

UCH-FC
Biotecnología
B887
C.2

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



**“AISLAMIENTO, SECUENCIACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS
GENES *flgE* y *flgJ* DE PROTEÍNAS FLAGELARES DE
PISCIRICKTTSIA SALMONIS”**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Rodrigo Esteban Brücher Urcelay

Dr. Pablo Valenzuela Valdés
Tutor Memoria de Título

Dra. Vivian Wilhelm Bavestrello
Co-Tutora

Dr. Mario Rosembaltt Silber
Prof. Patrocinante

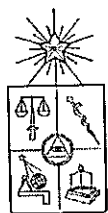
Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Herman Silva Ascencio
Presidente Comisión

Dr. Aldo Gaggero Brillouet
Corrector

Santiago de Chile, 10 DICIEMBRE 2004





FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



AISLAMIENTO, SECUENCIACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS GENES *flgE* Y *flgJ* DE
PROTEÍNAS FLAGELARES DE *PISCIRICKETTSIA SALMONIS*.

Memoria de Título en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en
Biotecnología Molecular

Por

Rodrigo Esteban Brücher Urcelay

Tutor de Tesis: Pablo D. T. Valenzuela Valdés

Cotutor de Tesis: Vivian Wilhelm Bavestrello

Profesor Patrocinante: Mario Roseblatt Silber

FUNDACIÓN CIENCIAS PARA LA VIDA, MIFAB

Diciembre, 2004

Santiago – Chile

AGRADECIMIENTOS

En principio me gustaría agradecer al Doctor Pablo Valenzuela y al Doctor Mario Roseblatt por recibirme y permitir la realización de esta Tesis en la Fundación.

A la Doctora Vivian Wilhelm, por ser mucho más que "La Jefa", siendo una excelente persona, comprensiva y en el fondo una amiga más, en verdad gracias.

A toda la gente del laboratorio, sin excepción, que de alguna u otra manera ayudaron a que la realización de esta tesis fuera en sumo agradable y en un excelente ambiente, aquí quiero agradecer especialmente a Fernando Ugarte y Esteban Engel que formaron parte del estudio del flagelo. No quiero dejar pasar aquí a Sebastián Valenzuela por ser un gran tipo y un gran amigo.

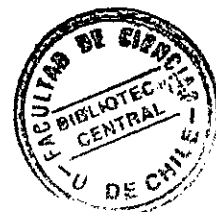
A todos los que trabajan en Bios-Chile y la Fundación, los de lavado, inmunología, etc, que permitieron en parte el desarrollo de esta Tesis. En particular a Adolfo Jamett por colaborar en la producción de anticuerpos, a la Tati por todo, a Rodrigo Martínez por las secuencias y aguantar las presiones, a Álvaro Míquel por colaborar en los estudios de microscopía y a la Mónica por anotarme para el almuerzo las millones de veces que se me olvidó.

Tampoco quiero dejar afuera a gente que no tuvo directa relación con el desarrollo de esta tesis, pero claramente influenciaron mi paso por la universidad que finalmente termino con este escrito. Por eso gracias a todos los de Biotech por compartir horas de estudio, haciendo informes y trabajos varios y por supuesto disfrutando algunos momentos de esparcimiento.

Mención a parte necesitan mis amigos del colegio, con los que tengo una relación fenomenal y mas de una vez tuvieron que escuchar mis comentarios de la carrera y de esta tesis que por momentos fue muy estresante y parecía ser interminable.

Finalmente quiero agradecer a mi familia por el apoyo y creer siempre en mi, por que mal que mal sin ellos yo no estaría escribiendo estas líneas.

Bueno finalmente gracias a todos por aguantarme mientras llegaba este momento.



DEDICATORIA



Bueno quiero dedicar esta Tesis en especial a mis padres, por que ellos son la raíz principal de todo lo que he realizado hasta el momento....

También quiero dedicar esta culminación de mis estudios universitarios a todos los que han estado ahí cuando lo he necesitado.

ÍNDICE



AGRADECIMIENTOS	II
DEDICATORIA	III
ÍNDICE	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Salmonicultura en Chile	1
2. Acerca del SRS	2
3. <i>Piscirickettsia salmonis</i>	3
4. El flagelo	5
5. Hipótesis	7
6. Objetivos	7
II. MATERIALES Y MÉTODOS	8
1. Animales	8
2. Células	8
3. Reactivos	8
4. Oligonucleótidos	9
4.1. FlgE	9
4.2. FlgJ	10
4.3. pET32a	10
5. Vectores	11
5.1. pGEM-T	11
5.2. pET-32a	11
5.3. pET-21a	12



6. Cultivo de Células CHSE-214	13
7. Cultivo de <i>P. salmonis</i>	13
8. Preparación de ADN genómico de <i>P. salmonis</i>	13
9. Amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	14
10. Purificación de productos de PCR	15
11. Clonamiento de fragmentos de ADN en vectores pGEM-T, pET-32a y pET-21a	15
11.1. Digestión de los plásmidos pET-32a y pET-21a	15
11.2. Ligación de fragmentos de ADN a plásmidos	16
12. Preparación de células de <i>E. coli</i> competentes	16
13. Transformación y selección de colonias	17
14. Purificación de ADN plasmidial	18
15. Análisis de ADN por electroforesis en geles de agarosa	18
16. Digestión con endonucleasas de restricción	19
17. Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa	19
18. Secuenciación del ADN	20
19. Producción de proteínas recombinantes en bacterias	20
20. Preparación de extractos proteicos de bacterias	21
21. Determinación de la concentración de las proteínas	21
22. Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones denaturantes (SDS-PAGE)	22
23. Purificación de las proteínas recombinantes.....	23
23.1. Trx-FlgJ	23
23.2. Trx-FlgE	23
24. Inmunización de ratones con las proteínas recombinantes	24
25. ELISA	24
26. <i>Western Blot</i>	25
27. Incubación de <i>P. salmonis</i> en diferentes soluciones salinas	27
28. Microscopía	27



28.1. Fluorescencia por <i>NanoOrange</i>	27
28.2. Inmunofluorescencia directa de <i>P. salmonis</i>	28
28.3. Electrónica	28
29. Preparación de ARN total de <i>P. salmonis</i>	29
30. Purificación de ARN total con LiCl y DNAsa	30
31. Transcripción Reversa-PCR	30
32. Inmunoprecipitación	31
III. RESULTADOS	32
1. Análisis del genoma de <i>P. salmonis</i> e identificación.....	32
de genes flagelares y de sistema de secreción tipo III.	
2. Estudios de microscopía de fluorescencia y electrónica	35
2.1. Microscopía de fluorescencia: Tinción con <i>NanoOrange</i> ...	35
e inmunofluorescencia indirecta.	
2.2. Microscopía electrónica con tinción negativa	37
2.3. Microscopía electrónica de transmisión	38
3. Aislamiento de los genes <i>flgE</i> y <i>flgJ</i> de <i>P. salmonis</i>	39
3.1. Clonamiento <i>flgE</i>	40
3.2. Clonamiento <i>flgJ</i>	44
4. Inducción y expresión de las proteínas FlgJ y FlgE en <i>E. coli</i>	46
4.1. FlgJ	46
4.2. FlgE	48
5. Obtención de anticuerpos monoclonales contra las proteínas	50
recombinantes FlgE y FlgJ.	
6. Estudio de la transcripción y traducción de <i>flgE</i> y <i>flgJ</i>	53
en <i>P. salmonis</i> .	
6.1. Estudio de la expresión de <i>flgE</i> y <i>flgJ</i> de <i>P. salmonis</i>	53
mediante RT-PCR	
6.2. Análisis de FlgE y FlgJ en extractos proteicos de	56
<i>P. salmonis</i> mediante <i>Western blot</i>	

6.3. Análisis de FlgE y FlgJ en extractos de <i>P. salmonis</i> mediante inmunoprecipitación.	57
IV. DISCUSIÓN	59
V. CONCLUSIONES	65
VI. BIBLIOGRAFÍA	66
VII. ANEXO 1	71



ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1:</u>	Esquema del aparato flagelar.....	6
<u>Figura 2:</u>	Esquema del vector pGEM-T	11
<u>Figura 3:</u>	Esquema del vector pET-32a.	12
<u>Figura 4:</u>	Esquema del vector pET-21a.	12
<u>Figura 5:</u>	Esquema de la organización de algunos de los genes flagelares en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	33
<u>Tabla 1:</u>	Lista de los genes relacionados con el aparato flagelar..... encontrados luego de la secuenciación del genoma de <i>P. salmonis</i> .	34
<u>Figura 6:</u>	Análisis de <i>P. salmonis</i> , mediante tinción por <i>NanoOrange</i>	36
<u>Figura 7:</u>	Análisis de <i>P. salmonis</i> , mediante inmunofluorescencia directa.	36
<u>Figura 8:</u>	Análisis de <i>P. salmonis</i> mediante microscopía electrónica con tinción negativa.	37
<u>Figura 9:</u>	Análisis <i>P. salmonis</i> mediante microscopía electrónica de transmisión.	39
<u>Figura 10:</u>	Análisis de <i>flgE</i> amplificado por PCR desde ADN genómico .. de <i>P. salmonis</i> mediante electroforesis en agarosa al 1%.	40
<u>Figura 11:</u>	Esquema del gen estructural <i>flgE</i> de <i>P. salmonis</i>	41
<u>Figura 12:</u>	Esquema del fragmento de 3.161pb amplificado por PCR, y su homología estructural con <i>flgE</i> de <i>P. aeruginosa</i> .	42
<u>Figura 13:</u>	Análisis del clonamiento de <i>flgE</i> en pGEM-T mediante electroforesis en agarosa al 1%.	43
<u>Figura 14:</u>	Análisis del clonamiento de <i>flgE</i> en pET-32a mediante electroforesis en agarosa al 1%.	43
<u>Figura 15:</u>	Análisis de <i>flgJ</i> amplificado por PCR y clonado en pGEM-T . mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.	45
<u>Figura 16:</u>	Análisis de <i>flgJ</i> subclonado en pET-32a y pET-21a mediante . electroforesis en geles de agarosa al 1%.	45

<u>Figura 17:</u>	Análisis de la producción de Trx-FlgJ en <i>E. coli</i> mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12,5%.	46
<u>Figura 18:</u>	Análisis de la purificación de Trx-FlgJ por columna Ni-agarosa mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12,5%.	47
<u>Figura 19:</u>	Análisis de la inducción de FlgJ clonado en el vector pET-21a mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12,5%.	48
<u>Figura 20:</u>	Análisis de la inducción de Trx-FlgE mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12,5%.	48
<u>Figura 21:</u>	Análisis de la purificación de Trx-FlgE por columna Ni-agarosa mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5%.	49
<u>Figura 22:</u>	Análisis por <i>Western blot</i> de la inmunoreactividad de los anticuerpos monoclonales anti-FlgE contra Trx-FlgE.	50
<u>Figura 23:</u>	Análisis de la digestión de Trx-FlgJ con trombina y enteroquinasa, y análisis por <i>Western blot</i> de la inmunoreactividad del anticuerpo monoclonal anti-FlgJ 9A2 contra Trx-FlgJ.	52
<u>Figura 24:</u>	Análisis por <i>Western blot</i> de la inmunoreactividad de los anticuerpos monoclonales anti-FlgJ 9A2 y 8G8 contra FlgJ de pET-21a.	52
<u>Figura 25:</u>	Análisis de la integridad de ARN de <i>P. salmonis</i> mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.	54
<u>Figura 26:</u>	Análisis de fragmentos de ADN obtenidos por RT-PCR para FlgJ, mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.	55
<u>Figura 27:</u>	Análisis de fragmentos de ADN obtenidos por RT-PCR para FlgE, mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.	56
<u>Figura 28:</u>	Análisis por <i>Western blot</i> de la presencia de FlgE y FlgJ en extractos totales de <i>P. salmonis</i> .	57

ABREVIATURAS

% p/v	Porcentaje peso volumen
aa	Aminoácidos
ADN	Ácido deoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BCIP	5-bromo-4-cloro-3'-indolifosfato-p-toluidina
BSA	Albúmina de suero de bovino
col.	Colaboradores
D.O.	Densidad óptica
DNAsa I	Deoxirribonucleasa I
dNTP	deoxi-Nucleotido trifosfato
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético
FAL	Fosfatasa alcalina
Fit C	Isotiocianato de fluoresceína
hr	Horas
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactósido
kDa	kilodalton
LB	Medio Luria Bertani
M	Molar
MEM	Medio mínimo esencial
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
NBT	Cloruro de nitroazul de tetrazolio
ng	Nanogramos
nm	Nanometros
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida

pb	Pares de bases
PBS	Tampón salino de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PSA	Persulfato de amonio
RPM	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción reversa-PCR
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	Segundos
SRS	Septicemia rickettsial salmonidea
TBS	Tampón a base de Tris, ácido bórico y cloruro de sodio
TE	Tampón Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-etileno -diamina
Trx	Tioredoxina A
TTSS	Sistema de secreción tipo III
U	Unidades
xg	Veces la fuerza de gravedad
μl	microlitros
μm	Micrometro

RESUMEN

Este trabajo se refiere al aislamiento y expresión de genes flagelares de *Piscirickettsia salmonis*, bacteria responsable de la septicemia rickettsial salmonídea, enfermedad que afecta gravemente la industria de la salmonicultura.

El análisis bioinformático de la secuencia del genoma de esta bacteria indicó la presencia de al menos 36 genes involucrados en la formación de flagelos. Este antecedente llevo a plantear la posibilidad de que *P. salmonis* forme un flagelo en alguna etapa de su ciclo de vida. Un estudio de *P. salmonis* realizado mediante microscopía de fluorescencia y electrónica, bajo varias condiciones de cultivo, no dio indicios de la presencia de este organelo. Con el objetivo de verificar la presencia, integridad y el grado de expresión de algunos de los genes identificados, se aislaron, secuenciaron, clonaron y expresaron los genes *flgE* y *flgJ*, que codifican la proteína estructural del codo del filamento flagelar (FlgE) y una peptidoglican hidrolasa (FlgJ). Los anticuerpos monoclonales desarrollados contra las dos proteínas recombinantes no detectaron la presencia de las proteínas FlgE y FlgJ en extractos de *P. salmonis* con ninguno de los métodos empleados. Sin embargo estudios realizados por RT-PCR revelaron que *flgJ* es transcrito, aunque su nivel de transcripción es bajo, mientras que para *flgE* no se detectaron transcritos. Dado estos resultados se sugiere que *P. salmonis* pudiera utilizar todos o algunos de los 36 genes para otros propósitos distintos a la formación de un flagelo, ya sea como un sistema de secreción tipo III, sistemas de adhesión, o alguna otra función similar.

ABSTRACT

This work describes the isolation and expression of flagellar genes in *Piscirickettsia salmonis*; which is the etiological agent of the salmonid rickettsial septicemia, one of the most important diseases in the Chilean salmonid industry, due to the serious economic losses produced.

Bioinformatic analysis of the bacterial genome shows the presence of at least 36 genes involved in the synthesis of flagella. This information led us to consider the possibility that *P. salmonis* expresses a flagellum at some stage of its life cycle. Fluorescence and electron microscopy studies did not reveal the presence of flagella in bacteria, even though it was subjected to several culture conditions. In an attempt to verify the presence, integrity and expression levels of some of the genes found, *flgJ* and *flgE* genes were isolated, sequenced and cloned. *flgJ* encodes a peptidoglycan hydrolase and *flgE* encodes the flagellar hook protein. Monoclonal antibodies against the two recombinant proteins did not detect the presence of either FlgJ or FlgE in *P. salmonis* extracts with the methods used. Nevertheless, RT-PCR studies indicated the transcription of *flgJ* in small levels, whereas for *flgE* no transcripts could be found. Therefore, the results suggests that *P. salmonis* could use some of the 36 genes for different purposes, such as type III secretions system, adhesion, or other similar functions, rather than flagellum synthesis.

I. INTRODUCCIÓN

1. SALMONICULTURA EN CHILE

La industria de la salmonicultura ha tenido un rápido crecimiento en Chile en los últimos 20 años, transformando al país en el primer productor y exportador de truchas a nivel mundial, y el segundo de salmónes después de Noruega (Fundación Terram, Agosto 2002).

Durante el año 2003, la exportación de truchas y salmónes superó las 280 mil toneladas netas, lo cual se traduce en un retorno superior a los 1.100 millones de dólares anuales, que constituye el 5,6% de las exportaciones totales de Chile para el año 2003 (Asociación de la Industria del Salmón de Chile A.G. www.salmonchile.cl, Mayo 2004).

Sin embargo, la salmonicultura no está exenta de problemas, siendo el de las enfermedades causadas por agentes infecciosos uno de gran importancia. El esfuerzo por controlarlas requiere de gastos considerables; tan solo en el año 2001 se importaron más de 600 toneladas de antibióticos para tratamiento de enfermedades asociadas a esta industria (Fundación Terram, Agosto 2002).

Dentro de las enfermedades que atacan salmónidos, se encuentran agentes virales como ISAV (Anemia Infecciosa del Salmón) e IPN (Necrosis Pancreática Infecciosa); bacterianos, como el BKD (Bacterial Kidney Disease) causada por *Renibacterium salmoninarum*, furunculosis causada por *Aeromonas salmonicida*, SRS (Septicemia Rickettsial Salmonidea) producida por *Piscirickettsia salmonis*; además de otras producidas por hongos.

En este ámbito, el SRS es sin duda la enfermedad que más pérdidas causa a la salmonicultura nacional y si bien esta enfermedad no se presenta todos los años en igual magnitud, se registran años en que las pérdidas han alcanzado los 100 millones de dólares en conceptos de tratamiento y disminución de los ingresos por la cantidad de peces muertos o que no pueden ser comercializados.

2. ACERCA DEL SRS

El SRS fue descrito por primera vez en Chile en el año 1989, como una enfermedad específica de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), por lo que fue llamada síndrome del salmón coho (Bravo y Campos, 1989a), pero posteriormente se encontró en otras especies de salmónidos como la trucha arcoíris (*O. mykiss*), el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y salmón chinook (*O. tshawytscha*). En el año 1990 se describe por primera vez el agente etiológico de la enfermedad, como una bacteria de tipo rickettsial, gracias a los estudios bioquímicos y de microscopía realizados por Fryer (Fryer y col., 1990). En el año 1992, gracias a la secuenciación del ADN ribosomal 16S y estudios filogenéticos, se determinó que la bacteria no pertenecía a la familia de las rickettsias, y se clasificó como una especie nueva dentro de un género nuevo y fue denominada *Piscirickettsia salmonis* (Fryer y col., 1992), siendo ubicada taxonómicamente en el grupo de las gamaproteobacterias y no alphaproteobacterias, como ocurre con el resto de las rickettsias. Agentes similares a *P. salmonis* se encontraron en salmónidos de Canadá (Brocklebank y col., 1992; Kent, 1992), Noruega (Olsen y col., 1993) e Irlanda (Rodger y Drinan, 1993), sin embargo las mortalidades en estos lugares nunca han alcanzado las observadas en Chile.

La enfermedad se manifiesta por lo general entre la sexta a decimosegunda semana posterior a la transferencia de los salmones al agua salada, (Alvarado y col., 1990) en primavera o otoño, cuando la temperatura del agua oscila entre los 9 y 16°C (Lannan y Fryer, 1994). Existen reportes de que en contadas ocasiones la enfermedad también se presentaría en agua dulce (Bravo, 1994).

La forma de contagio puede ocurrir tanto en forma vertical, por presencia de la bacteria en ovas y espermios o en los fluidos de los mismos (Larenas y col., 2003), así como de manera horizontal, ya que se ha visto que *P. salmonis* es capaz de penetrar por heridas e incluso por la piel y branquias intactas de los salmónidos (Smith y col., 1998). Esto toma importancia con el hecho de que *P. salmonis* puede ser secretado por las heces, orina y bilis de peces infectados (Salinas y col., 1997). De todas maneras no se descarta la posibilidad de que existan vectores marinos que porten la enfermedad.

Los signos clínicos de la enfermedad corresponden a nado lento y errático, anorexia, oscurecimiento de la piel, descamación, palidez branquial, ulceraciones en la piel y hemorragias. Internamente se pueden observar nodulaciones amarillentas y hemorragias, siendo los órganos mas afectados el riñón, hígado, bazo e intestino (Cubillos y col., 1990; Larenas y col., 1995).

3. *PISCIRICKETTSIA SALMONIS*

P. salmonis fue descrita como una bacteria Gram negativa, no mótil, intracelular obligada, no encapsulada, pleomórfica, habitualmente cocoide, con un tamaño aproximado de 0,5 a 1,5µm, además presenta una membrana externa ondulada (Fryer y

col., 1990). La bacteria se multiplica por división binaria dentro de vacuolas y crece en diferentes líneas celulares de salmónidos como CHSE-214 (Chinook Salmon Embryo Cells), CSE-119 (Coho salmon embryo) o CHH-1 (Chum Heart) (Fryer y col., 1990). Su multiplicación intracelular obligada ha dificultado el estudio de *P. salmonis*, puesto que no es posible crecerla libre de un cultivo celular. Sin embargo se ha descrito que la bacteria es capaz de sobrevivir en agua salada y medio de cultivo MEM por un par de semanas, mientras que en agua dulce muere casi inmediatamente (Lannan y Fryer, 1994). Esta dificultad de cultivo se pone en evidencia con el hecho que recién en 1996 fue posible obtener anticuerpos anti-*P. salmonis*, que no reaccionen con CHSE-214 (Kuzyk y col., 1996).

En un afán por conocer y estudiar la biología molecular de esta bacteria, los distintos factores de virulencia que esta pudiese tener, así como otros factores importantes en la interacción patógeno-huésped que permitan desarrollar métodos de protección contra el SRS, se realizó la secuenciación del genoma de *P. salmonis* en la Fundación Ciencias para la Vida. A través de este estudio se logró identificar alrededor de 1.500 genes homólogos a otros descritos previamente en las bases de datos, y entre ellos se encontraron varios genes que corresponden a ortólogos de genes flagelares en especies como *Vibrio* o *Pseudomonas*. Esta información resultó muy sorprendente debido a que esta bacteria había sido descrita como no mótil y por lo tanto se llegó a considerar la posibilidad de que este patógeno tuviese un flagelo en alguna etapa de su ciclo de vida, lo que podría explicar de alguna manera la transmisión horizontal de la enfermedad.

4. EL FLAGELO

El flagelo corresponde a un organelo bacteriano de gran importancia para la supervivencia de diversas especies bacterianas, debido a que es el principal involucrado en la motilidad de las bacterias, y también se sabe que juega un rol crítico en la infectividad de bacterias patogénicas como *Vibrio anguillarum* (Ormonde y col., 2000) e incluso que puede participar en la adherencia de bacterias a sus huéspedes. Este organelo está formado por tres estructuras principales, el motor, el cuerpo basal y el filamento flagelar. El motor, se encuentra alojado en la membrana citoplasmática y es el involucrado en proporcionar la energía y dirección del movimiento al flagelo, mediante un gradiente de protones (Manson y col., 1977). El cuerpo basal, se encuentra ubicado desde la membrana citoplasmática hasta la membrana externa, atravesando el peptidoglicán y el espacio periplásmico. El filamento se encuentra ubicado en el exterior de la bacteria y funciona como una suerte de hélice que impulsa a la bacteria. Este está constituido por un gancho y el filamento flagelar.

El cuerpo basal funciona también como un sistema de secreción denominado de tipo III para los mismos componentes que van formando el cuerpo basal, el gancho y el filamento flagelar (Minamino y Macnab, 1999; Hirano y col., 2003), e incluso para diversos factores de virulencia como se ha descrito en *Yersinia* (Young y col., 1999).

Esta gran estructura requiere para su correcto funcionamiento alrededor de 40 a 45 tipos de proteínas diferentes. Algunas de ellas son requeridas en cientos o miles de monómeros por flagelo, como FlgE o FliC, que son las proteínas estructurales del filamento flagelar, mientras que otras son requeridas tan sólo en 6 monómeros por flagelo, como FlgC o FlgF de *E. coli* (Macnab, 2003). Este fenómeno requiere una gran

coordinación y regulación para su correcta producción, secreción y ensamblaje. Las proteínas que se estudian en esta tesis corresponden a FlgE y FlgJ. FlgE es la proteína estructural del codo en el filamento flagelar, por lo que se encuentra expuesta al exterior de la bacteria y es exclusiva para la formación de esta estructura. Por su parte, FlgJ corresponde a una peptidoglicán hidrolasa que se encuentra en el espacio periplásmico y posee un rol importante en el ensamblaje del bastón presente en el cuerpo basal (Macnab, 2003). Por lo tanto esta proteína está involucrada tanto en la formación de un flagelo funcional, como en el sistema de secreción flagelar, el cual no requiere de la formación del filamento para funcionar. Cabe mencionar que anexo a este trabajo se estudiaron otros genes flagelares presentes en *P. salmonis*, debido a que de esta forma se puede tener un panorama mas extenso de la organización y funcionalidad de estos genes flagelares en *P. salmonis* (Ugarte, 2004).

La presencia de un flagelo en algún momento del ciclo de vida de *P. salmonis* sería un hallazgo importante, puesto que entregaría una nueva perspectiva sobre la manera en que esta bacteria infecta salmónidos y permitiría comprender mejor su ciclo de vida, cómo sobrevive en el océano y en general conocer mejor la biología de *P. salmonis*.

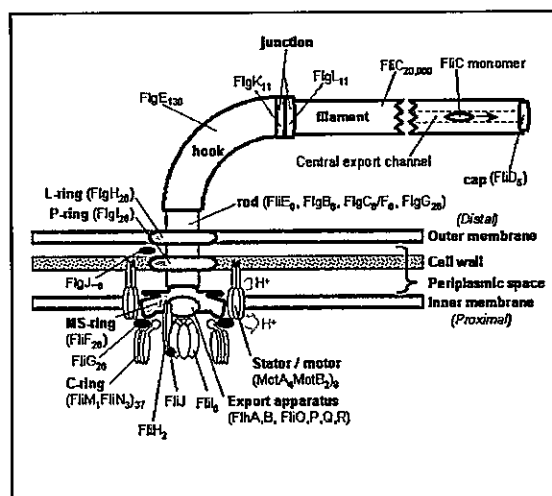


Figura 1: Esquema del aparato flagelar. Se aprecia el nombre de algunos genes estructurales junto con la cantidad de monómeros utilizados por cada flagelo funcional. En rojo se ven los genes estudiados en esta tesis.

HIPÓTESIS

Los genes flagelares de *P. salmonis* deberían expresarse a nivel transcripcional y de proteína en algún momento del ciclo de vida de la bacteria.

OBJETIVOS

GENERALES

- Analizar la estructura genómica y organización de los genes *flgE* y *flgJ* de *P. salmonis* y determinar si existe expresión *in vivo* de estos genes flagelares en *P. salmonis* bajo condiciones específicas de cultivo.

ESPECÍFICOS

- Estudiar la secuencia codificante de los genes *flgE* y *flgJ* y su organización dentro del genoma de *P. salmonis*.
- Clonar los genes *flgE* y *flgJ* en vectores de expresión y obtener las respectivas proteínas recombinantes.
- Obtener anticuerpos policlonales y monoclonales para las proteínas FlgE y FlgJ.
- Investigar la expresión de los ARN mensajeros para FlgE y FlgJ de *P. salmonis* mantenido en diferentes condiciones de cultivo.
- Investigar la expresión *in vivo* de las proteínas FlgE y FlgJ de *P. salmonis* mantenido en diferentes condiciones de cultivo.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Los ratones Balb/c utilizados para las inmunizaciones se obtuvieron del vivero de BiosChile I.G.S.A.

2. CÉLULAS

Células CHSE-214 (línea celular embrionaria de salmón chinook *Oncorhynchus tshawytscha*, ATCC CRL 1681) se obtuvieron de la colección de Bios-Chile I.G.S.A. La bacteria *Piscirickettsia salmonis* corresponde a la cepa ATCC VR 1361. Células competentes Nova Blue y BL21 (DE3) se adquirieron de la empresa Novagen.

3. REACTIVOS

Las sales, ácidos, bases y solventes utilizados de grado analítico o de grado para biología molecular, se obtuvieron en Merck y Sigma. Las enzimas de restricción, Taq DNA polimerasa, T4 DNA ligasa, fosfatasa alcalina de ternero, X-GAL, IPTG, DNA ladder, ADN ϕ x (HaeIII), λ (HindIII), dATP, dGTP, dCTP, dTTP se obtuvieron de GibcoBRL. Los sistemas de purificación de productos de PCR y los de purificación de ADN plasmidial se obtuvieron de Qiagen Inc. El sistema de purificación de ADN desde geles de agarosa es de ConcertTM. La glucosa, azul de bromo fenol, bromuro de etidio y fenol se adquirieron de Sigma. Triptona, extracto de levadura y agar se adquirieron en Difco Laboratories. La agarosa utilizada para geles de uso diario fue de GibcoBRL, y de FMC

BioProducts para la purificación de ADN desde geles. El kit para cuantificación de proteínas utilizado fue el Micro BCA™ Protein Assay Reaction Kit de Pierce. Los estándares de proteínas preteñidas se adquirieron en Invitrogen.

4. OLIGONUCLEOTIDOS

Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR se diseñaron a partir de las secuencias obtenidas del genoma de *P. salmonis* y se adquirieron en Invitrogen.

A continuación se presenta la secuencia de los partidores utilizados en esta tesis, donde las F representan los partidores directos o sentido y las R los reversos o antisentido.

4.1. FlgE

FlgD F1: 5' CGACGCAGCTTAAGCATCAA 3'

FlgE F2: 5' ATTGACAGCGTGATTTTAGGC 3'

FlgE F3: 5' TGAGTGATGATGGTGCGCTAA 3'

FlgF R1: 5' CTGCTTAGCACCACCTCATTG 3'

FlgE R2: 5' TGCTAGACTGGCCATTACTG 3'

FlgE R3: 5' ACCATCCGAAACCAAGACAAT 3'

FlgE R4: 5' CATCTTCATGGATTATTAACCG 3'

FlgE Fr: 5' ACAGATATCAGGGGCATTATGTCATTTAACA 3'
EcoRV

FlgE Rr: 5' CAGGGATCCATCTTAAGTATAATAATTAACGAATATT 3'
BamHI

4.2. FlgJ

FlgI F1: 5' TCAGCGCATTGACGTGACG 3'

FlgJ F2: 5' CGGCGGTCACACATGGTAAT 3'

FlgK R1: 5' AAGTAAATCATTTCGGTATTGCC 3'

FlgJ R2: 5' GACGCGTATAGCCTGGTGT 3'

FlgJ R3: 5' CAACGATGGCATGGCTTAATA 3'

FlgJ Fr: 5' CAGGGATCCATGGATGCGATTCCCTACACAG 3'
BamHI

FlgJ Rr: 5' ACTGAATTCCCCACCTGTATCGACATCATA 3'
EcoRI

4.3. pET32a

pET32a fw: 5' GAAAGAAACCGCTGCTGCTA 3'

pET32a rv: 5' GCTAGTTATTGCTCAGCGGT 3'

5. VECTORES

5.1. pGEM-T

Vector de clonamiento, diseñado para ligar productos de PCR debido a las timidinas no apareadas presentes en ambos extremos del sitio de clonación. Posee un gen de resistencia a ampicilina, y una región codificante para la betagalactosidasa, necesaria para la selección de colonias recombinantes (Figura 2).

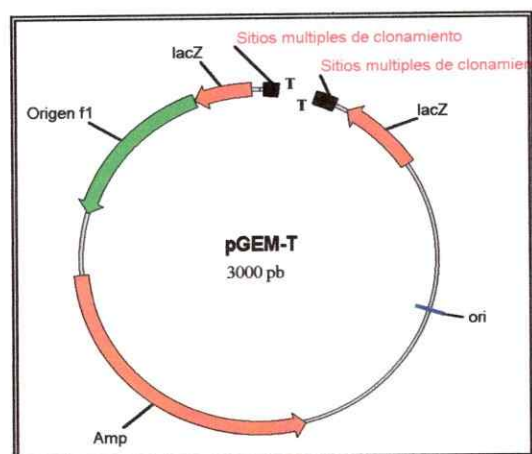


Figura 2: Esquema del vector pGEM-T.

Amp: Gen de resistencia a ampicilina; Origen f1: Origen de replicación del fago f1; lacZ: Región codificante para la β -galactosidasa; T: Timidinas no apareadas en los extremos 3' de cada hebra, para la inserción de los amplificadores de PCR.

5.2. pET-32a

Vector de expresión procarionte, posee un gen de resistencia a ampicilina, y río abajo del promotor T7 lac, posee la región codificante de la tioredoxina A (Trx) de *E. coli* junto a un dominio de polihistidinas, lo cual es expresado como proteína de fusión al producto de clonamiento (Figura 3).

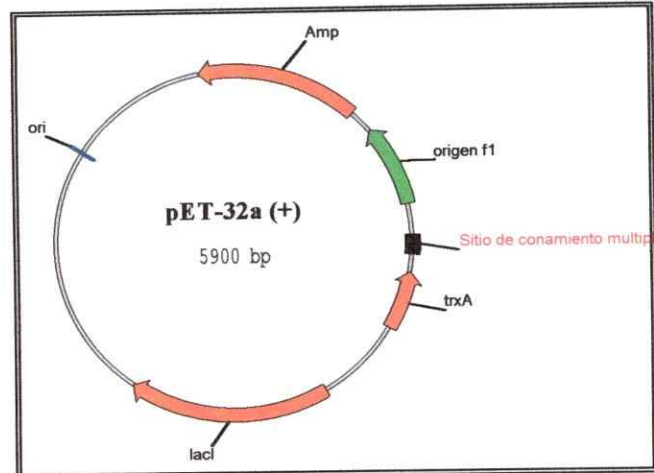


Figura 3: Esquema del Vector pET-32a.

Ori: Origen de replicación bacteriano pBR 322; Amp: Gen de resistencia a ampicilina; Origen f1: Origen de replicación del fago f1; trxA: Gen de Tioredoxina A de *E. coli*, posee un dominio con polihistidinas; lacI: Represor del operón lac.

5.3. pET-21a

Vector de expresión procarionte, carece de la región codificante de Trx que presenta el pET-32a. Se usó para expresar la proteína sin la fusión a Trx. Posee además un gen de resistencia a ampicilina y un dominio de proteína T7 de 11 codones, que se fusiona a la proteína a clonar (Figura 4).

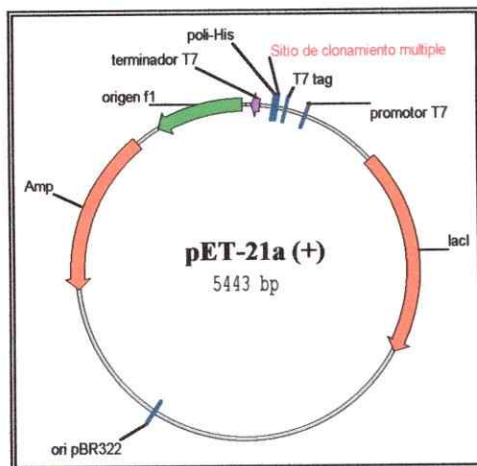


Figura 4: Esquema del Vector pET-21a.

Ori pBR322: Origen de replicación bacteriano pBR 322; Amp: Gen de resistencia a ampicilina; Origen f1: Origen de replicación del fago f1; lacI: Represor del operón lac; T7 tag: Dominio de proteína del fago T7 (11 codones)

6. CULTIVO DE CÉLULAS CHSE-214

Los inóculos de células CHSE-214, mantenidos en nitrógeno líquido se descongelaron y cultivaron en frascos T175 en medio MEM a 16°C durante 7 días o hasta que las células llegaran a confluencia.

7. CULTIVO DE *P. SALMONIS*

Se usaron inóculos de *P. salmonis* con un título de al menos 1×10^8 bacterias/ml para infectar cada uno de los frascos T175 con células CHSE-214. Al día siguiente, se retiró el medio y se agregaron 50 ml de medio MEM completo fresco. El cultivo se dejó a 16°C durante 10 a 14 días, observando periódicamente al microscopio de contraste de fases, el grado de lisis de las células CHSE-214 provocada por el desarrollo de la infección. Cuando el efecto citopático fue cercano al 100% el cultivo de *P. salmonis* se consideró listo para su cosecha o para su propagación. Las bacterias se cosecharon golpeando el frasco en repetidas ocasiones para despegar las células y el lisado se centrifugó a 200 xg. El sobrenadante corresponde a la fracción semipurificada de *P. salmonis*.

8. PREPARACIÓN DE ADN GENÓMICO DE *P. SALMONIS*

Se usó un procedimiento basado en el protocolo de Binder (1995). La fracción purificada de *P. salmonis* se lavó con tampón PBS y se le agregaron 20 µl de una solución de 10 mg/ml de DNAsa I y se incubó a 37°C por 30 min. Luego de la centrifugación para eliminar el sobrenadante, la pella se resuspendió en 500 µl de PBS y

100 µl de EDTA 0,1M para detener la actividad de la DNAsa I. Se agitó suavemente por inversión, se volvió a centrifugar y la pella exenta de DNAsa I se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis (sacarosa 0,75 M, NaCl 400 mM, EDTA 20 mM, Tris-HCl 50 mM, SDS 0,2%, 1 mg de proteinasa K, pH 9) Se agitó suavemente por inversión y se incubó a 58°C durante 60 min con agitación suave. Una vez terminada la incubación con la proteasa la solución se extrajo con un volumen de fenol saturado en Tris-HCl pH 8 y luego se extrajo 2 veces con una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. Posteriormente el ADN se precipitó con 0,4 volúmenes de acetato de amonio 5 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C durante 30 min.

9. AMPLIFICACIÓN DE ADN POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción de PCR se realizó con partidores diseñados basándose en las secuencias contiguas obtenidas en la secuenciación de *P. salmonis*, utilizando ADN genómico de *P. salmonis* como templado. En tubos Eppendorf autoclavados de 600 µl, se agregaron 5 µl de tampón PCR 10X sin Mg; 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 4 µl de mezcla de dNTP 2,5 mM; 2,5 µl de cada uno de los oligonucleótidos con concentración 10 µM; 50-200 ng de ADN templado; 0,5 µl de Taq ADN polimerasa 5 U/µl y se completó a un volumen final de 50 µl con agua miliQ estéril. La reacción de PCR se lleva a cabo en un termociclador (modelo PTC-200 MJ Research) con el siguiente programa: una etapa inicial de 5 min de denaturación a 95°C, 30 ciclos compuestos por 1 min de denaturación a 95°C, 1 min de apareamiento a 55-58°C (según T_m de los óligos) y de 1 a 3 min a 72°C de extensión,

tiempo que varía según el tamaño del fragmento que se quiera amplificar (1 min por cada 1 kb). Finalmente se realiza una etapa de elongación durante 10 min a 72°C.

10. PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

La purificación de los productos de PCR se realizó mediante el kit Qiaquick para purificación de productos de PCR (Qiagen) utilizando la columna de purificación de acuerdo al protocolo suministrado por el fabricante. Los productos se eluyeron con 50 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8,5 tibio.

11. CLONAMIENTO DE FRAGMENTOS DE ADN EN LOS VECTORES pGEM-T, pET-32a y pET-21a

11.1 Digestión de los plásmidos pET-32a y pET-21a

Aproximadamente 2 µg de cada uno de los vectores se linearizaron con 10 unidades de EcoRI en 50µl de tampón de reacción correspondiente, durante 90 min a 37°C. Luego se agregó 1 µl de BamHI (10 U/µl) y se siguió incubando por 90 min adicionales a 37°C. La mezcla se incubó posteriormente con fosfatasa alcalina para remover los fosfatos 5' y prevenir la religación del plásmido. Para esto, a los 50 µl de la mezcla anterior se agregó, 10 µl de tampón 10x (0.5 M Tris-HCl pH 8.5, 1 mM EDTA, pH 8.5), 40 µl de agua miliQ y 1 µl de fosfatasa alcalina, y se incubó a 37°C durante 1 hora. Posteriormente se detuvo la reacción con EDTA 10 mM, incubando a 80°C por 10 min. El plasmidio linearizado se purificó de la mezcla de reacción usando el kit Qiaquick

(Qiagen), y se realizó una extracción con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en una razón 25:24:1 y luego con 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico en razón 24:1 para eliminar el fenol remanente. El ADN se precipitó agregando 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,0 y 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C . Se cuantificó y estimó la integridad del plásmido mediante un gel de agarosa al 1%.

11.2. Ligación de fragmentos de ADN a plásmidos

Los fragmentos de ADN obtenidos ya sea por amplificación por PCR o por digestión con enzimas de restricción, se ligaron a los distintos vectores de clonamiento u expresión manteniendo una relación molar vector:inserto de 1:10. La reacción se llevó a cabo en 10 μl por 16 hr a 14°C con 1 μl de Ligasa T4 GIBCO (1 U/ μl) y 2 μl de tampón T4 ligasa 5X (GIBCO). El producto de ligación se usó para transformar células *E. coli* Novablue competentes.

12. PREPARACIÓN DE CÉLULAS DE *E. COLI* COMPETENTES

Células de *E. coli* Novablue y BL21(DE3) fueron cultivadas en el medio Luria-Bertani (LB) (10 mg/ml de triptona, 5 mg/ml de extracto de levadura y 10 mg/ml de NaCl). Inicialmente se preparó un inóculo de 5 ml de células en medio LB el cual se incubó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se agregó este inóculo a 500 ml de medio LB y se incubó por 2 horas aproximadamente hasta alcanzar una densidad óptica a 650 nm de 0,6 a 0,8. El cultivo se centrifugó a 3.500 xg durante 10 min a 4°C y las células

sedimentadas se resuspendieron en 250 ml de NaCl 10 mM frío y esterilizado por filtración. Se volvió a centrifugar y las células se resuspendieron en 250 ml de CaCl₂ 75 mM frío y esterilizado por filtración. Luego de incubar durante 30 min en hielo se volvió a centrifugar y las células se resuspendieron en 15 ml de CaCl₂ 75 mM frío y en hielo. Para aumentar la eficiencia de transformación las células se dejaron 3 horas en hielo con CaCl₂ 75 mM y 14% de glicerol estéril. Para guardar las células, se congelaron primero en etanol con hielo seco y luego se almacenaron a -80°C (BioFreezer Forma Scientific) hasta su uso. Todo el proceso de preparación se realizó en una campana de flujo laminar para asegurar y mantener la esterilidad del proceso.

13. TRANSFORMACIÓN Y SELECCIÓN DE COLONIAS

A un tubo Eppendorf esterilizado de 1,5 ml se agregan 100 µl de células competentes y 10 µl del producto de ligación (o 10 ng del ADN plasmidial circular purificado). La mezcla se incubó durante 30 min en hielo, luego se sometió a un shock térmico a 42°C durante 1 min, seguido de 3 min en hielo. Se agregaron 800 µL de medio SOC (Extracto de levadura 0,5%, Triptona 2,0%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 20 mM, glucosa 20 mM) estéril y se incubó con agitación durante 1 hr a 37°C.

El cultivo se centrifugó a 5.700 xg para concentrar y la pella se resuspendió en 200 µl del mismo cultivo. Con esta suspensión se sembraron placas de LB-Agar A100 (agar al 2 % en medio LB y ampicilina 100 µg/ml) las cuales se incubaron a 37°C durante la noche. Al día siguiente se seleccionaron colonias de cada placa, se picaron y se dejaron

creciendo en 5 ml de medio LB con ampicilina 100 µg/ml durante la noche con agitación a 37°C.

La selección de colonias recombinantes se realizó por α-complementación en las transformaciones con pGEM-T. Para esto se agregó a la placa 20 µl de X-Gal (50 ng/ml) y 100 µl de IPTG (100 mM), procediéndose a seleccionar las colonias blancas.

14. PURIFICACIÓN DE ADN PLASMIDIAL

El ADN plasmidial de cultivos de clones bacterianos iniciados a partir de las colonias seleccionadas, fue purificado mediante el kit Qiaprep (Qiagen). El protocolo utilizado es el suministrado por el fabricante y se basa en el método de Sambrook y col. (1989). El ADN plasmidial purificado se eluyó en 50 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8,5.

15. ANÁLISIS DE ADN POR ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

El análisis de fragmentos de ADN provenientes de amplificación por PCR, digestiones con enzimas de restricción, derivados de purificaciones de ADN plasmidial, preparaciones de ADN genómico, preparaciones de plásmidos linearizados, fue realizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE (Tris acetato 40 mM, EDTA 2 mM), con bromuro de etidio [0,3 µg/ml]. Las muestras fueron preparadas con 1/10 de volumen de tampón de carga 10X (azul de bromofenol 0,25% y glicerol 50%). Como estándar de tamaño se utiliza una mezcla de ADN de fago λ digerido con HindIII, más ADN de fago ΦX174 digerido con HaeIII 0,2µg/µl (HindIII-λ/HaeIII-ΦX174). Esta mezcla de ADN digerido entrega un patrón de bandas desde 23 kb hasta

100 pb. Las bandas de ADN en el gel son visualizadas bajo luz ultravioleta y fotografiadas con una cámara digital.

16. DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Con el objeto de comprobar que un fragmento de ADN de interés se haya insertado en el plasmidio o también para clonar los insertos de un vector a otro, se realizaron cortes con endonucleasas de restricción. Para comprobar las ligaciones de insertos de ADN amplificados por PCR en pGEM-T, las enzimas utilizadas fueron NotI y NcoI. Las enzimas EcoRI, EcoRV y BamHI se usaron para comprobar inserción de los genes amplificados con partidores que contienen los sitios correspondientes en pGEM-T, pET-32a y pET-21a. La reacción se realizó en 10 μ l que contienen 250 ng de ADN, 1 μ l del tampón 10x adecuado para la enzima de restricción y 1U de enzima/ μ g de ADN. Se incubó a 37°C por una hora. Las digestiones preparativas se hicieron con aproximadamente 5 μ g de ADN en 100 μ l totales, con 10 μ l de tampón correspondiente y 20U de cada una de las enzimas. La mezcla se incubó a 37 °C durante 3 horas.

17. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DESDE GELES DE AGAROSA

Para la recuperación de ADN desde geles, se utilizó la agarosa Seakem GTG, BioWhittaker Molecular Applications; que tiene un mayor grado de pureza que la usada habitualmente. El ADN de interés presente en el gel se purificó mediante el Kit ConcertTM Rapid Gel Extraction System, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego de la purificación, el ADN se eluye en 50 μ l de tampón Tris-HCl 10 mM pH 8,5.

18. SECUENCIACIÓN DE ADN

Las muestras de ADN purificadas se secuenciaron utilizando el kit comercial Bigdye 2.0, de Perkin Elmer y un secuenciador automático ABI Prism 310 Genetic Analyzer, de Applied Biosystems Inc. Para esto se utilizaron partidores específicos para el fragmento a secuenciar, o para las secuencias que flanquean el inserto en cada vector. En el caso de pGEM-T se utilizan los partidores M13 y para pET-32a se utilizan los partidores PETFw y PETRv diseñados en el laboratorio.

19. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN BACTERIAS

La expresión de las proteínas de fusión FlgE y FlgJ se realizó en células *E. coli* BL21(DE3) previamente transformadas con los vectores recombinantes pET32a-*flgJ*, pET21a-*flgJ* o pET32a-*flgE*. Estas células tienen integrado en su genoma el gen de T7 ARN polimerasa, el que se expresa cuando las células son inducidas con IPTG, y la T7 ARN polimerasa producida, induce la expresión de los genes regulados por el promotor de T7 en pET-32a y pET-21a. Para inducir la expresión de las proteínas, se inoculó 50 ml de medio LB-A100 (ampicilina 100 µg/ml) con 1,5 ml de cultivo fresco del clon BL21(DE3) recombinante de interés, crecido durante la noche y se incubó a 37°C con agitación hasta que alcanzó una densidad óptica (D.O.) a 600nm de 0,5 a 0,7.

Cuando el cultivo alcanza la D.O. esperada se toma una alícuota de 1 ml correspondiente al tiempo 0 y al resto del cultivo se le agrega IPTG a una concentración final de 1mM. Hecho esto se toma una alícuota cada hora hasta cumplir 3 horas de inducción.

De cada alícuota se preparan extractos de proteínas totales que se separan en fracciones soluble e insoluble como se describe a continuación. La inducción de la proteína recombinante en las distintas fracciones se analizó en geles de poliacrilamida-SDS al 12,5%.

20. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DE BACTERIAS

Los extractos de proteínas de *E. coli* BL21(DE3) recombinantes o bien de *P. salmonis* se obtienen centrifugando las bacterias correspondientes a 5.700 xg por 10 min a 4°C, resuspendiéndolas luego en PBS 1x, en presencia del inhibidor de proteasas PMSF a una concentración final de 1mM. Las bacterias se lisan mediante sonicación, tres veces por 20 seg cada una, manteniendo los tubos siempre en hielo. La suspensión sonicada se centrifuga a 9.300 xg durante 5 a 10 min a 4°C para separar la fracción proteica soluble de las proteínas insolubles y restos celulares.

21. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Para determinar la concentración de proteínas presentes en los extractos se utilizó el kit Micro BCA™ Protein Assay Reaction Kit de Pierce, según las instrucciones del fabricante. Para la curva de calibración se usó seroalbumina de bovino (BSA) en concentraciones de 0,05 a 0,8 mg/ml.

22. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA BAJO CONDICIONES DENATURANTES (SDS-PAGE)

Los extractos de proteína son analizados en geles de poliacrilamida-SDS de acuerdo a Laemmli y col. (1970). Los extractos solubles y proteínas puras son previamente cuantificadas y se preparan con un volumen de tampón de corrida (Tris-HCl pH 6,8 62,5mM; glicerol 10%; SDS 3%; azul de bromofenol 0,00125%; β -mercaptoetanol 5%). Las fracciones insolubles son resuspendidas directamente en 50 μ l de tampón de corrida. Las muestras se calientan a 100°C en baño maría durante 5 min antes de ser cargadas en el gel.

Los geles de poliacrilamida poseen una zona concentradora de poliacrilamida al 4,5% (Tris-HCl 0,5M pH 6,8; SDS 0,4%; mezcla acril-bisacrilamida 4,5%; TEMED 0,3%; APS 0,3%) y una separadora con poliacrilamida al 12,5% (Tris-HCl 1,5M pH 8,8; SDS 0,4%; bis-acrilamida 12,5%; TEMED 0,3%; APS 0,3%). El tampón de corrida corresponde a Tris-glicina (Tris-base 25mM; glicina 190mM; SDS 0,1%). La electroforesis se realiza a un voltaje constante de 100 a 110 volts hasta que el frente de corrida caiga del gel (aprox. 2 hr). Como patrón de tamaños moleculares se utilizó el estándar de InvitrogenTM BenchMark Prestained Protein Ladder que incluye tamaños de proteína desde 8,4 a 176,5 kDa.

El gel se tiñe con azul de Coomassie (ácido acético glacial 10%; metanol 45%; azul de Coomassie 0,25%p/v) durante 20-30 min con agitación en un agitador orbital a 40-50 rpm. Luego se elimina el exceso de colorante con sucesivos lavados con solución de

desteñido (ácido acético glacial 10%; metanol 45%). Los geles son secados a 80°C en condiciones de vacío durante 1 hr, en un secador 543 Gel Dryer de marca Bio-Rad.

23. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

El cultivo bacteriano obtenido de la inducción se centrifugó a 9.300 xg a 4°C durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. La pella se resuspendió en 4 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8 y se sonicó 4 veces durante 25 seg manteniendo los tubos siempre en hielo, luego se centrifugó nuevamente a 4°C por 10 min a 9.300 xg. Los siguientes pasos de la purificación fueron levemente diferentes dependiendo si la proteína recombinante se encuentra en la fracción proteica soluble o insoluble.

23.1. Trx-FlgJ

Se separó la pella del sobrenadante. Para la purificación solo se utilizó el sobrenadante ya que gran parte de la proteína es soluble. El sobrenadante se incubó con la resina de afinidad agarosa Ni-NTA la cual retiene a la proteína por interacción con las histidinas presentes en la proteína de fusión. La incubación se realizó en presencia de NaCl 0,3M e imidazol 10mM y la proteína se eluyó de la resina con concentraciones crecientes de imidazol (desde 20 mM hasta 500 mM) en las soluciones de lavado y eluido, siguiendo el protocolo entregado por el fabricante (Novagen).

23.2. Trx-FlgE

Esta proteína se encontró principalmente en la fracción insoluble. Esta fracción obtenida se resuspendió en urea 2 M, Tris 50 mM pH 8, NaCl 0,3M, imidazol 10mM y esto se

incubó con la resina de afinidad agarosa Ni-NTA siguiendo el mismo protocolo que para FlgJ, pero agregando urea en concentración final 2M a cada una de las soluciones de lavado y eluido.

24. INMUNIZACIÓN DE RATONES CON LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para ambas proteínas, FlgJ y FlgE, se siguió el mismo protocolo de inmunización. 50 µg de cada proteína fue inyectada intraperitonealmente a 3 ratones Balb/c en 200 µl de emulsión. Se inyectaron 3 dosis, la primera de ellas con adyuvante de Freund completo y las otras dos se realizaron a los 14 y 28 días respectivamente con adyuvante de Freund incompleto. La sangría se realiza 10 días después de la última inyección y se evalúa la presencia en el suero de anticuerpos para la proteína recombinante, mediante las técnicas de ELISA y *Western blot*. Aquel ratón que presentó la mayor respuesta inmune frente a la proteína recombinante, fue elegido para obtener los hibridomas y producir los anticuerpos monoclonales. Estos monoclonales se produjeron en colaboración con Adolfo Jamett de Bios-Chile.

25. ELISA

Se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano recubiertas con un adhesivo biológico aislado de cholga (Burzio y col., 1997). La placa se activa agregando en cada pocillo 50 µl de proteína recombinante 10 µg/ml en PBS y se incuba por 90 min a temperatura ambiente. Luego de eliminar el exceso de proteína se bloquea cada pocillo con 350 µl/pocillo de una solución de caseína-sacarosa al 2% en PBS por 1 hr a temperatura

ambiente. Los sueros a analizar se mezclan con solución de bloqueo y se agregan 50 µl a cada pocillo en diluciones seriadas en base 2 partiendo por una dilución de 1:4. La placa se incuba durante 90 min a temperatura ambiente. Luego la placa se lava tres veces con 350µl/pocillo de PBS-Tween 20 al 0,02% por 5 min.

La placa se incuba durante 30 min a temperatura ambiente con 50 µl/pocillo del segundo anticuerpo que es un anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina, desarrollado en cabra (KPL), diluido 1/1.000 en solución de bloqueo. Posteriormente se realizan 4 lavados más, de igual modo que los anteriores. La reacción colorimétrica se realiza incubando por 30 min a 37°C con 50µl/pocillo del sustrato parafenilfosfato 1 mg/ml en tampón FAL (NaCl 100mM, Tris 100mM, MgCl₂ 5mM, pH 9,5). La reacción se detuvo agregando 50 µl de NaOH 3N por pocillo. Finalmente la D.O. de los contenidos de los pocillos se lee a 405 nm en un lector de ELISA ELX 800 de Biotek Instrumets Inc.

26. WESTERN BLOT

Para la detección de las proteínas recombinantes de *P. salmonis* se utilizaron sueros policlonales o anticuerpos monoclonales obtenidos contra las proteínas FlgE y FlgJ recombinantes.

Las muestras proteicas se someten a electroforesis en condiciones denaturantes en un gel de poliacrilamida-SDS al 12,5% y luego se electrotransfieren a una membrana de nitrocelulosa aplicando 100 volts durante 1 hr en tampón de transferencia (Tris-base 25mM, glicina 190mM, SDS 0,1%, metanol al 20%).

La membrana se bloquea con leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 al 0,02% durante 1 hora. Luego se incuba con el suero policlonal diluido 1/500, en solución de

bloqueo (leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 al 0,02%) y se incuba durante 90 min a temperatura ambiente con agitación. La membrana se lava 3 veces durante 10-15 min cada vez con TBS-Tween 20 0,02% con agitación.

Como segundo anticuerpo se utilizaron anticuerpos anti-IgG de ratón acoplados a fosfatasa alcalina o peroxidasa, siendo utilizado este último para una reacción con sustrato quimiolumincente que presenta mayor sensibilidad al revelar el *Western Blot*. Ambos fueron desarrollados en cabra, y se utilizaron en una dilución 1/1.000, en leche al 2,5% en TBS-Tween 20 0,01%. La membrana se incuba durante 1 hr a temperatura ambiente con agitación. Una vez terminada la incubación con el segundo anticuerpo la membrana se vuelve a lavar tres veces por 10-15 min cada una con TBS-Tween 20 0,02%. Para el revelado se siguen dos protocolos diferentes dependiendo del segundo anticuerpo usado. Para aquel acoplado a fosfatasa alcalina, las membranas se sumergen en 10 ml de tampón FAL con 33µl de BCIP 50 mg/ml y 66µl de NBT 50 mg/ml. Una vez que se visualizan las bandas se detiene la reacción con tampón de detención (EDTA 2mM, PBS 1X pH 8,0) y las membranas se lavan con agua destilada. Para la peroxidasa se utilizó el sustrato quimiolumincente del kit Super Signal®West Pico Chemiluminescent substrate de Pierce (Life Sciences Company), según las indicaciones del fabricante. En un cuarto oscuro se expone la membrana a la placa fotográfica (Kodak T-Mat G/RA Diagnostic Film o Kodak MXG/Plus Medical X-Ray Film) durante 1 a 10 min. A continuación la placa se revela sumergiéndola de 1 a 3 min en el revelador Kodak Dektol (preparado previamente según las instrucciones del fabricante), luego se lava con agua destilada y finalmente se fija sumergiéndola en fijador U3 de Jamarca.

27. INCUBACIÓN DE *P. SALMONIS* EN DIFERENTES SOLUCIONES SALINAS

P. salmonis semipurificado de 2 frascos de cultivo T175 se centrifugaron a 2.600 xg por 10 min a 4°C y se resuspendió en 15 ml de medio de cultivo MEM completo como control, o bien, con agua de mar estéril o PBS 200 mM NaCl y se incubó hasta 24 horas a 8°C o 16°C. Se tomaron alícuotas de las muestras a los 30 min, 1 hr, 4 hr o 24 hr para obtener RNA total, extractos de proteínas o realizar microscopía electrónica.

28. MICROSCOPIA

Para el estudio de microscopía, *P. salmonis* semipurificados se trataron con agua de mar, PBS-NaCl 200mM, para emular su etapa de vida extracelular, o mantenidos en medio MEM, por distintos tiempos: 30 minutos, 1, 4 y 24 horas.

28.1. Fluorescencia por *NanoOrange*

Para la microscopia de fluorescencia, las muestras de *P. salmonis* fueron observadas utilizando tinción con *NanoOrange* (Molecular Probes) basada en el protocolo de Grossart (Grossart y col., 2000). Para esto se tomaron 10 µl de cultivo de *P. salmonis* al que se le agregó 1 µl de dilución 1:20 de solución concentrada de *NanoOrange*. Las muestras fueron montadas y observadas en un microscopio de fluorescencia Zeiss MC-80 con filtro azul en un aumento de 100X. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara fotográfica análoga acoplada al microscopio. La imagen del control positivo de *NanoOrange* con *Vibrio ordalli*, fue obtenida con un microscopio de epifluorescencia

Olympus modelo IX70 acoplado a una cámara digital Sony CXC-390 3CCD, utilizando el objetivo PLAN 100X/1,25 oil y el filtro UN31001, lo que se realizó en el laboratorio de Genética Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

28.2. Inmunofluorescencia directa de *P. salmonis*

Un cultivo de células CHSE-214 se infecta con inóculos de *P. salmonis* y se mantienen hasta que se logra un efecto citopático cercano al 100%. Posteriormente se aísla un semipurificado de *P. salmonis* y se tratan con agua de mar o medio MEM por 1 o 4 hr. Se colocan 20 µl de la preparación en un portaobjetos. Luego se fija la preparación con paraformaldehído al 4 % durante 30 min a temperatura ambiente y se lava 3 veces con 1 ml de PBS 1X durante 5 minutos cada vez. Se agregan 100 µl del anticuerpo monoclonal respectivo diluido 1:500 en una solución con seroalbúmina bovina al 2% en PBS. Esto se incuba durante 1 hora en un lugar húmedo y carente de luz. Este anticuerpo se encuentra acoplado al fluoróforo FITC. Se repite nuevamente la etapa de lavado 3 veces y se agrega solución de montaje DABCO previo a su observación en un microscopio de fluorescencia Zeiss MC-80.

28.3. Microscopía Electrónica

Muestras de *P. salmonis* se llevaron al laboratorio de microscopía electrónica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile para ser analizadas, y fueron fijadas con protocolos de esa unidad. Las bacterias se fijaron en Glutaraldehído al 2.5 % en buffer cacodilato de sodio 0,1 M, pH 7,4 a 4°C por toda la noche. Luego se postfijaron en tetróxido de osmio al 1% por 1 h, y se deshidrataron en diluciones crecientes de

etanol. Finalmente las muestras se incluyeron en resina Epon 812 y cortes de las muestras fueron analizados mediante microscopía electrónica de transmisión. Además las muestras fueron observadas mediante microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa, para lo que se utilizaron grillas de 400 mesh las que se pusieron sobre una gota de suspensión de *P. salmonis* durante 3 minutos. Luego las grillas se colocaron en una solución de tinción de acetato de uranilo al 1% en agua bidestilada durante 15 minutos, y se observaron al microscopio electrónico.

29. PREPARACIÓN DE ARN TOTAL DE *P. SALMONIS*

La purificación de ARN se realizó por el método de fenol caliente (Aiba y col., 1981) modificado (Guiliani y col., 1997). Primero se centrifugan las bacterias y se resuspenden en 500 µl de tampón de lisis (EDTA 1mM; acetato de sodio 0,02M; SDS 0,5%) y se agita vigorosamente. Luego se extrae con 1 volumen de fenol en un baño a 60°C, durante 7 min, agitando cada 1 min. La mezcla se centrifuga a 13.400 xg durante 5 min a 4°C, y se recolecta la fase acuosa superior. La extracción fenólica se repite y se precipita el RNA de la fase acuosa con 1 ml de etanol absoluto y 36µl de KCl 1M, incubando a -80°C durante 1 hora o a -20°C durante la noche. Hecho esto la suspensión se centrifugó a 15.700 xg por 10 min a 4°C y la pella resultante se lava con etanol 70%. La pella se deja secar a temperatura ambiente para luego resuspenderla en el volumen deseado de agua DEPC o tampón TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) libre de RNAsa.

30. PURIFICACIÓN DE ARN TOTAL CON LiCl Y DNAsa

La fracción de ARN total extraída contenía ADN genómico contaminante, por lo que se sometió a una purificación inicial con LiCl y luego con DNAsa. Para esto el ARN suspendido en agua DEPC se llevó a 300 μ l con tampón TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) y luego se precipitó con 100 μ l de LiCl 10M a -20°C durante 16 horas. La suspensión se centrifugó a 13.400 xg durante 25 min y se descartó el sobrenadante. La pella se lavó dos veces resuspendiendo con etanol 70% y centrifugando a 13.400 xg por 10 min cada vez. Posteriormente, el ARN precipitado se resuspendió en el volumen inicial de agua DEPC o tampón TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM). Se trataron 15 μ g de la suspensión de ARN con 4U de DNAsa en el tampón correspondiente para la DNAsa. La reacción se incubó a 37°C por 50 min y se agregan 2 μ l de tampón de detención para inhibir la actividad de la DNAsa.

31. TRANSCRIPCIÓN REVERSA-PCR

La transcripción reversa se realizó con hexámeros al azar (50 ng) u oligonucleótidos antisentido específicos para el gen en estudio como partidores (10nM). Para esto 0,5-1 μ g de ARN total se incubaron con los partidores reversos o hexámeros durante 5 min a 70°C y luego en hielo por 5 min adicionales. A esta mezcla se le agregó 5 μ l de dNTP (10 mM total), 5 μ l de tampón concentrado 5x para M-MLV, 25 U de RNAsa Out (Promega) y 200 U de M-MLV completando a un volumen total de 25 μ l con agua tratada con DEPC. La reacción se mantuvo a 37°C durante 1 hora para el caso de los

hexámeros, y a 42°C si se usaron partidores reversos. Luego se tomaron 1,5 µl de esta mezcla para realizar la reacción de PCR de acuerdo al protocolo antes descrito.

32. INMUNOPRECIPITACIÓN

Para la inmunoprecipitación se utilizó 1 ml de extracto total de *P. salmonis* a una concentración de 0,6 mg/ml de proteínas, en tampón de lisis con inhibidores de proteasas (PBS 1X, Triton X-100 1%, leupeptina 1 mg/ml, aprotinina 1 mg/ml, PMSF 1 mM final y pepstatina 1 mg/ml) preparados por sonicación (3 veces por 20 seg en hielo). La proteína G de Amersham Biosciences al 50%, se lavó con tampón lisis sin inhibidores durante 2 min centrifugando a 5.000 xg cada vez. Luego se realizó un preblanqueamiento a los extractos proteicos con 60µl de proteína G 50% mas suero de conejo, en tampón de lisis durante 2 hr a 4°C con agitación. Luego la mezcla se centrifugó por 2 min a 5.000 xg y al sobrenadante se le agregó aproximadamente 3 µg de anticuerpo monoclonal específico para la proteína que se desea precipitar (anti-FlgE o anti-FlgJ) y se incubó a 4°C durante la noche con agitación. Luego a la mezcla se agregaron 25 µl de proteína G 50% en tampón de lisis y se incubó durante 2 hr a 4°C con agitación. A continuación se centrifugó la mezcla a 5.000 xg, la pella se lavó por suspensión suave 4 veces con 1 ml de tampón de lisis con inhibidores centrifugando a 5.000 xg luego de cada lavado. A la pella lavada se agregó un volumen de tampón de carga con inhibidores de proteasas y se siguió el protocolo descrito previamente para carga de geles de poliacrilamida-SDS.

III. RESULTADOS

1. ANÁLISIS DEL GENOMA DE *P. SALMONIS* E IDENTIFICACIÓN DE GENES FLAGELARES Y DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III.

Previo a la realización de esta tesis se contaba con un borrador del genoma de *P. salmonis*, realizado por la Fundación Ciencias para la Vida en conjunto con Incyte Genomics (Palo Alto, California, EEUU). A partir de esta secuenciación se obtuvieron alrededor de 2.100 *contigs* o secuencias contiguas, las cuales fueron comparadas y alineadas frente a la base de datos pública de GenBank en Internet, en donde se pudieron identificar alrededor de 1.500 genes ortólogos a otros genes (Valenzuela y col., 2001). Entre estos genes, se identificaron alrededor de 36 genes involucrados en la formación de un flagelo, entre los cuales se encuentran genes utilizados en el motor flagelar, quimiotaxis, estructurales y de exportación y ensamblaje. Los resultados de esta recopilación se presentan en la Tabla 1. Un análisis de estos genes indica que entre ellos, hay varios que han sido descritos también como genes de proteínas involucradas en el sistema de secreción tipo III. Muchos de los genes identificados presentan solo una fracción de la secuencia, debido a que actualmente se dispone de un borrador del genoma distribuido en varios *contigs* o secuencias contiguas. Los genes flagelares se encuentran organizados en grupos en otras especies bacterianas flageladas. Este hecho y la gran similitud de muchos de estos genes identificados en *P. salmonis* con aquellos de los géneros de *Vibrio* y *Pseudomonas*, nos permitió basarnos en el genoma de estas bacterias para el ensamblaje de las secuencias contiguas obtenidas en la secuenciación

de *P. salmonis*. Un ejemplo de la organización de un grupo de estos genes en *Pseudomonas aeruginosa* se presenta en la Figura 5. La existencia de esta gran cantidad de genes flagelares nos llevó a postular la posible presencia de flagelos en *P. salmonis*. Para determinar si *P. salmonis* presentaba flagelos en algún momento de su ciclo de vida se llevaron a cabo algunos estudios mediante microscopía.

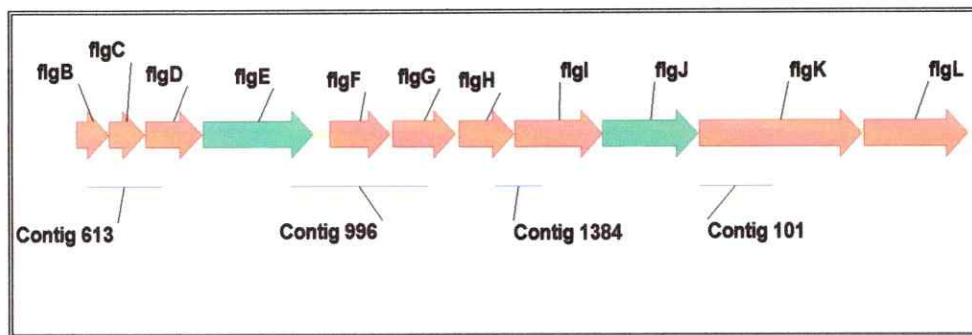


Figura 5: Esquema de la organización de algunos de los genes flagelares en *Pseudomonas aeruginosa*.

Los genes en verde corresponden a los ortólogos de los genes *flgE* y *flgJ* analizados en este trabajo. Las barras azules representan la posición relativa de las secuencias contiguas resultantes de la secuenciación de *P. salmonis*, que son homologas a las secuencias flagelares de *Pseudomonas*.

Contig	Gen	E-value	Organismo al que se asemeja	Función que se le atribuye
101	flgK	8E-12	<i>Pseudomonas putida</i>	Proteína asociada al gancho flagelar
237	flaA	2E-07	<i>Legionella pneumophila</i>	Proteína estructural del filamento flagelar
253	cheW	1E-29	<i>Pseudomonas syringae</i>	Transmite la señal de los quimiorreceptores al motor flagelar
502	flhA	2E-08	<i>Shewanella oneidensis</i>	Biosíntesis y exportación de proteínas flagelares
502	flhB	1E-29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Biosíntesis y exportación de proteínas flagelares
582	fliO	8E-07	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Proteína de ensamblaje flagelar
582	fliP	2E-48	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Componente de la vía de síntesis del flagelo
596	flhF	2E-33	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Proteína de síntesis flagelar de unión a GTP
613	flgB	2E-05	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Proteína del eje proximal flagelar
613	flgC	1E-34	<i>Pseudomonas putida</i>	Proteína del eje proximal flagelar
613	flgD	8E-06	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Proteína de ensamblaje del codo flagelar
614	cheV	6E-14	<i>Pseudomonas syringae</i>	Transmite la señal de los quimiorreceptores al motor flagelar
641	flaM	1E-25	<i>Vibrio cholerae</i>	Regulador de respuesta sigma 54 dependiente
641	fliE	6E-10	<i>Pseudomonas syringae</i>	Proteína del eje proximal del cuerpo basal del flagelo
822	motA	4E-25	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Transportador de protones necesario para el motor flagelar
822	motB	5E-20	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Transmite el torque del motor a la pared celular
842	motY	1E-13	<i>Vibrio cholerae</i>	Estabiliza la fuerza generada por el motor en la pared celular
863	flaA	4E-26	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Proteína estructural del filamento flagelar
953	fliM	1E-102	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Proteína polar que determina la dirección de rotación
996	flgF	1E-42	<i>Vibrio cholerae</i>	Proteína del eje proximal del cuerpo basal del flagelo
996	flgG	9E-35	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Proteína del eje distal del cuerpo basal del flagelo
1086	fliJ	3E-04	<i>Yersinia pestis</i>	Chaperona de la biosíntesis flagelar
1086	fliK	6E-13	<i>Vibrio cholerae</i>	Regula el tamaño del gancho flagelar
1230	fliF	7E-86	<i>Pseudomonas putida</i>	Proteína estructural del anillo M del cuerpo basal del flagelo
1230	fliG	9E-66	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Involucrada en determinar la dirección de rotación flagelar
1230	fliI	5E-74	<i>Legionella pneumophila</i>	ATP sintasa específica de flagelo
1234	fliY	3E-09	<i>Aeromonas sp</i>	Involucrada en determinar la dirección de rotación flagelar
1234	MCP	1E-29	<i>Vibrio vulnificus</i>	Proteína de quimiotaxis aceptora de metilos
1384	flgH	3E-03	<i>Vibrio cholerae</i>	Lipoproteína del anillo L del cuerpo basal del flagelo
1384	flgI	7E-26	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Proteína estructural del anillo L del cuerpo basal flagelar
1565	flaA	1E-30	<i>Caulobacter crescentus</i>	Proteína estructural del filamento flagelar
1565	flmB	5E-56	<i>Aeromonas punctata</i>	Proteína modificadora de flagelina
1661	flmB	6E-21	<i>Aeromonas punctata</i>	Proteína modificadora de flagelina
1704	fleN	1E-39	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Regulador de la síntesis de flagelo
1930	flaA	1E-22	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Proteína estructural del filamento flagelar
1996	fliI	6E-35	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATP sintasa específica de flagelo
2076	flhA	4.5e-2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Biosíntesis y exportación de proteínas flagelares
2076	flhF	3E-12	<i>Vibrio cholerae</i>	Proteína de unión a GTP asociada a la biosíntesis de flagelo
2097	flgE	3E-15	<i>Bordetella parapertussis</i>	Proteína del codo flagelar
2097	flgG	3E-30	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Proteína distal del eje basal del flagelo
2097	flgH	9E-01	<i>Pseudomonas syringae</i>	Proteína del anillo L
2128	fliR	6E-07	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Participa en la biosíntesis del flagelo
2132	cheY	2E-15	<i>Vibrio vulnificus</i>	Transmite la señal de los quimiorreceptores al motor flagelar
2132	cheZ	5E-09	<i>Vibrio vulnificus</i>	Regula la rotación flagelar

Tabla 1: Lista de los genes relacionados con el aparato flagelar encontrados luego de la secuenciación del genoma de *P. salmonis*.

En la lista aparece el número del contig, el gen al cual se asocia con el respectivo e-value dado por el análisis mediante el BLAST del NCBI. Además se ve la función de cada uno de estos genes.

2. ESTUDIOS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y ELECTRONICA

2.1. Microscopía de fluorescencia: Tinción con *NanoOrange* e Inmunofluorescencia directa.

En un primer intento para detectar un flagelo en *P. salmonis* se utilizó microscopía de fluorescencia. Se realizaron estudios con *P. salmonis* incubados en agua de mar, PBS-NaCl 200mM, para emular su etapa de vida extracelular; o mantenidas en medio MEM, por distintos tiempos: 30 minutos, 1, 4 y 24 horas. Se utilizaron 2 técnicas de microscopía de fluorescencia. Una fue la tinción con *NanoOrange*, un fluoróforo que se asocia fuertemente a proteínas y que ha sido usado previamente para observar flagelos (Grossart y col., 2000) y que además permite observar todas la bacterias presentes en la muestra. Los resultados se presentan en la Figura 6, donde se puede apreciar un cultivo de *P. salmonis* tratado 1 hr con agua de mar, en el cual las bacterias se tiñen de un color verde amarillento. En la figura 6A se puede ver una estructura alargada que se extiende desde la bacteria, la cual podría corresponder a una estructura similar a un flagelo, pero no presentan la estructura propia de un flagelo (señalada por una flecha negra). Cabe destacar que este tipo de estructura se apreciaba en aproximadamente un 1% de las bacterias y su frecuencia no aumentaba al incubar por tiempos más prolongados. En la Figura 6B se puede apreciar un control positivo con *Vibrio ordalli* el cual posee un flagelo constitutivo (señalado por la flecha blanca). La otra técnica fue de inmunofluorescencia directa, la cual permite ver estructuras de una manera específica mediante la reacción con anticuerpos específicos que son acoplados con una molécula fluorescente (FITC). Los resultados se presentan en la Figura 7. En este experimento se

utilizó un anticuerpo monoclonal contra *P. salmonis*, que reacciona principalmente con elementos de la pared bacteriana. Nuevamente se aprecian algunas estructuras similares a flagelos (señalado por una flecha) en una fracción no superior al 1% del total de las bacterias, pero los resultados no son concluyentes (figura 7B).

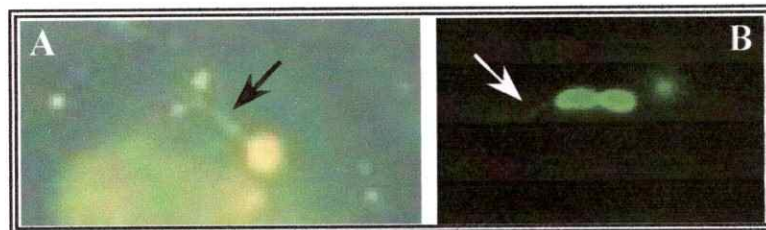


Figura 6: Análisis de *P. salmonis*, mediante tinción con NanoOrange. En el cuadro A, se ven *P. salmonis* semipurificados, incubados en agua de mar durante 1hr a 16°C y luego teñidos con NanoOrange. En B control positivo con *Vibrio ordalli*.

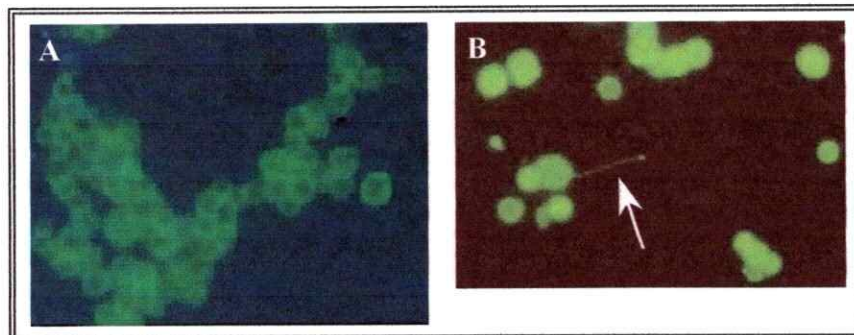


Figura 7: Análisis de *P. salmonis*, mediante inmunofluorescencia directa. Se utilizó un anticuerpo anti-*P. salmonis* desarrollado en Bios-Chile acoplado a FITC. A: control de *P. salmonis* semipurificados de CHSE-214; B: *P. salmonis* incubados con PBS-NaCl 200mM durante 24 hr.

2.2. Microscopía Electrónica con tinción negativa

Con el fin de analizar las estructuras detectadas con un mayor aumento, se decidió recurrir a la microscopía electrónica con tinción negativa que permitiría visualizar en mayor detalle las estructuras observadas y determinar si presentan las características propias de un flagelo. Se realizaron observaciones en las instalaciones del laboratorio de microscopía electrónica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, utilizando muestras de *P. salmonis* tratados con PBS-NaCl 200mM durante 24 hr, los resultados se muestran en la Figura 8.

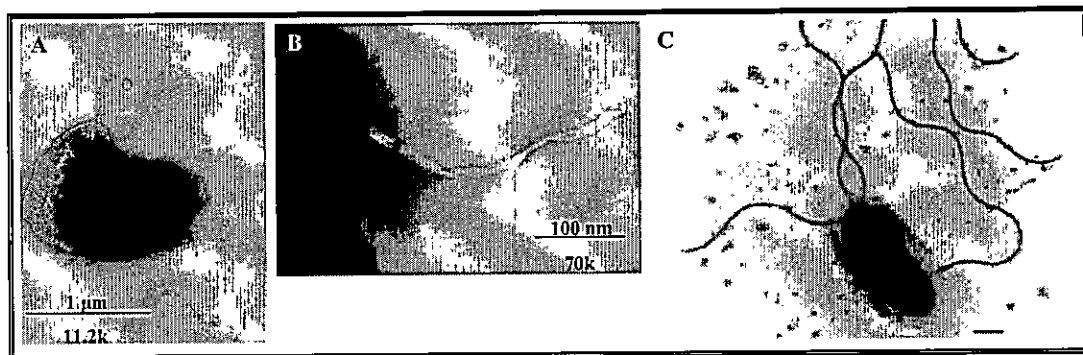


Figura 8: Análisis de *P. salmonis* mediante microscopía electrónica con tinción negativa.

En A y B se utilizó *P. salmonis* incubados con PBS-NaCl 200mM durante 24hr. La tinción se realizó con acetato de uranilo al 1%. C fotografía de *Aeromonas salmonicida* donde se aprecian flagelos, teñidos por tinción negativa (Umelo y Trust, 1997)

Como se ve en esta figura, también aparecen elongaciones desde la bacteria que son similares a flagelos, pero no se puede aseverar que sean efectivamente este tipo de estructuras puesto a que no poseen la morfología esperada para flagelos, ni los tamaños usualmente vistos.

2.3. Microscopía Electrónica de Transmisión

Muestras de *P. salmonis* cultivados en agua de mar y mantenidos en medio MEM durante 1 hr fueron analizados por microscopía de transmisión. Las células fueron fijadas en el laboratorio de microscopía electrónica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile según protocolos establecidos. Aún cuando con este método se observan cortes de las células, y por consiguiente una menor probabilidad de visualizar un flagelo, esta técnica de mayor aumento entrega una mejor definición de las células y sus estructuras. Los resultados se presentan en la Figura 9. Como se aprecia en esta figura, los controles mantenidos en MEM presentan un *P. salmonis* con su membrana extracelular ondulada y aun cuando se detecta la presencia de vesículas, probablemente artefactos de la fijación, no se observa ningún tipo de estructura similar a flagelos. En el caso de las tratadas en agua de mar, se observó exactamente lo mismo. En la Figura 8B se seleccionó una bacteria con la membrana rota, y cuya extensión se dispone de una forma semejante a lo observado con microscopía electrónica con tinción negativa, por lo que se pone en duda que esas estructuras hayan sido efectivamente flagelos.

Debido a la dificultad para determinar la presencia de flagelos en *P. salmonis* a través de los estudios de microscopía, se decidió a aislar algunos de los putativos genes flagelares con el objetivo de estudiar su expresión mediante la detección del ARN mensajero o la proteína correspondiente. Para esto se eligieron *flgE* y *flgJ*.

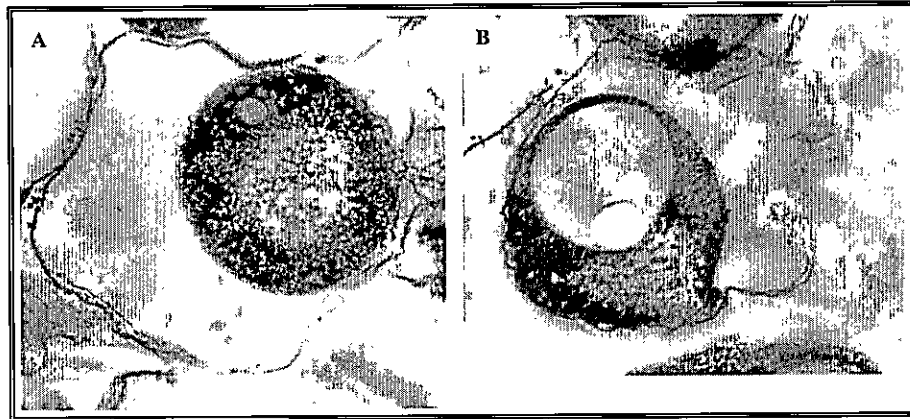


Figura 9: Análisis de *P. salmonis* mediante microscopía electrónica de transmisión.
A: Bacterias semipurificadas y mantenidas en medio MEM; B: bacterias tratadas con agua de mar durante 1hr a 16°C.

3. AISLAMIENTO DE LOS GENES *flgE* y *flgJ* DE *P. SALMONIS*

Como se sospechaba de la presencia de todos los genes flagelares ya descritos, pero no se logró observar ningún flagelo mediante la microscopía, se decidió verificar la presencia de los genes *flgE* y *flgJ* que no se encontraban presentes en ninguna de las secuencias contiguas obtenidos en la secuenciación de *P. salmonis*. El gen *flgE* codifica para la proteína FlgE, que es la proteína estructural del codo o gancho flagelar y se encuentra ubicada fuera de la célula como unión entre el filamento y el cuerpo basal del flagelo. Resulta interesante estudiar y verificar la presencia de esta proteína debido a que se presenta exclusivamente en el flagelo y no en el sistema de secreción tipo III y además está suficientemente expuesta como para ser detectada mediante anticuerpos. Por su parte el gen *flgJ* codifica para una peptidoglicán hidrolasa que se encuentra en el periplasma que además cumpliría funciones de chaperona y ayudaría en el ensamblaje del cuerpo basal. Esta proteína se presenta en bacterias con flagelo y podría presentarse

también en bacterias que poseen el sistema de secreción tipo III. Esta propiedad podría ser útil para realizar análisis entre ambos genes respecto a su existencia y expresión.

3.1. Clonamiento de *flgE*

De acuerdo a la organización de genes flagelares de otras bacterias, el gen *flgE* se localizaría entre *flgD* y *flgF*. Estos dos genes fueron identificados en el genoma de *P. salmonis* y se localizan en las secuencias contiguas 613 y 996 respectivamente (Figura 4). Basándonos en la organización de los genes flagelares, y en las secuencias contiguas 613 y 996, se diseñó la pareja de oligonucleótidos FlgDF1 y FlgFR1 y se realizó un PCR con ADN genómico de *P. salmonis* (Figura 10).

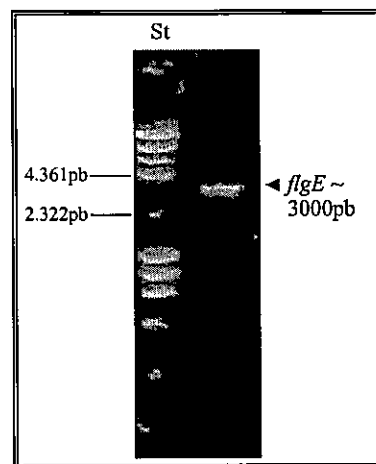


Figura 10: Análisis de *flgE* amplificado por PCR desde ADN genómico de *P. salmonis* mediante electroforesis en agarosa al 1%. El estándar corresponde a 1 μ g de λ /HindIII- Φ X174/HaeIII, el gel posee bromuro de etidio 0,3 μ g/ml.

Como resultado del PCR se obtuvo un fragmento único de ADN de aproximadamente 3000 pb, que tiene un tamaño significativamente mayor al esperado para *flgE*, el que en otras especies, oscila entre los 1200pb y 1400pb. El amplificado se ligó al vector de clonamiento pGEM-T, y se identificaron los clones positivos mediante PCR y corte del

ADN plasmidial con enzimas de restricción. Se seleccionó un clon positivo para ser secuenciado con los partidores m13, FlgDF1 y FlgFR1, y se confirmó que el segmento secuenciado correspondía a *flgE*. Debido al gran tamaño del fragmento se diseñaron a partir de estas secuencias nuevos partidores (FlgEF2 y FlgER2). Esta operación se realizó dos veces más diseñando los partidores FlgEF3, FlgER3 y FlgER4 (Figura 11).

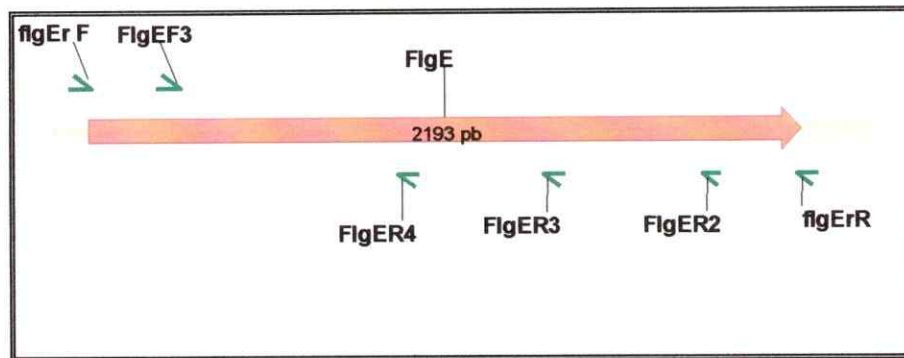


Figura 11: Esquema del gen estructural *flgE* de *P. salmonis*.

Se aprecia la ubicación de los partidores internos utilizados para su secuenciación (FlgEF3, FlgER4, FlgER3 y FlgER2). También se indican los partidores con sitios de restricción utilizados posteriormente para su clonamiento en vectores de expresión (FlgErF y FlgErR).

Luego, las secuencias obtenidas se ensamblaron formando una sola secuencia de 3.161 pb, la cual fue comparada con la información existente en la base de datos Gene Bank, con el objetivo de estudiar su homología con otros genes. Los resultados de este análisis se presentan en la Figura 12, donde se indica que los primeros 600 pb de la secuencia amplificada corresponden al segmento final de la región que codifica *flgD*, y la secuencia a continuación correspondería a *flgE*. El gen *flgE* de *P. salmonis* está compuesto por 2.196 pb, siendo sus extremos muy semejantes a los *flgE* de otras bacterias, pero en el centro, la secuencia posee un inserto de aproximadamente 1.000 pb

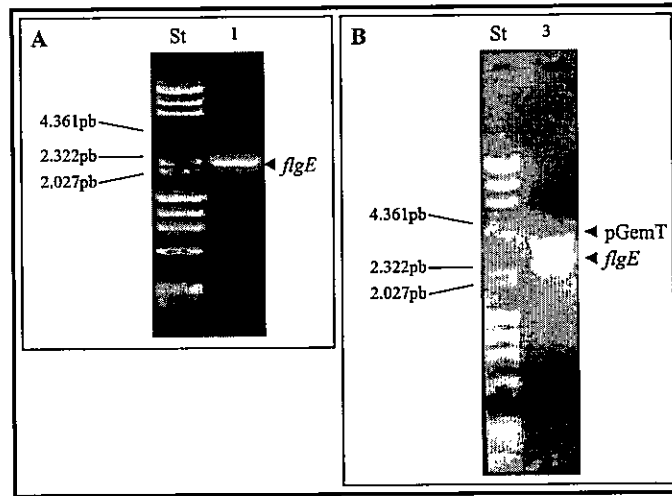


Figura 13: Análisis del clonamiento de *flgE* en pGEM-T mediante electroforesis en agarosa al 1%.
 A: Amplificación con partidores FlgErF y FlgErR (carril 1). B: Digestión de pGEMT-*flgE* con EcoRV y BamHI (carril 3). St: ADN de λ /HindIII + ϕ X174/HaeIII

El gen *flgE* aislado de pGEMT-*flgE* se subclonó en el vector de expresión bacteriana pET-32a(+), previamente cortado con las mismas enzimas. Los clones positivos se identificaron por PCR y digestión con enzimas de restricción. El resultado de este análisis se presenta en la Figura 14.

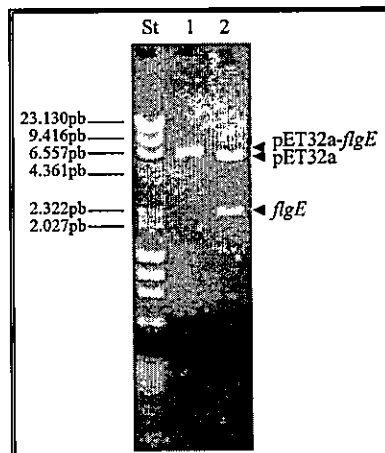


Figura 14: Análisis del clonamiento de *flgE* en pET-32a mediante electroforesis en agarosa al 1%.
 1: plasmidio pET32a-*flgE* linearizado luego de un corte con EcoRV. 2: Digestión del plasmidio pET32a-*flgE* con EcoRV y BamHI. St: λ /HindIII + ϕ X174/HaeIII.

3.2. Clonamiento de *flgJ*

Para aislar *flgJ* se siguió la misma metodología utilizada anteriormente, diseñando primero los partidores FlgIF1 y FlgKR1 en base a las secuencias contiguas 1.384 y 101 que presentan gran homología con *flgI* y *flgK* de otras bacterias (Figura 5). Luego de realizado el PCR se obtuvo un amplificado de aproximadamente 2.200 pb, el cual se clonó en pGEM-T para la posterior secuenciación. En base a la secuencia obtenida se diseñaron los partidores FlgJF2, FlgJR2, y FlgJR3 con los cuales se logró secuenciar por completo el amplificado inicial de 2.239 pb. Estas secuencias se ensamblaron en una secuencia única, la que fue comparada con las bases de datos provistas en Internet, buscando homología con *flgJ*.

El alineamiento demostró que existen 3 marcos de lectura abierto consecutivos que corresponden a los genes *flgI*, *flgJ* y *flgK*, siendo *flgJ* de 834 pb (Anexo 1). Esta organización coincide con la observada en otros microorganismos.

A partir de esta información se diseñaron partidores, complementarios a los extremos de *flgJ*, con sitios de restricción BamHI y EcoRI para amplificar solamente el gen estructural *flgJ*. El PCR se realizó con ADN genómico de *P. salmonis* como templado y el producto se clonó en pGEM-T y se secuenció. El inserto de 862 pb se liberó con las enzimas BamHI y EcoRI (Figura 15) y fue subclonado en los vectores de expresión bacteriana pET-32a y pET-21a, con el fin de obtener la proteína FlgJ recombinante. Un análisis de los resultados de esta construcción se presenta en la Figura 16.

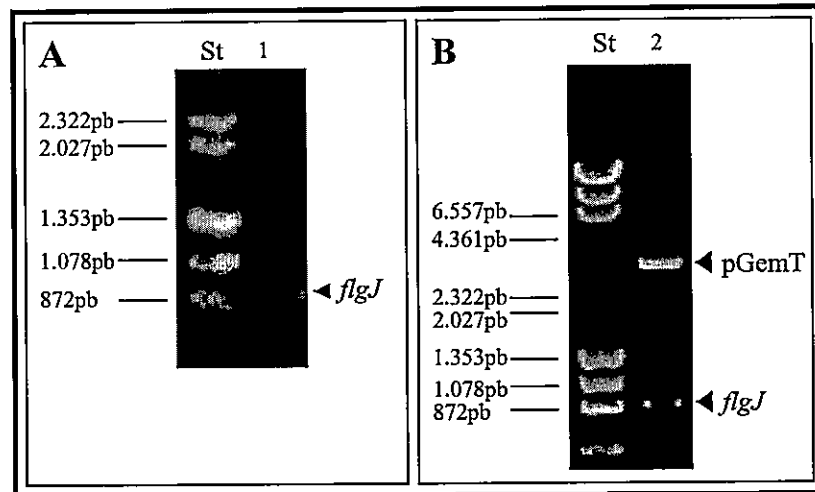


Figura 15: Análisis de *flgJ* amplificado por PCR y clonado en pGEM-T mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.
 A: Amplificado con partidores FlgJrF y FlgJrR. B: digestión del plásmido pGEM-T-*flgJ* con BamHI y EcoRI. St: ADN λ /HindIII + ϕ X174/HaeIII.

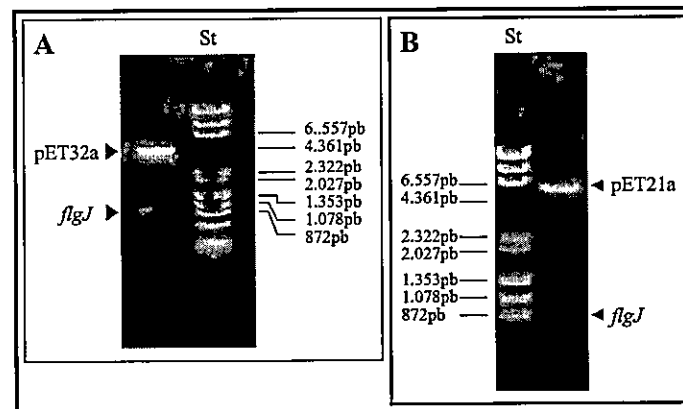


Figura 16: Análisis de *flgJ* subclonado en pET-32a y pET-21a mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.
 A: Fragmentos resultantes de digestión de pET32a-*flgJ* con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI. B: Fragmentos resultantes de digestión de pET21a-*flgJ* con BamHI y EcoRI. St: ADN λ /HindIII + ϕ X174/HaeIII.

Estos dos vectores difieren entre sí principalmente en que el pET-32a posee una secuencia que codifica para la tioredoxina A de *E. coli* y un dominio de 6 histidinas, que resultan de gran utilidad para su purificación. El vector pET-21a se utilizó principalmente para obtener la proteína recombinante sin la fusión a Trx y así facilitar el

análisis de monoclonales que detectan la proteína de interés y no reaccionan frente a Trx.

4. INDUCCIÓN Y EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS FlgJ y FlgE EN *E. COLI*.

4.1. FlgJ

Con el fin de expresar FlgJ, se transformó células *E. coli* BL21(DE3) con los plasmidios pET32a-*flgJ* y pET21a-*flgJ*. Al inducir BL21(DE3) transformada con el plasmidio pET32a-*flgJ* se obtuvo la expresión de la proteína de fusión Trx-FlgJ de 50kDa (30,5 kDa corresponden a FlgJ y 20 kDa a Trx). La proteína se encontró tanto en la fracción proteica soluble (sobrenadante) como en la fracción insoluble (pella) de las bacterias sonicadas (Figura 17). Se optó por purificar la proteína desde el sobrenadante.

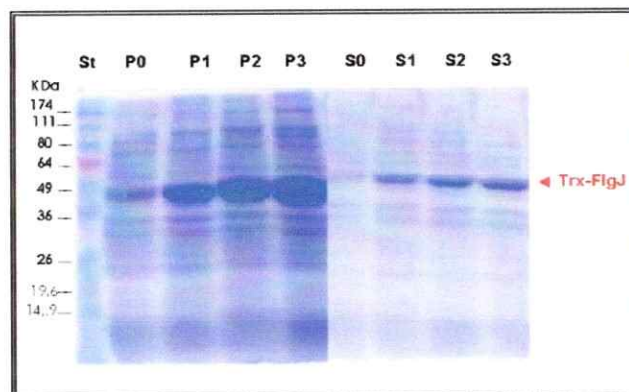


Figura 17: Análisis de la producción de Trx-FlgJ en *E. coli* mediante electroforesis en poliacrilamida-SDS al 12,5%.

Se analizó la pella (P) correspondiente a 350 μ l de cultivo y 150 μ l de la fracción soluble (S) de muestras tomadas antes (t0) y cada hora luego de la inducción con IPTG (t1, 2, 3). St: Estándar preteñido *Protein Ladder* de Invitrogen.

La purificación se realizó por cromatografía de afinidad en una columna de Ni-Agarosa como se describe en Métodos. Como se aprecia en la Figura 18, la proteína Trx-FlgJ eluyó mayoritariamente en las fracciones que contenían imidazol en concentraciones 50 y 100 mM (E2 y E3). Estas fracciones se juntaron y cuantificaron con una curva de BCA, determinándose una concentración de 0,5 mg/ml. La proteína purificada se utilizó posteriormente para la inmunización de ratones y obtención de monoclonales.

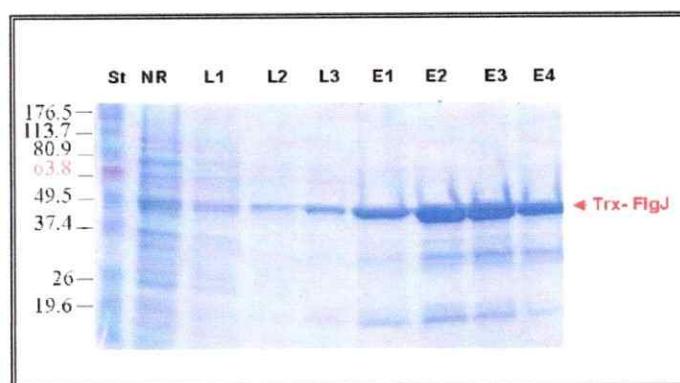


Figura 18: Análisis de la purificación de Trx-FlgJ en columna de Ni-agarosa mediante electroforesis en gels de poliacrilamida-SDS al 12,5%.

En cada carril se cargaron 30 μ l de las distintas fracciones recolectadas, siendo NR la fracción no retenida en la columna, L (1, 2, 3) distintos lavados y E (1, 2, 3, 4) eluidos, con concentraciones crecientes de imidazol, de 10mM (L1), 20mM (L2 y L3), 50mM (E1 y E2), 100mM (E3 y E4). St: Estándar preteñido *Protein Ladder* de Invitrogen.

En paralelo, bacterias BL21(DE3) transformadas con pET21a-*flgJ* se indujeron con IPTG obteniéndose la proteína T7-FlgJ con el tamaño esperado de 30,5 kDa. La expresión de esta recombinante fue menos abundante que la recombinante Trx-FlgJ. La proteína también se encontró en el sobrenadante (Figura 19). Esta proteína no posee la región rica en polihistidinas que permite una rápida purificación por la columna de agarosa Ni-NTA, y se utilizó como extracto crudo solamente para análisis proteicos mediante *Western blot* y ELISA.

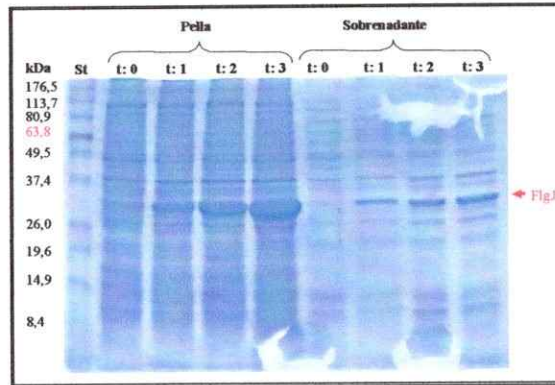


Figura 19: Análisis de la inducción de FlgJ clonado en el vector pET-21a mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12,5%.
Se cargaron 15 μ l de las fracciones proteicas insolubles (pella) y soluble (sobrenadante) de muestras tomadas antes (t: 0) y hasta tres horas luego de la inducción (t: 1, 2, 3) con IPTG. St: Estándar preteñido *Protein Ladder* de Invitrogen.

4.2. FlgE

Células *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el vector pET32a-flgE fueron inducidas por el mismo protocolo anterior, obteniéndose una proteína con el tamaño esperado de 100kDa (80,41kDa correspondientes a FlgE y 20kDa a Trx). Esta proteína se encontró formando cuerpos de inclusión en la fracción insoluble (Figura 20).

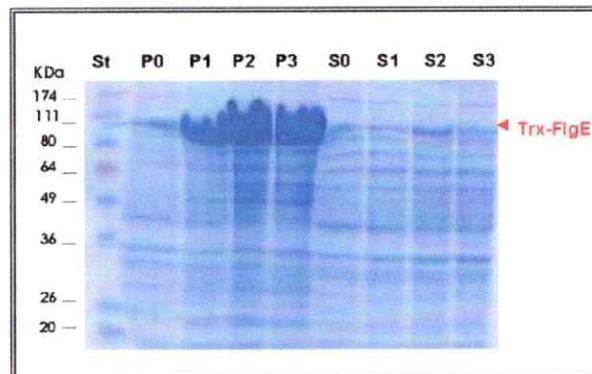


Figura 20: Análisis de la inducción de Trx-FlgE mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12,5%.
Se analizaron 15 μ l de la fracción proteica insoluble (P) y sobrenadantes (S), de distintas muestras sonicadas, tomadas previa inducción (t: 0) o por cada hora luego de la inducción (t: 1, 2, 3). St: Estándar preteñido *Protein Ladder* de Invitrogen.

Con el objetivo de solubilizar la fracción insoluble se resuspendió en concentraciones crecientes de urea, con lo que se determinó que la concentración de urea óptima para su solubilización es 2M.

El extracto proteico que contenía Trx-FlgE se sometió a purificación en una columna de afinidad Ni-Agarosa en presencia de urea 2M. Aunque este procedimiento eliminó gran parte de las impurezas, la proteína de fusión Trx-FlgE no eluyó en una fracción específica sino que fue eluyendo homogéneamente con las diferentes concentraciones de imidazol utilizadas (Figura 21). Por esto se decidió juntar las fracciones de los eluidos con concentraciones de imidazol de 50 y 100mM (E2, E3 y E4), obteniendo una solución con 0,3 mg/ml de proteína.

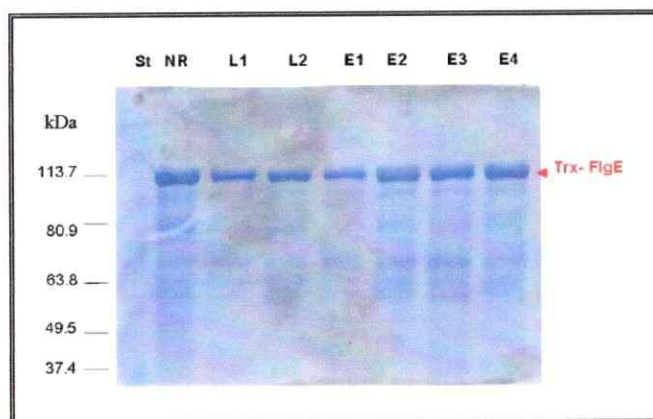


Figura 21: Análisis de la purificación de Trx-FlgE por columna de Ni-agarosa, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12,5%.

Se analizaron 30 μ l de las fracciones no retenida (NR), lavados L (1,2) y eluidos E (1,2,3,4), con diferentes concentraciones de imidazol, de 10mM (L1), 20mM (L2 y E1), 50mM (E2 y E3), 100mM (E4). St: Estándar preteñido *Protein Ladder* de Invitrogen.

5. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES FlgE Y FlgJ

Los anticuerpos monoclonales son de gran utilidad para realizar los análisis de expresión *in-vivo* de las proteínas FlgE y FlgJ en *P. salmonis*. Para su obtención se inmunizaron ratones Balb/c con 3 dosis de 50 µg de las proteínas de fusión Trx-FlgE o Trx-FlgJ. Al cabo de los 45 días se obtuvieron sueros que presentaron gran reactividad frente a las proteínas recombinantes, por lo que se prosiguió con la obtención de los hibridomas correspondientes.

Los sobrenadantes monoclonales fueron analizados por ELISA contra Trx-FlgE, Trx-FlgJ y Trx, para realizar así una selección de aquellos anticuerpos que reconocen solo las proteínas flagelares y no reconocen Trx. Para FlgE, se seleccionaron 3 anticuerpos (2E9/F12, 2G3/F11 y 5A2/G6) con títulos cercanos a 1/33.000 y cuya especificidad se evaluó por *Western blot* contra Trx-FlgE. Como se ve en la Figura 22, los anticuerpos reconocen específicamente la proteína de fusión Trx-FlgE en un extracto crudo de *E. coli* BL21(DE3) recombinante.

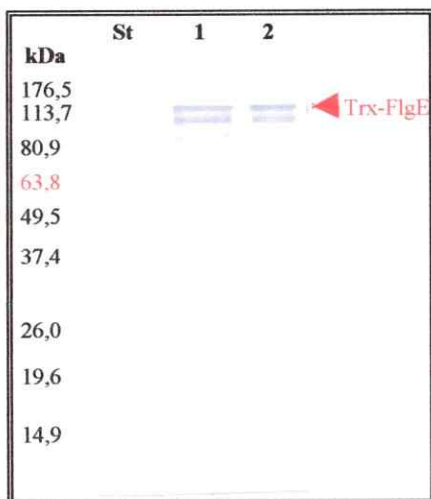


Figura 22: Análisis por *Western blot* de la inmunoreactividad de los anticuerpos monoclonales anti-FlgE contra Trx-FlgE.

Se utilizó una mezcla de los 3 anticuerpos para FlgE, 1: Trx-FlgE de la pella; 2: Trx-FlgE de el sobrenadante. St: Estándar preteñido *Protein Ladder* de Invitrogen.

Mediante la inmunización con Trx-FlgJ, se obtuvieron 2 anticuerpos monoclonales (8G8/E2 y 9A2/D8) los que se analizaron mediante ELISA con Trx-FlgJ. Los resultados indicaron que los anticuerpos tienen una gran reactividad obteniéndose títulos cercanos a 1/65.000.

En ensayos de *Western blot* se utilizó la proteína de fusión Trx-FlgJ, digerida con trombina y con enteroquinasa, ambas proteasas reconocen sitios de corte en la región de fusión entre Trx y la fusión FlgJ. La diferencia entre estas proteasas radica en la posición donde realizan el corte; en el caso de la trombina esta deja un segmento de 33 aa de fusión en la proteína flagelar, aumentando su tamaño en 3.630 Da. Por su lado, la enteroquinasa solo deja 4 aa de Trx en la proteína flagelar, lo que se traduce en adicionales 440 Da. Se puede apreciar en la Figura 23 que Trx- FlgJ, presenta además un corte interno que genera 2 polipéptidos; uno de 20.000 y otro de 14.000 Da aproximadamente.

Además se probó la reactividad frente a FlgJ obtenida desde el plasmidio pET-21a que carece de tioredoxina (Figura 24). Como se ve en las figuras, los anticuerpos son afines por FlgJ y no por Trx.

Los anticuerpos monoclonales seleccionados, se usaron para analizar por *Western blot* y ELISA la expresión de FlgE y FlgJ nativas en extractos de proteína total de *P. salmonis*.

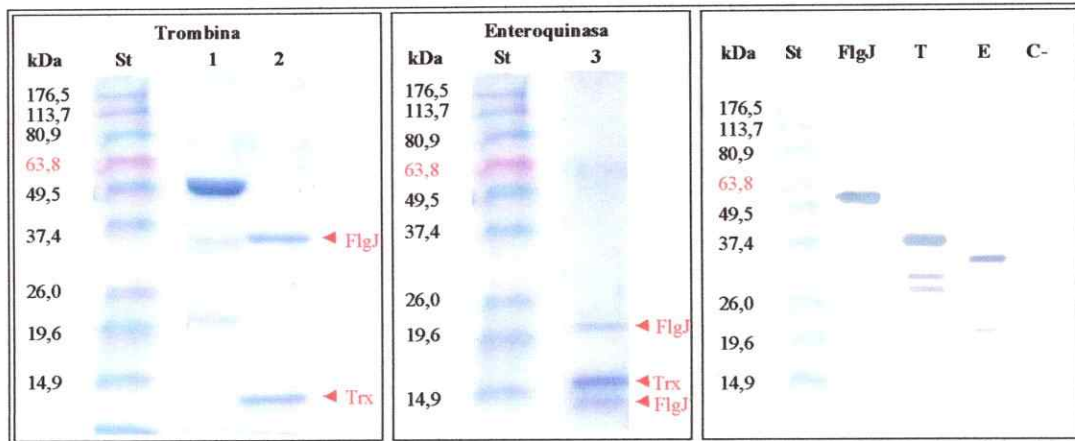


Figura 23: Análisis de la digestión de Trx-FlgJ con trombina y enteroquinasa, y análisis por *Western blot* de la inmunoreactividad del anticuerpo monoclonal anti-FlgJ 9A2 contra Trx-FlgJ. 1: Proteína de fusión Trx-FlgJ; 2: Trx-FlgJ digerido con trombina; 3: Trx-FlgJ digerido con enteroquinasa; FlgJ: Trx-FlgJ; T: Trx-FlgJ digerido con trombina; E: Trx-FlgJ digerida con enteroquinasa; C-: Control negativo con proteína irrelevante. St: Estándar preteñido *Protein Ladder* de Invitrogen.

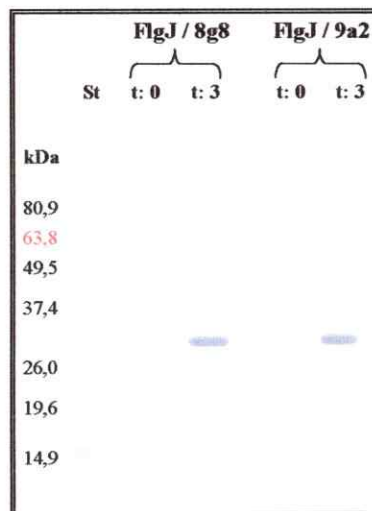


Figura 24: Análisis por *Western blot* de la inmunoreactividad de los anticuerpos monoclonales anti-FlgJ 9A2 y 8G8 contra FlgJ de pET-21a. Fracciones solubles previa (t: 0) y 3 horas después (t: 3) de inducidos desde BL12 pET-21a. St: Estándar preteñido *Protein Ladder* de Invitrogen.

6. ESTUDIO DE LA TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN DE *flgE* Y *flgJ* EN *P. SALMONIS*.

Una vez que se comprobó que los genes en estudio se encontraban intactos en el genoma de *P. salmonis*, y que se obtuvieron las proteínas recombinantes utilizadas para producir anticuerpos monoclonales, se procedió a determinar si existían estas proteínas nativas en extractos de *P. salmonis* incubados en diferentes condiciones. Así también se realizaron estudios a nivel de ARN para determinar si existían o no ARN mensajeros para las proteínas en estudio. Los extractos de ARN y proteínas se hicieron con cultivos de *P. salmonis* semipurificados e incubados a 16°C con agua de mar estéril o PBS-NaCl 200 mM para emular una condición extracelular en el mar, o bien, mantenidos en medio MEM como control, durante 30 minutos, 1 y 24 hrs, como se describe en Materiales y Métodos. No se tienen antecedentes bajo que condiciones ocurriría la expresión de un flagelo en *P. salmonis*, por lo tanto se decidió utilizar estas condiciones ya que de acuerdo a la manera en que ocurre la patología, estas podrían ser favorables para una inducción flagelar.

6.1. Estudio de la expresión de *flgE* y *flgJ* de *P. salmonis* mediante RT-PCR

Se extrajo el ARN de *P. salmonis* según lo explicado en Materiales y Métodos y la integridad del ARN total se comprobó mediante análisis de las bandas del ARN ribosomal 16S y 23S por electroforesis en geles de agarosa (Figura 25). Para eliminar la contaminación con sales y ADN genómico, el ARN se precipitó con LiCl y luego se trató con DNAsa (Figura 25). La concentración del ARN se determinó mediante la

absorbancia a 260 nm y la pureza mediante la relación de D.O.260/D.O.280, obteniéndose valores de 1 a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por preparación. La transcripción reversa se realizó utilizando hexámeros al azar o los partidores específicos FlgER4 y FlgJR3. Los controles negativos fueron sometidos a todos los pasos que requiere el RT-PCR, pero sin agregar transcriptasa reversa y/o partidores reversos. El ADNc obtenido fue usado como templado en una reacción de PCR con los partidores FlgEF3 y FlgER4 para *flgE* y los partidores FlgJFr y FlgJR3 para *flgJ*. En paralelo se realizó un PCR de ADN genómico con los mismos partidores antes mencionados para cada gen, como controles positivos de los fragmentos a amplificar en el RT-PCR.

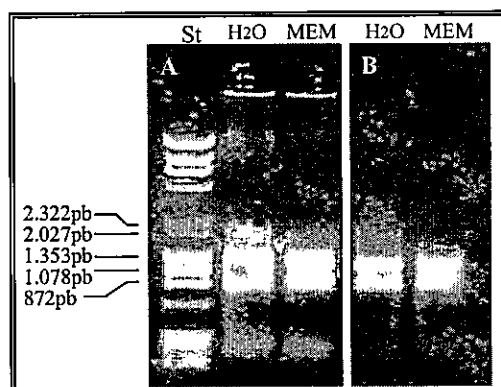


Figura 25: Análisis de la integridad del ARN de *P. salmonis* mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

A: ARN semipurificado por fenol caliente; B: ARN tratado con LiCl y DNase. ARN obtenido de *P. salmonis* tratado con agua de mar (H2O) o mantenido en medio MEM (MEM) durante 1hr a 16°C. St: Estándar λ /HindIII - Φ X174/HaeIII.

En la Figura 26 se muestra el resultado del RT-PCR con partidores específicos para *flgJ*, en ella se aprecia la amplificación de un fragmento predominante (*) que posee el tamaño esperado para el RT-PCR de *flgJ*, junto a otros de menor tamaño. En los

controles negativos no se obtienen fragmentos, lo que demostraría que el fragmento amplificado proviene de copias de ARNm. El fragmento amplificado con los partidores de *flgJ* se clonó en pGEM-T y se confirmó que su secuencia correspondía al segmento del gen estructural *flgJ* flanqueado por los partidores FlgJFr y FlgJR3 utilizados en la amplificación.

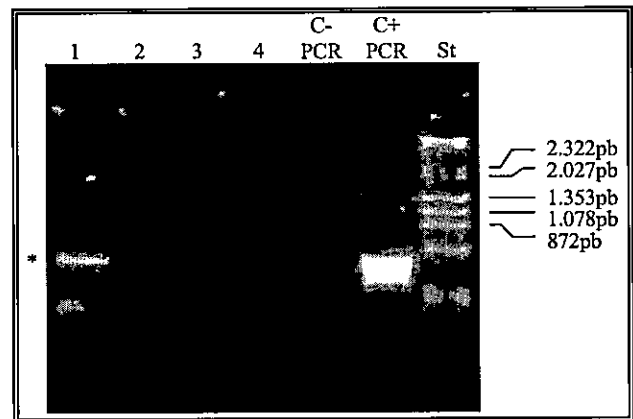


Figura 26: Análisis de fragmentos de ADN obtenidos por RT-PCR para *flgJ*, mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.
 1: RT-PCR de ARN de *P. salmonis*; 2: Control de RT-PCR sin transcriptasa reversa; 3: Control de RT-PCR sin partidore reverso; 4: Control de RT-PCR solo ARN y agua; C- PCR: Control PCR sin ADN de *P. salmonis*; C+ PCR: Control positivo PCR con ADN de *P. salmonis*; St: Estándar λ /HindIII – Φ X174/HaeIII.

En el caso de *flgE* no se obtuvo amplificado a partir de ARN en las condiciones utilizadas, pero si hubo amplificados usando ADN como control positivo lo que indica que el PCR se realizó correctamente (Figura 27). Estos resultados indican ausencia de ARN mensajero de *flgE* en las condiciones de cultivo utilizadas. Cabe destacar que los experimentos de transcripción reversa de *flgE* y *flgJ* se hicieron en paralelo usando la misma mezcla de reacción, lo que indica que la falta de amplificación de *flgE* no se debe

a un error experimental en la transcripción reversa. También cabe señalar que los experimentos se repitieron más de 3 veces.

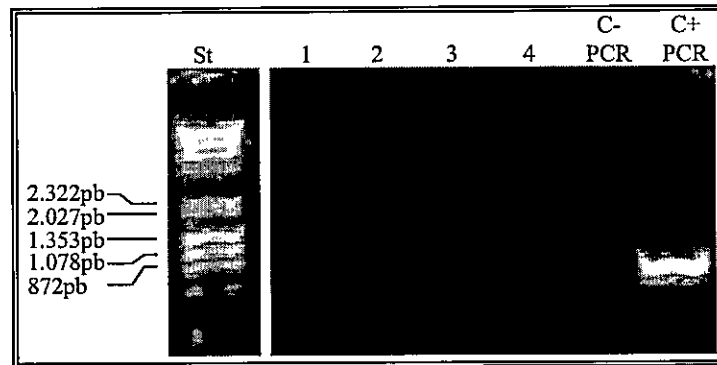


Figura 27: Análisis de fragmentos de ADN obtenidos por RT-PCR para *flgE*, mediante electroforesis en gels de agarosa al 2%.

1: RT-PCR sobre ARN de *P. salmonis*; 2: Control RT-PCR sin transcriptasa reversa; 3: Control RT-PCR sin partidor reverso; 4: Control RT-PCR solo ARN y agua; C- PCR: Control PCR sin ADN de *P. salmonis*; C+ PCR: Control positivo PCR con ADN de *P. salmonis*; St: Estándar λ /HindIII – Φ X174/HaeIII.

6.2. Análisis de FlgE y FlgJ en extractos proteicos de *P. salmonis* mediante *Western blot*

Otra manera de estudiar la expresión de *flgE* y *flgJ* es detectar la presencia de las proteínas FlgE y FlgJ en extractos proteicos de *P. salmonis*. Se prepararon extractos de proteína totales de las bacterias incubadas en las diferentes condiciones mencionadas y se analizó la expresión de FlgE y FlgJ por *Western blot* con los anticuerpos monoclonales obtenidos con las respectivas recombinantes, mientras que el segundo anticuerpo correspondía a un anti-IgG acoplado a peroxidasa. En la Figura 28 se aprecia una autoradiografía correspondiente a un *Western blot* de *P. salmonis* incubado en agua de mar durante 1 hora a 16°C, y como se aprecia, tan solo se pueden ver los controles positivos correspondientes a FlgE y FlgJ recombinantes. En el resto de las condiciones

estudiadas los resultados eran similares. Nunca se logró visualizar alguna reacción positiva para las proteínas FlgE y FlgJ de *P. salmonis*.

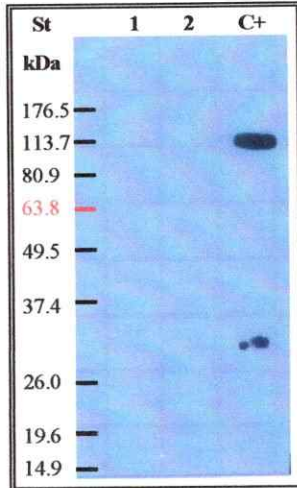


Figura 28: Análisis por *Western blot* de la presencia de FlgE y FlgJ en extractos totales de *P. salmonis*.

1: Extracto proteico insoluble de *P. salmonis* (30 μ g); 2: Extracto proteico soluble de *P. salmonis* (25 μ g); C+: Control positivo que posee las recombinantes FlgE y FlgJ. Se utilizó una mezcla de anticuerpos monoclonales anti-FlgE y anti-FlgJ como primer anticuerpo. St: Estándar preteñido *Protein Ladder* de Invitrogen.

Como los resultados de los *Western blot* no demostraron la presencia de FlgE y FlgJ en los extractos, se decidió intentar la técnica de inmunoprecipitación que tiene mayor sensibilidad para detectar proteínas que el *Western blot* directo, debido a que concentra selectivamente las proteínas en estudio desde los extractos totales.

6.3. Análisis de FlgE y FlgJ en extractos de *P. salmonis* mediante inmunoprecipitación.

La inmunoprecipitación se realizó para cada una de las proteínas flagelares en estudio, a partir de 0,6 mg de proteínas de un extracto total de *P. salmonis* incubadas con agua de mar durante 1 hr a 16°C. Los anticuerpos utilizados para inmunoprecipitar FlgE o FlgJ correspondieron a una mezcla de anticuerpos anti-FlgE (2E9/F12, 2G3/F11 y 5A2/G6) o anti-FlgJ (8G8/E2 y 9A2/D8) respectivamente. Luego que los extractos fueron

sometidos a la inmunoprecipitación con los anticuerpos específicos, estos se analizaron por *Western blot* como se describe en Materiales y Métodos. Se cargó el total de la muestra inmunoprecipitada en cada carril. En el análisis por *Western blot* también se utilizó una mezcla de los monoclonales anti-FlgE o anti-FlgJ respectivamente, y como segundo anticuerpo, se utilizó un anticuerpo contra IgG Fc específico conjugado con peroxidasa. Los resultados de este experimento no resultan concluyentes (datos no mostrados) debido a que no se puede apreciar una banda concluyente que corresponda a FlgE o FlgJ, por otro lado el control positivo, que corresponde a una proteína de membrana constitutiva de *P. salmonis* de 31kDa, que fue sometida al mismo proceso de inmunoprecipitación, si muestra una banda intensa lo que confirma su presencia y valida el ensayo.

IV. DISCUSIÓN

Los genes *flgE* y *flgJ* de *P. salmonis* fueron aislados y clonados con éxito, demostrando su presencia en el genoma de *P. salmonis*. Se confirmó que las secuencias codificadoras de estos genes no presentaban ningún codón de término ni inserción que interrumpiese su marco de lectura. En el caso de *flgE*, que poseía una gran inserción de aproximadamente 1.000 pb, esta mantenía un único marco de lectura abierto, y fue posible su expresión a nivel proteico. El trabajo de esta tesis forma parte de un estudio del laboratorio que involucra también a otros genes flagelares y es interesante mencionar que se aislaron y secuenciaron los genes *flgC*, *flgD*, *flgE*, *flgF*, *flgG*, *flgH*, *flgI* y *flgJ* (resultados no mostrados). Estos genes se encontraban dispuestos en este orden en el genoma de *P. salmonis*, confirmando que en esta bacteria se mantiene la misma organización de operón que se ha observado en otras bacteria flageladas.

El haber encontrado genes flagelares como *flgE* y *flgJ* abrió la posibilidad de que *P. salmonis* pudiera formar un flagelo funcional en algún momento de su ciclo de vida, ya sea en momentos de estrés o simplemente para movilizarse en el mar. Desde el punto de vista molecular, existía la posibilidad de que estos genes sólo fueran remanentes de genes que ya no son utilizados por la bacteria, y que estaban en su genoma sólo vestigialmente, pero al ser clonados y secuenciados se encontró que estos tenían sus secuencias nucleotídicas en perfecto estado como para poder codificar para las respectivas proteínas. Existen ejemplos de bacterias que han sido descritas inicialmente como no mótils, pero que luego se ha descubierto que son capaces de formar flagelos

en algunas condiciones de cultivo. Tal es el caso del patógeno humano *Shigella*, descritas inicialmente como bacterias no móviles, en cuyo genoma se identificaron genes flagelares que fueron denominados “crípticos” (Tominaga y col., 1994). Sin embargo en 1995, Girón descubrió que *Shigellas* extraídas de cultivos clínicos frescos, formaban flagelos y eran móviles en medios con bajas concentraciones de agar (Girón, 1995). El mismo fenómeno se ha visto en *Aeromonas salmonicida*, bacteria que infecta truchas y salmones, la cual fue descrita inicialmente como no flagelada y no mótil, sin embargo en 1997 se descubrió que poseía 2 genes para flagelina y que es capaz de expresar flagelos en un número reducido de la población bacteriana (Umelo y Trust, 1997). Sin embargo existen casos como el de *Bordetella pertusis* que presenta todos los genes necesarios para la formación de un flagelo pero no es mótil, aunque otras *Bordetellas* si lo son (Leigh y col., 1993), lo cual podría deberse al locus *bvgAS* el cual inhibe la formación de flagelos en *Bordetellas* constitutivamente flageladas bajo determinadas condiciones (Akerley y col., 1992).

Si los genes de *P. salmonis* estuvieran codificando para expresar un flagelo, la formación de esta estructura sería gatillada por algún estímulo que se encuentre en el agua de mar, o tal vez esta regulación está dada por la pérdida del flagelo al entrar la bacteria en una célula hospedadora. Si este fuera el caso, la inducción del flagelo se vería reprimida en el interior del salmón y en el agua de mar se formaría naturalmente. Considerando estas posibilidades, en los experimentos realizados en esta tesis se utilizaron *P. salmonis* tratadas con agua de mar. Como controles se utilizaron bacterias que fueron mantenidas en medio de cultivo. En las condiciones estudiadas no se logró observar bacterias flageladas, aun cuando un pequeño porcentaje de la población de

bacterias en agua de mar presentaba estructuras sospechosas que podrían sugerir la presencia de un flagelo, los resultados de microscopía electrónica sugieren más bien que estas se deberían a prolongaciones de la membrana externa dañada.

Es sabido que para la formación de un flagelo se requiere de la expresión de más de 40 genes, lo que conlleva a un gran gasto energético. Por este motivo sería una gran ventaja para las bacterias poseer un alto grado de regulación en cuanto a la expresión del flagelo. La mayoría de las bacterias flageladas parecieran no modular la expresión de el flagelo, sin embargo, existen algunas que si lo hacen. Por ejemplo *E. coli* no forma flagelo al ser cultivada en medios ricos en glucosa y otros catabolitos (Macnab, 1992), y en la bacteria *Caulobacter crescentus* la formación de flagelo solo ocurre en una etapa de su ciclo de vida (Gober y Shapiro, 1991). Si efectivamente *P. salmonis* formara un flagelo el cual aun no ha sido descubierto, este podría participar en el fenómeno de transmisión horizontal de este organismo en salmones en cautiverio, por que si bien se sabe que este fenómeno ocurre, no se sabe si es por causa de vectores o simplemente esta bacteria llegaría “nadando” hasta su hospedador.

Además, el flagelo ha sido descrito como un sistema muy complejo que no esta solamente involucrado en la motilidad de las bacterias, sino que también puede estar involucrado en la adherencia a sus hospedadores e incluso, puede funcionar como secretor de factores de virulencia, y por consiguiente está directamente relacionado con la magnitud de la infectividad de una bacteria.

En este contexto, se dice que el flagelo es una estructura tan compleja, que la teoría de evolución únicamente por ventajas selectivas, queda disminuida frente a una estructura de estas cualidades (Macnab, 1978). Es más, la homología que presentan muchas de las

proteínas involucradas en la formación del flagelo, con otras no flagelares, sugieren que el flagelo se habría formado desde sistemas ancestrales con otras funciones distintas a la motilidad (Matzke, 2003). Se cree que el flagelo habría derivado desde otras estructuras más primitivas presentes en las bacterias por fenómenos de cambios de función y de unión entre 2 o más estructuras primitivas, esto debido a que una estructura tan compleja no puede haberse creado por cambios sutiles y mejoramiento gradual de una sola función (Matzke, 2003). Fenómenos de cooperación entre estructuras primitivas, se ha visto en muchos sistemas multicomponentes muy estudiados, como el ciclo de Krebs (Meléndez-Hevia y col., 1996) o el sistema inmune de vertebrados (Muller y col., 1999; Pasquier y Litman, 2000). Incluso existen quienes dicen que el flagelo y la “motilidad por deslizamiento” serían homólogas ya que esta última sería una variación del cuerpo basal del flagelo, pero sin filamento, y que vendrían de un ancestro en común (Cavalier-Smith, 2002a).

Por lo tanto, si bien en esta tesis no fue posible comprobar la existencia de un flagelo en *P. salmonis* bajo las condiciones probadas, la existencia de al menos 36 genes flagelares en el genoma de *P. salmonis* no parece ser un resabio evolutivo ya que se confirmó que estos genes estudiados en detalle presentan una secuencia codificante intacta y han podido ser expresados como proteínas recombinantes, lo que sugiere que estos podrían ser expresados por la bacteria en alguna etapa, aunque su función es aún incierta. En este sentido, los resultados del RT-PCR demostraron un cierto grado de expresión de *flgJ* pero no así su traducción a proteína. Ya que este estudio forma parte de un trabajo del laboratorio que involucraba otros genes flagelares de *P. salmonis*, es posible mencionar que de 5 genes flagelares estudiados por RT-PCR, 4 son transcritos, entre estos genes se

encuentran *flgC*, *flgD* y *flgG* (aparte de los estudiados en esta tesis), los cuales codifican para proteínas estructurales del bastón del cuerpo basal (*flgC* y *flgG*) y para una proteína que ensambla y estabiliza el codo flagelar (*flgD*) (Ugarte, 2004). Por esto se puede postular que el hecho de haber encontrado mensajeros y no las respectivas proteínas podría deberse a algún tipo de regulación postranscripcional, que impide la correcta traducción a proteína de estos genes que componen el cuerpo basal del aparato flagelar. En este sentido se sabe que para la formación de un flagelo funcional se desencadena una cascada de eventos muy bien regulada y todas sus partes deben ser expresadas en este orden exacto, y cuando uno de esos pasos está alterado, toda la producción del flagelo se detiene. Por ejemplo si la proteína FlgM (factor anti σ^{28}) no es secretada por el complejo del cuerpo basal-gancho, el flagelo no completa su síntesis (Chilcott y Hughes, 2000). Por otro lado, podría existir algún sistema de regulación postranscripcional, como lo es la formación de estructuras secundarias por parte del ARNm (Jones y col., 1989; Chan y col., 1998) que puedan impedir la correcta interacción con la ARN polimerasa, impidiendo la terminación del transcrito, o bien impidiendo la correcta traducción por parte de los ribosomas. Se sabe también que existe regulación de la transcripción por productos anteriores en la cascada de síntesis del flagelo, y que existen distintas zonas promotoras para los operones, que regulan la expresión de genes flagelares de expresión más tardía (Anderson y Newton, 1997; Bonifield y col., 2000, 2003). En el caso de FlgE, para el cual no fue posible encontrar un ARNm, tal vez se deba a una transcripción incompleta del mensajero por problemas con su estructura secundaria, y si bien se sabe que esta proteína presenta una gran regulación postranscripcional (Bonifield y col.,

2000) llegando en ocasiones a generar gran cantidad de mensajero, sin expresar la proteína, no se tiene conocimiento de que esta no sea transcrita junto con el resto del operón. Como se mencionó anteriormente existen otros genes flagelares estudiados en el laboratorio, que si presentaban ARN mensajeros, incluso estaba presente el mensajero de *flgG* el cual está ubicado río abajo de *flgE*, lo cual es explicable en parte debido a que el gen *flgG* es parte de otra unidad transcripcional, la cual comienza desde *flgF* (Long y Louis, 1997; Dingwall y col. 1992). En el caso de *P. salmonis* se encontró una secuencia sigma 54 luego del gen estructural *flgE*, lo que permitiría una organización similar a la descrita.

Como ya se mencionó, es posible que *P. salmonis* no forme un flagelo como tal, pero no se puede descartar que *P. salmonis* forme alguna estructura similar en algún momento de su ciclo de vida, ya sea un sistema de secreción tipo III, o algún tipo de maquinaria para adherirse a sus huéspedes. Como ejemplo de esto, recientemente se ha descrito que *P. salmonis* formaría extensiones de membrana para adherirse a las ovas previo su ingreso a ellas (Larenas y col., 2003), lo que podría fortalecer la teoría del uso alternativo de estos genes flagelares.

V. CONCLUSIONES

- Mediante estudios de microscopía se detectaron estructuras prolongadas, aparentemente derivadas de la membrana celular. Sin embargo ninguna de estas pudo ser identificada como estructuras flagelares.
- El aislamiento de los genes *flgJ* y *flgE* de *P. salmonis*, de 834 y 2.196 pares de bases respectivamente, demostró que estos genes están presentes en su genoma y su secuencia codificante está intacta para su transcripción y traducción a proteínas.
- La expresión de las proteínas recombinantes FlgJ y FlgE fue abundante y correspondían a los tamaños esperados.
- Si bien los anticuerpos monoclonales para las proteínas recombinantes en cuestión, resultaron específicos para las mismas, no fue posible encontrar ni FlgJ ni FlgE en extractos celulares de *P. salmonis* mediante el uso de dichos monoclonales.
- Los RT-PCR realizados demostraron la presencia de transcritos para *flgJ*, pero no así para *flgE*. Esta proteína podría estar formando parte de un sistema de secreción tipo III, o de alguna estructura similar.
- La presencia de mensajero para *flgJ* pero ausencia de respectiva proteína, sugiere una regulación postranscripcional para la expresión de este gen flagelar.
- Si bien no fue posible detectar la presencia de un flagelo en *P. salmonis* en las condiciones de cultivo probadas, no se puede descartar que los genes estudiados si se utilicen en algún momento del ciclo de vida de la bacteria, ya sea como flagelo, sistema de secreción tipo III o alguna estructura similar que sirva para la adherencia o infectividad de la bacteria.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Aiba, H., Adhya, S., De Combrugghe, B. (1981). Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* 256: 11905-11910.
- 2) Akerley, B.J., Monack, D.M., Falkow, S., Miller, J.F. (1992). The *bvgAS* locus negatively controls motility and the synthesis of flagella in *Bordetella bronchiseptica*. *J. Bacteriol.* 174: 980-990.
- 3) Alvarado, V., Schäfer, W., Enríquez, R., Monrás, M., Cubillos, V., Farías, C., Alberdi, A. (1990). Síndrome del salmón coho (S.S.C.), nueva enfermedad de salmonídeos cultivados en fase de agua de mar en Chile. Situación actual. *Patología Animal* 4: 10-13.
- 4) Anderson, D.K, Newton A. (1997). Posttranscriptional regulation of *Caulobacter* flagellin genes by a late flagellum assembly checkpoint. *J. Bacteriol.* 179: 2281-2288.
- 5) Asociación de la Industria del Salmón de Chile A.G. [en línea] <<http://www.salmonchile.cl/>> link estadísticas producción nacional. [consulta: 10 Mayo 2003]
- 6) Binder, S. (1995) Mitochondrial nucleic acid purification and analysis. *Methods. Mol. Biol.* 49: 383-389.
- 7) Bonifield, H., Yamaguchi, S., Hughes, K. (2000). The flagellar hook protein, FlgE, of *Salmonella enterica* serovar typhimurium is posttranscriptional regulated in response to the stage of flagellar assembly. *J. Bacteriol.* 182: 4044-4050.
- 8) Bonifield, H., Hughes, K. (2003). Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism. *J. Bacteriol.* 185: 3567-3574.
- 9) Bravo, S., Campos, M. (1989). Síndrome del Salmón Coho. *Chile Pesquero* 54: 47-48.
- 10) Bravo, S. (1994). Piscirickettsiosis in freshwater. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 14: 137-138.
- 11) Brocklebank, J.R., Speare, D.J., Armstrong, R.D., Evelyn, T. (1992). Septicemia in farmed Atlantic and chinook salmon due to a rickettsia-like agent. *Fish Health Section/American fisheries Society. Newsletter* 22:6.

- 12) Burzio, L.O., Burzio, V.A., Silva, T., Burzio, L.A., Pardo, J. (1997). Environmental bioadhesion: themes and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 309-12.
- 13) Cavalier-Smith, T. (2002). The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 7-76.
- 14) Chan, V.L., Louie, H., Joe, A. (1998). Expression of the *flgFG* operon of the *Campylobacter jejuni* in *Escherichia coli* yields an extra fusion protein. *Gene.* 225: 131-141.
- 15) Chilcott, G., Hughes, K. (2000). Coupling of Flagellar Gene Expression to Flagellar Assembly in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol. and Molec. Biol. Rev.* 64: 694-708.
- 16) Cubillos, V., Farías, C., Alberdi, A., Alvarado, V., Schäfer, W., Monrás, M. (1990). Características anatomopatológicas del síndrome del salmón coho (S.S.C.), nueva enfermedad de los salmonídeos. *Patología Animal* 4: 14-17.
- 17) Dingwall, A., Garman, J.D., Shapiro, L. (1992). Organization and ordered expression of *Caulobacter* genes encoding flagellar basal body rod and ring proteins. *J. Mol. Biol.* 228:1147-1162.
- 18) Fryer, J.L., Lannan, C., Garcés, L., Larenas, J., Smith, P. (1990). Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathol.* 25: 107-114.
- 19) Fryer, J.L., Lannan, C.N., Giovannoni, S.J., Wood, N.D. (1992). *Piscirickettsia salmonis* gen. nov.; sp. nov. the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 120-126.
- 20) Fundación Terram, Análisis de políticas públicas, Serie APP N°12, Agosto 2002.
- 21) Girón, J.A. (1995). Expression of flagella and motility by *Shigella*. *Mol. Microbiol.* 18: 63-75.
- 22) Gober, J.W., Shapiro, L. (1991). Temporal and spatial regulation of developmentally expressed genes in *Caulobacter*. *Bioessays* 13: 277-283.
- 23) Guiliani, N., Bengrine, A., Borne, F., Chippaux, M., Bonnefoy, V. (1997). Alanyl-tRNA synthetase gene of the extreme acidophilic chemolithoautotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* is highly homologous to *alaS* genes from all living kingdoms but cannot be transcribed from its promoter in *Escherichia coli*. *Microbiol.* 143: 2179-2187.

- 24) Grossart, H.P., Steward, G.F., Martinez, J., Azam, F. (2000) A simple, rapid method for demonstrating bacterial flagella. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3632-3636.
- 25) Hirano, T., Minamino, T., Namba, K., Macnab, R. (2003). Substrate Specificity Classes and the Recognition Signal for *Salmonella* Type III Flagellar Export. *J. Bacteriol.* 185: 2485-2492.
- 26) Jones, C.J., Homma, M., Macnab, R.M. (1989), L-, P-, and M-ring proteins of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*: gene sequences and deduced protein sequences. *J. Bacteriol.* 171: 3890-3900.
- 27) Kent, M.L. (1992). Diseases of seawater netpen-reared salmonid fishes in the Pacific northwest. *Canadian Special Publication and aquatic Sciences.* 116: 17-19.
- 28) Kuzyk, M.A., Thorton, J.C., Kay, W.W. (1996). Antigenic characterization of the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Infec. and Immun.* 64: 5205 - 5210.
- 29) Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 30) Lannan, C., Fryer, J. (1994). Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis*. *J. Fish Dis.* 17: 545-548.
- 31) Larenas, J., Hidalgo, L., Garcés, H., Fryer, J.L., Smith, P. (1995). Piscirickettsiosis: Lesiones en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) infectados naturalmente con *Piscirickettsia salmonis*. *Avances en Ciencias Veterinarias* 10: 53-58.
- 32) Larenas, J.J., Bartholomew, J., Troncoso, O., Fernandez, S., Ledezma, H., Sandoval, N., Vera, P., Contreras, J., Smith, P. (2003). Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and *in vitro* study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. *Dis. Aquat. Org.* 56:25-30.
- Leigh, A.F., Coote, J.G., Parton, R., Duggleby, C.J. (1993). Chromosomal DNA of both flagellate and non-flagellate *Bordetella* species contains sequences homologous to the *Salmonella* H1-flagellin gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 111: 225-231.
- Ng, C. V., Louie, H., Joe, A. (1998). Expression of the flgFG operon of *Bacterium jejuni* in *Escherichia coli* yields an extra fusion protein. *Gene* 225:131-136.
- R.M. (1978). Bacterial motility and chemotaxis: the molecular biology of a bacterium. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 5: 291-341.
- M. (1992). Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 1-29.

- 37) Macnab, R.M. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:77-100.
- 38) Manson, M.D., Tedesco, P., Berg, H.C., Harold, F.M., Van der Drift, C. (1977). A protonmotive force drives bacterial flagella. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 3060-3064.
- 39) Matzke, N.J. (2003). Evolution in (Brownian) space: a model for the origin of the bacterial flagellum. Artículo de Talk Reason, 10 de Noviembre, 2003. [en línea] <http://www.talkreason.org/articles/flag.pdf> [consulta 5 de Enero 2004]
- 40) Meléndez-Hevia, E., Waddell, T.G., Cascante, M. (1996). The puzzle of the Krebs citric acid cycle: assembling the pieces of chemically feasible reactions, and opportunism in the design of metabolic pathways during evolution. *J. Mol. Evol.* 43: 293-303.
- 41) Minamino, T., Macnab, R. (1999). Components of the *Salmonella* Flagellar Export Apparatus and Classification of Export Substrates. *J. Bacteriol.* 181: 1388-1394
- 42) Muller, W.E., Blumbach, B., Muller, I.M. (1999). Evolution of the innate and adaptive immune systems: relationships between potential immune molecules in the lowest metazoan phylum (Porifera) and those in vertebrates. *Transplantation.* 68: 1215-1227.
- 43) Olsen, A.B., Evensen, O., Speilberg, L., Melby, H.P., Hästein, T. (1993). "Ny" laksesykdom forarsaket av rickettsie. *Norsk Fiskeoppdrett* 12:40-41.
- 44) Ormonde, P., Hörstedt, P., O'Toole, R., Milton, D.L. (2000). Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* 182: 2326-2328.
- 45) Pasquier, L.D., Litman, G.W., (Eds.), (2000). Origin and Evolution of the Vertebrate Immune System (Series: Current Topics in Microbiology and Immunology). Springer, Berlin.
- 46) Rodger, H.D., Drinan, E.M. (1993). Observation of a rickettsia-like organism in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Ireland. *J. Fish Dis.* 16:361-369.
- 47) Salinas, G., Contreras, J., Smith, P., Larenas, J. (1997). Horizontal transmission and excretion of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water condition. En: *VIII International Conference Diseases of Fish and Shellfish.* Abstracts Book. Heriot-Watt University, Edinburgh, European Association of Fish Pathologists. pp. P-057.

- 48) Sambrook, J., Russell, D.W., Sambrook, J. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory*
- 49) Smith, P.A., Ojeda, P., Pizarro, P., Contreras, J.R., Larenas, J.J. (1998). Entry portal of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Third International Symposium of Aquatic Animal Health*. Baltimore, Maryland, USA.
- 50) Tominaga, A., Mahmoud, M.A., Mukaihara, T., Enomoto, M. (1994). Molecular characterization of intact, but cryptic, flagellin genes in the genus *Shigella*. *Mol. Microbiol.* 12: 277-285.
- 51) Ugarte, F. (2004). Clonamiento de los genes *flgC* y *flgD* de *Piscirickettsia salmonis* y estudio de su expresión *in vivo*. Tesis de pregrado para Ingeniero en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 52) Umelo, E., Trust, T.J. (1997). Identification and molecular characterization of two tandemly located flagellin genes from *Aeromonas salmonicida* A449. *J. Bacteriol.* 179: 5292-5299.
- 53) Young, G.M., Schmiel, D.H., Miller, V.L. (1999a). A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96: 6456-6461.
- 54) Valenzuela, P.D.T., Burzio, L.O., Roseblatt, M., Yudelevich, A., Bernales, S., Engel, E., Erazo, E., Hernández, C., Huaracan, B., Araya, P., Martínez, R., Miquel, A., Morales, C., Soza, C., Villegas, J., Wilhelm, V. (2001) Sequence and Applications of the *Piscirickettsia salmonis* Genome. *Biol. Res.* 34: r17.

VII. ANEXO 1

Secuencia nucleotídica del gen *flgE* de *Piscirickettsia salmonis* (2.196pb)

atgtcatttaacatcgctctaagtgggtttacaagcatcatcacaagatttaagtgtgat
tagtaataatattgctaatacgctcaaccattgggttttaaaaagtctcgtgcagaattcg
gtgacgtctatcaaacctcaggttctggtagtgctgtgggttctggagtagagaactta
agtgtttcgcgaagattttggccaaggaccacaaaaaaatacgggtagaaatcttgattt
aagaattaatgggtgaaggctttttccgtagtgagtgatgggtgcgctaaaatacagcc
gcgtaggtgcatttcatttggataaagatgggttgattgtgaactctttggaacataat
ttaacaggctttactgtggatgaggatgggtgtattaaccagtgcggtggtaatttgca
aattagcactgcaaatcaacagcctaaagcgacagataaatattgtgttagaaatgaact
tggatgccgaagttgatattccgacacttgagtttcagcgtggctttaccgcagataat
ccaccagataccaatagctataataaattagaaaatacgggtgggttatgattctcttg
caccagtcataatcttatcgaagtattttgtcaagacgaatattgataaccgctgggatg
tttatgttggatttgatggcaatgatgttacacctgaggcggcggcggctcctgcggtg
acagtgccgatacctgggaacccaaattctggtaataatcaaggcagtgaccctatccc
taagccgaactctgcagattggcaaaaactattctcctttaccgtggctcttgataatt
taggtaaatttattgccaatgacccaaatgtgccgcccacaaattattacaaacgocgatc
gcttattcacgctcgacaaatgcgtatgatgggtctaaccgcccgggaagtgaagttt
aacggtaacgcccgcgggttaataatccatggaagatgggtatcaaccgttacagaccct
caaccctaaaaggacccaatggcaataatcttgcgattgagggtccgtaatgccagtggt
ggttttacgtcttataatgttgcagcaatgactggctcaggtaatcccaccgcacgccc
aatctcggatgcaattaatgcaacgggtacactgaatacgcctagttgatgcgatgctg
atactgagtttgaatttggagagtagcttttctggaaccgctgtagcaacatttgattta
accgcagccgggactaatgcaacggcaacaagtaccattaccattccagcaggaacgaa
cgtggcgggctgttagcggcaattaatgcagaaactgcaacgacaagcgtgtatgcgg
tgtctcgtgatattgctggggatacggcgaatgttaatcgtaagcgtattgtcttggtt
tcggatgggttatgatagtagcgggtacgcctttagggtgcgacggcgcgatggatttatctgg
ccataatattaccttgacgatgactgggacttcaacaacaccgttggtttcaaaattatg
atacgtcatcaaccggtcttgcgtaaacgcaacgtgggtgcgggtgactgtccgtgccgaa
accgtctctgctgactttaagttctctggcagtgatgcgaatgccatgggggtttgaaac
tggacgcatttatgaagctgtgggtggatcaagaaaactcagatgttatttcaattaact
ggacgccaacaacggcgggacctgcgaccaagccgacagacccacagcaaatattatt
aatatggcaacttcaacgcagatgggtgatccgtttgctgttacggataaaaacccaaga
tgggtttaccacgggtcggctctccggtattgaagtgataaatcaggcattatcttcg
ccagatacagtaatggccagctctagcacgctaggtaaagtaggcttagtgaattttccg
aatgaaaatgggttatcgctgtcggtaataactcagtggggtggaaagttttagttcagg
tcagcctcttattgggtgagccacaaacggcaaaactttggctctattgaggcactgactt
tagaagactctaattgttgatttaacgcaagagttgggtatcgatgattattgccagcgt
aatctccaggtaatgcgcaaacgattcgaacttctgatcaagttacacaaacgattat
taatattcgtaa

Secuencia aminoacídica de la proteína FlgE de *Piscirickettsia salmonis* (731aa)

MSFNIALSGLQASSQDLSVISNNIANASTIGFKKSRAEFGDVYQTSGSGSAVGSQVQNL
SVSQDFGQGPQKNTGRNLDLRINGEGFFRMSDDGALKYSRAGAFHLDKDGLI VNSLEHN
LTGFTVDEDGVLTSAVGNLQISTANQQPKATDNI VLEMNLDAEVDI PTLEFQRGFTADN
PPDTNSYNKLENTVVYDSLGTSHILSKYFVKTNIDNRWDVYVGIDGNDVTPEAAAAPAV
TVPIPGNPNSGNNQGS DPI PKPNSADWQNYSPFTVVFDNLGKFIANDPNVPPKLLQTP I
AYSPSTNAYDGSNPPGSESLTVTPAVNNPWKMVSTVTD PSTLKGPNGNLAI EVRNASG
GFTSYNVAAMTGS GNPTARRI SDAINATGTLNLTLDAYAYTEFEFGEYFSGTAVATFDL
TAAGTNATATSTITIPAGTNVAGVLAAINAETATTSVYAVSRDIAGDTANVNRKRI VLV
SDGYDSTGTP LGATAMDLSGHNITLTMGTSTTPLFQNYDTSSTGLALTQRGAVTVRAE
TVSADFKFSGSDANAMGFETGRI YEAVVDQENS DVISINWTPTTAGPATKPTDPQQII I
NMATSTQYGD PFAVTDKTDGFTTGRLSGIEVDKSGI IFARYSNGQSSTLGKVLVNF P
NENGLSPVGNTQWVESFSSGQPLIGEPQTANFGSIEAL TLEDSNVDLTQELVSMI IAQR
NFQANAQTIRTS DQVTQTI INIR

Secuencia nucleotídica del gen *flgJ* de *Piscirickettsia salmonis* (834pb)

atggatgcgattcctacacagcagcgttagtaatgcgtttgatttttccgcatttcaaaa
actaaaagccaatgtaataaagctggccaggaagataaaacattgcgggcagttgccg
agcaatttgaatctatattttatataaagctggcactagatagcatgagaaaagccagtaa
gagttagaaaagtgatttatttaaaagctcgtaccaagacttttatacaagatctatatga
tgaccagtttaagtttaacttagccaataatggcggcattggtttgacggatgccttag
tccgttatttatcgcagcaagcgggttctgaacagggtgtaaatgttaataacacactg
aaaaaagagcaatcagcacaggatgggcaaaactgcatttaagcaattaatagcaacggt
agagccatatcttgatgatttatcggaaaaattagggtgtgagtagaaaagccatattaa
gccatgccatcgttgaaaccggttggggtagtactaatatgatgaaaagaggacattta
tccaactcaaatcaggtaaatattttggcagtcgcgcagcgtttggcttagaggtaaa
ccaaggaagtgggggtggaggtgggttttttaaccgttgatgaagcggtgagtcattatg
atacatttttagaaaaatatttaaatgtaaatcaacgcgataataaaattgaacctgga
aaagtaagaaaatagccgatgaagatttttttaaatatttcaatcgacactgtatcc
aaaagagccagaaaaattgcagcaatttttaactggttgcaaaaagttccttattaaatg
gagtttaa

Secuencia aminoacídica de la proteína FlgJ de *Piscirickettsia salmonis* (277aa)

MDAIP TQHVSNAFDFSAFQK LKANVNKAGQEDKTLRAVAEQFESI FIKMALDSMRKASK
ELESDFLKSSYQDFYQDLYDDQLSLNLANNGGIGLTDALVRYLSQQAGSEQVLNVNNTL
KKEQSAQDGQTAFKQLIATLEPYLDDLSEKLGVSRKAILSHAI VETGWGSTNMMKRGHL
SNSNQVNLFGSPQRFGLEVNQSGGGGGFLTVDEAVSHYDTFLEKYLNVNQRDNKIEPG
KVKKIAD EDFFKFIQSTLYPKEPEK LQQFLTVAKSSLLNGV