1462.
- Bourret, R. B., J. F. Hess, and M. I. Simon. 1990. Conserved aspartate residues and phosphorylation in signal transduction by the chemotaxis protein CheY. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:41-45.
- Bourret, R. B., S. K. Drake, S. A. Chervitz, M. I. Simon, and J. J. Falke. 1993. Activation of the phosphosignaling protein CheY. II. Analysis of activated mutants by <sup>19</sup>F NMR and protein engineering. *J. Biol. Chem.* 268:13089-13096.
- Camarena, L., S. Poggio, and G. Dreyfus. Unpublished data.
- Campos, A., L. Camarena, and G. Dreyfus. Codon usage table of *R. sphaeroides* of more than one hundred genes. Unpublished data.
- Davis, J., T. J. Donohue, and S. Kaplan. 1988. Construction, characterization, and complementation of a *puf* mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 170:320-329.
- Gonzalez-Pedrajo, B., T. Ballado, A. Campos, R. E. Sockett, L. Camarena, and G. Dreyfus. 1997. Structural and genetic analysis of a mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 deficient in hook length control. *J. Bacteriol.* 179:6581-6588.
- Goodfellow, J. G., et al. GenBank accession no. Y14335.
- Helmann, J. D., and M. J. Chamberline. 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.* 57:839-872.
- Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* 70:191-197.
- Kubori, T., S. Yamaguchi, and S.-I. Aizawa. 1997. Assembly of the switch complex onto the MS ring complex of *Salmonella typhimurium* does not require any other flagellar proteins. *J. Bacteriol.* 179:813-817.
- Macnab, R. M. 1996. Flagella and motility, p. 123-145. In F. C. Neidhart, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Malakooti, J., B. Ely, and P. Matsumura. 1994. Molecular characterization, nucleotide sequence, and expression of the *fliO*, *fliP*, *fliQ*, and *fliR* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176:189-197.
- Metzger, W. W., and B. L. Wanner. 1993. Construction of new  $\beta$ -glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement. *Gene* 129:17-25.
- Ninfa, A. J., L. J. Reitzer, and B. Magasanik. 1987. Initiation of transcription at the bacterial *glnAp<sub>2</sub>* promoter by purified *E. coli* components is facilitated by enhancers. *Cell* 50:1039-1046.
- Ohnishi, K., F. Fan, G. J. Schoenhaus, M. Kihara, and R. M. Macnab. 1997. The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of *Salmonella typhimurium* putative components for flagellar assembly. *J. Bacteriol.* 179:6092-6099.
- Packer, H. L., and J. P. Armitage. 1994. The chemokinetic and chemotactic behavior of *Rhodobacter sphaeroides*: two independent responses. *J. Bacteriol.* 176:206-212.
- Parkinson, J. S., S. R. Parker, P. B. Talbert, and S. E. Houts. 1983. Inter-

- actions between chemotaxis genes and flagellar genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 155:265-274.
20. Quandt, J., and M. F. Hynes. 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. Gene 127: 15-21.
  21. Shah, D. S. H., and R. E. Sockett. 1995. Analysis of the *motA* flagellar motor gene from *Rhodobacter sphaeroides*, a bacterium with a unidirectional, stop-start flagellum. Mol. Microbiol. 17:961-969.
  22. Shah, D. S. H., J. P. Armitage, and R. E. Sockett. 1995. *Rhodobacter sphaeroides* W58 expresses a polypeptide that is similar to MotB of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 177:2929-2932.
  23. Sourjik, V., and R. Schmitt. 1996. Different roles of CheY1 and CheY2 in the chemotaxis of *Rhizobium meliloti*. Mol. Microbiol. 22:427-436.
  24. Stock, J., and M. G. Surette. 1996. Chemotaxis, p. 1103-1129. In F. C. Neidhart, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D C.
  25. Toker, A. S., Kihara, M., and R. M. Macnab. 1996. Deletion analysis of the FliM flagellar switch protein of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 178: 7069-7079.
  26. Toker, A. S., and R. M. Macnab. 1997. Distinct regions of bacterial flagellar switch protein FliM interact with FliG, FliN and CheY. J. Mol. Biol. 273: 623-634.
  27. Vogler, A. P., M. Homma, V. M. Irikura, and R. M. Macnab. 1991. *Salmonella typhimurium* mutants defective in flagellar filament regrowth and sequence similarity of FliI to F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>, vacuolar and archaeobacterial ATPase subunits. J. Bacteriol. 173:3564-3572.
  28. Ward, M. J., A. W. Bell, P. A. Hamblin, H. L. Packer, and J. P. Armitage. 1995. Identification of a chemotaxis operon with two *cheY* genes in *Rhodobacter sphaeroides*. Mol. Microbiol. 17:357-366.
  29. Ward, M. J., D. M. Harrison, M. J. Ebner, and J. P. Armitage. 1995. Identification of a methyl-accepting chemotaxis proteins in *R. sphaeroides*. Mol. Microbiol. 18:115-121.
  30. Welch, M., K. Oosawa, S.-I. Aizawa, and M. Eisenbach. 1993. Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. Proc Natl. Acad. Sci. USA 90:8787-8791.
  31. Welch, M., K. Oosawa, S.-I. Aizawa, and M. Eisenbach. 1994. Effects of phosphorylation, Mg<sup>2+</sup>, and conformation of the chemotaxis protein CheY on its binding to the flagellar switch protein FliM. Biochemistry 33:10470-10476.
  32. Yamaguchi, S., S.-I. Aizawa, M. Kihara, C. J. Jones, and R. M. Macnab. 1986. Genetic evidence for a switch an energy-transducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 168:1172-1179.

## BIBLIOGRAFIA

- Aizawa, S.-I. (1996). "Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*". Mol. Microbiol. **19**(1): 1-5.
- Armitage, J.P. (1992) "Bacterial motility and chemotaxis". Sci. Progress Oxford, **76**, 451-477.
- Armitage, J.P., Macnab, R. (1987) "Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*". J. Bacteriol., **169**, 514-518.
- Armitage, J.P., Schmitt, R. (1997) "Bacterial chemotaxis: *Rhodobacter sphaeroides* and *Sinorhizobium meliloti* - variations on a theme?". Microbiology, **143**:3671-3682.
- Armstrong, J.B., Adler, J. and Dahl, M.M. (1967). "Non-chemotactic mutants of *Escherichia coli*". J. Bacteriol. **93**:390-398.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidman, J.G., y Struhl, K. (1989). "Current protocols in molecular biology". John Wiley & Sons, New York, U.S.A.
- Ballado, T., Campos, A., Camarena, L., and G. Dreyfus. (1996). "Flagellar genes from *Rhodobacter sphaeroides* are homologous to genes of the *fliF* operon of *Salmonella typhimurium* and to the type-III secretion system". Gene **170**: 69-72.
- Bimboim, H.C. and Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA" Nucl. Acids Res. **7**: 1513-1522.
- Blair, D.F., and Berg, H.C. (1990). "The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor". Cell **60**:439-449.
- Blair, D.F., and Berg, H.C. (1991). "Mutations in the MotA protein of *Escherichia coli* reveal domains critical for proton conduction". J. Mol. Biol. **221**:1433-1442.
- Bourret, R., Davagnino, J., and Simon, M. (1993). "The carboxy-terminal portion of the Che A kinase mediates regulation of autophosphorylation by transducer and CheW". J. Bacteriol. **175**: 2097-2101.
- Donohue, T.J. and Kaplan, S. (1991). "Genetic techniques in Rhodospirillaceae". Methods Enzymol. **204**:459-485.
- Eisenbach, M., Wolf, A., Welch, M., Caplan, S.R., Lapidus, I.R., Macnab, R.M., Aloni, H., and Asher, O. (1990) . "Pausing, switching and speed fluctuation of the bacterial flagellar motor and their relation to motility and chemotaxis". J. Mol. Biol. **211**:551-563.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**



- Francis, N.R., Irikura, I.M., Yamaguchi, S., De Rosier, D.J., and Macnab, R.M. (1992) "Localization of the *Salmonella typhimurium* flagellar switch protein to the cytoplasmic M-ring face of the basal body". Proc. Natl. Acad. Sci. **89**:6304-6308.
- Francis, N.R., Sosinsky, G.E., Thomas, D., and DeRosier, D.J. (1994) "Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex". J. Mol. Biol. **235**:1261-1270.
- García N., Campos, A., Osorio, A., Poggio, S., González-Pedrajo, B., Camarena, L., and Dreyfus, G. (1998) "The flagellar switch genes *fliM* and *fliN* or *Rhodobacter sphaeroides* are contained in a large flagellar gene cluster". J. Bacteriol. **180**:3972-3982.
- Hamblin, P.A., Bourne, N.A., and Armitage, J.P. (1997). "Characterization of the chemotaxis protein CheW from *Rhodobacter sphaeroides* and its effect on the behaviour of *Escherichia coli*". Mol. Microbiol. **24**: 41-51.
- Hamblin, P.A., Maguire, B.A., Grishanin, R.N., and Armitage, J.P. (1997) "Evidence for two chemosensory pathways in *Rhodobacter sphaeroides*". Mol. Microbiol. **26**(5):1083-1096.
- Harrison, D.M., Skidmore, J., Armitage, J.P., Maddock, J.R. (1999) "Localization and environmental regulation of MCP-like proteins in *Rhodobacter sphaeroides*". Mol. Microbiol. **31**:885-92.
- Holmes, D.S., Quingley, M. (1981) "A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids" Anal. Biochem. **114**:193-197.
- Ingham, C., Armitage, J.P. (1987) "Involvement of transport in *Rhodobacter sphaeroides* chemotaxis". J. Bacteriol., **169**, 5801-5807.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids" Gene **96**:23-28.
- Irikura, V., Kihara, M., Yamaguchi, S., Sockett, H., and Macnab, R. (1993) "*Salmonella typhimurium* *fliG* and *fliN* mutations causing defects in assembly, rotation and switching of the flagellar motor". J. Bacteriol., **175**, 802-810.
- Iyoda, S., and Kutsukake, K. (1995). "Molecular dissection of the flagellum-specific anti-sigma factor, FlgM, of *Salmonella typhimurium*". Mol. Gen. Genet., 249:417-424.
- Jefferson, R.A., Burgess, S.M. and Hirsh, D. (1986). "Beta-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**:8447-8451.
- Kehry, M., and Dahlquist, F. (1982). "Adaptation in bacterial chemotaxis: CheB-dependent modification permits additional methylations of sensory transducer proteins". Cell, **29**:761-772.

- Kihara, M., Homma, M., Kutsukake, K., and Macnab, R.M. (1989). Flagellar switch of *Salmonella typhimurium*: gene sequences and deduced protein sequences" J. Bacteriol. **171**:3247-3257.
- Kleene, S., Hobson, A., Adler, J. (1979) "Attractants and repellents influence methylation and demethylation of methyl-accepting chemotaxis proteins in an extract of *Escherichia coli*". Proc. Natl., Acad., Sci. USA, **76**:6309-6313.
- Kubori, T., Yamaguchi, S., and S.-I. Aizawa. (1997) "Assembly of the switch complex onto the MS-ring complex of *Salmonella typhimurium* does not require any other flagellar proteins" J. Bacteriol. **179**:813-817.
- Kutsukake, K., Ohya, Y., Yamaguchi, S., and Iino, T. (1988) "Operon structure of flagellar genes in *Salmonella typhimurium*". Mol. Gen Genet. **214**:11-15.
- Kutsukake, K., Ohya, Y., and Iino, T. (1990). "Transcriptional Analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*". J. Bacteriol. **172**:741-747.
- Lapidus, I. R., Welch, M., and Eisenbach, M., (1988). "Pausing of flagellar rotation is a component of bacterial motility and chemotaxis". J. Bacteriol.. **170**:3627-3632.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A. L. Farr, and R.J. Randall. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent". J.Biol.Chem. **193**: 265-270.
- Lloyd, S., Tang, H., Wang, X., Billings, S., and Blair, D. (1996) "Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: evidence of a direct role for FliG but not for FliM or FliN". J. Bacteriol. **178**:223-231.
- Macnab, R., and Koshland, D.E. (1972) "The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **69**:2509-2512.
- Macnab, R. (1992). "Genetics and Biogenesis of Bacterial Flagella" Annu. Rev. Genet. **26**: 131-158.
- Macnab, R.M. (1995). "Flagellar Switch" de Two-Component Signal Transduction. Edit. James A. Hoch and Thomas J. Silhavy. pp. 181-199.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982) "Molecular Cloning; A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory.
- Marykwas, D., Schimidt, S., and Berg, H. (1996). "Interacting components of the flagellar motor of *Escherichia coli* revealed by the two-hybrid system in yeast". J.Mol.Biol. **256**: 564-576.
- Mathews; M., Tang, H. L., and Blair, D.F. (1998). "Domain analysis of the FliM protein of *Escherichia coli*". J. Bacteriol. **180**:5580-5590.

- Metcalf, W.W., and Wanner, B.L. (1993). "Construction of new beta-glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement". *Gene*. **129**:17-25.
- Packer, H.L. and Armitage, J.P. (1993). "The unidirectional flagellar motor of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 can rotate either clockwise or counterclockwise: characterization of the flagellum under both conditions by antibody decoration". *J. Bacteriol.* **175**: 6041-6045.
- Packer, H.L., Gauden, D.E., and Armitage, J.P. (1996). "The behavioural response of anaerobic *Rhodobacter sphaeroides* to temporal stimuli". *Microbiology* **142**:593-599.
- Poole, P.S., Smith, M.J. and Armitage, J.P. (1993). "Chemotactic signalling in *Rhodobacter sphaeroides* requires metabolism of attractants". *J. Bacteriol.* **175**:291-294.
- Quandt, J. and Hynes, M.F. (1993) "Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria". *Gene* **127**:15-21.
- Romagnoli, S., Armitage, J.P. (1999) "Roles of chemosensory pathways in transient changes in swimming speed of *Rhodobacter sphaeroides* induced by changes in photosynthetic electron transport". *J. Bacteriol.* **181**:34-39.
- Russo, A., and Koshland, D. (1983) "Separation of signal transduction and adaptation functions of the aspartate receptor in bacterial sensing". *Science*, **220**:1016-1020.
- Sanna, M. G., Swanson, R.V., Bourret, R. B., and Simon, M. I. (1995) "Mutations in the chemotactic response regulator, CheY, that confer resistance to the phosphatase activity of CheZ" *Mol. Microbiol.*: **15**:1069-1079.
- Sistrom, W.R. (1960). "A requirement for sodium in the growth of *Rhodopseudomonas sphaeroides*". *J. Gen Microbiol.* **22**:778-785.
- Sourjik, V., Schmitt, R. (1996) "Different roles of CheY1 and CheY2 in the chemotaxis of *Rhizobium meliloti*". *Mol. Microbiol.* **22**:427-436.
- Southern, E. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". *J.Mol.Biol.* **98**:503.
- Springer, M. S., Goy, M. F., and Adler, J. (1979) "Protein methylation in behavioural control mechanisms and in signal transduction". *Nature*, **280**:279-284.
- Toker, A., Kihara, M., and Macnab, R. (1996). "Deletion analysis of the FliM flagellar interruptor protein of *Salmonella typhimurium*". *J. Bacteriol.* **178**: 7069-7079.
- Vogelstein, B., Gillespie, D. (1979). "Preparative and analytical purification of DNA from agarose". *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **76**:615-619.

- Wang, H., and Matsumura, P. (1996) "Characterization of the CheA<sub>2</sub>/CheZ complex: a specific interaction resulting in enhanced dephosphorylating activity on CheY-phosphate" *Mol. Microbiol.*, **19**:695-703.
- Ward, M.J., Bell, A.W., Hamblin, P.A., Packer, H.L., Armitage, J.P. (1995). "Identification of a chemotaxis operon with two *cheY* genes in *Rhodobacter sphaeroides*". *Mol. Microbiol.* **17**, 357-366.
- Ward, M.J., Harrison, D.M., Ebner, M.J., y Armitage, J.P. (1995). "Identification of a methyl-accepting chemotaxis protein in *R. sphaeroides*". *Mol. Microbiol* **18**:115-121.
- Welch, M., Oosawa, K., Aizawa, S., Eisenbach, M. (1993). "Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8787-8791.
- Welch, M., Oosawa, K., Aizawa, S.-I., y Eisenbach, M. (1994). "Effects of phosphorylation, Mg<sup>2+</sup>, and conformation of the chemotaxis protein CheY on its binding to the flagellar switch protein FliM". *Biochemistry*, **33**:10470-10476.
- Yamaguchi, S., Aizawa, S.-I., Kihara, M., Jones, C.J., and Macnab, R.M. (1986a). "Genetic evidence for a switch, an energy-transducin complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*". *J. Bacteriol.* **168**:1172-1179.
- Yamaguchi, S., Fujita, H., Ishihara, A., Aizawa, S.-I., and Macnab, R.M. (1986b). "Subdivision of flagellar genes of *Salmonella typhimurium* into regions responsible for assembly, rotation, and switching". *J. Bacteriol.* **166**:187-193.
- Yang, Y., Park, H., Inouye, M. (1993) "Ligand binding induces an asymmetrical transmembrane signal through a receptor dimer". *J. Mol. Biol.* **232**:493-498.