



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL,
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LAS SEGUNDAS COPIAS DE LOS
GENES FLAGELARES DE *Rhodobacter sphaeroides*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
SALVADOR FABELA SÁNCHEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LAURA CAMARENA MEJÍA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

2005



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

0349972



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
" Estudio de las segundas copias de los genes flagelares de Rhodobacter
sphaeroides "

realizado por Salvador Fabela Sánchez

con número de cuenta 09611499-9 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Directora de Tesis
Propietario

Dra. Laura Camarena Mejía *Laura Camarena*

Propietario

Dra. María del Carmen Gómez Eichelmann *María del Carmen Gómez Eichelmann*

Propietario

Dr. Georges Dreyfus Cortés *Georges Dreyfus Cortés*

Suplente

Dr. Diego González Halphen *Diego González Halphen*

Suplente

Dra. Bertha González Pedrajo *Bertha González Pedrajo*

Consejo Departamental de Biología

Juan Manuel Rodríguez-Chávez
M. en C. Juan Manuel Rodríguez-Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

DEDICATORIAS

Para mis padres Ma. del Socorro y Salvador: sin su consejo, su ayuda y su apoyo incondicional esto no hubiera sido posible. Gracias por estar siempre a mi lado, por colmarme de amor y afecto, por todo lo que he aprendido de ustedes, por los regaños y por levantarme de mis tropiezos, porque su lucha en la vida me motiva a seguir adelante, porque son un verdadero ejemplo para mí. Esto también es suyo: los amo.

Para la mujer con más valor, fortaleza, entereza, coraje y dignidad que he conocido, de quien recibí y a quien di tanto amor, de quien aprendí tanto y quien es un ejemplo palpable de perseverancia para mí en todo momento: mi abuela, Enedina Hernández Vázquez, Mamanina. Gracias por siempre...

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Camarena Mejía, por su apoyo académico y personal incondicionales en la realización de este trabajo. Por la paciencia y confianza depositadas en mí y la valiosa amistad formada, por las enriquecedoras charlas vespertinas en el laboratorio, por su integridad y rectitud.

A mis sinodales: Dra. Carmen Gómez Eichelmann, Dr. Georges Dreyfus Cortés, Dr. Diego González Halphen y Dra. Bertha González Pedrajo, por los consejos en pos del mejoramiento de este trabajo, por las ideas vertidas, por su tiempo para revisar esta tesis.

A Sebastián Poggio, por los invaluable consejos y la ayuda brindada durante la realización del proyecto, por la amistad que hemos trabado, por las interminables horas de irreverencia dentro y fuera del laboratorio.

A Aurora Osorio, por su ayuda técnica y académica y por ser el ángel guardián del laboratorio.

A Doña Julia, por su labor diaria en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio, Fernando, Julieta y el recién llegado Víctor, por las charlas intralaboratorio, las cuales disminuyen la carga laboral durante el día.

Para Ana Laura, con quien aprendí tanto y quien es pilar inquebrantable en mi formación personal y académica, por su apoyo en cada momento difícil, por la celebración de los éxitos, por la maravillosa experiencia adquirida, por haberme otorgado los mejores momentos de mi vida. Gracias por todo.

A Alberto, por las afinidades que nos unen tanto, por la complicidad, por las incesantes risas, por la conexión cuasitelepática, por nuestra hermandad.

A Arturo, por la amistad que llegó a cerrar el círculo, por esa sabiduría tan especial, por su arrojo, por su dedicación en cada faceta de su vida, por nuestra hermandad.

A Juan Carlos, por su inigualable sentido del humor, por esos insuperables momentos en la facultad, por dar tanto sin condiciones, por esas charlas reflexivas, por nuestra hermandad.

A Luis, por los momentos de filosofía, por el humor ácido, por su lucha constante de superación personal, por nuestra hermandad. A ustedes, mil gracias por brindarme su amistad y por estar conmigo en todo momento.

A Fabiola, por ayudarme a salir a flote en esos tiempos difíciles, por el apoyo sin igual, los consejos, la incesante retroalimentación y por esa personalidad tan peculiar que la hace completamente diferente.

A Citlali, por enseñarme a ver la vida desde una óptica diferente, por mostrarme una amistad transparente e inquebrantable, por su incondicionalidad.

A Marilú, por inyectar energía, vitalidad y complicidad a los interminables días dentro de los muros de Biomédicas.

A todos aquellos con los que conviví en la facultad y de los que guardo tantos recuerdos, anécdotas y experiencias. Gracias a ustedes, ésta etapa de mi vida se ha convertido en la mejor.

A toda mi familia en Chiapas, muy en especial, a las familias Sánchez Coutiño, Enciso Sánchez, Salvatierra Enciso y Enciso Ramos. Gracias por todo su cariño, su apoyo, los consejos, las aventuras y los inolvidables momentos en aquella tierra sin igual.

A toda mi familia nortea, en especial, a los tíos Fabela Rodríguez e Hiraes Rodríguez.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	3
Antecedentes.....	23
Hipótesis y Objetivos.....	27
Materiales y Métodos.....	28
Resultados.....	38
Discusión.....	53
Conclusiones.....	58
Perspectivas.....	59
Bibliografía	60

RESUMEN

Rhodobacter sphaeroides es una bacteria púrpura no sulfurosa de vida libre, no patógena, que pertenece al subgrupo α -3 de las Proteobacterias y que nada gracias a un flagelo que rota unidireccionalmente. En 2001 su genoma fue liberado y en él se encontraron duplicaciones y multiplicaciones génicas. Las duplicaciones incluyen un set completo de genes flagelares, los cuales se hayan en una región muy alejada de aquella en la que se encuentran los loci que son responsables de la síntesis del flagelo y que han sido descritos con anterioridad. Las copias flagelares duplicadas no muestran mutaciones o alteraciones génicas evidentes y su arreglo asemeja operones funcionales. Para probar la funcionalidad de las segundas copias flagelares se generaron dos fusiones transcripcionales en los genes *flgE2* y *flhA2*. El primero guarda similitud con el gen que codifica para el gancho, y el segundo con el gen que forma parte del aparato de secreción tipo III, que exporta los componentes necesarios para el ensamble del flagelo. La actividad del gen reportero no mostró expresión alguna en las condiciones de laboratorio que fueron probadas. Sin embargo, todas las copias flagelares duplicadas guardan una estrecha similitud con los genes flagelares descritos para *Silicibacter pomeroyii*, una bacteria que pertenece a la misma familia que *R. sphaeroides* y que es un organismo marino que se encuentra en estrecha asociación con dinoflagelados. Para aclarar la relación que existe entre las copias flagelares duplicadas de *R. sphaeroides* y los genes de *S. pomeroyii*, se realizaron inferencias filogenéticas y se observó que las copias flagelares duplicadas de *R. sphaeroides* se agrupan con las α -Proteobacteria, lo que sugiere que éstos son los genes flagelares endógenos, mientras que las copias flagelares funcionales se

agrupan dentro de las γ -Proteobacteria (enterobacterias). Al parecer, los genes con los que nada *R. sphaeroides* son el resultado de una transferencia horizontal proveniente de una γ -Proteobacteria o una bacteria cercana a este grupo. Los genes flagelares fueron entonces integrados al genoma, confiriéndole alguna ventaja selectiva. Probablemente, los genes flagelares nativos fueron apagados, pero no desechados. Lo anterior debe ser confirmado mediante análisis filogenéticos robustos y análisis de congruencia. Este trabajo muestra los indicios de lo que puede ser el primer evento descrito donde un conjunto de genes xenólogos sustituyen en función a un conjunto de genes endógenos.

Introducción.

La secreción de proteínas hacia el espacio extracelular es un fenómeno común en la biología y también es un aspecto básico de la fisiología de los procariontes. Enzimas extracelulares, exotoxinas, y proteínas necesarias para formar apéndices como el flagelo o los pilis, deben cruzar las dos bicapas lipídicas y la pared extracelular de las bacterias Gram-negativas para alcanzar su destino final. Lo anterior sirve para llevar a cabo procesos biológicos de suma importancia tales como, por ejemplo: adhesión a tejidos e invasión de células eucariontes; transferencia de información genética mediante conjugación; montaje de bacteriófagos y la movilidad celular (Pugsley, 1993). Aunque las proteínas secretadas son muy diversas y numerosas y exhiben una gran variedad de funciones que incluyen: citotoxicidad, hemólisis, proteólisis, desfosforilación y fosforilación de proteínas; existen apenas unos cuantos sistemas por los cuales estas proteínas son transportadas del citoplasma bacteriano hacia el espacio extracelular o directamente liberadas al citoplasma de otras células. A la fecha, se han descrito cinco sistemas principales de secreción de proteínas en bacterias Gram-negativas, los cuales han sido denominados tipos I a V (Fath y Colter, 1993; Finlay y Falkow, 1997; Van Gijsegem *et al*, 1993 y Henderson *et al*, 2004).

Sistemas de secreción Sec-dependientes

En bacterias ocurren al menos tres categorías de procesos de translocación: 1) translocación mediada por el sistema de secreción Sec a través de la membrana citoplásmica; 2) translocación mediada por el sistema *Tat* a través de la membrana citoplásmica y 3) mecanismos

más especializados para la liberación de proteínas específicas a la superficie más externa de la célula (Thanassi y Hultgren, 2000).

En contraposición con el sistema *Tat*, el cual transporta enzimas ya plegadas y ligadas a su cofactor, la ruta de translocación *Sec* es responsable del transporte de proteínas sintetizadas *de novo* antes que éstas adquieran su estructura final (para una extensa revisión ver Pugsley, 1993). Un punto importante del proceso de translocación es que éste ocurre sin comprometer la barrera de permeabilidad general de la membrana (Mori e Ito, 2001). La ruta *Sec* está conformada en *Escherichia coli* por las siguientes proteínas: i) *SecB*, la cual es una chaperona dedicada a la exportación de proteínas, ii) *SecA*, que es una ATPasa que provee la energía para la exportación y el movimiento proteico dentro y a través de la membrana y iii) *SecY*, *SecE*, *SecG*, *SecD*, *SecF* y *YajC*, que son proteínas integrales de membrana (Figura 1). *SecY*, *SecE* y *SecG* forman el complejo heterotrimérico *SecYEG*, el cual constituye la ruta o canal para el movimiento polipeptídico. Estas proteínas atraviesan la membrana diez, tres y dos veces respectivamente. De esta manera *SecYEG* y *SecA*, conocidos como la translocasa, son los componentes primarios de la maquinaria de translocación (Mori e Ito, 2001).

Durante mucho tiempo mediante estudios bioquímicos, biofísicos y electrofisiológicos se había predicho que el translocón sirve como un canal por el cual las proteínas atraviesan la membrana. La solución de la estructura tridimensional del complejo *SecYE-Sec61β* de la arquea *Methanococcus jannaschii* (Van den Berg *et al*, 2004) dio el soporte estructural para estas afirmaciones. Si bien es cierto que muchas preguntas en la translocación de proteínas en arqueas permanecen sin resolver, el carácter evolutivo conservado del complejo *Sec* sugiere que la estructura de *M. jannaschii* es representativa.

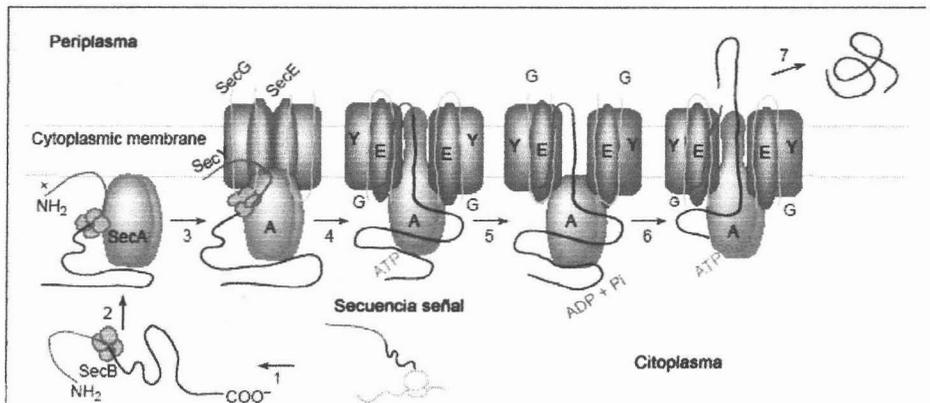


Fig 1. El translocón Sec. La preproteína es representada por una línea negra, con la región gris mostrando la secuencia señal. Pasos 1-3, Targeting. Una secuencia señal y su región C-terminal comprenden un dominio de iniciación que es reconocido por la maquinaria Sec. SecB, guía la preproteína a la ruta de translocación Sec y, adicionalmente, guía el precursor de unión hacia la translocasa por su habilidad para unir SecA. SecA entonces se une a la membrana en un sitio que tiene gran afinidad por SecA. SecY, SecE y SecG forman el complejo heterotrimerico SecYEG el cual constituye un canal para el movimiento polipeptídico. Pasos 4 y 5, iniciación. El paso de iniciación requiere ATP pero no su hidrólisis. Paso 6, continuación. La continuación de la translocación requiere ciclos de hidrólisis de ATP y/o fuerza protónica a través de la membrana. Paso 7 conclusión. Poco se sabe del proceso de conclusión, el cual ocurre en el lado periplásmico, dando lugar a la liberación o doblamiento del sustrato proteico en el espacio periplásmico (Modificado de Mori e Ito, 2001).

La organización de este complejo es tal, que SecY está envuelto en dos mitades, las cuales son unidas por la subunidad SecE, con la subunidad Sec61β en la periferia del núcleo SecYE. Cuando se ve desde la cara citoplásmica, el complejo presenta un espacio parecido a un embudo, el cual disminuye y eventualmente se contrae hacia la parte media de la molécula. Una forma similar es asumida por la segunda mitad del complejo, pero aquí, un dominio transmembranal provee una vuelta, que se piensa actúa como un tapón, restringiendo el paso a través del núcleo del complejo.

Por lo tanto, el movimiento del tapón produce un canal acuoso continuo a través del cual una preproteína que va a ser translocada puede pasar (Eichler y Duong, 2004). Cualquier mutación en los genes que constituyen el sistema Sec de *E. coli* provoca severos defectos en la exportación y, por lo tanto, un fenotipo letal. Pero esto sólo ocurre cuando las células son crecidas en medio rico o a temperaturas anormalmente altas o bajas. Esto indica que los genes sec son esenciales para la viabilidad. El carácter condicional de estas mutaciones puede indicar que los productos de los genes sec son inactivos o inestables en esas condiciones o que fallan al interactuar con proteínas antes de ser secretadas bajo condiciones no permisivas; que su síntesis está arrestada bajo condiciones no permisivas; o que los reducidos niveles o actividad pueden ser tolerados sólo bajo condiciones permisivas (Pugsley, 1993).

Los sistemas de secreción II, IV y V incluyen un paso separado de transporte a través de la membrana interna previo al transporte a través de la envoltura celular. Aunque estas vías difieren una de la otra en la forma en que las proteínas se transportan a través de la membrana externa, la exportación hacia el periplasma ocurre mediante el sistema Sec en los tres casos.

Sistema de Secreción Tipo II

El sistema de secreción tipo II (T2SS) es responsable de la secreción extracelular de toxinas y enzimas hidrolíticas, muchas de las cuales contribuyen a la patogénesis de plantas y animales; este sistema está ampliamente distribuido entre los miembros de Proteobacteria.

La vía general de secreción (general secretory pathway, GSP) es una forma de translocación, en la cual las exoproteínas cruzan sucesivamente, en dos pasos, las membranas interna y externa. El primer paso consiste en la translocación a través de la membrana citoplásmica, de la proteína precursora la cual contiene un péptido señal en el dominio N-terminal. Este precursor

es marcado y transportado a través de la membrana interna mediante el complejo Sec. El péptido señal es procesado por la peptidasa líder y la proteína madura se libera hacia el periplasma. A lo anterior se le conoce con el nombre de vía general de exportación, (general export pathway, GEP). Pero la exoproteína requiere de otra maquinaria para cruzar la membrana externa y finalmente llegar al exterior celular, lo cual se logra mediante lo que se conoce como la rama terminal del GSP (Filloux, 2004). El T2SS es un tipo de transporte particular que pertenece al GSP (Figura 3). También conocido como rama terminal principal (main terminal branch, MTB) el T2SS consiste de 12-16 proteínas las cuales constituyen su secretón. Los componentes de este sistema fueron descubiertos por vez primera en *Klebsiella oxytoca*, y su identificación posterior en *Pseudomonas aeruginosa* demostraron que están conservados en la mayoría de las bacterias Gram-negativas (Filloux *et al.* 1990). También se ha demostrado que el sistema de secreción tipo II es un determinante en la virulencia bacteriana y se ha comprobado su existencia en patógenos tales como *Legionella pneumophila* y *Yersinia pestis* (Hales *et al.*, 1999 e Iwobi *et al.*, 2003) El proceso mediado por el sistema de secreción tipo II ocurre en dos pasos de translocación de membrana que pueden ser separados genética y bioquímicamente. Inicialmente las proteínas que se van a secretar son producidas con péptidos señal en el extremo N-terminal, lo cual permite una translocación Sec-dependiente a través de la membrana citoplásmica. Esto es seguido por la remoción del péptido señal y el doblamiento y la liberación de las proteínas maduras en el espacio periplásmico. En este tránsito, las proteínas pueden sufrir otras modificaciones, tales como la formación de puentes disulfuro o el ensamble de subunidades antes de que sean translocadas a través de la membrana externa mediante el sistema de secreción tipo II (Sandkvist, 2001) . Este aparato es extremadamente específico, ya que es capaz de distinguir las proteínas que serán secretadas de aquellas que son proteínas periplásmicas residentes y, con unas cuantas excepciones, reconoce a sus propias proteínas secretadas de aquellas introducidas por otras especies (Filloux *et al.*, 1990).

El presumible poro del aparato del sistema de secreción tipo II es la proteína D, la cual forma un oligómero de 12-14 subunidades en la membrana externa. La proteína D pertenece a una gran familia de proteínas llamadas secretinas. El dominio C-terminal está conservado entre las secretinas y se piensa que está embebido en la membrana externa, mientras que el dominio N-terminal es variable y puede estar expuesto al periplasma, donde interactúa con otros componentes del aparato de secreción (Hardie *et al*, 1996). La proteína S es una lipoproteína pequeña que estabiliza a la proteína D y que promueve su inserción en la membrana externa en algunas especies. El requerimiento de la proteína S sólo ha sido documentada para los sistemas de secreción Pul y Out de *Klebsiella* y *Erwinia*. Ningún otro sistema de secreción tipo II parece tener un gen S, sin embargo esto no excluye la posibilidad de que otra proteína sea requerida para la inserción en la membrana externa y la estabilidad de la proteína D en estos sistemas (Sandkvist, 2001). La proteína B, aunque sólo se ha identificado en unos pocos sistemas de secreción tipo II, puede ser otro componente que interactúa con la proteína D. Las proteínas E, L y M forman heterooligómeros y homomultímeros y se encuentran en la membrana citoplásmica. Al parecer, en alguna etapa del proceso de secreción, el aparato atraviesa toda la pared celular, formando un puente entre la membrana externa e interna, el cual al parecer, requiere la fuerza protonmotriz de la membrana interna (Lee *et al*, 2000). Las proteínas G, H, I, J y K forman parte del sistema de secreción tipo II y son similares a las subunidades de pili tipo IV y al igual que las subunidades de los pilis, son producidas como proteínas precursoras que son procesadas en la región N-terminal y metiladas por la peptidasa prepilina. Además otros componentes del sistema de secreción tipo II son homólogos a proteínas requeridas para la biogénesis de los pilis tipo IV. Estas observaciones llevaron a suponer que los dos sistemas están evolutivamente relacionados y que algunos de los componentes podrían formar una estructura con forma de pili que soportara la secreción directa o indirectamente. Esto finalmente fue

demostrado (Sauvonnet *et al*, 2000) cuando se sobreexpresaron genes del sistema de secreción tipo II de *K. oxytoca* en *E. coli* y se mostró que la proteína PulG era capaz de ensamblar estructuras con forma de pili. Con esto surgió la incógnita de cómo es posible que esta estructura lleve a cabo la secreción de proteínas dobladas ocupando el mismo espacio del poro a través del cual cruzan las proteínas. Se ha propuesto que el pili actúa como un pistón el cual empuja la proteína secretada a través del poro de secreción (Filloux *et al*, 1998, ver figura 2). Pero también existen estudios que sugieren que las secretinas tienden a agregarse y formar multímeros altamente ordenados. Tal supraestructura sugiere modelos alternativos en los cuales la extrusión del pili y la secreción de proteínas no requieren ocupar el mismo espacio del poro (Linderoth *et al*, 1997).

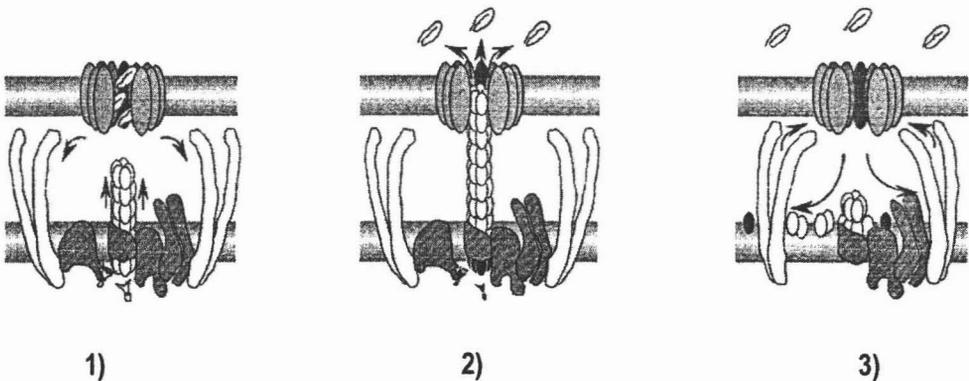


Figura 2. Modelo de la maquinaria del poro del sistema de secreción tipo II. 1) unión de las exoproteínas y apertura del canal, 2) empacamiento de pseudopilinas y liberación de exoproteínas, 3) disociación parcial y reciclaje de componentes (tomado de Filloux *et al*, 1998).

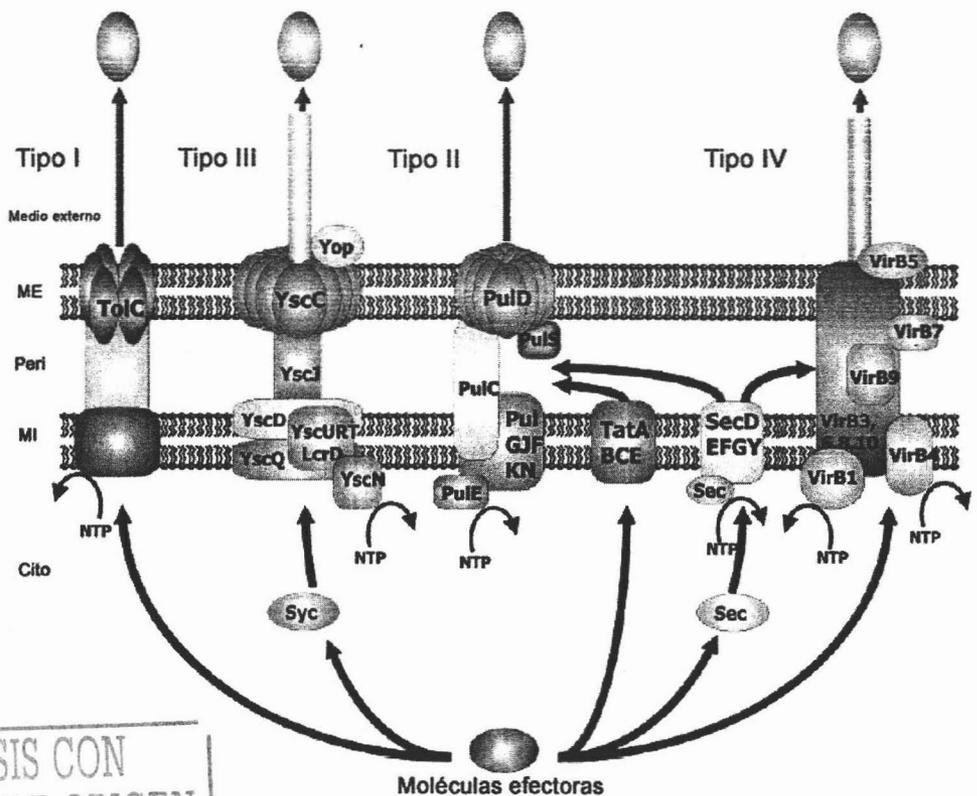
Sistema de secreción tipo IV

El sistema de secreción tipo IV (T4SS) transloca DNA y sustratos proteínicos a través de la envoltura celular bacteriana y es el la ruta de secreción de proteínas en bacterias Gram-negativas menos entendido. Este sistema se ha clasificado sobre la base de una posible relación ancestral con mecanismos de conjugación bacteriana, por lo tanto, los miembros de esta familia incluyen a todos los sistemas de conjugación de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas así como sistemas que guarden relación con la translocación de DNA o proteínas (Lawley *et al*, 2003). Los miembros de la familia tipo IV se agrupan en: 1) sistemas de conjugación de DNA que median la transferencia de DNA a la célula receptora, 2) sistemas "efector translocador" que transfieren efectores a células eucariontes durante la infección y 3) sistemas de toma y liberación de DNA, los cuales median el intercambio de DNA con el medio extracelular (Ding *et al*, 2003). La mayoría de los T4SS inyectan sus sustratos directamente en el citosol eucarionte, al igual que los sistemas de secreción tipo III. Los T4SS liberan los sustratos a una célula receptora mediante contacto célula-célula, aunque también se conocen ejemplos de exportación contacto-independientes en los cuales existe liberación de DNA y proteínas al medio y a su vez recolección de ellos del medio extracelular (Figura 3). La investigación sobre este sistema de secreción se ha desarrollado en *Agrobacterium tumefaciens*, un patógeno de plantas que provoca proliferación descontrolada del tejido vegetal. Este sistema de secreción funciona como un aparato de conjugación, transfiriendo DNA a receptores bacterianos y como efector translocador, liberando moléculas efectoras a blancos eucariontes durante la infección. El sistema de secreción de este organismo se ha definido como VirB/D4 T4SS. El producto de los genes de los operones que lo conforman, elaboran una estructura que cruza la membrana extracelular, la cual se requiere para la transferencia de sustratos, así como un filamento extracelular

denominado pili T, cuya función es mediar la unión con las células receptoras (Christie, 2004). Además de éste, se forma también un homomultímero de la proteína acopladora (Coupling Protein, CP), el cual es ensamblado mediante las proteínas formadoras del poro (Mating pore formation, Mpf). El homomultímero CP y el pili T actúan de manera coordinada, probablemente como un solo organelo supramolecular, ya que los requerimientos genéticos para el ensamble del canal de secreción corresponden casi en su totalidad a los de la biogénesis del pili T. Todas las proteínas VirB son necesarias para ambos procesos, con la excepción de VirB1. Esta estructura podría denominarse canal de secreción/piliT, y consistiría de un conjunto de proteínas de membrana interna y una estructura de pili que se extendería a través del periplasma y un poro parecido a secretina en la membrana externa. Una predicción para este modelo es que el lumen del pili sirva como un conducto para los sustratos de la secreción tipo IV. Dicha estructura mediaría las diversas etapas de translocación (Christie, 2004). Las etapas incluyen el reclutamiento de DNA y sustratos proteicos al aparato de transferencia, la transferencia de sustratos a través de la envoltura celular y la liberación de sustratos en las células blanco (Cascales y Christie, 2003). Los genes que conforman el T4SS parecen ser activados gracias a una respuesta generada por señales ambientales. Moléculas fenólicas y monosacáridos, liberadas por plantas dañadas o heridas, activan el sistema regulatorio de dos componentes VirA/VirG, lo cual induce la transcripción del regulón de virulencia *vir*. La transferencia de DNA y la formación del pili requiere de VirA, VirB1 a VirB11, VirD1 a VirD4, VirE2 y VirG. VirB2 es la subunidad principal del pili, aunque no está claro si el pili emana de la membrana interna o de la membrana externa. VirB4 y VirB11 son proteínas de membrana interna y VirD4 es una proteína citoplásmica; éstas poseen actividad de ATPasa. Se ha propuesto que estas proteínas proveen la energía para la translocación de moléculas efectoras a través del pili (Christie, 2004).

Es importante señalar que actualmente existe una discusión referente a la dependencia o no del sistema Sec para T4SS. Algunos autores aseguran que es Sec-independiente (Cascales y Christie, 2004, Kostakioti *et al*, 2005) aunque otros afirman que existe evidencia suficiente para poder decir que es Sec-dependiente en todas sus modalidades (ver arriba) (Baron *et al*, 2002, Sandkvist, 2001). Pero debido a la creciente evidencia que soporta la segunda hipótesis (Burns, 2003), se ha decidido colocar al T4SS dentro de los sistemas Sec-dependientes.

Finalmente, el estudio del sistema de secreción tipo II y su comparación con el sistema de secreción tipo IV será fructífero, ya que ambos sistemas tienen la capacidad aparente de formar pilis y transportar proteínas al medio extracelular. La información que se obtenga de un sistema puede ser aplicable al otro y viceversa. De hecho, es posible que estos dos sistemas sean sólo variaciones sobre un mismo tema.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 3. Representación esquemática de los sistemas de secreción I, II, III y IV. El tipo I es ejemplificado por la α -hemolisina en *E coli*, el tipo III es ejemplificado por la secreción Yop en *Yersinia*, el tipo II por la secreción de pululanasa en *Klebsiella oxytoca* y el IV, por el sistema VirB en *A. tumefaciens*. La hidrólisis de ATP de HlyB, YscN, SecA y VirB11 se indica. Las moléculas efectoras secretadas están representados por óvalos grises. ME, membrana externa; Peri, periplasma; MI, membrana interna; cito, citoplasma (Modificado de Henderson *et al*, 2004).

Sistema de secreción Tipo V

La ruta de los autotransportadores o sistema de secreción tipo V (T5SS) es uno de los más ampliamente distribuidos entre las bacterias Gram-negativas y es, quizá, el sistema de secreción más simple. La familia de proteínas secretadas incluye a aquellas secretadas mediante el sistema de autotransportadores (tipo Va o AT-1) la ruta de secreción de dos compañeros (tipo Vb) y el recientemente descrito tipo Vc (Henderson *et al*, 2004). Las proteínas secretadas mediante el T5SS (Figura 4) son típicamente factores de virulencia con diversos roles en patogénesis y poseen similitudes en sus estructuras primarias así como notables semejanzas en sus modos de biogénesis (Henderson y Nataro, 2001). Las proteínas son sintetizadas como grandes precursores de multidominio, consistente en una secuencia señal N-terminal Sec-dependiente; un dominio pasajero interno, un dominio α , y un dominio β C-terminal. Después del transporte a través de la membrana interna y el procesamiento de la secuencia señal, el dominio C-terminal se inserta en la membrana externa, guiando la exportación del dominio pasajero a la superficie celular. Allí, el dominio pasajero puede o quedarse unido a la célula bacteriana o ser liberado al medio extracelular (Kostakioti *et al*, 2005). La mayoría de los modelos propuestos para la secreción de los T5SS, sugiere que sobre la

inserción en la membrana externa, el dominio del translocador C-terminal se dobla en una conformación barril- β con un canal central hidrofílico. Una región α -hélice localizada en la región N-terminal del dominio del translocador, llamado la región del "eslabón", adopta una estructura de horquilla que se inserta en el poro, jalando el dominio pasajero hacia la superficie celular (Jacob-Dubuisson *et al*, 2004). Basado en el conocimiento actual que se tiene acerca del T5SS, varios modelos se han propuesto para el transporte del dominio pasajero a través de la membrana externa. La estructura monomérica del dominio translocador NalP en *Neisseria meningitidis*, (cuyo cristal revela un poro de 12.5 Å y una estructura barril- β con todas las características de las estructuras formadas por las porinas, y además, los dos términos localizados en la cara citoplásmica de la membrana) lleva a cabo la secreción del autotransportador maduro a través de un poro monomérico con la estructura barril- β . De acuerdo con este modelo, la región eslabón se inserta en el canal, jalando el dominio pasajero hacia la superficie bacteriana y conectando el poro después de la secreción (Jacob-Dubuisson *et al*, 2004). Después de la exportación hacia la superficie celular, el dominio pasajero adopta su conformación nativa, ya sea con la ayuda de una chaperona intramolecular o mediante un mecanismo desconocido (Newman y Stathopoulos, 2004). De allí en adelante, la proteína doblada puede permanecer unida a la superficie bacteriana o puede ser unida y liberada en el medio extracelular (Newman y Stathopoulos, 2004). El arribo de las secuencias genómicas ha abierto un nuevo capítulo en el estudio de las proteínas secretadas mediante el T5SS y ha demostrado que las proteínas autotransportadoras representan la familia más grande de polipéptidos secretados en bacterias Gram-negativas. Sin embargo, a pesar de la identificación de varios cientos de proteínas autotransportadoras mediante análisis *in silico*, sólo una mínima cantidad de ellas han sido caracterizadas. Por lo tanto, es muy probable que futuras investigaciones revelen

que muchas de estas proteínas juegan papeles esenciales en la patogénesis de enfermedades infecciosas (Henderson *et al*, 2004).

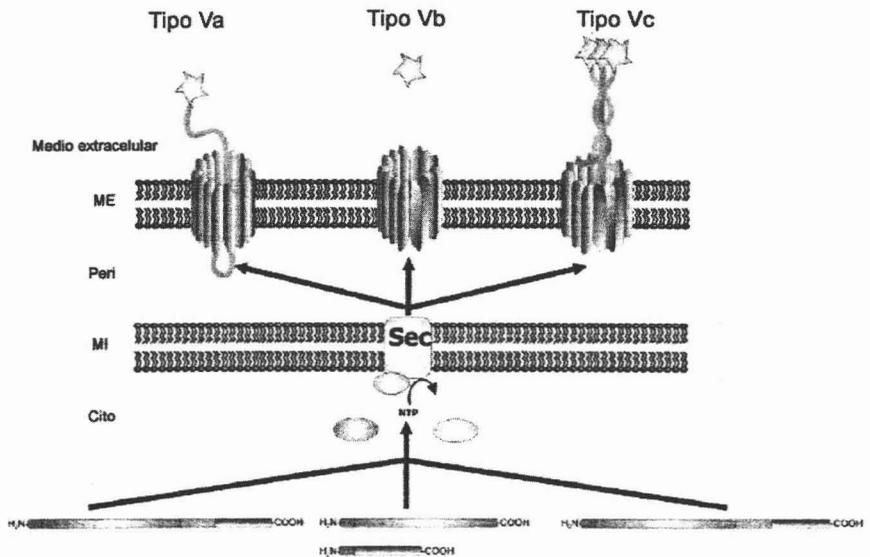


Figura 4. Esquema de los sistemas de secreción tipo V. Las poliproteínas autotransportadas son sintetizadas y generalmente exportadas a través de la membrana citoplásmica mediante la ruta Sec. Una vez que se haya cruzado la membrana interna, la secuencia señal se rompe y el β -dominio se inserta en la membrana externa en una estructura barril- β que forma un poro en la membrana externa. Después de la formación del barril- β el dominio pasajero se inserta en el poro y es translocado en la superficie celular bacteriana, donde puede sufrir o no, otros procesos. ME membrana externa; Peri, periplasma; MI, membrana interna; Cito, citoplasma (Modificado de Henderson *et al*, 2004).

Sistemas de Secreción Sec-independientes

En contraste con los sistemas de secreción tipo II, IV y V, los sistemas de secreción tipo I y III son independientes del sistema Sec y por tanto, no incluyen el procesamiento de la región amino terminal de las proteínas secretadas. Además, la secreción de proteínas a través de éstas últimas rutas ocurre mediante un proceso continuo, sin la presencia de intermediarios periplásmicos.

Sistema de Secreción Tipo I

El sistema de secreción tipo I (T1SS) permite la secreción de proteínas de diversos tamaños y funciones del citoplasma hacia el medio extracelular en un solo paso, sin un intermediario periplásmico estable. El estudio de este sistema se ha enfocado a la secreción de la α hemolisina (HlyA) de *E. coli* (Figura 3). La señal de secreción está usualmente localizada en la región C-terminal de la proteína y no se rompe durante la secreción (Delepalaire, 2004). Muchas de las proteínas secretadas tienen regiones repetidas ricas en glicina que unen específicamente iones de calcio. La mayoría de las proteínas secretadas contienen entre unas cuantas y más de 50 repeticiones, las cuales forman estructuras con forma de sándwich o estructuras beta plegadas con iones de calcio en las vueltas. Se ha demostrado que estas repeticiones son necesarias para la actividad de la proteína secretada (Finnie *et al*, 1998). La maquinaria del sistema de secreción tipo I consiste de tres proteínas localizadas en la envoltura celular, todas ellas se requieren para la secreción. Una proteína que posee un dominio citoplásmico que hidroliza ATP y es conocida como cassette de unión a ATP (ATP-binding cassette, ABC), que comprende dos dominios de unión a nucleótido

(nucleotide-binding domain, NBD) unidos a dos dominios transmembranales. El dominio citoplásmico reconoce al sustrato mediante su señal de secreción y es responsable de la especificidad del proceso de secreción; se cree que forma un dímero (Wandersman, 1996). La proteína de fusión a membrana (membrane fusion protein, MFP) o adaptador, consiste de un dominio citoplásmico corto en la región N-terminal seguido de un ancla membranal y un gran dominio periplásmico. Se cree que éste establece uniones específicas entre los componentes de las membranas externa e interna en respuesta a la unión de sustrato en la cara citoplásmica. El tercer componente del sistema es una proteína de membrana externa perteneciente a la clase TolC. La estructura cristalográfica de esta proteína (Koronakis *et al*, 2000) reveló que es un complejo trimérico el cual forma un canal lleno de agua (140 Å) a través del cual la membrana externa y el periplasma se abren hacia el medio extracelular y se contraen en la parte periplásmica. La interacción inicial de la región C-terminal de la proteína que será secretada con la proteína ABC desencadena el ensamble secuencial del complejo de secreción al generar interacciones específicas posteriores entre los componentes ABC, MFP y OMP (Delepelaire, 2004).

El primer modelo descrito del T1SS fue la secreción de la alfa-hemolisina (HlyA) de *E. coli* uropatógena (UPEC) (Koronakis *et al*, 1989). HlyA es una lipoproteína modificada con un dominio repetido de 11-179 aminoácidos que unen calcio y los cuales se piensa que interactúan con la célula huésped. Esta interacción estimula la inserción de HlyA en la membrana plasmática de las células eucariontes, causando la formación del poro y la liberación de los contenidos citoplásmicos. Otros modelos han contribuido también al entendimiento de este sistema de secreción, como el de metaloproteasas de *Erwinia chrysanthemi*, ciclolisin de *Bordetella pertussis* y de la proteína S de *Caulobacter crescentus* (Delepelaire, 2004). Los transportadores ABC del sistema de secreción tipo I proveen una ruta de secreción la cual es dependiente de la hidrólisis de ATP. Los sustratos de estos

transportadores son localizados en la superficie de la membrana externa o liberados como proteínas solubles en el medio extracelular. Las proteínas del T1SS que permanecen asociadas a la superficie celular incluyen ciertas glicanasas y la proteína protectora de la pared S (Fath y Colter, 1993). Finalmente, el dominio ABC de los T1SS es el más cercano filogenéticamente entre los transportadores ABC bacterianos a los TAP1/2 (transportador de péptidos) y Mdr, los cuales se hallan en mamíferos, incluyendo a humanos (Young y Holland, 1999).

Sistema de secreción tipo III

El sistema de secreción tipo III (T3SS) es, sin duda, el más documentado dentro de los sistemas de secreción en bacterias Gram-negativas (para una extensa revisión ver Hueck, 1998; para una revisión reciente ver Ghosh, 2004). Este sistema de secreción (Figura 3) es el responsable no sólo de la liberación de factores de virulencia directamente en la célula huésped, lo cual implica la exportación de proteínas a través de la envoltura celular bacteriana y en la membrana plasmática de las células eucariontes, sino también de la formación de la estructura supramolecular que provee el movimiento en bacterias llamada flagelo (He *et al*, 2004). El flagelo bacteriano (para revisión ver Macnab, 2003) es un organelo para la propulsión celular y ha sido estudiado mayoritariamente en *Salmonella* y *Escherichia coli* las cuales poseen de 6-8 flagelos por célula; sin embargo existen bacterias que poseen un solo flagelo y algunas especies de *Vibrio*, *Aeromonas*, *Azospirillum* y *Rhodospirillum*, poseen dos sistemas flagelares que son utilizados bajo diferentes circunstancias (Macnab, 2003, McCarter, 2001). En estos casos, el nado en medio líquido es promovido por un solo flagelo polar, mientras que el nado sobre superficies o ambientes viscosos ("Swarming" o nado en enjambre) ocurre gracias a la producción de flagelos peritricos o laterales. El flagelo polar es sintetizado continuamente, mientras que la presencia de flagelos laterales es inducida bajo

condiciones que incapacitan las funciones del flagelo polar. Así, por momentos, dos tipos de organelos flagelares están siendo ensamblados al mismo tiempo (McCarter, 2004)

Las bacterias utilizan los flagelos para moverse hacia microambientes favorables, los estímulos pueden ser químicos, de luz, de temperatura, etc. Algunos de estos estímulos son detectados mediante quimiorreceptores localizados en la membrana citoplásmica. El flagelo está dividido en tres partes: filamento, gancho y cuerpo basal. El filamento (que alcanza un tamaño 5-10 μm de longitud y 20 nm de diámetro) y el gancho (55 nm de longitud) están fuera de la célula, mientras que la estructura basal está anclada en las membranas interna y externa (16 nm de largo y 27 nm de ancho). El cuerpo basal es la fracción más compleja del flagelo, ya que en él se encuentra la maquinaria necesaria para poder ensamblar el sistema de secreción tipo III, el cual exporta los componentes axiales (las subunidades que forman el gancho y el filamento) y además, engloba el motor flagelar, cuya función final es proveer la fuerza para rotación del filamento (Aizawa, 1996). La expresión de los genes flagelares está estrictamente controlada en un orden jerárquico; en *E. coli* y *Salmonella*, se necesitan aproximadamente 50 genes para formar un flagelo funcional. El flagelo rota gracias a la fuerza protonmotriz o, en algunos casos, a la fuerza proporcionada por un gradiente de sodio. La energía electroquímica se convierte en torque, que resulta en la rotación del motor flagelar, el cual está unido al filamento a través del gancho y del eje que forma parte del cuerpo basal (Macnab, 2004). La rotación del filamento helicoidal impulsa la célula. El motor flagelar contiene un interruptor que puede generar rotación en dirección de las manecillas del reloj (CW) o en dirección contraria a las manecillas del reloj (CCW). Las dos direcciones tienen consecuencias diferentes para la célula; reorientación aleatoria o movimiento hacia adelante respectivamente (Macnab, 2004). Los flagelos forman una trenza para impulsar la célula en una misma dirección cuando la rotación en sentido contrario a las manecillas del reloj es aplicada, impulsando las células a una tasa de 10 μm

s-1. Existen nueve proteínas (FliH, FliI, FliJ, FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ y FliR) que son parte esencial para el aparato de exportación flagelar ya que participan en la exportación de todos los sustratos conocidos (Minamino y Macnab, 1999). Después de la formación del aparato de exportación, todos los demás componentes del flagelo son secretados gracias al T3SS, excepto los anillos L y P (Macnab, 2003). Una vez que el aparato de exportación se ha ensamblado, se forma el eje, formado por las proteínas FlgB, FlgC, FlgF y FlgG, los anillos L y P (FlgI y FlgH), los cuales se ubican en la membrana externa y la pared de peptidoglicanos respectivamente, el gancho (FlgE), y finalmente el filamento (FlgC) (Aizawa, 1996; Macnab, 2003). Aunque el flagelo cumple con la función específica de proveer movimiento a las células, se ha observado que el aparato de exportación flagelar también es capaz de exportar proteínas asociadas a virulencia en *Yersinia enterocolitica* (Young *et al*, 1999).

Los sistemas de secreción tipo III asociados a la virulencia son organelos especializados que translocan proteínas bacterianas de virulencia (efectores) del citoplasma bacteriano directamente en el citoplasma de la célula huésped. Estos efectores translocados alteran funciones básicas de la célula huésped, tales como: transducción de señales, arquitectura del citoesqueleto, tráfico membranal y expresión génica de citocinas (Ghosh, 2004). Muchos patógenos Gram-negativos como *Yersinia*, *Salmonella*, *Erwinia* y *Pseudomonas* requieren este sistema para causar enfermedad en células huésped de animales y plantas. Aunque los efectores translocados entre los patógenos varían, la visualización de los organelos asociados a la virulencia de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* y *Yersinia enterocolitica*, muestra que la estructura en sí misma está muy conservada (Kubori *et al*, 1998; Tamano *et al*, 2000; Hoyczyk y Blobel, 2001; y Daniell *et al*, 2001). Hasta ahora, la estructura mejor caracterizada dentro de los organelos asociados a virulencia dependientes del T3SS es el complejo de aguja (needle complex, NC) codificado por la isla 1 de patogenicidad de *S. enterica* serovar Typhimurium. Observado por

vez primera hace más de 20 años y confundido en ese momento como un intermediario del ensamble del cuerpo basal flagelar (Kimbrough y Miller, 2002), no fue sino hasta después de 1995 (cuando las similitudes entre el flagelo y los T3SS asociados a virulencia se establecieron) que el complejo de aguja fue purificado y correctamente descrito (Kubori *et al*, 1998). La estructura está conformada por aproximadamente 20 proteínas, de las cuales todas son necesarias para formar un organelo funcional. Esta estructura se forma por dos anillos que interactúan con la membrana externa, dos anillos internos que interactúan con la membrana citoplásmica y una extensión extracelular en forma de aguja que tiene 8 nm de diámetro y 80 nm de longitud con un canal en el centro de aproximadamente 13 nm; el número de complejos por célula ronda las cien unidades, las cuales se encuentran distribuidas a lo largo de la célula (Kubori *et al*, 1998; Kimbrough y Miller, 2000 y Kimbrough y Miller, 2002). El complejo de aguja es esencial para una invasión exitosa de la célula hospedera, ya que ciertas mutaciones en los genes que lo conforman demuestran que la virulencia disminuye significativamente o incluso desaparece (Sukhan *et al*, 2001). La longitud de la aguja está controlada genéticamente de una manera similar al control de la longitud del gancho en el flagelo. La delección en la proteína InvJ muestra agujas anormalmente largas, y por lo tanto, la supresión de la patogenicidad (Kubori *et al*, 2000). En el flagelo, mutaciones en el gen *fliK*, provocan ganchos irregularmente largos (Kawagishi *et al*, 1996; Minamino *et al*, 1999). Estructuralmente, el complejo de aguja posee una sorprendente similitud con el flagelo (Fig. 5). El notable parecido estructural y genético de estas dos estructuras (Aizawa, 2001) dio la pauta para que estas dos estructuras fueran estudiadas mediante análisis filogenéticos. Un estudio sugiere que una duplicación genética de los genes flagelares dio origen a las estructuras de virulencia asociadas al T3SS y que cuando la duplicación fue exitosa la estructura se especializó en exportar proteínas, perdiendo funciones propias del flagelo (Nguyen *et al*, 2000). Por otro lado, un estudio más reciente señala que ambas tuvieron un origen común ancestral y que evolucionaron independientemente la una de la otra dando

lugar a funciones y estructuras diferentes (Gophna *et al*, 2003). En un estudio reciente, se logró observar una nueva estructura de virulencia formada por *S. enterica* serovar Typhimurium (Chakravorty *et al*, 2005), la cual es codificada por la isla de patogenicidad 2 (*Salmonella* es la única bacteria hasta ahora, en la que se han hallado dos T3SS asociados a virulencia (Shea *et al*, 1996) y ambos son necesarios para una colonización exitosa de la célula huésped), dicha estructura se asemeja al complejo de aguja, pero a diferencia de éste, sólo se le encuentra individualmente o en pocas unidades en un solo polo de la bacteria.

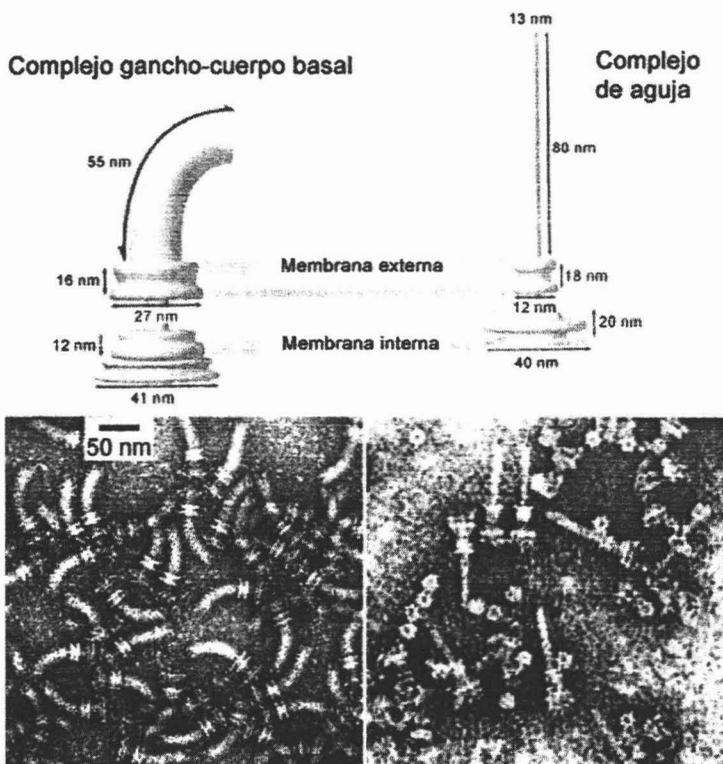


Figura 5. Comparación del complejo gancho-cuerpo basal flagelar y el complejo de aguja utilizado para la secreción de factores de virulencia. Las fotos inferiores muestran micrografías electrónicas de transmisión de los respectivos complejos. El lector debe advertir que en la figura del complejo gancho-cuerpo basal no está representado el filamento, cuya longitud ronda 5-10 μm (Modificado de Macnab, 2003).

Antecedentes

Rhodobacter sphaeroides (Figura 6) es una bacteria fotosintética púrpura no sulfurosa, que pertenece al subgrupo α -3 de Proteobacterias. Es un organismo de vida libre, no patógeno y que nada gracias a un solo flagelo que rota unidireccionalmente. Para cambiar de dirección, la bacteria sufre periodos de paro, durante los cuales, el filamento flagelar se relaja y el movimiento Browniano permite cambios en la dirección de nado (Armitage y Macnab, 1987). *R. sphaeroides* es metabólicamente muy versátil, es capaz de crecer en condiciones heterotróficas o fotoheterotróficas, utilizando preferentemente ácidos orgánicos como donadores de electrones. En la oscuridad es capaz de crecer fermentativamente. Además, en ausencia de oxígeno y amonio es capaz de fijar nitrógeno. Ha servido como modelo para estudiar la fotosíntesis bacteriana así como para entender la biogénesis flagelar en organismos monoflagelados. La estructura flagelar en *R. sphaeroides*, así como los genes que lo conforman, es muy similar a aquellos descritos para *E. coli* y *Salmonella*. También la organización jerárquica flagelar observada en sus contrapartes entéricas está presente en *R. sphaeroides* (Poggio *et al*, 2000). Además, *R. sphaeroides* posee características que la separan de otras bacterias monoflageladas como *Caulobacter crescentus* o *Sinorhizobium meliloti*, como por ejemplo, un gancho recto (West y Dreyfus, 1997). Se ha observado que a pesar de ser una bacteria monoflagelada, *R. sphaeroides* nada más rápido que *E. coli*, alcanzando velocidades de $35 \mu\text{m s}^{-1}$, mientras que ésta última, lo hace a $20 \mu\text{m s}^{-1}$ (Armitage y Schmitt, 1997). El genoma completo de *R. sphaeroides* fue secuenciado y liberado en 2001. Consta de dos cromosomas circulares, el cromosoma I tiene 3.0 megabases, y el cromosoma II, 0.9 megabases, los cuales contienen 3106 y 874 marcos de lectura abiertos (ORFs) respectivamente. Posee también cinco

replicones endógenos adicionales (Choudhary et al, 2004). Estudios preliminares mostraron que varios genes tienen copias duplicadas o multiplicadas dentro del genoma. Las multiplicaciones génicas incluyen los genes responsables de la quimiotaxis como *cheA*, *cheB*, *cheR*, *cheW* y *cheY*, así como genes reguladores, genes responsables del metabolismo de aminoácidos, genes de replicación y partición y genes de choque de calor (Mackenzie et al, 2001). Sin embargo, también se observó la duplicación de un gran número de genes dentro del cromosoma, los cuales incluyen genes del metabolismo de carbono, oxidoreductasas y los genes flagelares. Los genes duplicados en su conjunto superan en número a los que se encuentran multiplicados (Choudhary et al, 2004). Algunas caracterizaciones bioquímicas y genéticas han sido dadas a conocer con anterioridad para algunos genes duplicados implicados con el metabolismo de biosíntesis de tetrapirroles y la fijación de nitrógeno (Dryden y Kaplan, 1990; Neidle y Kaplan, 1992; Neidle y Kaplan, 1993). Las duplicaciones concernientes a los genes flagelares resultan un misterio, ya que a la fecha no se han observado células que posean más de un flagelo o que formen alguna estructura supramolecular homóloga al flagelo. Dichas duplicaciones se encuentran localizadas en una región cromosómica muy alejada de aquella en la que se halla el grupo de genes flagelares que sintetizan el flagelo, los cuales han sido descritos y caracterizados previamente. La identidad de aminoácidos de las copias flagelares funcionales con sus contrapartes duplicadas oscila entre 28 y 47% (Mackenzie et al, 2001 y Choudhary et al, 2004). En la tabla 1 se indica la identidad de aminoácidos entre las dos copias flagelares.

Gen	% Identidad
FigB	31
FigC	28
FigE	24
FigF	30
FigG	42
FigH	30
FigI	39
FliI	36
FliF	29
FliG	21
FliN	35
FliP	41
FliQ	47
FliR	33
FliA	36
FliB	42

Tabla 1. Porcentaje de identidad de aminoácidos entre las dos copias flagelares halladas en el genoma de *R. sphaeroides*.

Las duplicaciones flagelares se encuentran organizados en forma tal que sugieren la existencia de operones, además ninguno de estos genes presentan mutaciones evidentes que pudieran afectar su posible expresión. Análisis previos en el laboratorio indican que estos genes parecen ser funcionales ya que, un ensayo de reacción en cadena de la DNA polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) muestra una banda que pudiera corresponder al transcrito del gen *flgE2* (se añadirá el sufijo 2 de ahora en adelante, para diferenciar a las copias duplicadas de sus contrapartes caracterizadas). Por lo tanto se decidió estudiar las segundas copias de los genes flagelares en *R. sphaeroides* bajo la hipótesis de que los productos de estos genes podrían formar una estructura diferente del flagelo que no ha sido aún observada.

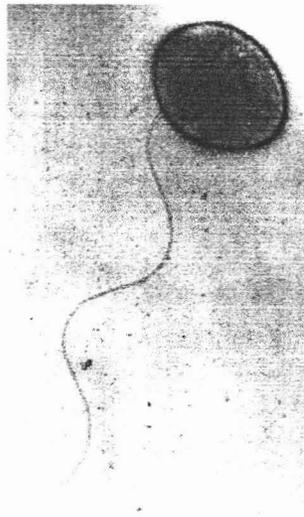


Figura 6. *Rhodospirillum rubrum*.

(Foto cortesía del laboratorio del Dr. Georges Dreyfus)

Hipótesis

Las copias flagelares duplicadas de *Rhodobacter sphaeroides* codifican para los componentes de una estructura de secreción tipo III, conocida como el complejo de aguja, o alguna estructura semejante.

Objetivos

- Generar dos mutantes, en el gen *flgE2*, (gancho) y en el gen *flhA2*, (aparato de secreción tipo III), utilizando un cassette de resistencia y un gen reportero.
- Monitorear la actividad transcripcional de los genes *flgE2* y *flhA2* mediante un gen reportero y probar así la expresión o no de las copias flagelares duplicadas.
- Estudiar, mediante análisis teóricos, la naturaleza de las copias flagelares duplicadas y su relación con las copias flagelares caracterizadas.

Materiales y métodos.

Plásmidos:

pTZ19R: fagémido multifuncional de ~2870 pb, que contiene los sitios de replicación f1 y pBR322. Posee el sitio múltiple de clonación de pUC19 y el gen *lacZ'* que permite la selección de colonias azules y blancas mediante la adición de X-gal. (Pharmacia)

pCR 2.1 TOPO: vector de clonación de 3931 pb, específicamente diseñado para clonar productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Contiene el sitio de replicación f1 y el origen de pUC. Posee el promotor/sitio de unión T7 y el gen *lacZ'* para la selección de colonias blancas y azules. (Invitrogen)

pRK415: derivado del pRK404, plásmido movilizable, retiene el promotor *lac*, MCS derivado del pUC19, RK2 oriV, oriT, *lacZ α* , Tc^r (Keen *et al.*, 1988)

Cepas Bacterianas

Escherichia coli:

DH5 α : *supE44* Δ *lacU169* (Δ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*.
(Hanahan, 1983)

JM103: *supE thi* Δ (*lac-proAB*) F'[*traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ* Δ M15] (Messing *et al.*, 1981)

S17-1: *recA endA thi hsdR* RP4-2-Tc::Mu::Tn7 Tpr Smr (Simon *et al.*, 1983)

XL1-Blue: *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi rel A1 lac* F'[*proAB⁺ lacI^q lacZ* Δ M15 Tn 10 (*tet^r*)] (Bullock *et al.*, 1987)

***Rhodobacter sphaeroides*:**

WS8: cepa silvestre con resistencia espontánea a ácido nalidíxico.

2.4.1: cepa silvestre con resistencia espontánea a ácido nalidíxico.

CM1: 2.4.1 Δ *flgE2::uidA:aadA*.

CM2: WS8 Δ *flgE2::uidA:aadA*.

CM3: 2.4.1 Δ *flhA2::uidA:aadA*.

R. sphaeroides 2.4.1 fue crecida fotosintéticamente en viales estériles de 10 mL o a 30°C en oscuridad conteniendo medio mínimo de succinato: K₂HPO₄ 34.8g, (KH₄)₂SO₄ 5.0 g, ácido succínico 40g, ácido L-glutámico 1g, ácido L-aspártico 0.4g, NaCl 5g, ácido nitrotriácético 2g, MgSO₄ 3g, CaCl 0.334g, FeSO₄ 0.020g, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 1% solución 0.2 mL, solución de elementos de traza (EDTA

1.765g, Zn SO₄ · 7H₂O 10.95g, FeSO₄ · 7H₂O, MnSO₄ · H₂O 1.54g, CuSO₄ · 5H₂O 0.392g, Co(NO₃)₂ · 6H₂O 0.248g, H₃BO₃ 0.114 para 100mL) 1mL, solución de vitaminas (ácido nicotínico 1g, tiamina HCl 0.5g, biotina 0.010g para 100mL) 1mL, para 1 litro.

Métodos de genética molecular.

Preparación y transformación de células *E. coli* competentes usando cloruro de calcio.
(Cohen *et al.*, 1972)

Se crece hasta fase exponencial (D.O.₆₀₀ ~0.5) 10 mL de la cepa de interés. Se incuba 10 minutos en hielo y se centrifuga a 4°C por 5 minutos a 5000 RPM. Se decanta y se resuspende cuidadosamente en lo que resta de medio. Se agregan 5 mL de CaCl₂ 100 mM y se incuban por 15 minutos. Nuevamente se centrifugan las células y se resuspenden cuidadosamente en 700 µL de CaCl₂ 100mM. Se incuban en hielo por al menos 1 hora. Posteriormente, se toma un alícuota de 200 µL, se transfiere a un tubo de microcentrifugación y se le agregan 50 ng de DNA, mezclando lentamente con una micropipeta. Se incuban en hielo por 30 minutos y se induce un choque térmico (42°C) por 2 minutos. Inmediatamente después, se colocan en hielo por otros 2 minutos. Al final se agregan 800 µl de LB y se incuba el cultivo por 45 minutos a 37 °C para que las bacterias se recuperen y expresen el marcador de resistencia al antibiótico codificado por el plásmido. Finalmente se platean en medio selectivo.

Transformación de *E. coli* mediante electroporación (Chassy *et al.*, 1988).

Para preparar bacterias electrocompetentes, se crece un cultivo de 10 mL hasta fase exponencial media (O.D. ₆₀₀ ~ 0.4), se enfría por 10 minutos y se centrifugan las células a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se decanta y se resuspende cuidadosamente en lo que sobra de medio. Se agregan 5mL de H₂O bidestilada desionizada estéril fría (2-4°C) y se centrifuga nuevamente con las condiciones antes mencionadas. Los lavados con agua se repiten 5 veces. Al final, en un tubo de microcentrifugación las células son resuspendidas en 150 µL de solución fría de H₂O y 10% de glicerol. La suspensión celular puede ser congelada y guardada a -70 °C hasta por 6 meses sin pérdida de eficiencia de transformación.

Para transformar, se enfría una celda de electroporación durante 10 minutos en hielo. Se agregan 25ng de DNA a las células electrocompetentes y se vacían en la celda cuidando que las células toquen el fondo para una transformación eficiente. Se coloca la celda en el aparato de electroporación y se da un pulso de 1.8 kV. Inmediatamente después se agrega 1 mL de LB para recolectar las células y se recuperan a 37°C durante 45 minutos. Se colectan y platean en medio selectivo.

Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.

Para extraer y purificar fragmentos de DNA se utilizó el kit de extracción QIAEX II de Qiagen. Se siguieron las instrucciones del fabricante en todos los pasos.

Purificación de plásmidos en pequeña escala mediante minipreparaciones hervidas (Holmes y Quingley, 1981).

Se inoculan 3 mL de medio selectivo con la colonia de interés durante toda la noche a 37°C. Se centrifugan 1.5 mL del cultivo y el paquete celular se resuspende en lo que resta de medio después de haber decantado el tubo. Se agregan 300 µL de STET (8% de sacarosa, 50 mM EDTA pH 8.0, 5% tritón, 50 mM Tris-HCl pH 8.0) y 30 µL de lisozima. Esta mezcla se agita vigorosamente durante 1 segundo y se hierve durante 45 segundos. Posteriormente se centrifuga durante 15 minutos a temperatura ambiente a 14000 rpm y el sobrenadante es transferido a un tubo limpio donde se precipitan los plásmidos agregando 300 µL de isopropanol y centrifugándolos en frío a 14000 rpm durante 20 minutos. El paquete celular resultante se lava con etanol al 70% y se seca al vacío durante 10 minutos. Finalmente se resuspenden con 40 µL de H₂O bidestilada y desionizada.

Purificación de fragmentos de DNA mediante geles de bajo punto de fusión (Wieslander, 1979).

Se prepara un gel con agarosa de bajo punto de fusión al 0.8% (BIO-RAD) y buffer TBE 1X. Después de haber teñido el gel en bromuro de etidio, se procede a observarlo bajo la luz UV de onda larga. Posteriormente se cortan las bandas de interés y se funden en un tubo de centrifugación

a 70°C durante 10 minutos. Se calcula el volumen de la agarosa y se le agrega 1/10 de NaCl 5M para dejarlo reposar nuevamente a la misma temperatura 5 minutos más. Durante este tiempo se procede a saturar una solución de fenol con NaCl mezclando 100 µL de NaCl 5M, 400 µL de H₂O y 500 µL de fenol; se agita vigorosamente la mezcla durante 30 segundos y se centrifuga durante 1 minuto. Se retira la fase acuosa y el fenol se coloca a 37°C durante 5 minutos. Se agrega a la agarosa fundida 2/3 del fenol, se agita vigorosamente durante 30 segundos y se centrifuga durante 5 minutos a temperatura ambiente a 14000 rpm. La fase acuosa resultante se transfiere a un tubo limpio y se agrega un volumen de fenol/cloroformo, se agita durante 30 segundos y se centrifuga durante 2 minutos. Nuevamente la fase acuosa se transfiere a un tubo limpio y se repite el paso anterior pero ahora sólo con cloroformo. Finalmente se añade un volumen de isopropanol y se mantiene a -20°C durante al menos 2 horas para después centrifugarlo en frío a 14000 rpm por 20 minutos y resuspenderlo en un volumen adecuado de H₂O.

Purificación de plásmidos por columnas QIAGEN.

Para extraer plásmido a gran escala se utilizó el Plasmid Maxi Kit de QIAGEN con las columnas P-20, las cuales poseen una resina de intercambio aniónico a la cual se une el DNA plasmídico y que es eluido por un buffer alto en sales, y después, concentrado y desalado mediante precipitación con isopropanol. Se siguieron las instrucciones del fabricante en todos los pasos.

Ensayos de movilidad.

Se toma una alícuota de 5 μ l de cultivo en fase exponencial y se coloca en la superficie de la caja de nado, (agar al 0.22%) las cajas se incuban aeróbicamente en oscuridad, en una cámara de humedad a 30°C. El proceso de nado se observa como la formación de un halo a partir del punto de inoculación.

Hibridación DNA-DNA tipo Southern Blot (Southern, 1975).

Se corre un gel con las muestras de DNA cromosomal digerido con las enzimas de interés, se tiñe con bromuro de etidio y se toma una fotografía. Para desnaturalizar el DNA, el gel se incuba en 5 volúmenes de HCl 0.25 mM en agitación suave por 15 minutos y después 2 lavados en 5 volúmenes de NaCl 1.5M, MaOH 0.5M por 20 minutos en agitación suave. Para neutralizar, el gel es incubado en 5 volúmenes de Tris 1.0M (pH 7.5), NaCl 1.5M por 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente el DNA contenido en el gel fue transferido a una membrana de Nylon (Hybond-N, Amersham) mediante presión positiva durante 15 minutos e incubada toda la noche a 70°C.

Para prehibridar la membrana se requiere solución de prehibridización (Formamida 50% (v/v) SSPE 6x, solución Demhardt 5x, SDS 10% (p/v) 1%). Se utilizan 20 μ L de DNA de timo por cada mL de solución prehibridadora, se hierve previamente durante 10 minutos y se incuba en

hielo por 5 minutos, simultáneamente se calienta la solución prehibridadora a 42°C y se mezclan perfectamente. Posteriormente se coloca la membrana de nylon en una bolsa de hibridación y se agrega la mezcla con cuidado que no queden burbujas. Se sella la bolsa y se incuba a 42°C al menos durante 6 horas.

Seguidamente, se calienta la solución de hibridización (sulfato de dextrán 10%, formamida 50%, SSPE 6x, solución Denhardt 5x y SDS 1%) a 42°C, y se desnaturaliza la sonda (marcada con biotina-14-dCTP y un kit de marcaje de cebadores al azar (Invitrogen)) junto con DNA de timo hirviéndolos durante 10 minutos y enfriándolos inmediatamente en hielo. Al final ambas se mezclan y se depositan en la bolsa de hibridación con la membrana de nylon reemplazando la solución anterior e incubándolo a 42°C durante toda la noche.

Posteriormente la membrana se lava con SSC5x y SDS 0.5% a 65°C dos veces durante 5 minutos; una vez con SSC 0.1X y SDS 0.1% a 50°C durante una hora; finalmente se lava una vez con SSC 2X a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Para unir el conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina SA-AP, la membrana requiere ser lavada con TBS-Tween 20 dos veces durante un minuto a temperatura ambiente, para después someterla a la solución bloqueadora BSA (0.03g de albúmina sérica bovina por cada mL de TBS-Tween 20) por una hora a 65°C con agitación suave. Después la membrana se coloca en una bolsa de hibridación y se agrega el conjugado SA-AP (5mL de SA-AP en 5mL de TBS-Tween 20) y se agita manualmente por 10 minutos para después lavarla con TBS-Tween 20 una vez durante 15 minutos y después una vez más durante una hora.

Después, la membrana se lava con buffer de lavado final (Tris Base 100mM, NaCl 100mM y $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ pH 9.5) durante 15 minutos y luego por una hora. Se aplica el agente de detección luminosa ($10\mu L/cm^2$) CDP-Star (TROPIX), se deja reposar durante 5 minutos y finalmente se expone sobre una placa de rayos X durante 5 minutos o el tiempo que sea necesario.

Determinación de la actividad enzimática de β -glucuranidasa (Jefferson *et al*, 1986).

Se preparan cultivos de las cepas de interés en 10mL de medio selectivo. Cuando el cultivo se encuentra en fase exponencial ($D.O_{600} \sim 0.5$) las células se colectan en tubos de 1.5 mL mediante centrifugación en frío. El paquete celular se resuspende en 200 mL de buffer de extracción (50 mM NaH_2PO_4 pH 7, 10 mM β -mercaptoetanol, 100 mM Na_2EDTA , 0.1% Triton X-100) Las células se lisan por sonicación y las proteínas celulares son separadas de los restos celulares por centrifugación.

El ensayo se lleva a cabo en buffer de extracción con 4-metilumbelifril β -D-glucurónido (1 mM). Las reacciones se incuban a $37^\circ C$ en alícuotas de 400 μL de buffer de ensayo previamente calentado a las que se agregan 100 μL del sobrenadante de la muestra. La reacción se detiene en tres tiempos transfiriendo alícuotas de 100 μL a un tubo con 900 μL de buffer de paro (0.2 M Na_2CO_3) a temperatura ambiente. Las muestras se miden en un fluorómetro calibrado con una solución blanco de 4-metilumbeliferona (10 mM) con una longitud de onda de excitación de 365 nm y de emisión de 455 nm.

Construcción de árboles filogenéticos.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas analizadas fueron obtenidas del banco de datos disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> y alineadas mediante el programa MUSCLE (<http://www.drive5.com/muscle/>). El uso de secuencias redundantes de los mismos géneros de bacterias fue evitado. Posteriormente, las secuencias fueron sometidas a un análisis de Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) en el programa MEGA 3 (Kumar *et al*, 2004), aplicando 1000 repeticiones de bootstrap y usando la matriz Jones-Taylor-Thornton. El árbol consenso de cada proteína se muestra en este trabajo.

Resultados

Se aislaron dos mutantes, en los genes *flgE2* y *flhA2* respectivamente. El gen *flgE2* es la copia duplicada del gen que codifica para las subunidades que conforman el gancho. El producto del gen *flgE2*, hipotéticamente, se hallaría en el espacio extracelular. El gen *flhA2* es la copia duplicada que presenta similitud con el gen cuyo producto forma parte del aparato de exportación. Ambas mutantes fueron construidas utilizando el cassette de resistencia *uidA::aadA* el cual lleva el gen de resistencia a espectinomicina y el gen que codifica para la β -glucuronidasa, a través del cual es posible monitorear la actividad transcripcional de los genes, ya que su expresión depende de la presencia de promotores exógenos.

Primeramente se realizó una reacción de RT-PCR (reacción en cadena de la DNA polimerasa y transcriptasa reversa) para el gen *flgE2* utilizando RNA total aislado de la cepa WS8 crecida en condiciones heterotróficas; así como un par de oligonucleótidos diseñados con base en la secuencia genómica de *R. sphaeroides* 2.4.1. El producto de amplificación esperado corresponde a un tamaño de 250 pb y como se puede observar en la figura 7, el producto de la reacción muestra un tamaño similar (fig. 7 carril 2), además su presencia es dependiente de la inclusión de la transcriptasa reversa en la reacción.

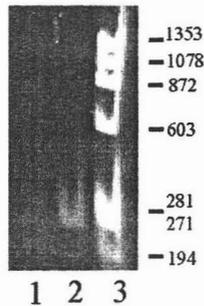


Figura 7. RT-PCR de *flgE2*. RNA total fue aislado de la cepa silvestre WS8 y sujeto a la reacción de RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el gen *flgE2*. (1) Control negativo en ausencia de transcriptasa reversa, (2) con transcriptasa reversa, (3) Φ X 174.

Con el fin de aislar la cepa mutante en el gen *flgE2* (ver figura 8), se diseñaron un par de oligonucleótidos para amplificar el gen completo basados en la secuencia genómica de *R. sphaeroides* 2.4.1 disponible en www.rhodobacter.org mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El resultado fue verificado en un gel de agarosa y el resultado coincidió con la predicción de 2 kb. Posteriormente el producto de PCR fue purificado a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP). Una vez puro, se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*, dichos sitios se habían generado previamente en el diseño de los oligonucleótidos. Al mismo tiempo, el plásmido pTZ19R fue también digerido con las enzimas mencionadas y el estado lineal del plásmido fue verificado en un gel de agarosa; al tenerlo lineal se le agregó fosfatasa alcalina de camarón para impedir su recircularización. Cuando las reacciones fueron concretadas, se unieron el producto de PCR y el DNA del plásmido ya linearizado mediante una reacción de ligación. Dicha ligación se transformó mediante electroporación a la cepa JM103 de *E. coli* y sembrada en medio

selectivo. La selección de colonias azules y blancas mediante la adición de X-gal permitió escoger las colonias blancas que portaban la inserción. Estas colonias fueron replicadas y crecidas en medio líquido con los antibióticos adecuados y se realizaron minipreparaciones del plásmido. Para corroborar la correcta ligación de los fragmentos de DNA en un solo fragmento plasmídico, los plásmidos fueron digeridos con la enzima *EcoRI*, dando como resultado la banda esperada de 5 kb. Se purificó el plásmido a gran escala. Para poder unir el cassette de resistencia *uidA:aadA* al gen *flgE2*, se digirió el plásmido pTZ19R-FlgE2 con la enzima de restricción *BamHI*. Lo anterior dió como resultado la eliminación de aproximadamente 1 kb de secuencia interna del gen *flgE2*, dejando un plásmido lineal y porciones del gen en los extremos de aproximadamente 500 pb. La banda mayor que se visualizaba en un gel la cual contenía el plásmido y el gen trunco fue purificado a partir de un gel de bajo punto de fusión. El cassette *uidA-aadA* también fue digerido con la misma enzima de restricción y se siguió el mismo procedimiento para purificarlo. Cuando ambos estuvieron puros se ligaron y posteriormente se transformaron utilizando cloruro de calcio en la cepa DH5 α de *E. coli*, se plateó en medio selectivo y algunos plásmidos aislados de las colonias resultantes fueron analizadas para verificar su estado. En este paso resulta muy importante comprobar la orientación del cassette de resistencia con respecto del gen *flgE2*, de lo contrario, no podría haberse monitorearse la actividad del gen reportero debido a que el gen reportero depende de los promotores externos cuando éste se integra al cromosoma. Mediante predicciones computacionales, se determinó que digiriendo el plásmido con la enzima *PstI* la orientación adecuada produciría 4 bandas visibles: 3 kb, 2,3 kb y 2 kb y 300 pb; si el cassette se ligaba en la dirección contraria produciría 3 bandas: 5 kb, 2 kb y 600 pb. Se eligió entonces una colonia que portaba el plásmido con la orientación adecuada y se purificó el plásmido de ~7500 pb a gran escala. Una vez puro, el plásmido pTZ19R/*flgE::uidA:aadA* fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* y purificado para obtener de esta manera el fragmento de ~5 kb *flgE::uidA:aadA*. Para poder ser integrada la construcción al genoma

de *R. sphaeroides* fue necesario transferir el alelo *flgE::uid-aad* al plásmido suicida pJQ200 el cual no se replica en dicha bacteria y porta un gen de resistencia a gentamicina. Para realizar dicha subclonación, el fragmento puro *flgE::uidA:aadA* fue incubado en presencia de la enzima T4 DNA polimerasa y dNTPs con el fin de obtener extremos romos. El plásmido pJQ200 fue digerido con la enzima *SmaI* para su linearización y purificado a partir de gel de bajo punto de fusión. De esta manera, estos fragmento se incubaron en presencia de ligasa durante 12 horas y se transformó por cloruro de calcio en la cepa XLI-Blue de *E. coli*, plateando en medio Luria adicionado con espectinomicina. Las colonias resultantes fueron replicadas en medio adicionado con gentamicina para comprobar la resistencia del plásmido pJQ200 y la resistencia del cassette a espectinomicina. Los plásmidos aislados de las colonias que mostraron resistencia a ambos antibióticos fueron digeridos con la enzima *BamHI* para comprobar el correcto estado de la construcción de ~ 9 kb. Posteriormente se purificó el plásmido a gran escala y fue transformado a la cepa S-17 de *E. coli*, la cual contiene los genes *tra*, necesarios para transferir el plásmido pJQ200 a las cepas de *R. sphaeroides* mediante conjugación (los pasos generales de las estrategias de clonación y mutagénesis se muestran en la figura 8).

Cuando se tuvo lista la construcción pJQ200/*flgE2::uidA:aadA* en la cepa S-17, se procedió a realizar la conjugación biparental con la cepa silvestre 2.4.1 de *R. sphaeroides*. Se seleccionaron colonias resistentes a espectinomicina pero sensibles a gentamicina que surgirían mediante un evento de doble recombinación homóloga, lo cual indicaba que el plásmido pJQ200 no estaba insertado en el cromosoma, pero el gen *flgE2* con el cassette de resistencia interrumpiéndolo sí. Cuando se obtuvieron las mutantes, se procedió a crecerlas hasta fase exponencial y fase estacionaria para después medirles la actividad de β -glucuronidasa producida por la transcripción del gen reportero. Los resultados se muestran en la tabla 2. La correcta inserción de la fusión

transcripcional en el cromosoma fue verificada mediante un ensayo Southern blot (Fig. 9) y mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (datos no mostrados). Asimismo, la ausencia de mutaciones que pudieran afectar la expresión de la construcción fue verificada al secuenciar la clona pTZ19R/*flgE2* (Fig. 10).

La estrategia experimental llevada a cabo para obtener la mutante en el gen *flhA2* fue idéntica a la implementada para el gen *flgE2*. Esta vez se clonó el producto de PCR en el plásmido pTOP10 y posteriormente se subclonó en el plásmido pTZ19R con las enzimas *EcoRI* y *XbaI*. Posteriormente, el plásmido pTZ19R/*flhA2* fue digerido con *BamHI* y se clonó el cassette de resistencia *uidA:aadA* en el sitio único *BamHI* presente en el gen *flhA2*. Cuando se verificó la inserción correcta del cassette, la construcción *flhA2::uidA:aadA* con extremos romos fue clonada en el plásmido pJQ200 digerido con *SmaI* y el plásmido final de ~9 kb pJQ200/*flhA2::uidA:aadA* fue transferido a la cepa S-17 mediante transformación con cloruro de calcio. La conjugación se realizó esta vez sólo para la cepa 2.4.1 de *R. sphaeroides*. La correcta inserción de la fusión transcripcional en el cromosoma fue verificada mediante un ensayo Southern blot (Fig. 8) y mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (datos no mostrados). Además se secuenció la clona pTZ/*flhA2* para verificar la ausencia de mutaciones (Fig 11). Cuando se obtuvo la mutante se practicaron los ensayos para medir la actividad de β -glucuronidasa (Ver tabla 1).

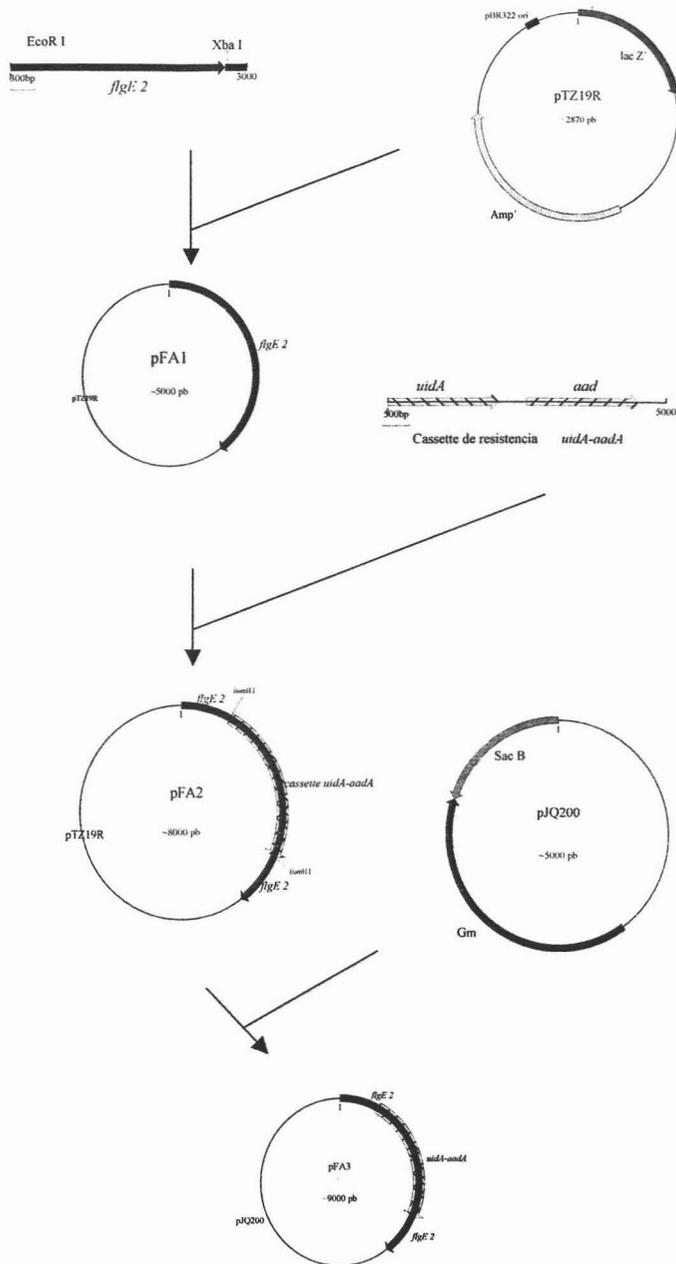


Figura 8. Construcción de las mutante $\Delta flgE2$. *flgE2* interrumpido con el cassette *uidA-aadA*, *uidA* nos permitirá monitorear la actividad transcripcional del gen y *aadA* confiere resistencia a espectinomicina. El plásmido suicida pJQ200, es incapaz de replicarse en *R. sphaeroides*, y permite aislar la mutante que porte la construcción. El procedimiento para aislar la mutante en *flhA2* fue el mismo.

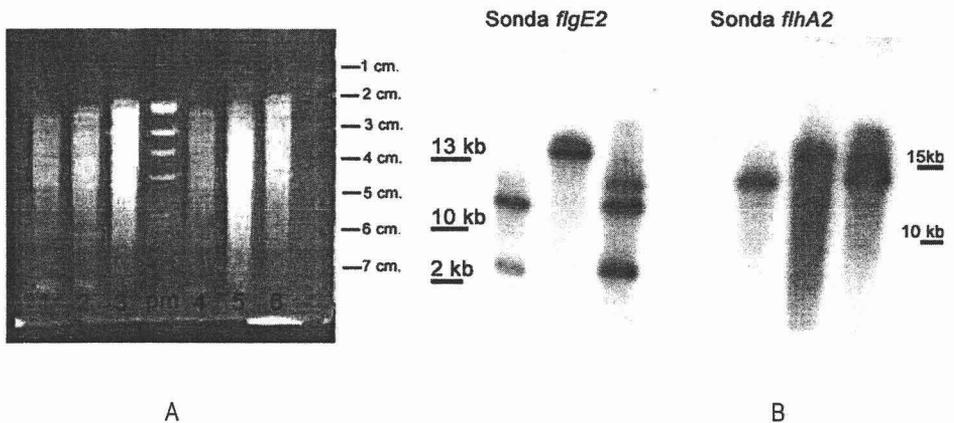


Figura 9. Hibridación DNA-DNA (Southern Blot) de DNA cromosomal total con las sondas *flgE2* y *flhA2* A: 1) DNA de cepa silvestre WS8 digerido con *Sall*, 2) DNA de $\Delta flgE2::uidA-aadA$ digerida con *Sall*, 3) DNA de cepa silvestre 2.4.1 digerida con *Sall*, 4) DNA de cepa silvestre WS8, 5) DNA de $\Delta flhA2::uidA-aadA$ digerida con *Sall*, 6) DNA de cepa silvestre 2.4.1 digerida con *Sall*. B: hibridación con las sondas biotiniladas. Para el DNA cromosomal de la cepa silvestre *flgE2* se observan las dos bandas esperadas de 11 y 3 kilobases. Para el DNA cromosomal de la cepa *flhA2* se observa la banda esperada de 15 kilobases.

Actividades específicas de β -glucuronidasa*

Cepa	Primer ensayo	Segundo ensayo
Silvestre 2.4.1 en FE	30.60	1.10
2.4.1 $\Delta flgE2::uidA-aadA$ en FE	15.71	1.68
Silvestre WS8 en FE	12	18
WS8 $\Delta flgE2::uidA-aadA$ en FE	37	13
2.4.1 $\Delta flgE2::uidA-aadA$ en FL	N. D.	15
2.4.1 $\Delta flhA2::uidA-aadA$ en FE	25	12

*La actividad está dada en picomoles de producto /minuto /extracto de proteína de cultivos crecidos hasta fase estacionaria o fase exponencial según se indica.

Tabla 2. Actividades específicas de β -glucuronidasa de las cepas mutantes generadas en este estudio. FE: fase estacionaria; FL: fase logarítmica, N. D.: no determinado.

cajas de agar suave, en las cuales la cepa silvestre forma un halo de nado a partir de un punto de inoculación. Cuando una mutante no es capaz de nadar, se observa solamente el punto de inoculación sin halo a su alrededor, o en su defecto, el halo es muy irregular. Las mutantes con la mutación *flgE2::uid-aadA* y *flhA2::uid-aadA* mostraron una capacidad de nado similar a la cepa progenitora 2.4.1. Por otro lado, se ha probado que una cepa mutante en el gen *flgE* (que codifica para el gancho) es incapaz de nadar. Cuando ésta es complementada con el alelo silvestre la cepa recupera su capacidad de nado (Ballado *et al*, 2001). Para examinar si el alelo *flgE2* es capaz de cumplir la función de la copia flagelar caracterizada *flgE*, se realizó un ensayo de complementación alélica para la mutante en el gen *flgE* de *R. sphaeroides*. El fragmento *flgE2* fue clonado en el plásmido pRK415 el cual es un plásmido movilizable que contiene un *oriT* y el promotor *lac* y mediante una conjugación triparental, el plásmido fue introducido a la cepa con la mutación *flgE::aadA*. Como se observa en la fig. 11 el alelo *flgE2* no fue capaz de sustituir la función del alelo *flgE*.

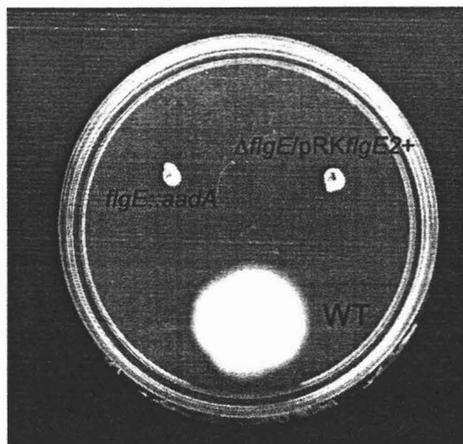


Figura 12. Ensayo de nado en caja de agar suave. WT, cepa silvestre; $\Delta flgE$ es la mutante en el gancho impedida para nadar; $\Delta flgE/pRKflgE2+$ es la mutante en *flgE* complementada con el plásmido pRK415 que expresa el gen *flgE2*. Dicho alelo no puede complementar la función del gen *flgE* y esto se ve reflejado en la imposibilidad de la bacteria para formar un halo de nado.

Como parte de los análisis *in silico*, se realizó una búsqueda mediante BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para localizar el similar más cercano de todas las copias flagelares duplicadas en *R. sphaeroides*. Sorprendentemente, todos los genes flagelares duplicados tienen como su similar más cercano con los genes flagelares de *Silicibacter pomeroyii* DSS-3 y *Silicibacter* sp. TM1040; ambas bacterias pertenecen al grupo de las α -proteobacterias.

Proteína	% identidad	% similitud	Organismo
FlgB2	46	64	<i>Silicibacter pomeroyii</i> DSS-3
FlgC2	65	80	<i>Silicibacter</i> sp. TM1040
FlgE2	50	68	<i>Silicibacter pomeroyii</i> DSS-3
FlgF2	56	78	<i>Silicibacter pomeroyii</i> DSS-3
FlgG2	74	86	<i>Silicibacter pomeroyii</i> DSS-3
FlgH2	64	78	<i>Silicibacter pomeroyii</i> DSS-3
FliA2	52	63	<i>Silicibacter pomeroyii</i> DSS-3
FliB2	41	52	<i>Silicibacter pomeroyii</i> DSS-3
FliA2	78	86	<i>Silicibacter pomeroyii</i> DSS-3
FliN2	65	83	<i>Silicibacter pomeroyii</i> DSS-3
FliP2	69	81	<i>Silicibacter pomeroyii</i> DSS-3
FliQ2	56	78	<i>Silicibacter</i> sp. TM1040
FliR2	51	67	<i>Silicibacter pomeroyii</i> DSS-3
FliE2	71	85	<i>Silicibacter pomeroyii</i> DSS-3
FliF2	53	65	<i>Silicibacter pomeroyii</i> DSS-3
FliI2	60	75	<i>Silicibacter</i> sp. TM1040
FliM2	38	50	<i>Silicibacter pomeroyii</i> DSS-3
FliC2	54	72	<i>Silicibacter</i> sp. TM1040
FlgK2	41	58	<i>Silicibacter pomeroyii</i> DSS-3
FlgJ2	48	63	<i>Silicibacter pomeroyii</i> DSS-3
FlgI2	75	84	<i>Silicibacter pomeroyii</i> DSS-3

Tabla 3. Refleja el porcentaje de identidad de aminoácidos entre las copias flagelares duplicadas y el homólogo más cercano de cada una usando BLASTP.

Para indagar en el arreglo genético de las copias flagelares duplicadas, se ordenaron los genes y se agruparon en clusters que podrían corresponder a los posibles operones, esto con base a la cercanía de los codones de inicio y término para cada uno de estos genes (ver figura 13).

Sorprendentemente, la organización genética de las segundas copias flagelares de *R. sphaeroides* se asemeja a las caracterizadas en *Caulobacter crescentus*, y a la organización de *Silicibacter pomeroyii*, ambas α -proteobacterias (Miur *et al*, 2001 y Mullin *et al*, 2001) y no a la organización descrita para las copias flagelares caracterizadas, la cual se asemeja a la de las enterobacterias (γ -proteobacteria).

Para hacer un análisis evolutivo de las copias duplicadas flagelares se realizaron dos inferencias filogenética a las proteínas FlhA2 y FlgE2 mediante el método del vecino más cercano (Neighbor-joining). Este método ha adquirido aceptación por su certeza y rapidez (Holder y Lewis, 2003). Los árboles filogenéticos obtenidos de este estudio se puede ver en las figuras 14 y 15.

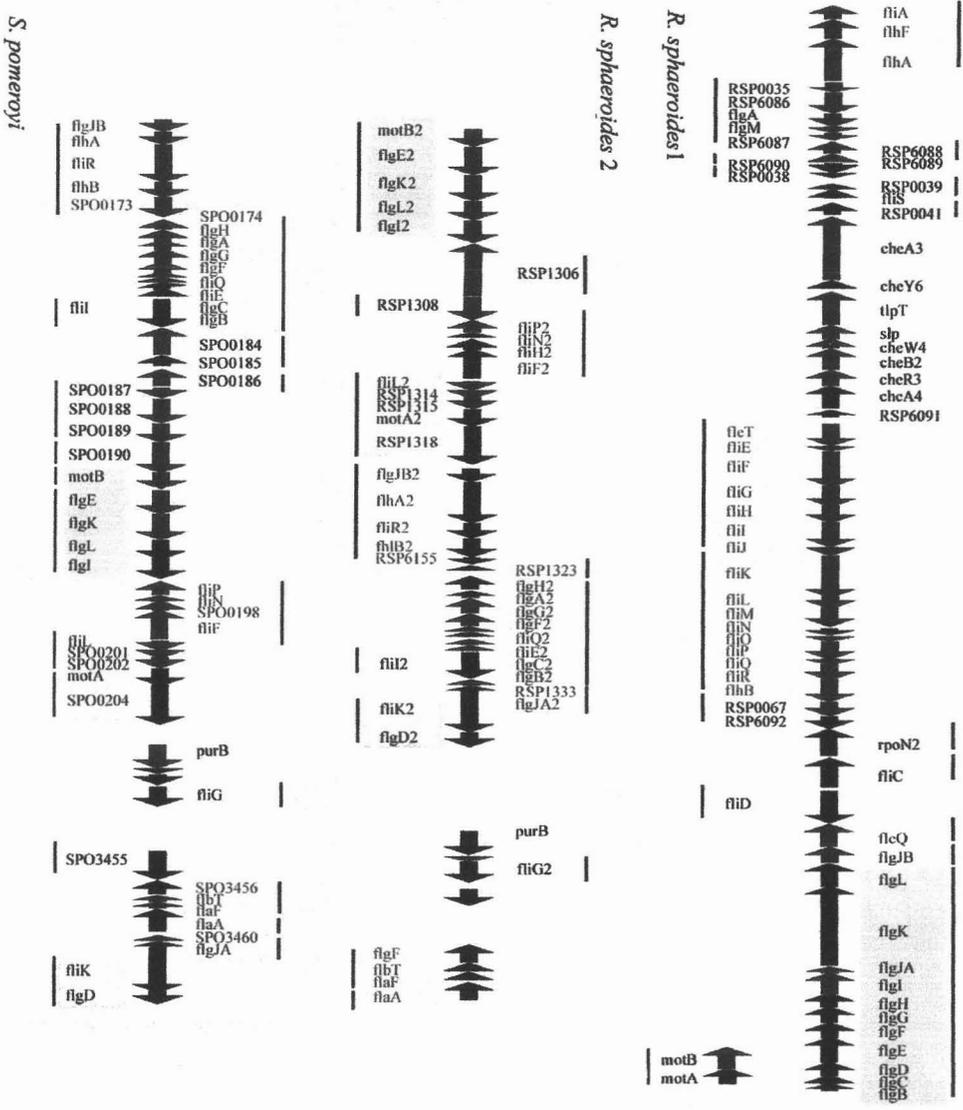


Figura 13. Se muestra la organización genética de ambos juegos de copias flagelares en *Rhodobacter sphaeroides* y *Silicibacter pomeroyi*. *R. sphaeroides 1* denota el arreglo de los genes flagelares previamente caracterizados, *R. sphaeroides 2* denota el arreglo de las copias duplicadas flagelares. Las líneas que se encuentran a un costado del nombre de los genes indica los posibles operones en *R. sphaeroides 1* basado en información experimental. En el caso de *R. sphaeroides 2* y *S. pomeroyi* se dibujó una línea en los conjuntos de genes que asemejan operones cuando había una distancia máxima de 50 pares de bases entre un codón de paro y la metionina de inicio del siguiente gen. El uso de colores representa posibles funciones homólogas en cada uno de los arreglos.

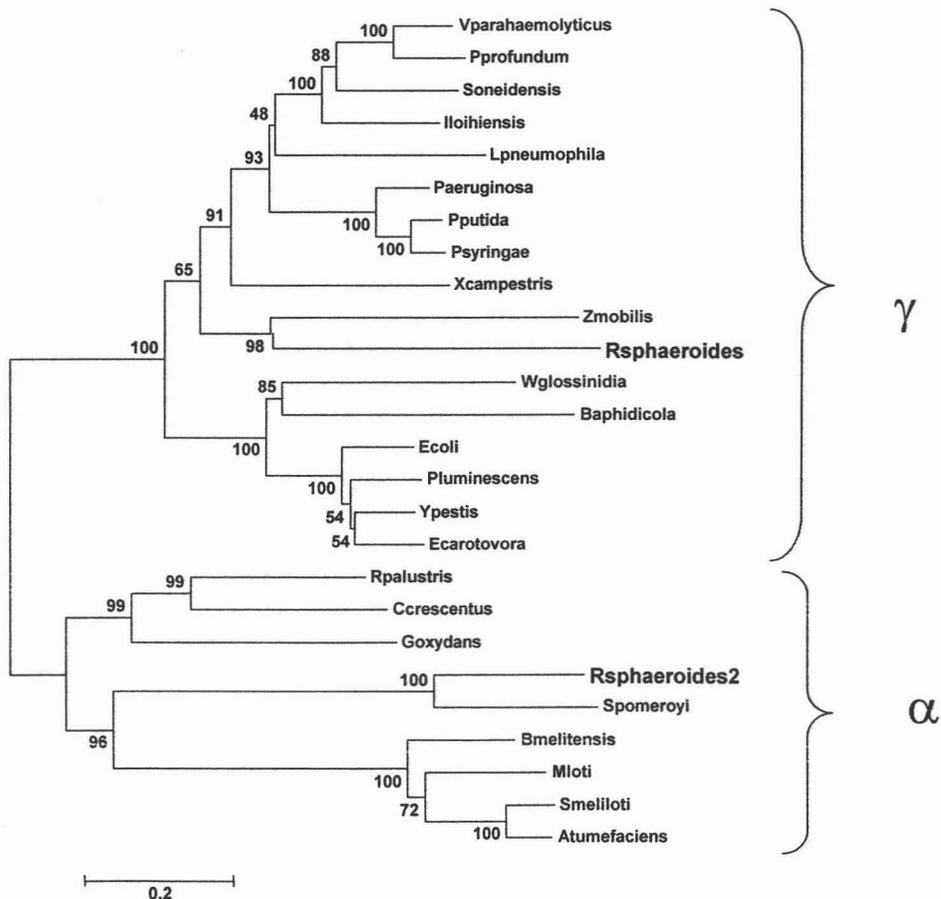


Figura 14. Árbol filogenético de la proteínas FlhA. En esta inferencia se incluyeron las proteínas homólogas a FlhA de los organismo descritos. R. sphaeroides se refiere a la copia flagelar caracterizada; R. sphaeroides2 se refiere a la copia flagelar duplicada. γ se refiere a los organismos γ -proteobacteria; α y β se refiere a los organismos α y β -proteobacteria. Nótese la clara agrupación de los organismos en su respectiva clasificación. Los valores numéricos en el inicio de las ramas corresponde al valor de bootstrap.

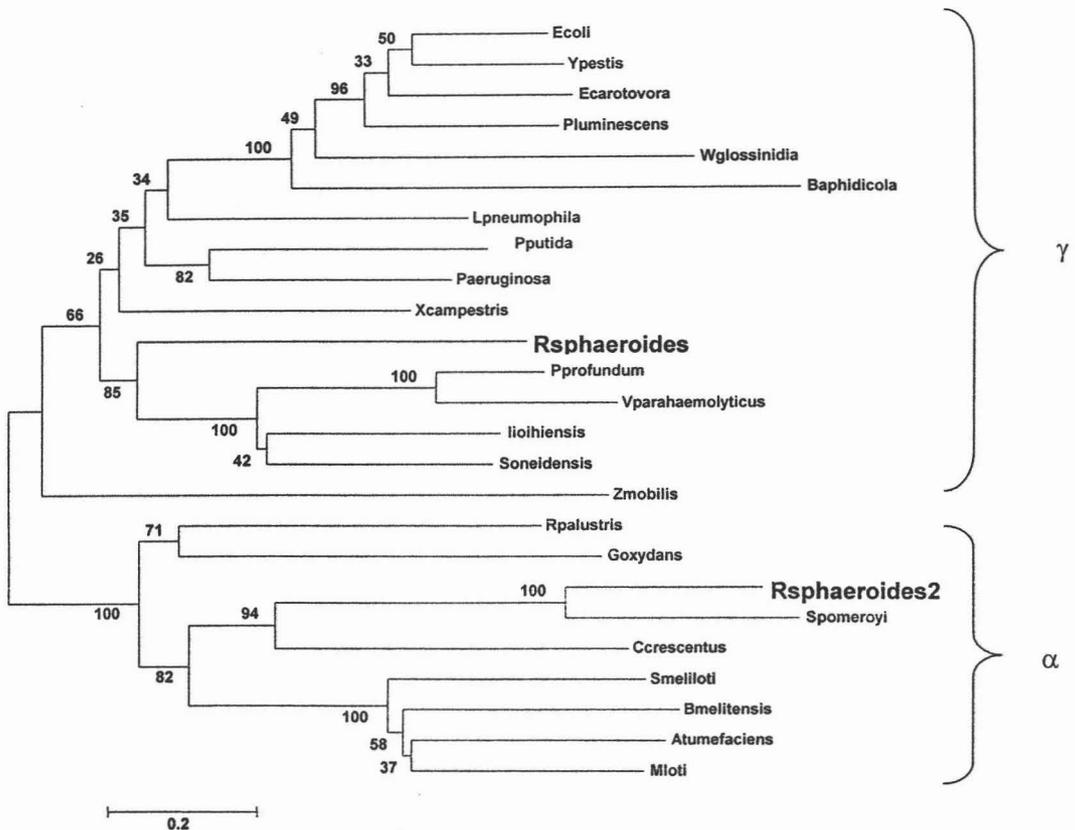


Figura 15. Árbol filogenético de las proteínas FigE. En esta inferencia se incluyó las proteínas homólogas a FigE de los organismos indicados. R. sphaeroides se refiere a la copia flagelar caracterizada; R. sphaeroides2 se refiere a la copia flagelar duplicada. γ se refiere a los organismos γ -proteobacteria; α se refiere a los organismos α -proteobacteria. Nótese la clara agrupación de los organismos en su respectiva clasificación. Los valores numéricos en el inicio de las ramas corresponde al valor de bootstrap.

Los estudios de uso preferencial de codones se utilizan como uno de los criterios para determinar si cierta región genómica fue adquirida mediante transferencia horizontal. Lo anterior se infiere si la región genómica de interés presenta un uso preferencial de codones diferente a la del uso generalizado por el resto del genoma (Ochman *et al*, 2000). Para determinar si las copias

duplicadas flagelares son el resultado de una transferencia horizontal se realizó un uso preferencial de codones para algunos de estos genes. Usando el programa Evolving Code <http://www.evolvingcode.net/codon/cai/cai.php#1> se sometieron a análisis las secuencias de los genes *flhA2* y *flgE2* contra el uso de codones del genoma completo y se compararon con sus contrapartes flagelares caracterizadas. Los resultados fueron prácticamente idénticos (Tabla 4).

Gen	Valor de CAI
<i>flgE</i>	0.719
<i>flgE2</i>	0.793
<i>flhA</i>	0.801
<i>flhA2</i>	0.584
<i>fliC</i>	0.813
<i>flaA</i>	0.862
<i>rplA</i>	0.802
<i>rplJ</i>	0.578
<i>rplB</i>	0.775

Tabla 4. Uso preferencial de codones (CAI) de los genes *flgE2*, *flhA2* y sus contrapartes caracterizadas. Para tener una referencia se incluyeron los genes *fliC* y *flaA* que son dos tipos de flagelinas. Estos genes presentan una altísima expresión debido a que son las subunidades que forman el filamento del flagelo. Los tres genes restantes son genes ribosomales cuya expresión también se sabe es alta.

Discusión

En este trabajo se probó la funcionalidad de las segundas copias de los genes flagelares de *R. sphaeroides* mediante dos mutantes aisladas que portan un gen reportero que interrumpe los genes duplicados *flgE2* y *flhA2*. Las mutantes portan el cassette de resistencia *uidA:aadA* que, mediante el gen de β -glucuronidasa, permite monitorear la actividad transcripcional de los genes en los cuales se inserta debido a que su expresión depende de promotores exógenos. La actividad de β -glucuronidasa observada para ambos genes en fase estacionaria y fase exponencial fue nula. Los valores que se aprecian en las tablas mostradas reflejan solo la expresión basal del gen reportero. Se ha observado que en genes flagelares que verdaderamente se expresan, estos valores superan 1'000,000 de actividad (Poggio *et al*, 2005), por lo que concluimos que en estas condiciones los genes no son expresados. *R. sphaeroides* vive en la parte superficial de los lagos, donde la luz solar incide con mayor fuerza y le provee la energía necesaria para realizar el proceso de fotosíntesis. Existen reportes de autores que la han aislado de suelos (Vázquez-Acevedo *et al*, 2002). Las condiciones de vida en el hábitat natural de la bacteria así como su ecología es un área poco explorada. Nada se sabe acerca de las interacciones que esta bacteria establece con el medio ambiente ni las implicaciones fisiológicas que éstas le acarrearán. *R. sphaeroides* pertenece al subgrupo α -3 de *Proteobacteria* dentro del clado *Roseobacter*. Dicha familia comprende en su mayoría bacterias marinas, las cuales son miembros importantes del picoplancton marino y se hallan generalmente con comunidades algales (Alavi *et al*, 2001) Dentro de su asociación a comunidades algales son responsables de degradar el compuesto organosulfúrico dimetilsulfoniopropionato

(DMSP), producido por dinoflagelados (Alavi *et al*, 2001). Sin embargo, *R. sphaeroides* solo se ha encontrado en aguas continentales y hasta ahora no existen reportes de su presencia en aguas salobres.

La falta de actividad de las segundas copias probadas significa que dicha carencia de expresión aplica solamente para las condiciones de laboratorio a las que fue sometida y de ninguna manera descarta la posibilidad de que éstas copias puedan ser expresadas en alguna otra condición no probada en este estudio o en vida libre. A pesar de que experimentalmente la única prueba a favor de la funcionalidad de las segundas copias flagelares es el ensayo de RT-PCR, donde se visualiza una banda que concuerda con el tamaño predicho para el gen *flgE2*, lo cual sugiere que este gen se está transcribiendo y por lo tanto, se está expresando. Sin embargo, dado que el producto no fue secuenciado, cabe la posibilidad de que este sea el producto de una amplificación inespecífica. La evidencia que apunta a la falta de expresión en las segundas copias flagelares bajo las condiciones probadas en *R. sphaeroides* es más fuerte y directa. Las condiciones de expresión de genes, por ejemplo, de virulencia en bacterias entéricas está muy bien caracterizada debido al nicho específico que ocupan. Lamentablemente resulta un galimatías tratar de inferir qué condiciones serían las apropiadas para una posible expresión de los genes flagelares duplicados en *R. sphaeroides* ya que, es un organismo de vida libre y hace falta información concerniente a su ecología. Sin embargo, no se desecha la posibilidad de que éstas copias no cumplan función alguna, aunque el uso preferencial de codones observado para las copias duplicadas no varíe respecto a la del resto del genoma. La duplicación genética seguida de la divergencia en la secuencia de DNA juega un papel fundamental en la evolución de los genomas (Lynch y Katju, 2004). Existe evidencia creciente de que la transferencia horizontal bacteriana ha jugado también un papel integral en la evolución de los genomas bacterianos y en la diversificación y especiación de las bacterias. La

importancia de la transferencia genética horizontal en la evolución bacteriana no fue reconocida sino hasta la década de 1950, cuando los patrones de resistencia a antibióticos emergió de manera global (Davies, 1996). Ahora se sabe que la adquisición de secuencias de organismos lejanamente emparentados deriva en una proporción significativa de diversidad genética para las bacterias (Ochman *et al*, 2000).

La manera más robusta para poder argumentar a favor de un evento de transferencia horizontal son los análisis de las secuencias de DNA o secuencia de aminoácidos. En este sentido la inferencia filogenética hecha en este trabajo demuestra claramente que las copias duplicadas flagelares de *R. sphaeroides* están mas cerca filogenéticamente de *Silicibacter pomeroyii* y de *Caulobacter crescentus* (α -proteobacterias) mientras que las copias flagelares funcionales se agrupan con las γ -proteobacterias (enterobacterias). Cabe señalar que los valores de bootstrap para cada rama son muy altos, todos son cercanos a 100. El valor de bootstrap es una prueba estadística que se usa para estimar el nivel de confianza en las hipótesis filogenéticas. El bootstrap pertenece a una clase de métodos llamados técnicas de remuestreo porque estima la distribución de la muestra remuestreando repetidamente los datos del set de datos originales. Se considera que existe una altísima confianza cuando los valores de bootstrap son cercanos o iguales a 100 (Graur y Li, 2000).

El resultado de los árboles filogenéticos concuerda perfectamente con el parecido de las copias flagelares duplicadas en los ensayos de BLASTP, en los cuales el similar más cercano predicho es el de un α -proteobacteria. *S. pomeroyii* DSS-3 es un organismo marino asociado a dinoflagelados y que se encuentra presente en las comunidades bacterianas asociados a *Pfiesteria*,

el dinoflagelado responsable de las mareas rojas (Alavi *et al*, 2001). El genoma completo de esta bacteria fue liberado en 2004, posee solo un flagelo polar y se ha observado que se puede posicionar en micronichos favorables en asociación con plankton. Sin embargo, no se detectaron marcos de lectura abiertos (ORFs) con fuerte homología hacia proteínas quimiotácticas conocidas (Moran *et al*, 2004). Pero por otro lado, la cepa *Silicibacter* sp. TM1040 (la cual también arrojó el mejor hit para algunos genes flagelares duplicados en *R. sphaeroides*) posee tres flagelos lofotricos (distribuidos alrededor de todo el cuerpo celular). Un estudio demostró que esta cepa posee una alta movilidad y que es atraída mayormente, mediante su sistema quimiotáctico, hacia productos de dinoflagelados. Cabe señalar que el estudio se llevó a cabo porque ésta cepa en particular había demostrado ser inusualmente móvil en cajas de agar suave y en medio líquido (Miller *et al*, 2004). Interesantemente, *Silicibacter* se ve involucrada en interacciones físicas (unida o embebida intracelularmente) o fisiológicas (producción de toxinas y mejoría en el crecimiento) con los dinoflagelados (Miller *et al*, 2004). Los mecanismos para estas interacciones pueden basarse en la movilidad bacteriana y el comportamiento quimiotáctico que le permite a estas bacterias censar y moverse hacia su huésped eucarionte, donde se localizan los nutrientes benéficos una vez que hay un contacto físico cercano con el dinoflagelado.

El parecido evidente que existe entre los genes flagelares de *S. pomeroyii* y los genes flagelares duplicados en *R. sphaeroides* ha sido un hallazgo inesperado. Resulta muy interesante que las copias flagelares caracterizadas sean homólogas a aquellas encontradas en las γ -proteobacterias (enterobacterias) y no con las contrapartes de los organismos que pertenecen a su misma familia (α -proteobacteria). Si lo anterior se analiza con más detenimiento, podría significar que el juego de genes flagelares que utiliza *R. sphaeroides* para nadar, provendría de una

transferencia horizontal donada por alguna γ -proteobacteria, que por alguna razón fueron integradas al genoma y utilizadas ya que, quizá, les confiere una ventaja selectiva. La propuesta toma más fuerza cuando se observa con detenimiento la organización genética de las copias flagelares duplicadas (sintenia). Éstas demuestran que su arreglo asemeja la organización genética de *C. crescentus* y *Silicibacter pomeroyii*, ambas α -proteobacterias. El alelo *flgE2* demostró ser lo suficientemente lejano como para no complementar la mutante en el gen *flgE* (gancho). Es decir, la copia duplicada del gen flagelar del gancho diverge lo suficiente como para no sustituir la función del gen caracterizado aún siendo homólogos y hallándose en el mismo genoma. Esto argumenta a favor de una lejanía filogenética considerable.

Sería precipitado asumir como cierta *de facto* la hipótesis de que los genes con los que nada *R. sphaeroides* provienen de una transferencia horizontal de alguna γ -proteobacteria y que la inclusión de estos en su genoma sustituyó a los genes flagelares nativos. Se tendría que demostrar en primer lugar, que los genes con los que nada *R. sphaeroides* son realmente xenólogos y se tendría que probar que las segundas copias flagelares son realmente nativas a *R. sphaeroides*. Lo anterior se podría lograr mediante análisis filogenéticos robustos como la máxima verosimilitud o la inferencia bayesiana y someter esos resultados a análisis de congruencia (ver Holder y Lewis, 2003). Un estudio reciente revela que los eventos de transferencia horizontal de genes flagelares no podría ser un evento tan raro (Ren *et al*, 2005). Este trabajo aporta los indicios de lo que podría ser el primer evento descrito de una transferencia horizontal de un donador lejano, que sustituye en función a los genes nativos que desempeñaban la función originalmente.

Conclusiones

- Los genes flagelares duplicados de *Rhodobacter sphaeroides* no se expresan en las condiciones de laboratorio que fueron probadas. No se descarta la posibilidad de que estos sean expresados bajo otras condiciones.
- Las copias duplicadas flagelares de *R. sphaeroides* divergen lo suficiente de sus contrapartes caracterizadas, para que las primeras no pueden sustituir alelos mutados de las segundas.
- Los genes flagelares duplicados de *R. sphaeroides* guardan una estrecha similitud con los marcos de lectura abiertos (ORFs) flagelares de *Silicibacter pomeroyi*.
- Filogenéticamente, los genes flagelares duplicados de *R. sphaeroides* están más cerca de las α -proteobacterias en contraposición con los genes flagelares caracterizados, los cuales se agrupan con las enterobacterias (γ -proteobacterias).
- Los genes flagelares caracterizados de *R. sphaeroides* podrían ser el resultado de una transferencia horizontal de una γ -proteobacteria, la cual sustituyó en función a los genes flagelares nativos que son lo que conocemos como los genes flagelares duplicados.

Perspectivas

- Analizar a fondo mediante estudios filogenéticos robustos el origen de las copias flagelares caracterizadas y el origen de las copias flagelares duplicadas.
- Indagar la ecología de *R. sphaeroides* en su nicho natural y tratar de discernir qué interacciones pudiera entablar con su medio ambiente y si dentro de estas existe la posibilidad de que las copias flagelares duplicadas de *R. sphaeroides* cumplan con una función específica y cuál es.
- Comprobar o descartar la posibilidad de que mediante un evento de transferencia horizontal se hayan adquirido los genes flagelares de *R. sphaeroides* y éstos hayan sustituido la función de las copias flagelares nativas en *R. sphaeroides*.

Bibliografía

- Aizawa, S. I. 1996. Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. Mol. Microbiol. 19. p. 1-5.
- Aizawa, S. I. 2001. Bacterial flagella and type III secretion systems. FEMS Microbiol. Letters. 202. p. 157-164.
- Alavi, M., Miller, T., Erlandson, K., Schneider, R. y R. Belas. 2001. Bacterial community associated with *Pfiesteria*-like dinoflagellate cultures. Environ. Microbiol. 3. p. 380-396.
- Armitage, J. P. y R. M. Macnab. 1987. Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bact. 169. p. 541-518.
- Armitage, J. P. y R. Schmitt. 1997. Bacterial chemotaxis: *Rhodobacter sphaeroides* and *Sinorhizobium meliloti*, variations on a theme? Microbiol. 121. p. 3671-3682.
- Baron, C., O'Callaghan, D., y E. Lanka. 2002. Bacterial secrets of secretion: Euroconference on the biology of type IV secretion processes. Mol. Microbiol. 43. p. 1359-4365.
- Bullock, W. O., Fernandez, J.M., y J.M. Short. 1987. XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with b-galactosidase selection. BioTechniques. 5. p. 376-379.

-Burns, D. L. 2003. Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 6. p. 29-34.

-Cascales, E y P. J. Christie. 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nature Reviews Microbiol.* 1. p. 137-149.

-Chakravorty, D., Rohde, M., Deiwick, J. y M. Hensel. 2005. Formation of a novel surface structure encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *EMBO J.* 24. p. 2043-2052.

-Chassy, B. M., Mercenier, A. y J. Flickinger. 1988. Transformation of bacteria by electroporation. *Trends Biotechnol.* 6. p. 303-309

-Christie, P. J. 2004. Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 1694. p. 219-234.

-Cohen, S. N., Chang, A.C., y L. Hsu. 1972. Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R factor. *PNAS USA.* 69. p. 2110-2114

-Daniell, S., Takahashi, N., Wilson, R., Friedberg, D., Rosenshine, I., Booy, F. P., Shaw, R., Knutton, S., Frankel, G. y S. I. Aizawa. 2001 The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* 3 p. 865-871.

-Davies, J. 1996. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia* 12 p. 9-16.

- Delepelaire, P. 2004. Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1694. p. 149-161.
- Ding, Z., Atmakuri, K. y P. Christie. 2003. The outs and ins of bacterial type IV secretion system. *TRENDS Microbiol.* 11. p. 527-533.
- Dryden, S. C. y S. Kaplan. 1990. Localization and structural analysis of the ribosomal RNA operons of *Rhodobacter sphaeroides*. *Nucleic Acids Res.* 24. p. 7267-7267.
- Eichler, J. y F. Duong. 2004. Break on through to the other side - the Sec translocon. *TRENDS Biochem. Scie.* 29. p. 221-223.
- Fath, M. y R. Kolter. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Reviews.* 57. p 995-1017.
- Filloux, A., Bally., Ball, G., Akrim, M., Tommassen, J. y A. Lazdunski. 1990. Protein secretion in gram-negative bacteria: transport across the outer membrane involves common mechanisms in different bacteria. *EMBO J.* 9. p. 4323-4329.
- Filloux, A. 2004. The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim. Biophys. Acta.* 1694. p. 163-179.

- Filloux, A., Michel, G. y M. Bally. 1998. GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Review. 22. p. 177-198.
- Finnie, C., Zorreguieta, A., Hartley, N. M. y J. A. Downie. 1998. Characterization of *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide glycanases that are secreted via a type I exporter and have a novel heptapeptide repeat motif. J. Bacteriol. 180. p. 1691-1699.
- Finlay, B. B. y S. Falkow .1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiol. Mol. Biol. Reviews. 61. p. 136-169.
- Ghosh, P. 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. Microbiol. Mol. Biol. Reviews. 68. p- 771-795.
- Gophna, U., Ron, E. Z. y D. Graur. 2003. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by múltiple horizontal-transfer events. Gene. 312. p. 151-163.
- Graur, D. y W. H. Li. 2000. Fundamentals of Molecular Evolution. 2nd Ed. Sinauer Associates Inc. Massachusetts, USA.
- Hales, L.M. y H.A. Schuman. 1999. *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amobae as well as for secretion of the Msp protease. Infect. Immun. 67. p. 3662-3666.

- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 4. p. 557-560.
- Hardie, K.R., Lory, S. y A. P. Pugsley. 1996. Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. EMBO. J. 15. pp. 978-988.
- He, S. Y., Nomura, K. y T. S. Whittam. 2004. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. Biochim. Biophys. Acta. 1694. p. 181-206.
- Henderson, I. R. y J.P. Nataro. 2001. Virulence functions of autotransporters proteins. Infect. Immun. 69. p. 1231-1243.
- Henderson, I. R., Navarro-García, F., Desveaux, M., Fernández, R. C. y A. Ala'Aldeen. 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. Microbiol. Mol. Biol. Reviews. 68. p. 692-744.
- Hoiczky, E. y G. Blobel. 2001. Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. PNAS USA. 98. p. 4669-4674.
- Holder, M y P. O. Lewis. 2003. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. Nature Rev. Genetics. 4. p. 275-284.
- Holmes, D. S. y M. Quingley. 1981. A rapid boiling method for preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114. p. 193-197.

-Hueck, C. J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews.* 62. p. 379-433.

-Iwobi, A., Heesemann, J., Garcia, E., Igwe, E., Noelting, A. y A. Rakin. 2003. Novel virulence-associated type II secretion system unique to high-pathogenicity *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 71. p. 1872-1879.

-Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R. y L. Coutte. 2004. Protein secretion through autotransporters and two partner pathways. *Biochim. Biophys. Acta.* 1694. p. 235-257.

-Jefferson, R., Burgess, S. M. y D. Hirsh. 1986. β -Glucuronidase form *Escherichia coli* as a fusion marker. *PNAS, USA.* 83. pp. 8447-8451

-Kawagishi, I., Homma, H., Williams, A. W. y R. M. Macnab. 1996. Characterization of the flagellar hook length control protein FliK of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178. p. 2954-2959.

-Keen, N. T., Tamaki, S., Kobayashi, D. Y D. Trollinger. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene.* 70. p. 191-197.

-Kimbrough, T. G. y S. I. Miller. 2000. Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *PNAS USA.* 97 p. 11008-11013.

-Kimbrough, T. G. y S. I. Miller. 2002. Assembly of the type III secretion needle complex of *Salmonella typhimurium*. *Microbes and Infection.* 4. p. 75-82.

-Koronakis, V., Koronakis, E. y C. Hughes. 1989. Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of *Escherichia coli* hemolysin protein across both bacterial membranes. EMBO J. 8. p. 595-605.

-Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. y C. Hughes. 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multifrug efflux and protein export. Nature. 405. p. 914-919.

-Kostakioti, M., Newman, C. L., Thanassi, D. G. y C. Stathopoulos. 2005 Mechanisms of protein transport across the bacterial outer membrane. J. Bacteriol. 187. p. 4306-4314.

-Kubori, T., Matsushima, Y., Nakaura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J. E. y S. I. Aizawa. 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. Science. 280. p. 602-605.

-Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S. I. Y J. E. Galan. 2000. Molecular characterization and assembly of the needle complex of *Salmonella typhimurium* type III secretion system. PNAS USA. 97. 10225-102230.

-Kumar, S. Tamura, T. y M. Nei 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics 5:150-163.

- Lawley, T. D., Klimke, W. A., Gubbins, M. J. y L. S. Frost. 2003. F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol. Letters*. 224. p. 1-15.
- Lee, H.M., Wang, K. C., Liu, Yew, Y. L., Chen, L. Y y W. M. Leu. 2000. Association of the cytoplasmic membrane protein XpsN with the outer membrane protein XpsD in the type II protein secretion apparatus of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Bacteriol.* 182. p. 1549-1557.
- Linderoth, N. A., Simon, M. N. y M. Russel. 1997. The filamentous phage pIV multimer visualized by scanning transmission electron microscopy. *Science*. 278. p. 1635-1638.
- Lynch, M y V. Katju. 2004. The altered evolutionary trajectories of gene duplicates. *TRENDS. Genet.* 20. p. 544-549.
- Mackenzie, C., Choudhary, M., Larimer, F. W., Predki, P. F., Stilwagen, S., Armitage, J. P., Barber, R. D., Donohue, T. J., Hosler, J. P., Newman, J. E., Shapleigh, J. P., Sockett, E., Zeilstra-Ryalls, J. y S. Kaplan. 2001. The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Photosynth. Research*. 70. p. 19-41.
- Macnab, R. M. 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* 57. p. 77-100.
- Macnab, R. M. 2004. Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim. Biophys. Acta*. 1694. 207-217.
- McCarter, L. L. 2001. Polar flagellar motility of the Vibrionaceae. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65. p. 445-462.

- McCarter, L. L. 2004. Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7. p. 18-29.
- Messing, J., Crea, R. y P. H. Seeburg. 1981. A system for shotgun DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 9. p. 309-321.
- Miller, T. R., Hnilicka, K., Dziedzic, A., Desplats, P. y R. Belas. 2004. Chemotaxis of *Silicibacter* sp. Strain TM1040 toward dinoflagellate products. *Appl. Environ. Microbiol.* 70. p. 4692-4701.
- Minamino, T., González-Pedrajo, B., Yamaguchi, K., Aizawa, S. I. Y R. M. Macnab. 1999. FliK, the protein responsible for flagellar hook length control of *Salmonella* is exported during hook assembly. *Mol Microbiol.* 34. p. 295-304.
- Minamino, T., y R. M. Macnab. 1999. Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J. Bacteriol.* 181. p. 1388-1394.
- Miur, R.E. y J. W. Gober. 2001. Regulation of late flagellar gene transcription and cell division by flagellum assembly in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol.* 41. p. 117-130.
- Moran, M. A., Buchan, A., Gonzalez, J. M., Heidelberg, J. F., Whitman, W. B., Klene, R. P., Henriken, J. R., King, G. M. *et al.* 2004. Genome sequence of *Silicibacter pomeroyii* reveals adaptations to the marine environment. *Nature.* 432. p. 910-913.
- Mori, H. y K. Ito. 2001. The Sec protein-translocation pathway. *TRENDS Microbiol.* 9. 494-500.

- Mullin, D. A., Ohta, N., Mullin A. H. y A. Newton. 2001. Organization, expression, and function of *Caulobacter crescentus* genes needed for assembly and function of the flagellar hook. *Mol. Genet. Genomics*. 265. p. 445-454.
- Neidle, E. L. y S. Kaplan. 1992. *Rhodobacter sphaeroides* rdxA, a homolog of *Rhizobium meliloti* fixG, encodes a membrane protein which may bind cytoplasmic [4Fe-4S] clusters. *J. Bacteriol.* 174. p. 6444-64454
- Neidle, E. L. y S. Kaplan. 1993. Expression of the *Rhodobacter sphaeroides* hemA and hemT genes, encoding two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes. *J. Bacteriol.* 175. p. 2292-2303
- Newman, L. C. y C. Stathopoulos. 2004. Autotransporter and two pathway secretion: delivery of large-size virulence factors by gram-negative bacterial pathogens. *Crit. Rev. Microbiol.* 30. p. 275-286.
- Nguyen, L., Paulsen, I., Tschieu, J., Hueck, C. J. Y M. H. Saier. 2000. Phylogenetic analyses of the constituents of type III protein secretion systems. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2. p. 125-144.
- Ochman, H., Lawrence, J y E. Groisman. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial evolution. *Nature*. 405 p. 299-304.
- Poggio, S., Aguilar, C., Osorio, A., González-Pedrajo, B., Dreyfus, G. y L. Camarena. 2000. σ -54 promoters control expression of genes encoding the hook and basal body complex in *Rhodobacter sphaeroides*.

- Pugsley, A. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Reviews* 57. p 50-108.
- Ren, C. P., Beatson, S. A., Parkhill, J. y M. J. Allen. 2005. The flag-2 locus, an ancestral gene cluster is potentially associated with a novel flagellar system from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187. p. 1430-1440.
- Saitou, N. y M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol. Evol.* 4. pp. 706-425.
- Sandkvist, M. 2001. Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol.* 40. 271-283.
- Sauvonnnet, N., Vignon, G., Pugsley, A. P. y P. Gounon. 2000. Pilus formation and protein secretion by the same machinery in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 19. p. 2221-2228.
- Shea, J., Hensel, M., Gleeson, C. y D. Holden. 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *PNAS USA.* 93. p. 2593-2597.
- Simon, R., U. Priefer, y A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology.* 1. p. 37-45.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol Biol.* 98. p. 503-517.

-Sukhan , A., Kubori, T., Wilson, J. y J. E. Galan. 2001. Genetic analysis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type III secretion-associated needle complex. J. Bacteriol. 183. p. 1159-1167.

-Tamano, K., Aizawa, S. I., Katayama, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwase, A., Nagai, S. y C. Sasakawa. 2000 Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. EMBO J. 19. p. 3876-3887.

-Thanassi, D.G. y S.J. Hultgren. 2000. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. Curr. Opin. Cell. Biol. 12. p. 420-430.

-Van den Berg, B. *et al.* 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. Nature. 427. p. 36-44.

-Van Gijsegem, F., Genin, S. y C. Boucher. 1993. Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. TRENDS. Microbiol. 1. p. 175-180.

-Vazquez-Acevedo, R y C. Rios-Velazquez. 2002. Isolation and Characterization of Specific Bacteriophages for the Photosynthetic Bacteria *Rhodobacter sphaeroides* From Samples of Soil and Water of the Southwest Area of Puerto Rico. Memorias del Congreso "The Puerto Rico Louis Stokes Alliance for Minority Participation".

-Wandersman, C. 1996. Secretion across the bacterial outer membrane. in: F.C. Neidhart (Ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and molecular biology. ASM Press. Washington DC. p. 955-967.

-Wieslander, L. 1979. A simple method for recover intact high molecular weight RNA and DNA after electrophoretic separation in low gelling temperature agarose gels. *Anal. Biochem.* 98. p. 305-309.

-West, M. A. y G. Dreyfus. 1997. Isolation and ultrastructural study of the flagellar basal body complex from *Rhodobacter sphaeroides* WS8 (Wild type) and a polihook mutant (PG). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238. p. 733-737.

-Young, J y B. Holland. 1999. ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochim. Biophys. Acta.* 1461. p. 177-200.

-Young, G. M., Schmiel, D. H. y V. Miller. 1999 A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein secretion system. *PNAS USA.* 96. p. 6456-6461.