



“CLONAMIENTO DE LOS GENES *flgC* y *flgD* DE PISCIRICKETTSIA SALMONIS Y ESTUDIO DE SU EXPRESIÓN *IN VIVO*”.

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

FERNANDO ANDRES UGARTE VERDUGO

Directores de Memoria de Título

Dr. Pablo Valenzuela Valdés

Dra. Vivian Wilhelm Bavestrello

Dr. Mario Roseblatt Silver
Prof. Patrocinante

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Carlos Jerez Guevara
Presidente Comisión

Dr. Herman Silva Ascencio

Santiago de Chile, _____ 2004



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

CLONAMIENTO DE LOS GENES *flgC* y *flgD* DE
PISCIRICKETTSIA SALMONIS Y ESTUDIO DE SU
EXPRESION *IN VIVO*

MEMORIA DE TITULO PARA OPTAR AL TITULO PROFESIONAL DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

FERNANDO ANDRES UGARTE VERDUGO

PROFESOR PATROCINANTE: MARIO ROSEMBLATT SILBER

DIRECTORES DE TESIS: PABLO VALENZUELA VALDES

VIVIAN WILHELM BAVESTRELLO

Santiago, Chile 2004

Dedicado a...

Mi madre por su apoyo incondicional y por todo lo que me ha enseñado en la vida. A mi familia que siempre ha estado a mi lado ayudándome. A mi amorcito por su paciencia, comprensión y amor durante todo este tiempo, y a mi Knight porque siempre estuvo a mi lado acompañándome y dándome alegrías.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a los Doctores Pablo Valenzuela y Mario Roseblatt por haberme permitido realizar esta tesis en su laboratorio, y por contribuir en gran medida en mi formación profesional.

Asimismo quisiera agradecer a la Doctora Vivian Wilhelm por su constante ayuda y apoyo durante el desarrollo de esta tesis, y por ser una excelente persona, más allá de su capacidad profesional, sino que también en su gran calidad humana.

Agradezco a todas las personas que integran la Fundación Ciencia para la Vida y BiosChile, quienes generan un agradable ambiente de trabajo y con quienes compartí durante todo este tiempo. En especial, me gustaría agradecer a Adolfo Jamett y Juanita Bustamante por su ayuda en el desarrollo de anticuerpos, a Álvaro Miquel por su ayuda en el cultivo de *P. salmonis*, y a Sebastián Valenzuela por su ayuda en el laboratorio y su amistad.

Agradezco también al Doctor Herman Silva, responsable del laboratorio de fisiología y genética molecular vegetal de la Universidad de Chile y a la Doctora Nancy Olea encargada del laboratorio de microscopía electrónica de la facultad de medicina de la Universidad de Chile por su colaboración en los experimentos de microscopía de *P. salmonis*.

Particularmente quiero agradecer a Esteban Engel y Rodrigo Brücher, tesistas del laboratorio, con quienes trabajé estrechamente y con los que compartí ideas e interesantes discusiones que fueron de gran ayuda para el desarrollo de la tesis.

Finalmente, quisiera agradecer a mis padres, familia, polola y amigos por su constante apoyo y por todo el cariño que me han dado, que ha sido fundamental para que hoy esté cumpliendo esta importante etapa de mi vida.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pagina
I. INTRODUCCION.....	1
1. SALMONICULTURA EN CHILE.....	1
2. <i>P. SALMONIS</i> Y EL SINDROME RICKETTSIAL SALMONIDEO (SRS).....	2
3. FLAGELO: ESTRUCTURA Y FUNCION.....	4
4. HIPOTESIS.....	10
5. OBJETIVO GENERAL.....	10
6. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	10
II. MATERIALES Y METODOS.....	11
1. ANIMALES.....	11
2. CELULAS.....	11
3. REACTIVOS.....	11
4. OLIGONUCLEOTIDOS.....	12
5. VECTORES.....	13
6. CULTIVOS DE CELULAS CHSE-214.....	15
7. CULTIVO DE <i>P. SALMONIS</i>	15
8. INCUBACION DE CULTIVOS DE <i>P. SALMONIS</i> EN CONDICIONES SALINAS Y A DISTINTAS TEMPERATURAS.....	16
9. PURIFICACION DE <i>P. SALMONIS</i>	16
10. PREPARACION DE EXTRACTOS DE PROTEINAS DE <i>P. SALMONIS</i>	17
11. PREPARACION DE ADN GENOMICO DE <i>P. SALMONIS</i>	18

12. PREPARACION DE ARN TOTAL DE <i>P. SALMONIS</i>	18
13. AMPLIFICACION DE ADN POR REACCION DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR)	19
14. SINTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO A PARTIR DE ARN MENSAJERO MEDIANTE LA TECNICA DE RT-PCR.....	20
15. CLONAMIENTO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR EN LOS VECTORES pGEM-T Y pET32A	21
A. Digestión del plásmido pET32a con enzimas de restricción	21
B. Ligación de fragmentos de ADN a vectores	22
C. Preparación de células de <i>E. coli</i> competentes.....	22
D. Transformación de <i>E. coli</i> y selección de colonias	23
E. Purificación del ADN plasmidial	24
F. Análisis de ADN por electroforesis en geles de agarosa.....	24
G. Digestión con endonucleasas de restricción	25
H. Purificación de los fragmentos de ADN desde geles de agarosa	25
I. Secuenciación del ADN	26
16. ANALISIS BIOINFORMATICO DE SECUENCIAS	26
17. PREPARACION DE PROTEINAS RECOMBINANTES EN <i>E. COLI</i>	27
A. Inducción de la síntesis de proteínas	27
B. Determinación de la concentración de proteínas	27
C. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes	28
D. Purificación de las proteínas recombinantes	29
E. Digestión de proteínas de fusión mediante enteroquinasa.....	30
18. INMUNIZACION DE RATONES CON LAS PROTEINAS RECOMBINANTES Y OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	30
19. ANALISIS DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIANTE ELISA	31
20. ANALISIS DE PROTEINAS POR LA TECNICA DE <i>WESTERN BLOT</i>	32
21. INMUNOPRECIPITACION	33
22. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y ELECTRONICA.....	35
III. RESULTADOS.....	36
1. ANALISIS BIOINFORMATICO DEL GENOMA E IDENTIFICACION DE GENES FLAGELARES DE <i>P. SALMONIS</i>	36
2. ORGANIZACION DE LOS GENES <i>FLGC</i> Y <i>FLGD</i> EN <i>P. SALMONIS</i>	38
3. AISLAMIENTO Y SECUENCIACION DE LOS GENES FLAGELARES <i>FLGC</i> Y <i>FLGD</i> DE <i>P. SALMONIS</i>	40

A. Aislamiento y secuenciación de <i>flgC</i>	40
B. Aislamiento y secuenciación de <i>flgD</i>	42
4. EXPRESION Y PURIFICACION DE FLGC Y FLGD RECOMBINANTES EN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	45
5. OBTENCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA FLGC Y FLGD DE <i>P. SALMONIS</i>	50
6. ESTUDIO DE LA MORFOLOGIA Y EXPRESION DE LOS GENES <i>FLGC</i> Y <i>FLGD</i> DE <i>P. SALMONIS</i> BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO.	55
A. Análisis de la morfología y la presencia de flagelo en <i>P. salmonis</i> mediante microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión.	56
B. Análisis de la expresión de los genes <i>flgC</i> y <i>flgD</i> a nivel transcripcional mediante RT-PCR.....	60
C. Análisis de la expresión de FlgC y FlgD mediante <i>Western blot</i>	63
 IV. DISCUSION.....	 66
 V. CONCLUSIONES.....	 77
 VI. REFERENCIAS	 78
 VII. ANEXO GENES FLAGELARES <i>FLIE</i> Y <i>FLIF</i>	 86
 VIII. ANEXO SECUENCIAS.....	 88

INDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Esquema de un flagelo bacteriano junto con una fotografía del cuerpo basal del flagelo hecho mediante microscopía electrónica.	6
Figura 2. Esquema de los vectores pGEM-T, pET32a y pET21a.....	14
Figura 3. Modelo de la posible organización de los genes flagelares estructurales en <i>P. salmonis</i> en base a la organización presente en <i>P. aeruginosa</i>	39
Figura 4. Esquema de los genes flagelares y contigs, para la amplificación del gen <i>flgC</i>	40
Figura 5. Análisis electroforético de los fragmentos de ADN resultantes de PCR y de fragmentos de ADN resultantes de la digestión de los plasmidios que contienen <i>flgC</i>	41
Figura 6. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de FlgC de <i>P. salmonis</i> con las secuencias de FlgC de <i>P. aeruginosa</i> , <i>M. degradans</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>S. oneidensis</i> y <i>V. cholerae</i>	42
Figura 7. Esquema de los genes flagelares y <i>contigs</i> , utilizados para la amplificación de <i>flgD</i>	43
Figura 8. Análisis electroforético de los fragmentos de ADN resultantes de PCR (A y B) y de la digestión de los plasmidios recombinantes con <i>flgD</i> con endonucleasas de restricción (C).....	44
Figura 9. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de FlgD de <i>P. salmonis</i> con las secuencias de FlgD de <i>P. aeruginosa</i> , <i>M. degradans</i> y <i>V. cholerae</i>	44
Figura 10. Esquema representativo del vector recombinante pET32a con los insertos de <i>flgC</i> o <i>flgD</i> y su análisis por electroforesis luego de la digestión con endonucleasas de restricción.....	46
Figura 11. Análisis de la inducción de proteínas recombinantes Trx-FlgC y Trx-FlgD mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes.	47

- Figura 12.** Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% de las proteínas recombinantes purificadas mediante columna de afinidad de níquel-agarosa. 49
- Figura 13.** Análisis por ELISA de la reactividad de los anticuerpos monoclonales 5E12 y 7B2 contra FlgC y FlgD respectivamente..... 52
- Figura 14.** Análisis de distintas proteínas recombinantes de FlgC y FlgD mediante geles de poliacrilamida y *Western blot* con sus respectivos anticuerpos monoclonales α -FlgC 5E12 y α -FlgD 7B2. 54
- Figura 15.** Microscopía de fluorescencia con tinción de Nanorange de *P. salmonis* y *Vibrio ordalli*. 57
- Figura 16.** Microscopía electrónica de transmisión de *P. salmonis* cultivadas en medio MEM y en agua de mar..... 59
- Figura 17.** Análisis por electroforesis en geles de agarosa del ARN total de *P. salmonis* y de los fragmentos de cADN amplificados mediante RT-PCR para los genes *flgC* y *flgD*..... 61
- Figura 18.** Análisis mediante *Western blot* de extractos totales de *P. salmonis* con anticuerpos monoclonales 5E12 (FlgC), 7B2 (FlgD) y anti-31KDa. 65
- Figura 19.** Esquema de organización de los genes regulador sigma 54, *fliE*, *fliF* y *fliG* en *P. aeruginosa* y alineamiento de los *contigs* 641 y 1230 de *P. salmonis*. 87

INDICE DE TABLAS

	Pagina
• Tabla 1. Lista de los genes relacionados con flagelo, encontrados en el borrador del genoma de <i>P. salmonis</i> .	36
• Tabla 2. Resumen del total de genes flagelares ordenados en categorías según su posible función.	37

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATCC	American Type Cell Collection
ATP	Adenosina 5' trifosfato
BCIP	5-Bromo-4 Cloro-3 Indolidil Fosfato
BrEt	Bromuro de etidio
CHSE-214	Célula embrionaria de salmón Chinook
dNTP	Deoxirribonucleotido trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DO	Densidad óptica
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
FAL	Fosfatasa alcalina
g	Fuerza de gravedad
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil tio- β -D-galactósido
kDa	Kilodalton
LB	Medio Luria-Bertani
MEM	Medio mínimo esencial
M-MLV	Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina
NBT	Nitrobluetetrazolium
ORF	Marco de lectura abierto
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
rpm	Revoluciones por minuto
RNasa	Ribonucleasa
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
TRX	Tioredoxina de <i>E. coli</i>
U	Unidad enzimática
V	Voltio
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido

RESUMEN

El patógeno *Piscirickettsia salmonis* es el agente causal del síndrome rickettsial del salmón (SRS), enfermedad que afecta en gran medida a la industria salmonera nacional. Esta bacteria gram negativa ha sido descrita hasta ahora como intracelular obligada y no mótil, sin embargo existen evidencias recientes de nuestro laboratorio de la presencia de genes flagelares en su genoma. Debido a esto se consideró la posibilidad de que *P. salmonis* pudiera expresar un flagelo funcional en respuesta a estímulos que simulen sus estadios extracelulares, como sería su inmersión en agua de mar. En la presente tesis se aislaron y secuenciaron los genes flagelares *flgC* y *flgD* a partir del ADN genómico de la bacteria. Ambos genes se expresaron en *E. coli* dando origen a las proteínas recombinantes FlgC y FlgD, con las cuales se desarrollaron anticuerpos monoclonales. Los estudios de expresión *in vivo* de los genes *flgC* y *flgD*, indicaron que éstos se transcriben como una sola unidad transcripcional, sin embargo no se pudo detectar la presencia de las respectivas proteínas mediante anticuerpos monoclonales. Igualmente, estudios de microscopía bajo diferentes condiciones de incubación tampoco detectaron la expresión de un flagelo. La falta de detección de las proteínas flagelares FlgC y FlgD o de un flagelo en *P. salmonis* puede deberse a que las condiciones de estimulación no fueron las adecuadas para que este se expresara. Alternativamente, es posible que a pesar que *P. salmonis* contiene la mayoría de los genes flagelares carece de alguno que es vital para la formación de la estructura. La función de estos genes en *P. salmonis* es mas bien incierta y se podría especular que tal vez forman parte de un sistema de secreción de tipo III, o que sólo son evidencia de algún resabio evolutivo o de algún evento de transferencia horizontal.

ABSTRACT

The pathogen *Piscirickettsia salmonis* is the causal agent of the salmon rickettsial syndrome (SRS), a disease that greatly affects the Chilean salmon industry. This bacterium has been characterized as obligate intracellular and non motile. However recent evidence obtained in our laboratory indicates the presence of flagellar genes as a part of its genome. Therefore, the possibility of the expression of a functional flagellar system in *P. salmonis* as a result of stimulation by conditions similar to the extracellular environment, such as sea water, has been considered. The flagellar genes *flgC* and *flgD* were isolated from *P. salmonis* genomic DNA and sequenced. Both genes were expressed as recombinant proteins in *E. coli*, and monoclonal antibodies produced. RT-PCR studies of *flgC* and *flgD* expression *in vivo* indicate that these genes are being transcribed together as a single transcriptional unit, but no flagellar proteins were detected using the monoclonal antibodies. Similarly, observations made by microscopy indicate that there is no visible flagellar structure in *P. salmonis*. The failure to detect these flagellar proteins and the absence of a flagellum may be due to the inappropriate conditions tested. On the other hand, in spite of having many flagellar genes, it is possible that *P. salmonis* lacks another one of these genes that may be fundamental for the assembly of the structure. Thus, the significance of the presence of these genes in *P. salmonis* genome remains undilucidated. They may be part of a type III secretion system, or perhaps they are evidence of an evolutionary remanent or the result of a horizontal gene transfer event.

I. INTRODUCCION

1. SALMONICULTURA EN CHILE

La salmonicultura comenzó hace aproximadamente dos décadas en Chile, destacando su explosivo crecimiento en la década de los noventa, que ha llevado a nuestro país a ocupar el segundo lugar a nivel mundial de la industria de los salmónidos después de Noruega. Las cifras actuales revelan este hecho, es así como durante el año 2003 la exportación de salmónidos fue de cerca de 285 mil toneladas, las que dieron origen a ventas por 1.147 millones de dólares (Industria del salmón, 2004). Los principales mercados de exportación son Estados Unidos, Japón y Europa, donde la tendencia de la industria es a seguir en alza con expectativas de duplicar sus números de aquí al 2015 y a mantener su posición de líder a nivel mundial (ProChile New York, 2003). La salmonicultura se ubica geográficamente en la zona sur de Chile principalmente en las regiones X y XI, donde el cultivo se centra en especies de salmón coho (*Oncorhynchus kitsutch*), salmón del atlántico (*Salmo salar*), trucha arcoiris (*O. mykiss*) y salmón chinook (*O. tshawytscha*). Los salmónidos se cultivan en balsas jaulas en condiciones de agua dulce y salada, para lo que se utilizan ovas importadas así como también ovas producidas en el país, y son alimentados principalmente con harina y aceite de pescado. El gran impacto económico y social que ha generado el desarrollo de esta industria, se ve afectado por un fuerte impacto ecológico y una serie de problemas de enfermedades infecciosas que afectan la producción. Dentro de estas enfermedades se

pueden encontrar las de origen viral como el IPN (necrosis pancreática infecciosa), el ISA (anemia infecciosa de salmón) o el VHS (septicemia viral hemorrágica); así como también existen las enfermedades de origen bacteriano como el BKD (enfermedad bacteriana del riñón), la furunculosis, la vibriosis y el SRS (síndrome rickettsial salmonideo). Todas ellas han perjudicado enormemente el desarrollo de la industria en los últimos años, contaminando y arruinando la producción (Fundación Terram, 2001). Esto ha creado un gran interés por parte de empresarios e investigadores por conocer más de estas enfermedades y sus patógenos, para lo que es necesario conocer la biología de los mismos y sus mecanismos de infección.

2. P. SALMONIS Y EL SINDROME RICKETTSIAL SALMONIDEO (SRS)

El Síndrome Rickettsial Salmonideo o SRS es una de las enfermedades que produce más pérdidas a la industria de la salmonicultura, las que se derivan de costos asociados a la mortalidad de peces y tratamiento de la enfermedad (Aquanoticias, 2003; Fryer y Hedrick, 2003). La patología causada por la bacteria *Piscirickettsia salmonis* en el sur de Chile fue descrita inicialmente en 1989 por Bravo y Campos (Bravo y Campos, 1989), y luego caracterizada mayormente por Fryer en 1990 (Fryer y col., 1990). Esta enfermedad se caracteriza principalmente por producir anorexia, hemorragias y anemia severa en los peces. Las lesiones se ubican en hígado, riñones, intestino y cerebro, con gran porcentaje de necrosis. Además son frecuentes las lesiones en branquias y aletas, ulceraciones, oscurecimiento de la piel, conductas letárgicas de los peces y nado superficial en el agua (Larenas y col., 1998; Mauel y Miller, 2002). El patógeno *P.*

salmonis fue descrito como una bacteria “de tipo rickettsial”, gram negativa, intracelular obligada, no mótil, pleomórfica pero predominantemente cocoide, de entre 0,5 a 1,5 μm de diámetro y que se agrupa ocasionalmente en forma de anillos o pares dentro de vacuolas citoplasmáticas en las células hospedadoras (Fryer y col., 1992, 1997). Debido a sus características había sido clasificada inicialmente como una rickettsia (en la categoría de las α -proteobacterias, genero *Rickettsiales*), pero más tarde por análisis filogenético mediante la secuencia de su ARN 16S fue clasificada en la categoría de las γ -proteobacterias, donde se ubican las *Legionellales*, *Aeromonadales*, *Vibrionales*, *Enterobacteriales* y *Pseudomonadales* (Mauel y col., 1999; Fryer, 2001). El cultivo de esta bacteria en el laboratorio debe ser realizado en líneas celulares embrionarias de salmón como las células CHSE-214 (Chinook Salmon Embryo Cell), en condiciones de esterilidad a 16°C. Hasta el momento no se sabe de ningún medio de cultivo extracelular en que estas bacterias puedan ser crecidas. Por otra parte, *P. salmonis* puede mantener su infectividad hasta por un período de 14 días en agua de mar, sin embargo en agua dulce, el patógeno pierde rápidamente su infectividad. La bacteria se puede teñir con tinción de Giemsa, azul de metileno y hematoxilina-eosina. Además se ha observado mediante microscopía electrónica en la que se denota una membrana externa muy ondulada y una membrana interna citoplasmática típica de organismos rickettsiales. La transmisión de la bacteria podría ocurrir en forma vertical (de una generación a otra) (Larenas y col., 2003) o también en forma horizontal (de un pez infectado a otro) (Almendras y col., 1997), sin embargo no son claros los mecanismos que puedan explicar estos fenómenos. Además no se sabe si existe algún reservorio especial de la bacteria en la naturaleza o de algún vector que ayude en su proceso de infección (Fryer y Hedrick, 2003).

Debido a que la distribución de esta bacteria a través del mundo es sólo en algunos lugares muy específicos donde se cultiva el salmón industrialmente, como en Chile, Noruega o Canadá, los estudios referentes a ella no han sido muchos. A esto se suma su complicado cultivo, que ha dificultado la caracterización de esta bacteria y por lo tanto se sabe muy poco de su biología. Recientemente la Fundación Ciencia para la Vida en colaboración con la empresa Incyte Genomics secuenció cerca del 95% del genoma de *P. salmonis*, obteniendo un borrador en el que se identificaron aproximadamente 1.500 genes (Valenzuela y col., 2001). Dentro de los genes identificados se encontraron genes relacionados con la formación y funcionamiento de un flagelo. Estos genes flagelares presentes en el genoma de *P. salmonis* permiten considerar la posibilidad de que esta bacteria podría expresar una estructura flagelar, antes no descrita, que ayudaría a explicar de alguna manera algunos fenómenos del ciclo de vida de la bacteria, así como sus vías de infectividad y también su virulencia.

3. FLAGELO: ESTRUCTURA Y FUNCION

El flagelo bacteriano es una estructura altamente compleja que da origen a la motilidad de las células. La presencia de un flagelo confiere una gran ventaja a los organismos en su adaptación, dispersión por el medio, en la eficiencia de adquirir nutrientes y evitar sustancias tóxicas, sin embargo se requiere de un gran costo energético para crearlo y hacerlo funcionar, así como también implica la presentación de estructuras potencialmente antigénicas al sistema inmune del huésped (Ottemann y Millar, 1997; McCarter, 2001). Además la motilidad generalmente va asociada a funciones de

adherencia e invasión al huésped, lo que aumenta la virulencia de la bacteria (Ormonde y col., 2000).

La síntesis y función del flagelo están determinadas por una serie de factores externos como temperatura, concentración de sales, niveles de AMPc, transición entre superficies o líquidos, fase de crecimiento y control del ciclo celular, entre otros (Aizawa y Kubori, 1998; Chicott y Hughes, 2000). Esto implica que el mecanismo por el cual funciona el flagelo involucra una serie de proteínas regulatorias de su síntesis y actividad.

Se ha descrito que en general las bacterias que poseen flagelo utilizan alrededor de 40 a 50 genes que participan en funciones de regulación de la síntesis flagelar, estructura flagelar, quimiotaxis, motor flagelar y exportación de proteínas. Gran parte de ellos han sido caracterizados individualmente describiendo su función, localización subcelular y número de copias por célula (Berg, 2003; Macnab, 2003).

El flagelo está compuesto por un filamento rígido en forma de espiral, un codo flagelar, y un cuerpo basal compuesto de un anillo L en la membrana externa, un anillo P en el periplasma, un anillo MS en la membrana citoplasmática y un eje o bastón hueco que une todos los anillos, y a través del cual se exportaran algunas proteínas (Kubori y col., 1992; Morgan y Khan, 2001) (Figura 1). Unido al anillo MS se encuentra el motor flagelar y el sistema de secreción de proteínas tipo III. La estructura tridimensional, organización y funcionamiento de este multicomplejo ha sido caracterizada mediante microscopía electrónica y debido a la generación y caracterización de mutantes para cada una de las proteínas involucradas (Kim y McCarter, 2000; Macnab, 2003).

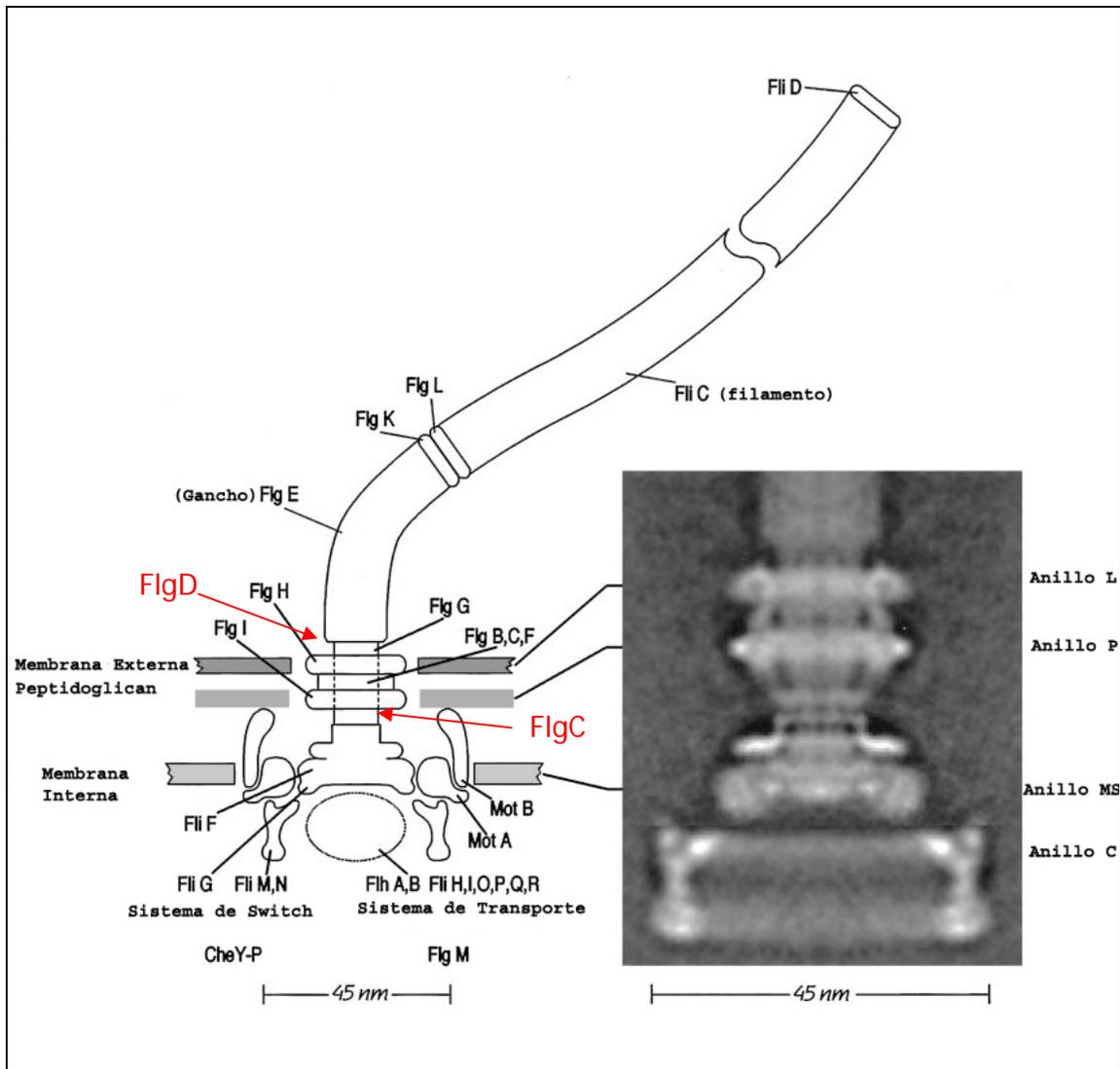


Figura 1. Esquema de un flagelo bacteriano junto con una fotografía del cuerpo basal del flagelo hecho mediante microscopía electrónica.

En el esquema de la izquierda se indica el nombre de las estructuras que conforman el flagelo, la base, motor, gancho y filamento flagelar, así como también el nombre de las proteínas que las componen. En la fotografía de la derecha se ilustra la estructura del cuerpo basal del flagelo de *Salmonella typhimurium* obtenido mediante análisis y modelamiento con microscopía electrónica (Berg, 2003).

El flagelo bacteriano funciona a través de un motor flagelar que obtiene su energía a partir del gradiente electroquímico producido por el flujo de protones o iones sodio a través de la membrana, y que está compuesto por proteínas de anclaje ubicadas en

la membrana (Mot), proteínas que regulan el torque y sentido de la rotación (FliG, FliM y FliN), y proteínas que activan y regulan el funcionamiento mediante señales de quimiotaxis (Che) (DeRosier, 1998; Blair, 2003). Por el contrario, su homólogo eucarionte es un sistema basado en microtúbulos y motores de dineína y que utiliza el ATP como fuente de energía para su funcionamiento.

Los genes flagelares se encuentran agrupados en forma de operones, los cuales ocupan una vía regulatoria común, conformando un regulón flagelar. Existen varios operones en distintas regiones del cromosoma, en los cuales los genes se agrupan según el tiempo en el que se expresan, es decir tempranos, intermedios y tardíos (Boyd y Gober, 2001; Dasgupta y col., 2003). A su vez estos se encuentran regulados por distintos tipos de promotores (clase I, II y III), dentro de los cuales hay algunos regulados por el factor σ^{28} específico para los genes flagelares. Esta organización se mantiene a través de la mayoría de las especies, sin embargo muchos de estos genes son expresados por más de un tipo de promotor, lo que implica que existe un complejo sistema de regulación (Kutsukake y col., 1990; Chilcott y Hughes, 2000)

Gran parte de los componentes del flagelo se exportan a través de la membrana mediante un sistema de secreción de tipo III (TTSS), para ser armados en la estructura final (Minamino y Macnab, 1999; Hirano y col., 2003). Este sistema está compuesto de proteínas libres en el citoplasma así como otras unidas al cuerpo basal del flagelo, que exportarán algunos de los componentes más distales a través de la estructura basal previamente formada (Figura 1). Por su parte, los sistemas de secreción de tipo III son independientes de la presencia de un flagelo y son de gran importancia en la patogenicidad de las bacterias, ya que son responsables de la secreción de una serie de

factores de virulencia y componentes en la célula huésped (Hueck, 1998; Kubori y col., 1998). Parte de los componentes de ambos sistemas presentan un cierto nivel de homología estructural y funcional, por lo que se especula su posible origen común en términos evolutivos (Gophna y col., 2003).

Debido a las evidencias de la presencia de genes flagelares en *P. salmonis*, y la amplia información en la literatura de organización de genes flagelares, estructuras y funcionamiento, hemos propuesto en este trabajo la hipótesis de la posible existencia de un flagelo en alguna etapa del ciclo de vida de esta bacteria. Esto explicaría una serie de eventos que son de vital importancia en la interacción del patógeno con el huésped. Para este trabajo de tesis se ha elegido aislar y estudiar la expresión de dos genes flagelares estructurales, *flgC* y *flgD*. Ambos genes forman parte de un operón que contiene los genes *flgB*, *flgC*, *flgD*, *flgE*, *flgF*, *flgG*, *flgH*, *flgI*, *flgJ*, *flgK*, mayoritariamente estructurales y que se clasifican como genes intermedios en su tiempo de expresión. La elección se hizo en base a que ambos dan origen a proteínas estructurales, que son fundamentales en el funcionamiento y formación de un flagelo, al igual que las demás proteínas que forman la estructura.

El gen *flgC* codifica para una proteína estructural del eje proximal del cuerpo basal del flagelo (Ran y Haeng, 2003; Saijo-Hamano y col., 2004). La proteína FlgC se localiza en el espacio periplásmico, interactuando con las proteínas FlgB y FlgF (Figura 1), las cuales son partes del eje proximal que sustenta al complejo.

El gen *flgD* codifica para una proteína encargada del ensamblaje y estabilización del codo flagelar al exterior de la bacteria (Kutsukake y Doi, 1994; Ohnishi y col., 1994). La presencia de FlgD se ha descrito como esporádica ya que sólo estaría presente cuando

el cuerpo basal ha sido finalizado, formando una especie de sombrero o tapón en el extremo distal del mismo, estabilizando la estructura, similar a lo que ocurre con FliD en el filamento flagelar. Luego participaría de la misma forma en la síntesis del gancho flagelar, y finalmente sería reemplazada para dar paso a la formación del filamento flagelar. De esta manera FlgD no es parte de la estructura final del flagelo y su presencia (mayoritariamente extracelular) sería necesaria solo para la síntesis del flagelo.

4. HIPOTESIS

La bacteria *P. salmonis* tendría una fase mótil en su ciclo de vida, en la que expresaría las proteínas necesarias para la formación de un flagelo funcional, que participaría en la adhesión y penetración de la bacteria a la célula huésped, y que sería un posible mecanismos de transmisión horizontal.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las regiones codificadoras de los genes *flgC* y *flgD* y estudiar la expresión *in vivo* de las proteínas FlgC y FlgD bajo diferentes condiciones de incubación, y la posible presencia de un flagelo funcional en *P. salmonis*.

6. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar y secuenciar los genes estructurales *flgC* y *flgD* de *P. salmonis*.
- Clonar los genes *flgC* y *flgD* en vectores de expresión en *E. coli* con el fin de obtener proteínas recombinantes.
- Obtener sueros policlonales y anticuerpos monoclonales contra las proteínas recombinantes.
- Analizar la expresión de los genes *flgC* y *flgD* *in vivo* mediante las técnicas de RT-PCR y *Western blot*.

II. MATERIALES Y METODOS

1. ANIMALES

Los ratones Balb/c utilizados en este trabajo se obtuvieron del vivero de BiosChile IGSA.

2. CELULAS

Las células CHSE-214 (línea celular embrionaria de salmón chinook *Oncorhynchus tshawytscha*) ATCC CRL 1681 y la cepa de *P. salmonis* ATCC VR 1361 se obtuvieron de BiosChile IGSA. Las células de *Escherichia coli* competentes Novablue y BL21 (DF3) se adquirieron en la empresa Novagen.

3. REACTIVOS

Las sales, ácidos, bases, glucosa, bromuro de etidio y solventes utilizados de grado analítico o de biología molecular, se obtuvieron en Merck y Sigma. Las enzimas de restricción, Taq ADN polimerasa, T4 ADN ligasa, M-MLV transcriptasa reversa, RNAsin, fosfatasa alcalina de ternero, X-GAL, IPTG, ADN ladder, dATP, dGTP, dCTP, dTTP se obtuvieron de Invitrogen y Promega. Los sistemas de purificación de productos de PCR, de purificación de ADN plasmidial y de extracción desde geles se obtuvieron de Qiagen. La triptona, extracto de levadura y agar se adquirieron en Difco Laboratories. La agarosa se obtuvo de GibcoBRL y Biowhittaker Molecular Applications. El reactivo

MicroBCA para cuantificar proteínas se obtuvo en Pierce. El anticuerpo anti IgG de ratón hecho en cabra se obtuvo en Kirkegaard & Perry Laboratorios (KPL).

4. OLIGONUCLEOTIDOS

Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR varían entre 18 y 25 bases y su temperatura de hibridación se calculó de acuerdo a la fórmula $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$, según la cual la mayoría de los óligos utilizados tiene una T_m de 60°C a 64 °C. La notación Fw indica que es un partidador en el sentido directo y Rv indica que es un partidador inverso. En azul se destacan los sitios de restricción *BamHI* de los partidores directos, y en rojo se destacan los sitios de restricción *EcoRI* de los partidores inversos. La secuencia de cada partidador se indica a continuación.

FlgC Fw: 5'- GTCGGATCCTCGGTGTGTTTATGTTTTTCAGTGT-3'

FlgC Rv: 5'- GTCGAATTCCTACTGCTGCGCCAACCGT-3'

FlgD Fw: 5'- CAGGGATCCATGGCAGAGATTAATTCAACCGA - 3'

FlgD Rv: 5'- GTCGAATTCCTTATCCAAGCTGTTTAATTCCTGA-3'

FlgDF: 5'- ATGGTGAATATGATCTCAGCATC-3'

FlgE rv: 5' CATCTTCCATGGATTATTAACCG 3'

PUC/M13 fw: 5' – GTTTTCCCAGTCACGAC - 3'

PUC/M13 rv: 5' – CAGGAAACAGCTATGAC - 3'

5. VECTORES

El vector pGEM-T, especialmente diseñado para clonar productos de PCR se obtuvo de Promega. Este vector posee una timidina en el extremo 3' de cada una de las hebras en el sitio de inserción lo que facilita la ligación a segmentos de ADN obtenidos por PCR que tienen una adenina en el extremo 3' de cada hebra. Además se utilizó el vector pET32a(+), obtenido de Novagen, para expresar las proteínas recombinantes en *E. coli*. Este vector produce proteínas recombinantes fusionadas a una tioredoxina de *E. coli* y a un péptido de polihistidinas que facilita su posterior purificación. Finalmente se utilizó el vector pET21a, también obtenido de Novagen, el cual produce proteínas recombinantes sin fusión a tioredoxina y sólo unidas a un péptido del fago T7 de 14 aminoácidos. Las estructuras de estos plásmidos se presentan en la Figura 2.

El vector pGEM-T se compone de un sitio múltiple de clonamiento para productos de PCR; *Amp*, gen de resistencia a ampicilina; *fl ori*, origen de replicación para producir ADN de hebra simple; *ori*, origen de replicación y *lacZ*, región codificante para la β -galactosidasa interrumpida por el sitio de clonamiento. El vector pET32a(+) de expresión en *E. coli* se compone de *ori*, origen de replicación bacteriano derivado de pBR322; *Amp*, resistencia a ampicilina; *f₁*, *origin* origen de replicación del fago f₁; *lacI*,

repressor del operón lac; promotor de T7; *Tras*, gen de tioredoxina A de *E. coli*; sitio de corte con enteroquinasa y un péptido de polihistidinas. El vector pET21a se compone de *ori*, origen de replicación bacteriano derivado de pBR322; promotor de T7; *Amp*, resistencia a ampicilina; *T7 oligo*, péptido de 14 aminoácidos; *f1 origin*, origen de replicación del fago f₁; *lacI*, repressor del operón lac y un sitio de clonamiento múltiple.

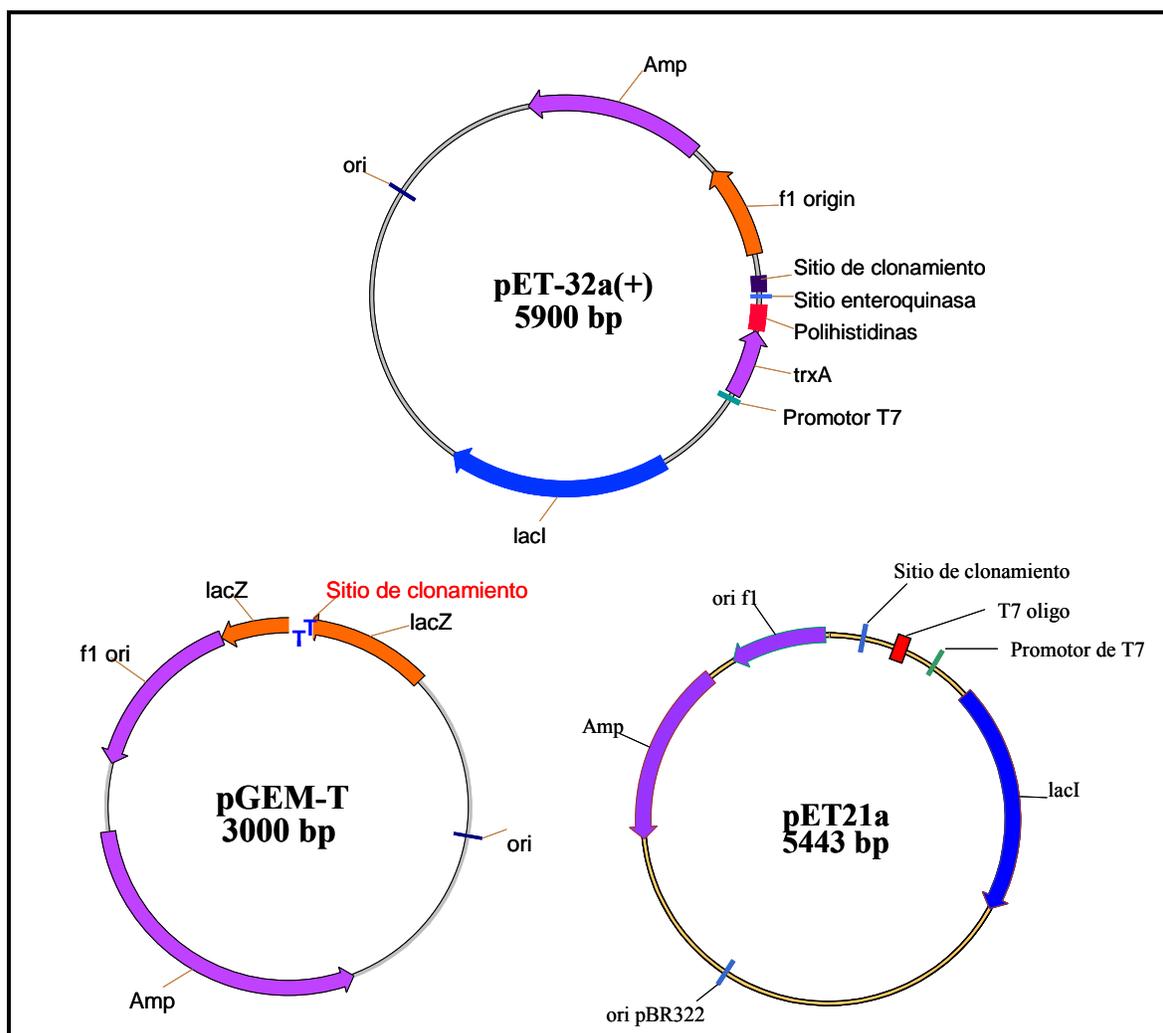


Figura 2. Esquema de los vectores pGEM-T, pET32a y pET21a.

6. CULTIVOS DE CELULAS CHSE-214

Inóculos de células CHSE-214 (ATCC 1681), mantenidos en N₂ líquido se descongelaron y se cultivaron en frascos T175 en medio MEM a 16°C por 7 días o hasta que las células llegaron a confluencia.

7. CULTIVO DE *P. SALMONIS*

Se usaron inóculos de 1 ml de *P. salmonis*, que contienen al menos un título de 1×10^8 bacterias/ml, en cada uno de los frascos T175 con células CHSE-214. Al día siguiente, se retiró el medio y se agregó 50 ml de medio MEM-completo fresco. El cultivo se mantuvo a 16°C por 10 a 14 días, observándose periódicamente el grado de lisis de las células CHSE-214 provocada por la infección bacteriana mediante un microscopio de contraste de fases. Cuando el efecto citopático fue cercano al 100% de las células, el cultivo de *P. salmonis* se consideró listo para ser cosechado o para su posterior propagación. Las bacterias se cosecharon utilizando un raspador de células. Una vez colectado, el lisado se centrifugó (200 x g por 10 min). El sobrenadante corresponde a la fracción semipurificada de *P. salmonis*.

8. INCUBACION DE CULTIVOS DE *P. SALMONIS* EN CONDICIONES SALINAS Y A DISTINTAS TEMPERATURAS

Con el fin de asemejar las condiciones naturales de *P. salmonis* en agua de mar, fracciones semipurificadas de *P. salmonis* se incubaron con agua de mar filtrada y con PBS salino (NaCl 200 mM). En cada caso se incubó a dos temperaturas, 8°C y 16°C, por tiempos de 30 min, 60 min y 4 h. La fracción semipurificada proveniente de 2 botellas de cultivo se resuspendió suavemente en 4 ml de agua de mar o PBS salino, y ambas se dejaron incubando a 8°C y 16°C. Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad y las centrifugaciones para obtener el semipurificado se realizaron en frío para evitar efectos de temperatura en las bacterias. Se obtuvieron muestras a los distintos tiempos, las que se centrifugaron a 3.000 x g para obtener un sedimento bacteriano. La pella luego se resuspendió en solución tampón PBS para ser utilizado en experimentos de extracción de ARN, preparación de proteínas para *Western blot* y microscopía.

9. PURIFICACION DE *P. SALMONIS*

La fracción semipurificada de *P. salmonis* se sometió a una centrifugación en gradiente de densidad, obteniéndose una banda mayoritaria cerca del fondo del tubo de centrífuga. Esta banda se colectó y se lavó dos a tres veces mediante centrifugación en una solución tampón. El sedimento o pella final constituye la fracción purificada de *P. salmonis* que será utilizada para obtener ADN genómico de la bacteria. Este procedimiento se hizo en colaboración con Álvaro Miquel de BiosChile IGSA.

10. PREPARACION DE EXTRACTOS DE PROTEINAS DE *P. SALMONIS*

Los extractos de proteínas de *P. salmonis* se prepararon para ser analizados mediante *Western blot*, inmunoprecipitación y ELISA con anticuerpos monoclonales específicos contra las proteínas de la bacteria. El primer protocolo consistió en resuspender la fracción semipurificada de *P. salmonis* en solución tampón PBS con Tritón X100 al 1% en presencia de inhibidores de proteasas (PMSF 1mM, aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml y pepstatina 1 µg/ml). Luego, la muestra se sonicó y centrifugó a 3.000 x g por 15 min, luego el sobrenadante nuevamente centrifugado a 13.000 x g durante 20 min a 4°C. Así se separaron fracciones de pella y sobrenadante que se cargaron en un gel de poliacrilamida. La segunda aproximación experimental se obtuvo con un extracto en presencia de lisozima, que digiere el peptidoglicano, y que podía ser de utilidad para liberar las proteínas que se encuentren en el espacio periplásmico. El protocolo a seguir fue muy similar al anterior, solo que esta vez la solución tampón incluyó concentraciones crecientes de lisozima (desde 10 µg hasta 200 µg por ml de extracto de *P. salmonis*). Se incubó con la solución tampón con lisozima durante 30 min a temperatura ambiente y luego la muestra se sonicó y centrifugó como se describió anteriormente. Estas preparaciones se utilizaron para ensayos de *Western blot* y ELISA posteriormente.

11. PREPARACION DE ADN GENOMICO DE *P. SALMONIS*

La fracción purificada de *P. salmonis* se lavó con tampón PBS, se le agregó 20 µL de una solución de 10 mg/mL de DNasa I y se incubó a 37°C durante 30 min. Luego de una centrifugación para eliminar el sobrenadante, la pella se resuspendió en 500 µL de PBS mas 100 µL de EDTA 0,1 M para detener la actividad de DNasa I. La suspensión 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, SDS 0,2%, 1 mg/ml de Proteínasa K, Tris-HCl 50 mM pH 9). Se agitó suavemente por inversión y se incubó a 58°C durante 1 h con agitación suave. Una vez terminada la incubación con la proteasa, la solución se extrajo con un volumen de fenol saturado con 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.

12. PREPARACION DE ARN TOTAL DE *P. SALMONIS*

Para esto se utilizó el método del fenol caliente (Guiliani y col., 1997). En breve, la fracción semipurificada de *P. salmonis* se resuspendió en 500 µl de tampón de lisis (EDTA 1 mM, acetato de sodio 20 mM, SDS 0,5%, pH 5,5). Luego, se agregó 1 volumen de fenol saturado en agua y se incubó a 60°C por 7 min con agitación por inversión para posteriormente centrifugar y rescatar la fase acuosa. La extracción con fenol se repitió en

iguales condiciones rescatándose la fase acuosa. El ARN se precipitó con 1 ml de etanol absoluto y 36 μl de KCl 1 M durante toda la noche a -20°C . Se agregó un lavado adicional para limpiar el ARN de sales e impurezas con una solución de LiCl 10 M en relación 1:4 con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) por toda la noche a -20°C . Finalmente el ARN se lavó con etanol 70% a -20°C durante 1 h, luego se centrifugó y el ARN se dejó secando a temperatura ambiente. Este se resuspendió en 50 - 100 μl de agua DEPC, para luego ser cuantificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y por medición de su absorbancia a 260 nm.

13. AMPLIFICACION DE ADN POR REACCION DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR)

La reacción de PCR se llevó a cabo en tubos Eppendorf autoclavados de 500 μL en los que se agregaron los siguientes componentes: 5 μL de tampón PCR 10X sin Mg^{+2} , 1,5 μL de MgCl_2 50 mM, 4 μL de mezcla de dNTP 2,5 mM, 2,5 μL de una solución 10 μM de cada uno de los oligonucleótidos, 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. Los oligonucleotidos utilizados como partidores se diseñaron de acuerdo a las secuencias a amplificar. Luego, los tubos se incubaron en un termociclador (modelo PTC-200 MJ Research) con el siguiente programa: una etapa inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C ; 30 ciclos de desnaturalización de 1 min a 95°C , 1 min a 54°C para apareamiento y 1-3 min a 72°C para extensión. El tiempo de la etapa de extensión varía

según el tamaño del fragmento que se quiera amplificar. Finalmente se realizó una etapa de elongación durante 10 min a 72°C.

La purificación de los productos de PCR se realizó mediante el kit Qiaquick de Qiagen de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante.

14. SINTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO A PARTIR DE ARN MENSAJERO MEDIANTE LA TECNICA DE RT-PCR

Para la reacción de transcripción reversa se utilizó una mezcla con hexameros de secuencia al azar obtenidos de Invitrogen. En algunos casos se utilizó partidores específicos de cada gen. El ARN de *P. salmonis* se trató con la enzima DNasa I para eliminar la contaminación de ADN. En 20 µl totales se agregó 1 U de DNasa I en su respectiva solución tampón por cada 1 µg de ARN. La reacción se incubó 50 min a 37°C y al término, se agregó 1 µl de solución de detención (EGTA 20 mM pH 8) para inhibir la actividad de la DNasa I.

Para la reacción de transcripción reversa se incubó 1 µg de ARN con 0,25 µg de partidores al azar o de partidore específico antisentido en un volumen final de 15 µl durante 10 min a 65°C. Luego de incubar en hielo por 5 min, la mezcla de reacción se completó a un volumen de 25 µl con 5 µl tampón de reacción 5X (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM, DTT 50 mM), 5 µl de una mezcla de dNTP's 10 mM, 1U de RNasin inhibidor de RNasas, 200 U de M-MLV transcriptasa reversa y agua DEPC para completar. La reacción se incubó 60 min a 37°C para partidores de secuencia

al azar y a 42°C para partidores específicos. Del producto de esta reacción se utilizó 3 a 4 µl como templado para realizar la reacción de PCR como se describe anteriormente.

15. CLONAMIENTO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR EN LOS VECTORES pGEM-T Y pET32A

A. Digestión del plásmido pET32a con enzimas de restricción

Dos µg de ADN del vector pET32a se digirieron con 2 µL de *EcoRI* (10 U/µL) en 50 µl del tampón correspondiente durante 90 min a 37°C. Luego se agregó 2 µL de *BamHI* (10 U/µL) y se incubó a 37°C por 90 min adicionales. Luego, la mezcla se incubó con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP) para remover los fosfatos 5' y prevenir la religación del plasmidio. A los 50 µl de mezcla se agregó 1 µL de fosfatasa alcalina, 10 µl de tampón 10x (0,5 M Tris-HCl pH 8,5, 1 mM EDTA, pH 8,5), y 40 µL de agua miliQ, y se incubó a 37°C durante 1 h. A continuación se agregó EDTA a una concentración 10 mM final y se incubó 80°C por 10 min para inhibir la actividad de la fosfatasa alcalina. El ADN se purificó de la mezcla de reacción mediante el kit Quiaquick de Qiagen, y se extrajo 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. El ADN se precipitó con 1:10 volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5) y 2 volúmenes de etanol absoluto, y la cantidad e integridad del plasmidio se comprobó en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio 0,3 µg/ml.

B. Ligación de fragmentos de ADN a vectores

Los fragmentos de ADN obtenidos por amplificación por PCR o los fragmentos obtenidos por digestión con enzimas de restricción se ligaron a los distintos vectores de clonamiento o expresión. La reacción de ligación se realizó en 10 μ l con 1 U de ligasa T4 Gibco en el tampón de ligación correspondiente, manteniendo una relación molar de al menos 1:10 de vector/inserto. La reacción se incubó por 16 h a 14°C. El producto de ligación se usó para transformar células competentes Novablue.

C. Preparación de células de *E. coli* competentes

Las células de *E. coli* Novablue se cultivaron en el medio Luria-Bertani (LB) (5 g/L de triptona, 10 g/L de extracto de levadura (Difco Lab), 10 g/L de NaCl, esterilizado en autoclave). Inicialmente se preparó un inóculo de bacterias en 5 ml de medio LB que se incubó toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se agregaron estos 5 ml a 500 ml de medio LB y se incubó por 2 h aproximadamente hasta alcanzar una densidad óptica a 650 nm de 0,6-0,8. El cultivo se centrifugó a 3.500 x g durante 10 min a 4°C y las células se resuspendieron en 250 ml de NaCl 10 mM frío. Se volvió a centrifugar y las células se resuspendieron en 250 mL de CaCl₂ 75 mM frío. Se dejó en hielo durante 30 min y se volvió a centrifugar resuspendiendo las células en 30 mL de CaCl₂ 75 mM frío. Para aumentar la eficiencia de transformación las células se dejaron 3 h en hielo en presencia de 14 % de glicerol estéril y se congelaron en mezcla de hielo seco etanol y se

almacenaron a -80°C (BioFreezer Forma Scientific) hasta su uso. Todo el proceso de preparación se realizó bajo campana para mantener la esterilidad del proceso.

D. Transformación de *E. coli* y selección de colonias

Un volumen de 100 μL de células competentes (1×10^8 células/ml) (Novablue o BL21) y 10 μl del producto de ligación o 10 ng del ADN plasmidial purificado se incubó a 4°C por 30 min. Luego se sometió las bacterias a un shock térmico de 1 min a 42°C y se dejó reposar 3 min en hielo. Se agregaron 800 μL de medio SOC estéril y se incubó con agitación durante 1 h a 37°C . El cultivo se centrifugó a $900 \times g$ por 2 min y las bacterias se resuspendieron en aproximadamente 200 μl del mismo cultivo. Placas A100 (agar al 1,5 % en medio LB y ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se sembraron con esta suspensión y se incubaron a 37°C durante la noche. Al día siguiente se seleccionaron colonias de cada placa y se dejaron creciendo en 5 mL de medio LB con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante la noche con agitación a 37°C . Se seleccionaron colonias por α complementación cuando la transformación se realizó con el vector pGEM-T, picando así las colonias blancas que se dejaron creciendo como se describió anteriormente. En este caso las placas debieron ser preparadas agregando sobre su superficie 100 μl de IPTG 100 mM y 20 μl de X-gal 50 mg/ml.

E. Purificación del ADN plasmidial

El ADN plasmidial presente en los clones seleccionados se purificó mediante el kit Qiaprep de Qiagen, utilizando el protocolo recomendado por el fabricante, que se basa en el protocolo para obtener ADN plasmidial de Sambrook (Sambrook y col., 1989).

F. Análisis de ADN por electroforesis en geles de agarosa

El análisis de los productos derivados de la amplificación por PCR, de las digestiones con enzimas de restricción, de la purificación de ADN plasmidial, de las preparaciones de ADN genómico, de las preparaciones de ARN total y de las preparaciones de plasmidios linearizados, se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa GibcoBRL al 1 o 2 % en TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, BrEt [0,3 µg/mL]). Para esto, las muestras se prepararon con 1:10 de volumen de una solución de carga que contiene azul de bromofenol 0,42% y glicerol 50%. Como patrón de tamaño de ADN se utilizó 1 µg de una mezcla de estándar de [HindIII-λ/Hae IIIΦX174], que contiene fragmentos que van desde los 70 pb hasta 23 Kb. Las bandas de ADN en el gel se visualizaron bajo luz ultravioleta y se fotografiaron con una cámara digital. En los casos de digestiones preparativas para purificar un fragmento a partir de su extracción del gel se utilizó una agarosa de mayor pureza Seakem GTC agarose (Biowhittaker Molecular Applications).

G. Digestión con endonucleasas de restricción

Para comprobar la presencia de los genes clonados en los respectivos plasmidios, el ADN plasmidial se sometió a digestión con las enzimas de restricción específicas para las secuencias que bordean los genes en cada vector y el producto se analizó por electroforesis en geles de agarosa. En este caso las enzimas utilizadas fueron *EcoRI*, *BamHI*, *NotI* y *NcoI* obtenidas de Gibco BRL. La digestión se realizó en 20 μ l totales agregando aproximadamente 500 ng de ADN plasmidial y 5 U/ μ g de la enzima de restricción en su correspondiente tampón de reacción. La mezcla se incubó 1 h a 37°C para cada enzima, y si ambas enzimas ocupan la misma solución tampón se pudo incubar con ambas simultáneamente. Para la digestión preparativa se utilizó 5 μ g de ADN plasmidial en un volumen final de 100 μ L en las mismas condiciones anteriormente descritas.

H. Purificación de los fragmentos de ADN desde geles de agarosa

Los fragmentos de ADN resultantes de las digestiones con enzimas de restricción se analizaron en geles de agarosa al 1% Seakem GTC agarose. El segmento del gel correspondiente al fragmento de ADN de interés se cortó y separó del resto del gel, y luego se purificó mediante el Kit Concert Rapid Gel Extraction de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante.

I. Secuenciación del ADN

Las muestras purificadas de ADN se secuenciaron utilizando el Kit comercial Bigdye 2.0 fabricado por Perkin Elmer y un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer fabricado por Applied Biosystems. Para esto se utilizaron partidores específicos para las secuencias que flanquean el inserto como los partidores PUC/M13 Fw y PUC/M13 Rv propios del vector pGEM-T. En algunas ocasiones se utilizaron también los partidores propios de cada gen.

16. ANALISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS

Para su análisis, las secuencias se alinearon y revisaron con el software Vector NTI suite 6.0 obtenido de Invitrogen. La comparación de las secuencias con la base de datos del NCBI se realizó mediante el algoritmo BLASTX (compara la secuencia nucleotídica traducida en todos sus marcos de lectura contra una base de datos de proteínas), restringiendo la búsqueda en el reino bacteria y utilizando los demás parámetros predeterminados por el programa. En el análisis de la base de datos de contigs de *P. salmonis*, se tomó el 100% de la secuencia de cada contig, y luego de identificar aquellos contigs que presentaban homología con algún gen flagelar, estos se analizaron con mayor detalle, para lo que se hizo blast con la parte inicial, central y final de la secuencia. Se tomó como límite de resultados un valor mínimo de e-value de 1×10^{-5} , el que a pesar de ser tan bajo fue lo suficientemente significativo para determinar el orden

de los genes y la presencia de partes de ellos en los extremos de los distintos contigs. Los alineamientos múltiples a nivel de aminoácidos se realizaron mediante el software Multalin obtenido del sitio Web del INRA (Instituto Nacional de Investigación Agronómica de Francia) (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/>), según los parámetros predeterminados por el programa.

17. PREPARACION DE PROTEINAS RECOMBINANTES EN *E. COLI*

A. Inducción de la síntesis de proteínas

La expresión de las proteínas de fusión FlgC y FlgD se realizó en células de *E. coli* BL21 previamente transformadas con los vectores recombinantes pET32a-FlgC y pET32a-FlgD. Para inducir la expresión de las proteínas, 50 mL de medio LB-Amp (ampicilina 100 µg/mL) se inoculó con 1,5 ml de cultivo fresco de la cepa de *E. coli* BL21 crecida durante la noche, y se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 a 0,7 a una longitud de onda de 600 nm. Luego se tomó 1 ml correspondiente al tiempo 0 de inducción y al resto del cultivo se le agregó IPTG a una concentración final de 1 mM. Hecho esto, se tomó una alícuota a cada hora durante las siguientes 3 h. Las alícuotas de 1 ml se centrifugaron y la pella se resuspendió en 200 µL de tampón PBS. Las muestras se sonicaron tres veces durante 15 s a intensidad media, manteniendo los tubos en frío para evitar la degradación de la muestra. Luego de sonicar,

la suspensión se centrifugó a 13.000 x g por 10 min, separándose la fracción proteica soluble de las proteínas insolubles y los restos celulares.

B. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó con el kit Micro BCA protein assay de Pierce. La detección se hizo en placas de ELISA utilizando 200 μ l de reactivos del kit y 10 μ l de muestra, agregando también muestras de BSA de concentración conocida para obtener una curva de calibración desde 0,05 – 0,8 mg/ml. La placa se incubó a 37°C por 30 min y luego se leyó en un lector de ELISA ELX 800 (Biotek Instruments Inc) a 490 nm.

C. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes

Las muestras a analizar se prepararon mezclándolas con 1 volumen de tampón de corrida 2X que contiene Tris 62,5 mM (pH 6,8), SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,02% y β -mercaptoetanol 50 mM. En el caso de las fracciones proteicas insolubles, éstas se resuspendieron directamente en 60 μ l de tampón de corrida. Las muestras se calentaron a 100°C durante 5 min antes de cargar los geles. Los geles de poliacrilamida se prepararon de acuerdo a Laemmli (1970). El gel concentrador es al 4,5% de acrilamida : bisacrilamida (30:1) en Tris 0,125 mM (pH 6,8), SDS 0,1%,

TEMED 0,1% y persulfato de amonio al 0,13%. El gel separador es al 12,5% de acrilamida : bisacrilamida (30:1), en Tris 0,375 mM (pH 8,8), SDS 0,1%, TEMED 0,25% y persulfato de amonio al 0,037%. El tampón de corrida corresponde a Tris-glicina (Tris-base 25 mM; glicina 190 mM; SDS 0,1%, pH 8,3). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 a 110 V hasta que el frente de corrida cayó del gel. Posteriormente el gel se tiñó con una solución que contiene azul de Coomassie 0,5%, metanol 45% y ácido acético al 10%, durante aproximadamente 30 min con agitación, y se destiñó con la misma solución sin colorante. Los geles se secaron en un secador modelo 543 Gel Dryer de la marca Bio-Rad a 80°C durante 1 h en condiciones de vacío. Como patrón de tamaños moleculares se utilizó el estándar de Invitrogen BenchMark Prestained Protein Ladder que incluye tamaños de proteína de 8,4 KDa hasta 176,5 KDa.

D. Purificación de las proteínas recombinantes

El cultivo bacteriano se centrifugó a 4.000 x g a 4°C durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el sedimento bacteriano se resuspendió en 4 mL de Tris 50 mM (pH 8) en presencia de PMSF 1 mM. Este se sonicó 4 veces durante 25 s manteniendo los tubos en hielo. Luego se centrifugó por 10 min a 9.000 x g a 4°C y se separó la fracción proteica soluble del material insoluble. La purificación de las proteínas recombinantes se realizó utilizando la resina de afinidad níquel-agarosa Ni-NTA que se acopla a las histidinas presentes en la proteína de fusión. El procedimiento utilizado con esta resina varía según la proteína sea soluble o se encuentre en la fracción insoluble. En el caso de la proteína soluble, se eluyó incrementando la concentración de imidazol en las soluciones de los

lavados, siguiendo el protocolo entregado por el fabricante (Novagen) para la purificación de proteínas nativas.

En el caso en que la proteína se encontraba principalmente en la fracción insoluble, ésta se debió resuspender en urea, determinando primero la concentración óptima de urea en la que la proteína se solubilizaba con soluciones de urea 1 M hasta 6 M en Tris 50 mM (pH 8,0). Luego de que la proteína se solubilizó se procedió a purificarla con la resina de afinidad de Ni-NTA según el protocolo entregado por el fabricante para su purificación en condiciones desnaturantes con la misma concentración de urea usada para solubilizarla.

E. Digestión de proteínas de fusión mediante enteroquinasa

Las proteínas de fusión recombinantes Trx-FlgC y Trx-FlgD se digirieron con la enzima enteroquinasa, que es una proteasa que tiene un sitio de corte que escinde las proteínas recombinantes de su fusión a tioredoxina.

La digestión se realizó por 16 h a 20°C en un volumen final de 100 - 200 μ l utilizando 1 U de enteroquinasa de Novagen, por cada 25 μ g de proteína en el tampón de reacción suministrado en el kit. La eficiencia del proceso se analizó mediante geles de poliacrilamida en las condiciones desnaturantes anteriormente descritas.

En el caso que la proteína a cortar haya sido solubilizada en urea, esta se debió dializar hasta una concentración máxima de 2 M urea en Tris 20 mM pH 7,5 para no inhibir la actividad de la enteroquinasa.

18. INMUNIZACION DE RATONES CON LAS PROTEINAS RECOMBINANTES Y OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Para ambas proteínas recombinantes se siguió el mismo protocolo de inmunización. Para cada proteína se usaron 3 ratones Balb/c los que se inyectaron intraperitonealmente con aproximadamente 50 µg de proteína en 200 µl de una emulsión con adyuvante de Freund. La primera inyección se realizó con adyuvante de Freund completo y los refuerzos a los 14 y 28 días se realizaron con adyuvante de Freund incompleto. La sangría se realizó 10 días después de la última inyección y se evaluó la producción de anticuerpos contra la proteína recombinante en el suero del ratón, mediante las técnicas de ELISA y Western Blot. Para hacer la fusión y producir los anticuerpos monoclonales se eligió aquel ratón que presentó el mejor título. El procedimiento basado en el método de Köhler y Milstein (Köhler y Milstein, 1975), se realizó en colaboración con Adolfo Jamett y Juanita Bustamante de BiosChile IGSA.

19. ANALISIS DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIANTE ELISA

Se utilizaron placas de 96 pocillos, las que se activaron agregando 50 µL de una solución con 10 µg/ml de la proteína de interés en PBS por pocillo. Esto se incubó por 90 min a temperatura ambiente, luego se eliminó el exceso de la proteína recombinante y la placa se trató con 350 µL/pocillo de una solución de bloqueo que contiene caseína-sacarosa al 2% por 1 h a temperatura ambiente. A continuación se agregó 50 µL de los

sueros a analizar a cada pocillo en diluciones seriadas en base 2, con solución de bloqueo, partiendo por una dilución de 1:4 en el primer pocillo. La mezcla se incubó durante 90 min a temperatura ambiente. Luego la placa se lavó tres veces con 350 μ l de PBS-Tween 20 al 0,02% durante 5 min cada una. Se incubó con el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina desarrollado en cabra (KPL), el cual se agregó diluído 1/1000 en solución de bloqueo en un volumen de 50 μ l por pocillo. La placa se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se realizaron 4 lavados con PBS-Tween 20 al 0,02% por 5 min cada uno. El revelado de color se realizó incubando a 37°C con 50 μ L/pocillo de una solución 1 mg/ml de paranitrofenilfosfato (PNPP) en tampón FAL (100 mM NaCl, 100 mM Tris, 5 mM MgCl₂; pH 9,5) por 30 min. El revelado se detuvo agregando 50 μ L por pocillo de NaOH 3N. Finalmente la placa se leyó a 405 nm en un lector de ELISA ELX 800 de Biotek Instruments Inc.

20. ANALISIS DE PROTEINAS POR LA TECNICA DE *WESTERN BLOT*

Para la detección de las proteínas recombinantes purificadas o de las proteínas presentes en los extractos celulares de *P. salmonis* se utilizaron los sueros policlonales y los anticuerpos monoclonales obtenidos contra FlgC y FlgD. Las muestras se sometieron a una electroforesis en condiciones desnaturantes en un gel de poliacrilamida al 12,5% y luego se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m, durante 1 h a 100 V en tampón de transferencia (Tris-base 25 mM; glicina 190 mM; SDS 0,1%, pH 8, metanol al 20%). La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en TBS-Tween

20 al 0,02% durante 1 h. Luego se incubó con el primer anticuerpo diluído 1/500 si el suero era policlonal y 1/1000 si el anticuerpo era monoclonal. Estos se diluyeron en leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 al 0,02% y la mezcla se incubó durante 1,5 h a temperatura ambiente con agitación. Luego se lavó 3 veces durante 10-15 min cada una con TBS-T 0,02% y agitación.

Como segundo anticuerpo se usaron anti-IgG de ratón conjugados a dos enzimas diferentes, debido principalmente a la diferente sensibilidad de ellos: el primero correspondió a un anti IgG de ratón desarrollado en cabra conjugado con fosfatasa alcalina, y el otro correspondió a un anti IgG de ratón desarrollado en cabra conjugado con peroxidasa. Ambos se utilizaron a una dilución 1/1000, en leche descremada al 2,5% en TBS-Tween 0,01%, y se incubó con ellos por 60 min a temperatura ambiente con agitación. Luego la membrana se lavó 3 veces por 10 min con TBS-Tween al 0,02%.

Para el revelado se siguieron protocolos diferentes dependiendo del conjugado del segundo anticuerpo usado. Para la fosfatasa alcalina, las membranas se sumergieron en una solución tampón que contenía 33 μ l de BCIP (50 mg/ml) y 66 μ l de NBT (50 mg/ml) en tampón FAL, hasta que se vieron las bandas, luego se sumergieron en tampón de detención (EDTA 2 mM, Tris 20 mM pH 7,4) y las membranas se lavaron con agua destilada. Como sustrato para la peroxidasa se utilizó un kit Super signal[®] West Pico chemiluminiscent de Pierce según las indicaciones recomendadas por el fabricante. En un cuarto oscuro se incubó la membrana con sustrato durante 5 min y luego se expuso a la placa autoradiográfica durante 1 a 10 min según fue necesario. Posteriormente la placa se reveló utilizando revelador fotográfico Kodak, se lavó con agua y luego se fijó con solución fijadora Kodak.

21. INMUNOPRECIPITACION

Los extractos de *P. salmonis* se resuspendieron en tampón de lisis PBS tritón X-100 al 1% con lisozima (10 ug/ml), se incubó por 20 min y luego se agregó una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, aminopterina 1ug/ml, leupeptina 1mg/ml, pepstatina 1mg/ml, aprotinina 1mg/ml). Las muestras se sonicaron y se determinó la concentración de proteínas mediante el Kit de MicroBCA. El proceso se dividió en dos partes: A) *Prelimpieza*: se centrifugó a 3.000 x g por 2 min para eliminar desechos insolubles y restos celulares. El sobrenadante se incubó con proteína G-Sefarosa 4 Fast Flow (Amersham Bioscience) y con suero normal de conejo, durante 2 h a 4°C con agitación. Se utilizó 60 µl de proteína G-Sefarosa y 30 µl de suero normal de conejo por cada 1 mg de extracto de proteína, estando la proteína G en un exceso relativo. La proteína G-Sefarosa se lavó previamente con el tampón de lisis PBS Tritón X-100 al 1% 3 veces por 2 min. B) *Inmunoprecipitación*: la suspensión se centrifugó a 5.000 x g por 2 min y al sobrenadante se agregó 5 µg de anticuerpo monoclonal. La mezcla se incubó toda la noche a 4°C con agitación. Luego se agregaron 25 µl de proteína G-Sefarosa y se incubó 30 min a 4°C con agitación. Se centrifugó a 3.000 x g por 5 min y la pella se lavó 4 veces con 1 ml de tampón de lisis PBS Tritón X-100 al 1% con inhibidores de proteasas. Se hizo un último lavado con PBS, se centrifugó y la pella se disolvió en 20 µl de solución de carga 3X en presencia de inhibidores de proteasas. Las muestras se incubaron a 100°C por 5 min y se cargaron en un gel de poliacrilamida SDS al 15 %. Se continuó con el protocolo de *Western blot* en las mismas condiciones antes descritas y la presencia de bandas proteicas se reveló mediante quimioluminiscencia.

22. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y ELECTRONICA.

Para la microscopía electrónica, las células de *P. salmonis* provenientes de cultivos incubados con agua de mar y en condiciones control se semipurificaron y se llevaron al laboratorio de microscopía electrónica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile para ser analizadas. 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 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.

Para la microscopia de fluorescencia, las muestras de *P. salmonis* fueron observadas utilizando tinción con Nanorange (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 Nanorange. 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 Nanorange 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 Fisiología y Genética Molecular Vegetal de la Universidad de Chile.

III. RESULTADOS

1. ANALISIS BIOINFORMATICO DEL GENOMA E IDENTIFICACION DE GENES FLAGELARES DE *P. SALMONIS*.

A partir de la secuenciación del genoma de *P. salmonis* se obtuvo un borrador que se ordenó en 2143 *contigs* o secuencias contiguas. Estas se crearon a partir de la secuencia de uno o más clones que se superponen entre sí al ser alineados por un determinado algoritmo bioinformático de identidad de secuencias. Esta base de datos de 2143 *contigs* se analizó comparando las secuencias contra la base de datos del NCBI y así se identificaron el o los posibles genes codificados por cada *contig*. Cada uno de estos *contigs* puede contener más de un gen o parte de ellos en su secuencia. A partir de esta información se identificaron todos los *contigs* que contenían secuencias de genes que en otras bacterias tuvieran alguna relación con la estructura y funcionamiento de un flagelo. Este estudio se realizó en colaboración con Rodrigo Brücher y Estaban Engel, tesistas del laboratorio. Un resumen de estos *contigs*, y el resultado de su anotación se presentan en la Tabla 1. Al hacer un análisis de la posible función codificada por cada uno de estos genes para el desarrollo de un flagelo, estos se pueden agrupar en 3 grandes categorías (Tabla 2). Estas son, a) genes que codifican para proteínas estructurales, ya sea del cuerpo basal o del filamento; b) genes involucrados en la biosíntesis y formación del flagelo; c) genes que tienen que ver con la quimiotaxis y el funcionamiento del motor flagelar. Cabe destacar que el número de genes encontrados fue de 36, lo que es cercano a lo esperado si se considera que en general la cantidad de genes necesarios para formar un

flagelo va desde 40 a 50 genes. Esto considerando que la secuencia analizada no corresponde al 100% del genoma.

Tabla 1

Contig	Nombre del Gen	E-value	Organismo al que se asemeja	Función que se le atribuye
253	cheW	1E-29	<i>Pseudomonas syringae</i>	Transmite la señal de los quimiorreceptores al motor flagelar
614	cheV	6E-14	<i>Pseudomonas syringae</i>	Transmite la señal de los quimiorreceptores al motor flagelar
822	motA	4E-25	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Transportador de protones componente del motor
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
953	fliM	1E-102	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Parte del complejo de switch de dirección de rotación flagelar
1230	fliG	9E-66	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Parte del complejo de switch de dirección de rotación flagelar
1234	MCP	1E-29	<i>Vibrio vulnificus</i>	Receptor de quimiotaxis, aceptor de metilos
1234	fliY	3E-09	<i>Alteromonas sp</i>	Parte del complejo de switch de dirección de rotación flagelar
2132	cheZ	5E-09	<i>Vibrio vulnificus</i>	Regula la rotación flagelar interactuando con CheY
2132	cheY	2E-15	<i>Vibrio vulnificus</i>	Transmite la señal de los quimiorreceptores al motor flagelar
502	flhB	1E-29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Biosíntesis y exportación de proteínas flagelares
502	flhA	2E-08	<i>Shewanella oneidensis</i>	Biosíntesis y exportación de proteínas flagelares
582	fliP	2E-48	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Componente de la vía de síntesis del flagelo
582	fliO	8E-07	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Proteína de ensamblaje flagelar
596	flhF	2E-33	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Proteína de síntesis flagelar de unión a GTP
402	fliA	1E-72	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Factor sigma 28
641	flaM	1E-25	<i>Vibrio cholerae</i>	Regulador de respuesta sigma 54 dependiente
1086	fliK	6E-13	<i>Vibrio cholerae</i>	Regula el tamaño del gancho flagelar
1086	fliJ	3E-05	<i>Yersinia pestis</i>	Chaperona de la biosíntesis flagelar
1230	fliI	5E-74	<i>Legionella pneumophila</i>	ATP sintasa específica de flagelo
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
1996	fliI	6E-35	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATP sintasa específica de flagelo
2076	flhF	3E-12	<i>Vibrio cholerae</i>	Proteína de unión a GTP asociada a la biosíntesis de flagelo
2128	fliR	6E-07	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Participa en la biosíntesis del flagelo
no contig	flgJ	8E-15	<i>Vibrio vulnificus</i>	Peptidoglicán hidrolasa y chaperona flagelar
101	flgK	8E-12	<i>Pseudomonas putida</i>	Proteína asociada al gancho flagelar HPA1
237	flagelina	2E-07	<i>Legionella pneumophila</i>	Proteína estructural del filamento flagelar
613	flgB	2E-05	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Proteína del eje proximal del cuerpo basal del flagelo
613	flgC	1E-34	<i>Pseudomonas putida</i>	Proteína del eje proximal del cuerpo basal del flagelo
613	flgD	8E-06	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Proteína estabilizadora del ensamblaje del codo flagelar
641	fliE	6E-10	<i>Pseudomonas syringae</i>	Proteína del eje proximal del cuerpo basal del flagelo
863	flagelina	4E-26	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Proteína estructural del filamento flagelar
996	flgE	3E-15	<i>Bordetella parapertussis</i>	Proteína estructural del codo flagelar
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
1230	fliF	7E-86	<i>Pseudomonas putida</i>	Proteína estructural del anillo M del cuerpo basal del flagelo
1384	flgI	7E-26	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Proteína estructural del anillo L del cuerpo basal del flagelo
1384	flgH	3E-37	<i>Vibrio cholerae</i>	Lipoproteína del anillo L del cuerpo basal del flagelo
1565	flagelina	1E-30	<i>Caulobacter crescentus</i>	Proteína estructural del filamento flagelar
1930	flagelina	1E-22	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Proteína estructural del filamento flagelar
2097	flgG	3E-30	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Proteína del eje distal del cuerpo basal del flagelo

Tabla 1. Lista de los genes relacionados con el flagelo, encontrados en el borrador del genoma de *P. salmonis*.

Aquí se especifican los *contigs*, el gen al que se asocian y el e-value entregado por el análisis bioinformático que señala el grado de identidad. Además se incluye la posible función de cada uno de estos posibles genes. El gen *flgJ* no se encontraba en los *contigs* y se identificó posteriormente en fragmentos amplificados mediante PCR.

Tabla 2

Quimiotaxis y Motor	11
Estructural	12
Exportación y Ensamblaje	13
Total	36

Tabla 2. Resumen del total de genes flagelares ordenados en categorías según su posible función.

2. ORGANIZACION DE LOS GENES *FLGC* Y *FLGD* EN *P. SALMONIS*

Como el objetivo central de este trabajo es comprobar la existencia de un posible flagelo, la idea fue poder clonar algunos de estos genes flagelares a partir del genoma de *P. salmonis* y demostrar su expresión *in vivo*. Se seleccionaron los genes *flgC* y *flgD*, por codificar para proteínas estructurales del flagelo, las cuales son esenciales para la formación del mismo. Ambos genes son parte de un operón de genes estructurales que va generalmente desde *flgB* hasta *flgK*, todos genes de clase II o de expresión intermedia, es decir que son expresados en un tiempo medio en relación con los demás genes. Las secuencias de los genes *flgC* y *flgD* se encuentran parcialmente en el *contig* 613 de *P. salmonis*, por lo que para obtenerlos completamente será necesario flanquearlos con secuencias de *contigs* de genes adyacentes según el modelo de operón propuesto a continuación.

Un análisis más detallado de los genomas de distintos organismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Bordetella pertussis*, *Vibrio*

cholerae, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia pestis* y otros, indicó que gran parte de los genes flagelares se encuentran presentes en grupos de operones, o “clusters” muy compactos de genes, con un mínimo de secuencia intergénica. Se encontró que existe más de un operón de genes flagelares y que estos se componen por genes de función similar, y que además sugieren un orden cronológico de expresión particular. Basado en esta información y utilizando el programa Vector NTI suite se construyó un modelo de la organización de este operón en *P. salmonis* (Figura 3). Este modelo se basa en las secuencias del mismo operón de *P. aeruginosa*, en la que se incluyeron todos los *contigs* de *P. salmonis* que presentaban homología con los distintos genes de esta bacteria.

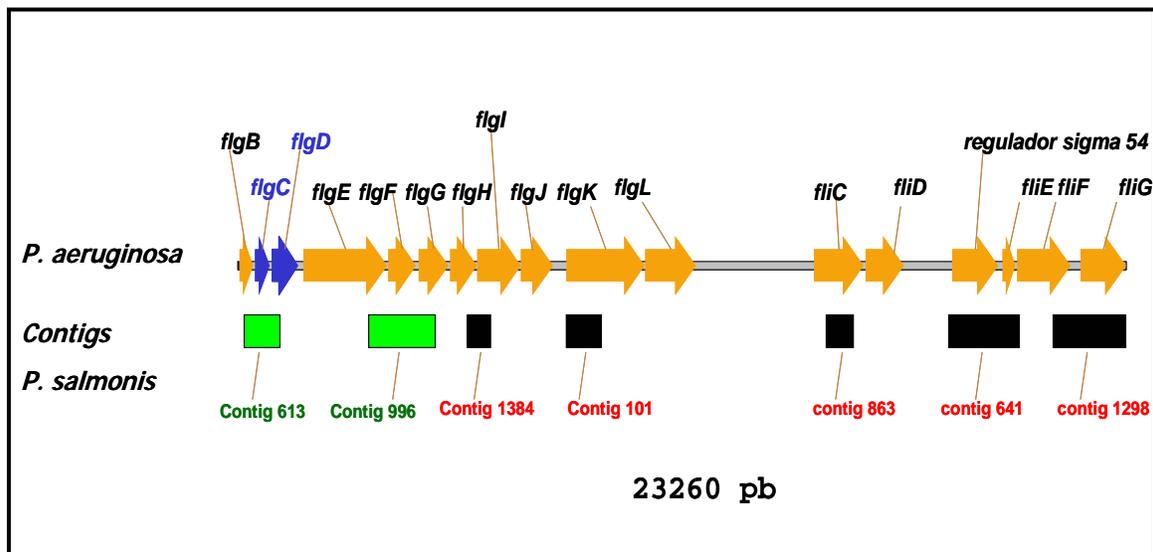


Figura 3. Modelo de la posible organización de los genes flagelares estructurales en *P. salmonis* en base a la organización presente en *P. aeruginosa*.

Se alinean las secuencias de los *contigs* obtenidos de *P. salmonis* con los genes flagelares de *P. aeruginosa*.

3. AISLAMIENTO Y SECUENCIACION DE LOS GENES FLAGELARES *FLGC* Y *FLGD* DE *P. SALMONIS*

A. Aislamiento y secuenciación de *flgC*

Al analizar la secuencia completa del *contig* 613 se determinó que este contenía la totalidad de *flgC*, así como el extremo carboxilo terminal de *flgB* y el extremo amino terminal de *flgD* (Figura 4). Para aislar *flgC* a partir del ADN genómico de *P. salmonis* se diseñaron los partidores FlgC Fw y FlgC Rv con sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*R RI respectivamente (ver secuencias en Materiales y Métodos).

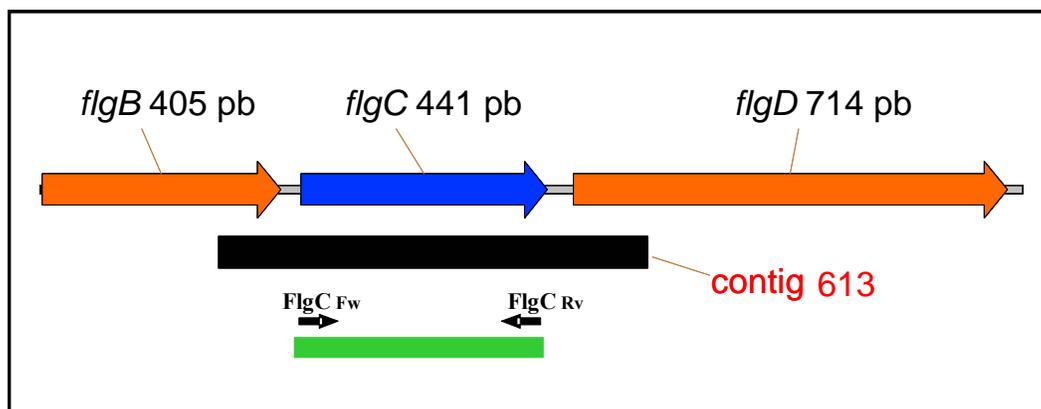


Figura 4. Esquema de los genes flagelares y contigs, para la amplificación del gen *flgC*. En negro se representa el *contig* 613 el que se encuentra alineado con la secuencia consenso. En verde se representa el fragmento final de *flgC* completo amplificado con sitios de restricción.

El fragmento obtenido por la reacción de PCR con estos partidores se analizó en geles de agarosa, lo que indicó un tamaño de aproximadamente 400 pb (Figura 5A). Este fragmento se purificó y posteriormente ligó al vector pGEM-T. Las células competentes Novablu se transformaron con el producto de ligación y los plasmidios de los clones

positivos obtenidos se analizaron mediante digestión con endonucleasas de restricción (Figura 5B). Una vez confirmada la inserción del gen *flgC* en pGEM-T, éste se secuenció usando los partidores PUC/M13 propios del vector pGEM-T, que flanquean ambos extremos del inserto. La secuencia nucleotídica confirmó la integridad del gen de 426 pb, que codifica para una proteína de 141 aminoácidos (Ver Anexo secuencias). Al comparar la secuencia obtenida con la base de datos del NCBI mediante el algoritmo BLASTX, se obtuvo un valor máximo (56%) de identidad con *flgC* de *Microbulbifer degradans*. Un alineamiento múltiple a nivel aminoacídico con las secuencias de mayor identidad de la base de datos se presenta en la Figura 6.

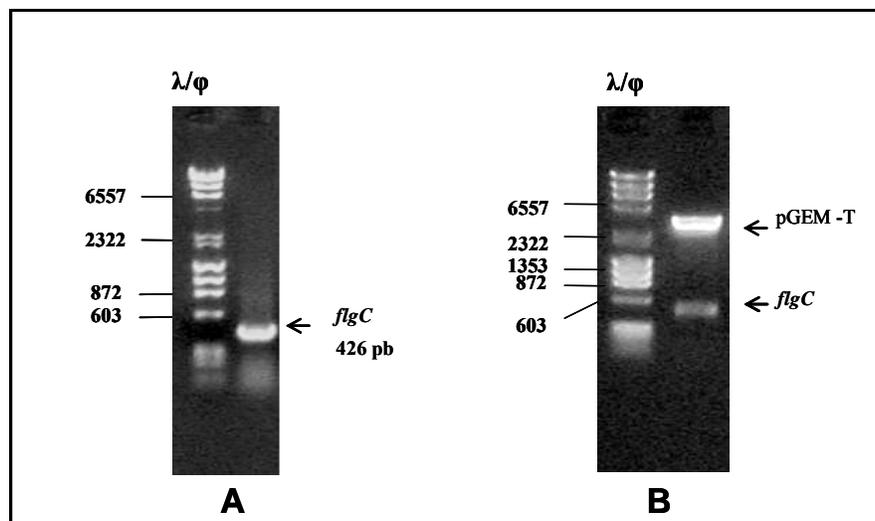


Figura 5. Análisis electroforético de los fragmentos de ADN resultantes de PCR y de fragmentos de ADN resultantes de la digestión de los plasmidios que contienen *flgC*.

En A se observa la banda que corresponde al amplificado de *flgC* obtenido por PCR de un tamaño aproximado de 400 pb. En B se observa la digestión del vector pGEM-T-*flgC* con *EcoRI* y *BamHI*. Se emplearon geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio [0,3µg/mL].

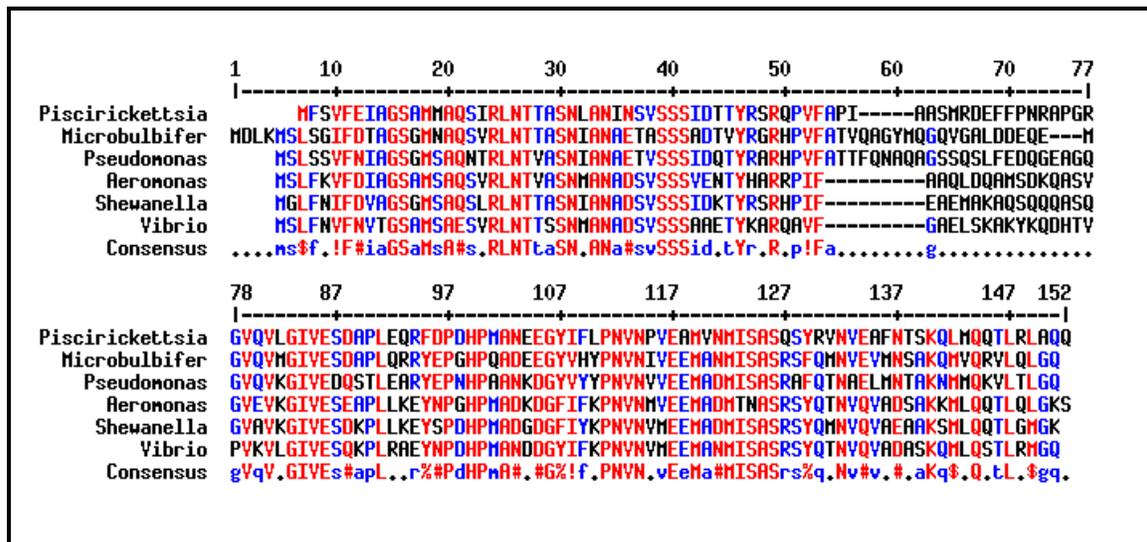


Figura 6. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de FlgC de *P. salmonis* con las secuencias de FlgC de *P. aeruginosa*, *M. degradans*, *A. hydrophila*, *S. oneidensis* y *V. cholerae*.

B. Aislamiento y secuenciación de *flgD*

Para aislar *flgD* solo se disponía de una secuencia de 170 pb del extremo amino terminal presente en el *contig* 613. En teoría, *flgD* debería ser de un tamaño aproximado de 600 pb en comparación con otros *flgD* conocidos, por lo que faltaba obtener más de 2/3 del gen. De acuerdo a la organización de los genes flagelares en otros organismos (modelo de la Figura 3), el *contig* 996 que codifica el extremo 3' de *flgE* se encontraría a continuación de *flgD*. Se diseñó un partidor antisentido, FlgE Rv, basado en una secuencia obtenida previamente en el laboratorio que codifica la mitad carboxilo terminal de *flgE*. El partidor directo denominado FlgDF se diseñó en base a la secuencia del extremo 3' de *flgC* (Figura 7).

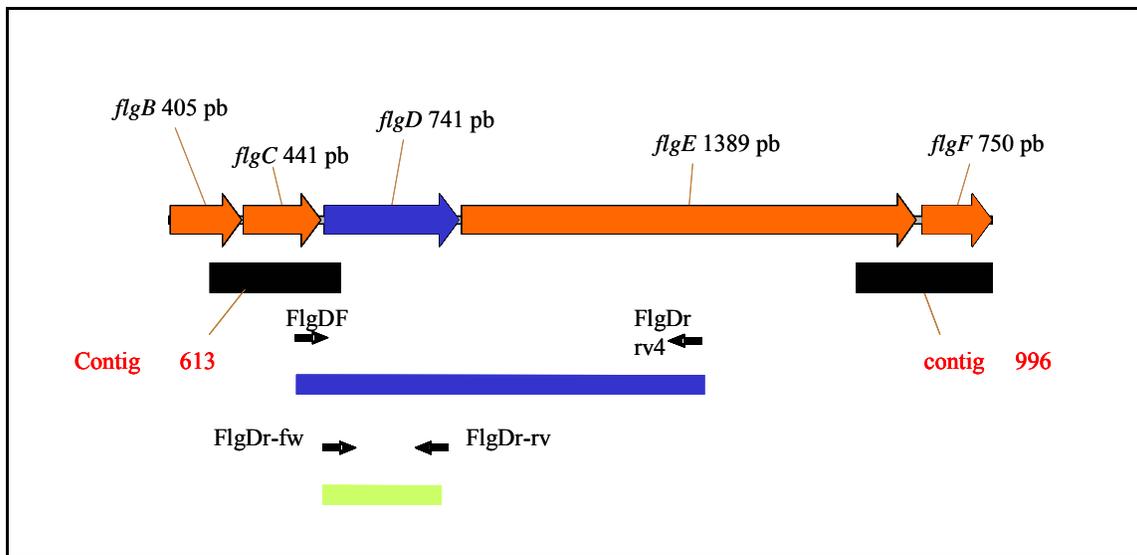


Figura 7. Esquema de los genes flagelares y *contigs*, utilizados para la amplificación de *flgD*.

En azul se representa el fragmento obtenido por PCR con partidores en base a la secuencias de *flgE*. En verde se representa el fragmento correspondiente a *flgD* que contiene los sitios de restricción.

Usando estos partidores se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1.8 Kb (Figura 8A) que correspondería a la totalidad de *flgD* y a la primera mitad de *flgE*. Este fragmento se clonó en pGEM-T y secuenció. A partir de esta secuencia se diseñaron partidores que contenían en sus extremos sitios de restricción *BamHI* y *EcoRI* para amplificar *flgD* completo (Figura 7). El resultado de este segundo PCR fue un fragmento de 684 pb (Figura 8B). Este se clonó en pGEM-T y secuenció (Figura 8C). La secuencia obtenida codifica para una proteína de 227 aminoácidos (ver Anexo secuencias). Al comparar la secuencia obtenida con la base de datos del NCBI, se obtuvo un valor máximo (46%) de identidad con *flgD* de *P. aeruginosa*. Al igual que para *flgC*, se hizo un alineamiento múltiple a nivel de aminoácidos con las secuencias de *flgD* de otras bacterias (Figura 9).

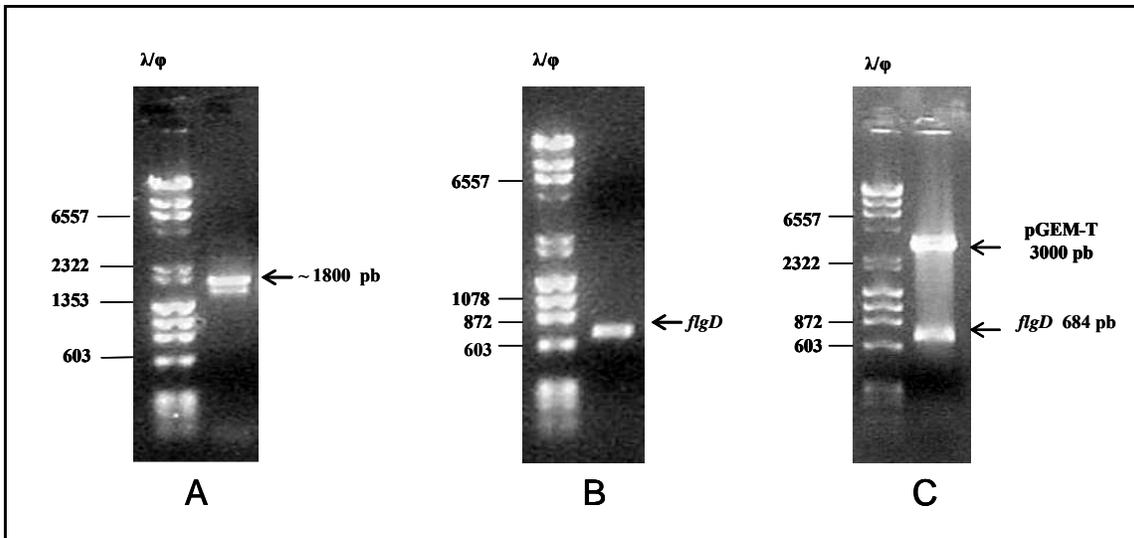


Figura 8. Análisis electroforético de los fragmentos de ADN resultantes de PCR (A y B) y de la digestión de los plasmidios recombinantes con *flgD* con endonucleasas de restricción (C).

A: producto de PCR obtenido con los partidores *flgDF* y *flgE* rv. B: fragmento completo de *flgD* de aproximadamente 660 pb, con partidores *FlgDr Fw* y *FlgDr Rv*. C: digestión con enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* de uno de los clones que contiene el vector pGEM-T con el inserto de *flgD*. Se emplearon geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio [0,3µg/mL].

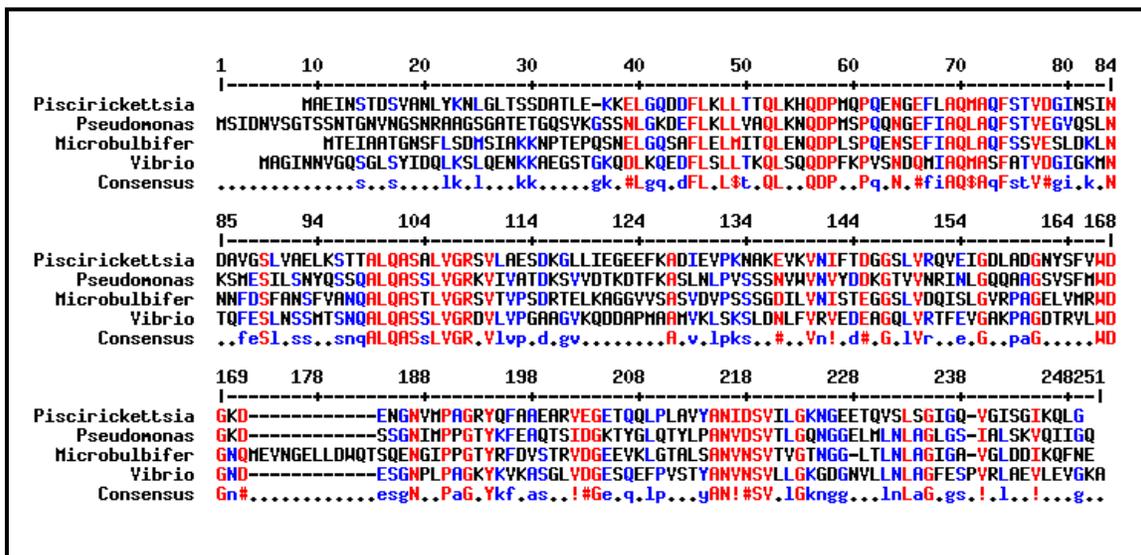


Figura 9. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de FlgD de *P. salmonis* con las secuencias de FlgD de *P. aeruginosa*, *M. degradans* y *V. cholerae*.

Los resultados obtenidos confirman que los genes *flgC* y *flgD* se encuentran ordenados según el modelo propuesto en la Figura 3. Esto indica que la organización de los genes flagelares en *P. salmonis*, al menos en este operón, sería similar a la de otras especies. Finalmente se comprobó la homología de FlgC y FlgD con las mismas proteínas de otros organismos flagelados (Figuras 6 y 9). Como resultados complementarios a estos, se sugiere ver el Anexo *fliE* y *fliF* al final de la tesis.

4. EXPRESION Y PURIFICACION DE FLGC Y FLGD RECOMBINANTES EN *ESCHERICHIA COLI*.

Con el fin de producir las proteínas recombinantes FlgC y FlgD, y con estas posteriormente producir anticuerpos monoclonales específicos, se utilizó el vector de expresión pET32a. En este vector los genes se clonaron río abajo del gen de tioredoxina (Trx) de *E. coli* y como producto se obtiene la proteína de interés unida a tioredoxina (Trx) de *E. coli*, que además posee un péptido de polihistidinas que facilita su posterior purificación. Un esquema del vector recombinante se presenta en la Figura 10. Para ello se aislaron los genes *flgC* y *flgD* a partir de los vectores pGEM-T-*flgC* y pGEM-T-*flgD* previamente descritos, utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. El fragmento de ADN correspondiente al gen se purificó del gel y se ligó al vector pET32a previamente digerido con *EcoRI* y *BamHI*. Estos sitios están dispuestos de manera tal que los genes quedan insertados en el vector en la orientación correcta y en marco de lectura del gen Trx. Para esto, células competentes Novablue se transformaron con las mezclas

de ligación, y los clones positivos se analizaron por digestión con enzimas de restricción (Figuras 10A y 10B).

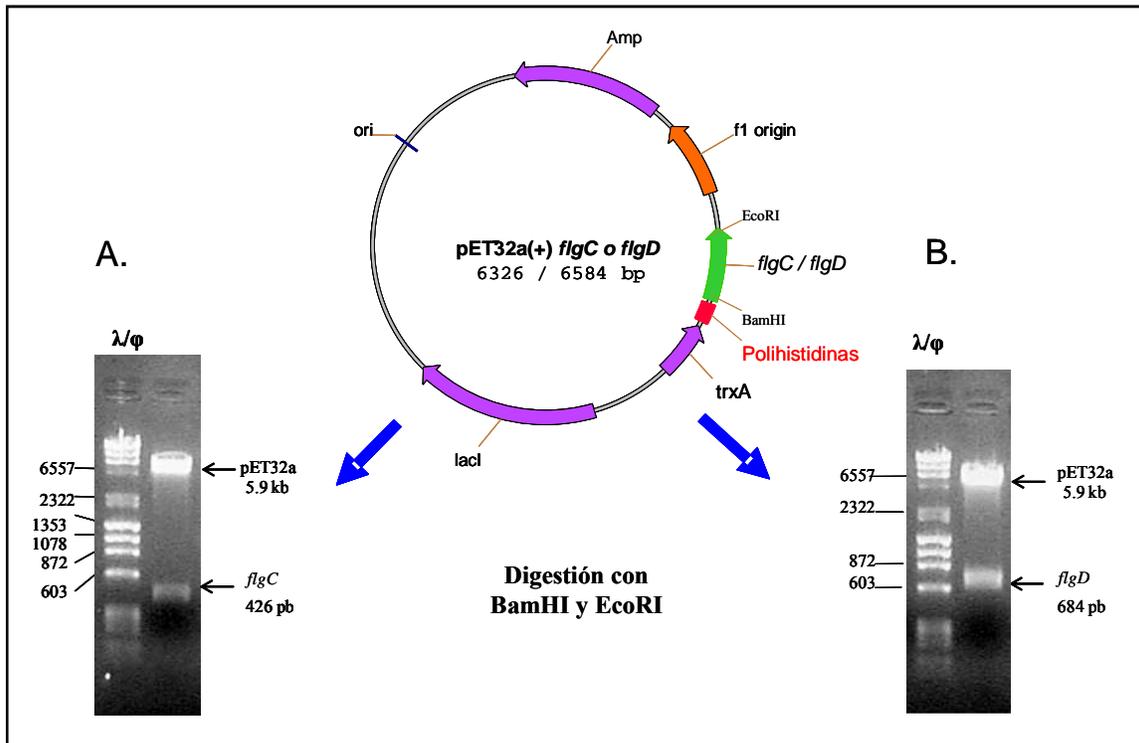


Figura 10. Esquema representativo del vector recombinante pET32a con los insertos de *flgC* o *flgD* y su análisis por electroforesis luego de la digestión con endonucleasas de restricción.

Los clones positivos se identificaron por digestión con enzimas *EcoRI* y *BamHI*. A: banda de 5.9 Kb correspondiente al vector pET32a linearizado y fragmento de *flgC* de 426 pb. B: banda de pET32a y fragmento de *flgD* de 684 pb. Se emplearon geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Luego de identificar los vectores recombinantes pET32a-*flgC* y pET32a-*flgD*, se usaron para transformar las células competentes BL21(DE3) especializadas para la expresión de genes clonados en esta clase de vectores. Se seleccionaron clones BL21 recombinantes para cada uno de los genes y se indujeron con IPTG para expresar la proteína recombinante según está descrito en Materiales y Métodos (Figura 11).

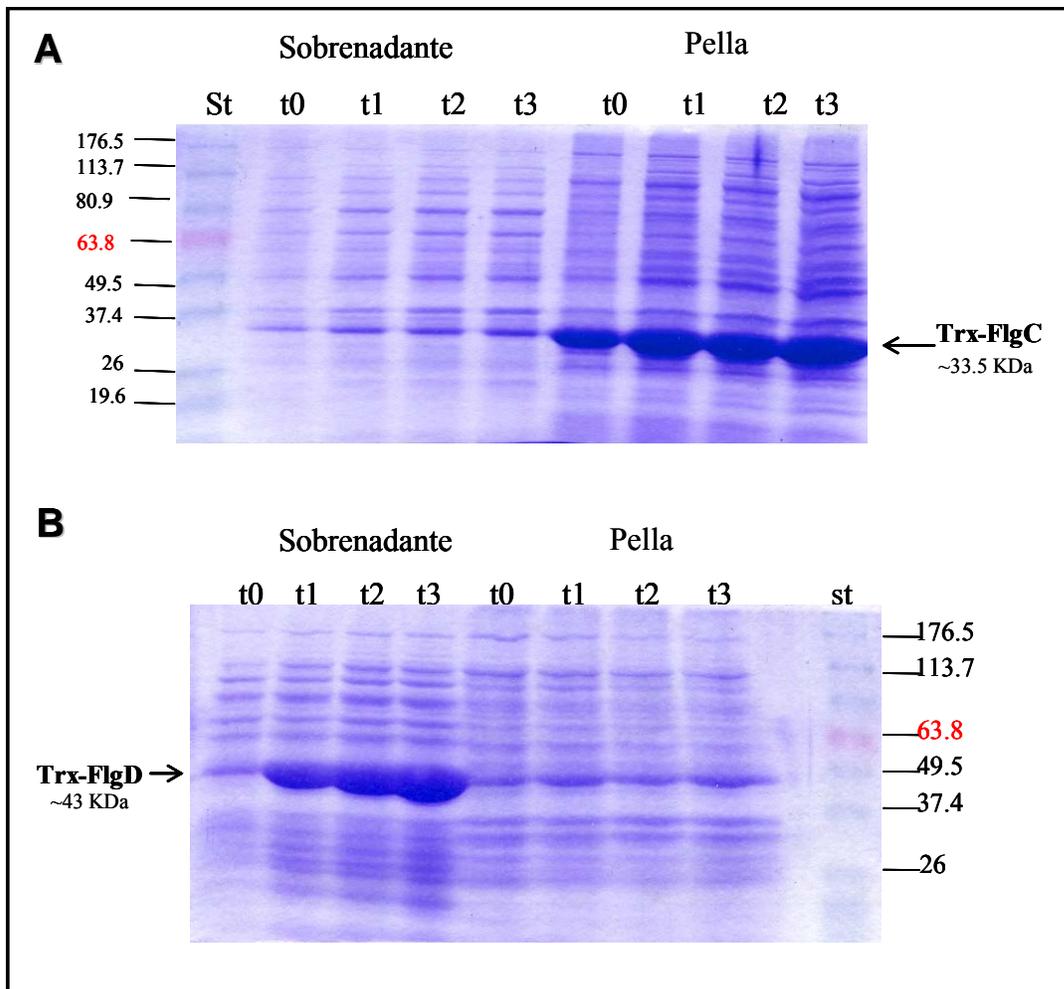


Figura 11. Análisis de la inducción de proteínas recombinantes Trx-FlgC y Trx-FlgD mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes.

A: Análisis por gel PAGE-SDS al 12,5%, de las fracciones proteicas solubles e insolubles luego de inducir *E. coli* BL21 transformadas con pET32a-*flgC* con IPTG. B: Análisis por gel PAGE-SDS al 12,5%, de las fracciones proteicas solubles e insolubles luego de inducir *E. coli* BL21 transformadas con pET32a-*flgD* con IPTG. Se analizó 10 μ g de proteína total de forma soluble y 20 μ l de la fracción insoluble a los distintos tiempos. t0: Pre-inducción, t1: 60 min, t2: 120 min, t3: 180 min post-inducción con IPTG. St: estándar de peso molecular de proteínas en KDa.

El análisis por geles de poliacrilamida de los cultivos de bacterias que contienen pET32a-*flgC* muestran que hubo una alta expresión de la proteína de fusión Trx-FlgC, la que se encuentra principalmente como cuerpos de inclusión (Figura 11A). El tamaño de la proteína de aproximadamente 33.5 KDa, corresponde al esperado para la suma de

FlgC de 15.5 KDa y la tioredoxina de 18 KDa. Dado que la proteína es insoluble, esta debió ser solubilizada con urea para su posterior purificación. Se probaron varias concentraciones de urea desde 1 M hasta 6 M y se estimó que la mayor solubilización se obtenía con urea 6 M.

Las bacterias recombinantes con pET32a-*flgD* en cambio presentan una alta expresión de la proteína de fusión Trx-FlgD en la fracción soluble (Figura 11B). El tamaño de la proteína es de aproximadamente 43 KDa que corresponde a la suma de FlgD de 24.9 KDa y la tioredoxina de 18 KDa.

Las proteínas de fusión se purificaron mediante una columna de afinidad de níquel-agarosa de Qiagen (ver Materiales y Métodos) que tiene afinidad por el péptido de polihistidinas presente en las proteínas recombinantes. Para esto se prepararon extractos de las proteína totales de 50 ml de cultivo de las cepas de *E. coli* BL21 pET32a-*flgC* y pET32a-*flgD* luego de inducir por 3 h la expresión de cada una de las proteínas recombinantes con IPTG. Los resultados muestran que las proteínas de fusión se purificaron eficientemente (Figura 12A y 12B). Gran parte de las otras proteínas presentes en el extracto quedaron en la fracción no retenida en la columna. La proteína de fusión, retenida en la columna a través de su péptido de polihistidinas, se eluyó aumentando la concentración de imidazol desde 5 mM hasta 500 mM, el cual al competir por el níquel con las histidinas libera las proteínas de fusión. En el caso de Trx-FlgC, las principales fracciones con proteína purificada fueron W20-2 a W50-2 obteniéndose alrededor de un 90% de pureza (Figura 12A). La recombinante Trx-FlgD eluyó en las fracciones W50-1 a E100-2 (Figura 12B), sin embargo su pureza fue menor, presentando algunas proteínas de menor tamaño a la proteína de fusión. Estas pueden ser productos

incompletos de expresión, o tal vez productos de degradación de la misma que contienen el Trx por lo que tienen afinidad por la columna, o bien proteínas fuertemente asociadas a la recombinante y que bajo estas condiciones de fuerza iónica no fue posible eliminar. A pesar de esto, la proteína de fusión es considerablemente la más abundante de estas fracciones presentando un grado de pureza cercano al 70%.

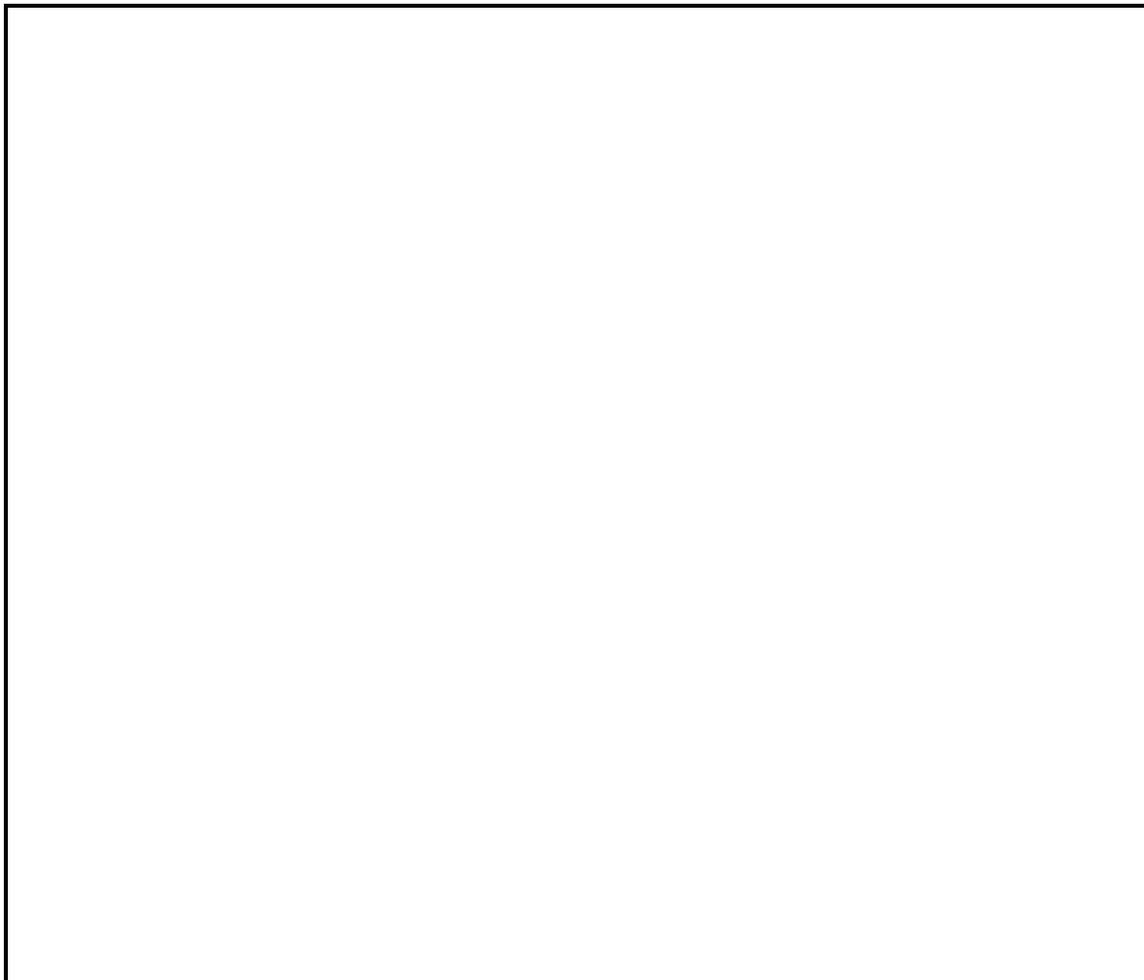


Figura 12. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% de las proteínas recombinantes purificadas mediante columna de afinidad de níquel-agarosa.

A: purificación de Trx-FlgC. B: purificación de Trx-FlgD. St: estándar de peso molecular de proteínas en KDa. NR: fracción no retenido, BB: solución de unión, W: solución de lavado, E: solución de elución. Los números anexos indican la concentración (mM) de imidazol utilizado en los 2 tubos de recolección (1 o 2) con cada solución. Se cargaron 20 μ l de cada fracción analizada.

Para estimar la concentración de las proteínas en las fracciones purificadas se analizaron alícuotas de estas fracciones de elusión en un gel de poliacrilamida junto con cantidades conocidas de BSA y se comparó la intensidad de las bandas. Según estos datos se obtuvo una concentración de Trx-FlgC de aproximadamente 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en la fracción W20-2, y una concentración de Trx-FlgD de aproximadamente 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en la fracción W50-2.

Además, se produjeron otras proteínas recombinantes para FlgC y FlgD, con el vector pET21a (datos no mostrados), con el que se obtuvo unas proteínas recombinantes no fusionadas a tioredoxina y que no poseen el péptido de polihistidinas por lo que no pueden ser purificadas mediante columna de níquel-agarosa. Estas se utilizaron con el fin de comprobar la especificidad de los anticuerpos monoclonales producidos contra las proteínas flagelares FlgC y FlgD libres de tioredoxina.

5. OBTENCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA FLGC Y FLGD DE *P. SALMONIS*.

Las proteínas recombinantes purificadas se usaron para inmunizar ratones Balb/c con el fin de producir anticuerpos monoclonales (ver Materiales y Métodos). Luego de la primera sangría se obtuvo un suero policlonal, el cual se probó mediante ELISA y *Western blot* contra las proteínas purificadas (datos no mostrados). Así se seleccionó el ratón que presentaba el mejor título contra la proteína recombinante. Luego se hizo la fusión celular y se obtuvieron hibridomas, los que posteriormente se seleccionaron. Así se obtuvo un anticuerpo monoclonal para FlgC (5E12) y tres anticuerpos monoclonales

para FlgD (7B2, 7B3 y 6H7). De todos ellos se produjo líquido ascítico al cual, mediante ELISA, se midió el título para su uso posterior (Figura 13). Los anticuerpos se probaron con la respectiva proteína recombinante purificada (Trx-Flg), con la proteína recombinante fusionada al péptido de T7 que se indujo en pET21a (Flg), y con una proteína heteróloga que contiene Trx, como un control negativo para descartar la posible reacción contra epítomos de este dominio.

Los resultados muestran un buen título de los anticuerpos por las correspondientes proteínas recombinantes de fusión así como también por las proteínas fusionadas a T7. Se observa una pequeña diferencia entre la proteína de fusión purificada y la proteína fusionada a T7 en extracto crudo. Sin embargo, para ambas la respuesta presenta el mismo comportamiento a través de las diluciones. Ninguno de los anticuerpos reconoció el control con las proteínas recombinantes intercambiadas, lo que demuestra que los anticuerpos anti-FlgC y anti-FlgD no reconocen a Trx, y son específicas para sus respectivas proteínas recombinantes. El título del anticuerpo 5E12 contra FlgC se estima de aproximadamente 1/1000 (Figura 13A). Para FlgD sólo se muestra el resultado del ELISA del anticuerpo 7B2, pero con los otros se obtuvo un título muy semejante, de alrededor de 1/20000 (Figura 13B).

La capacidad de los anticuerpos monoclonales de reaccionar con FlgC y FlgD se confirmó luego mediante *Western blot* contra las mismas proteínas recombinantes utilizadas en el ELISA, además se incluyó cada una de las proteínas de fusión digerida con enteroquinasa (Figura 14). El producto de esta digestión son proteínas recombinantes FlgC y FlgD escindidas de Trx. Los resultados del *Western blot* confirman la especificidad de los anticuerpos por las proteínas flagelares FlgC y FlgD.

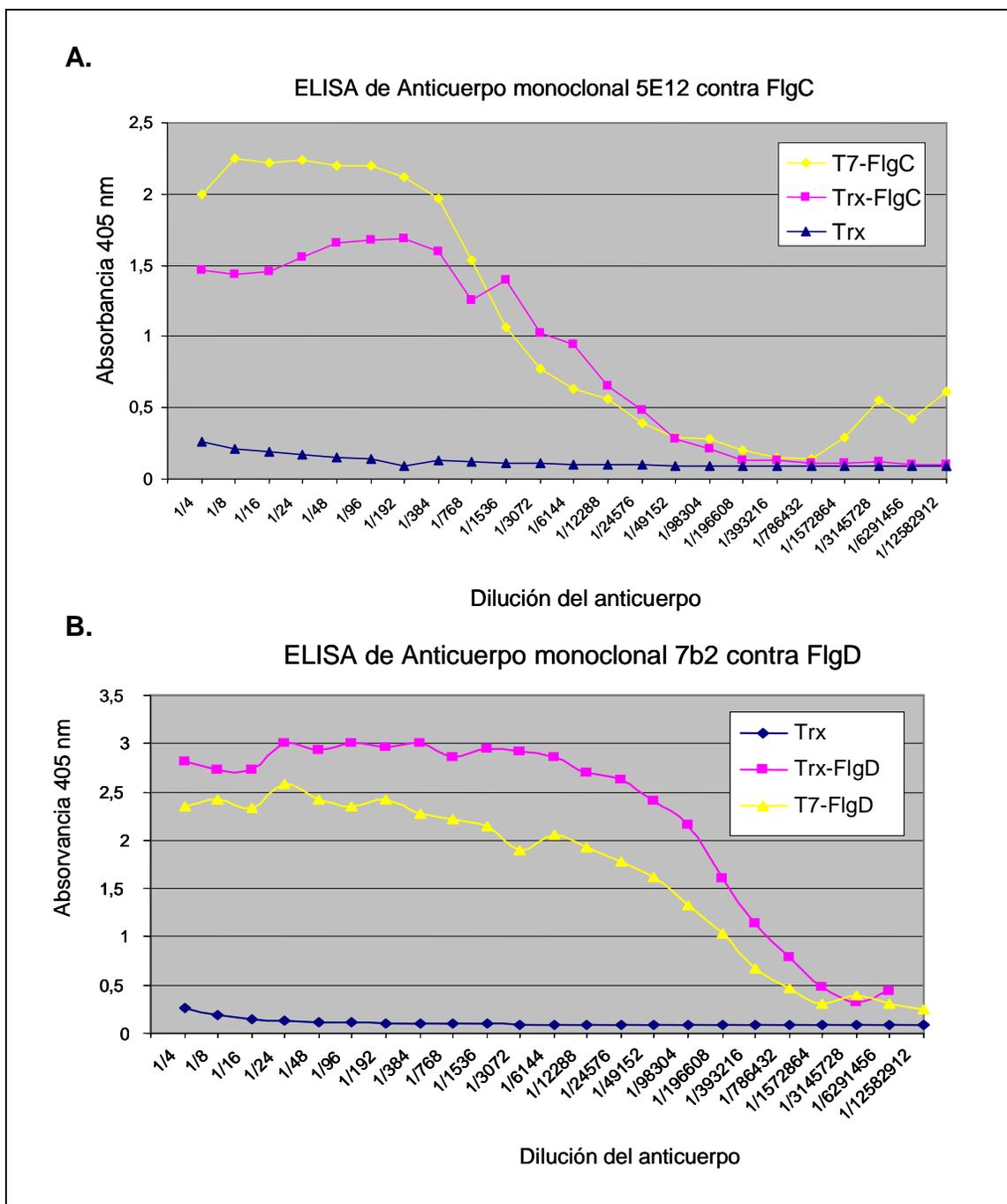


Figura 13. Análisis por ELISA de la reactividad de los anticuerpos monoclonales 5E12 y 7B2 contra FlgC y FlgD respectivamente.

A: reacción del monoclonal 5E12 contra las proteínas recombinantes Trx-FlgC, T7-FlgC y Trx. B: reacción del monoclonal 7B2 contra las proteínas recombinantes Trx-FlgD, T7-FlgD y Trx. La dilución de los anticuerpos es seriada en base 2 partiendo de una dilución 1:4.

Al lado de cada membrana de *Western* se incluye un gel de poliacrilamida teñido con el mismo orden de carga para ver la correspondencia de las bandas. Se observa mediante el *Western blot* que el anticuerpo monoclonal 5E12 contra FlgC reconoce la proteína de fusión de 34 KDa y la proteína fusionada al péptido de T7 en extracto crudo cerca de los 15 KDa, lo que concuerda con lo esperado (Figura 14A). Además se puede observar que el anticuerpo reconoce la proteína recombinante FlgC digerida con enteroquinasa que migra aproximadamente a los 15 KDa, pero no así la proteína Trx escindida que migra aproximadamente en los 18 KDa, confirmando así la especificidad del anticuerpo contra FlgC. En el caso de FlgD el anticuerpo 7B2 reconoce la proteína fusionada a Trx que se encuentra alrededor de los 40,5 KDa, y la proteína que contiene el péptido de T7 cerca de los 25 KDa de acuerdo a lo esperado (Figura 14B). Del mismo modo, el anticuerpo 7B2 contra FlgD reconoce la proteína escindida de Trx con la enteroquinasa, cerca de los 25 KDa, pero no reconoce la fracción de Trx confirmando la especificidad del anticuerpo. Cabe destacar que se ven otras bandas que pueden ser causa de que la proteína no pudo ser purificada totalmente, productos incompletos de expresión o producto de degradación que contienen el epítipo de FlgD, ya que el monoclonal reconoce algunas de estas proteínas. Al igual que en el ensayo de ELISA, sólo se muestra el resultado obtenido en el *Western blot* con el anticuerpo 7B2 ya que los otros anticuerpos tuvieron un comportamiento similar. Ninguno de los anticuerpos reaccionó contra Trx expresado por inducción del vector pET32a sin inserto confirmando una vez más la falta de reacción contra esta proteína. Para ambos casos la digestión con enteroquinasa de Trx-FlgC y Trx-FlgD fue parcial ya que aun se observa parte de la proteína de fusión, la que reacciona con los anticuerpos en el *Western blot*.

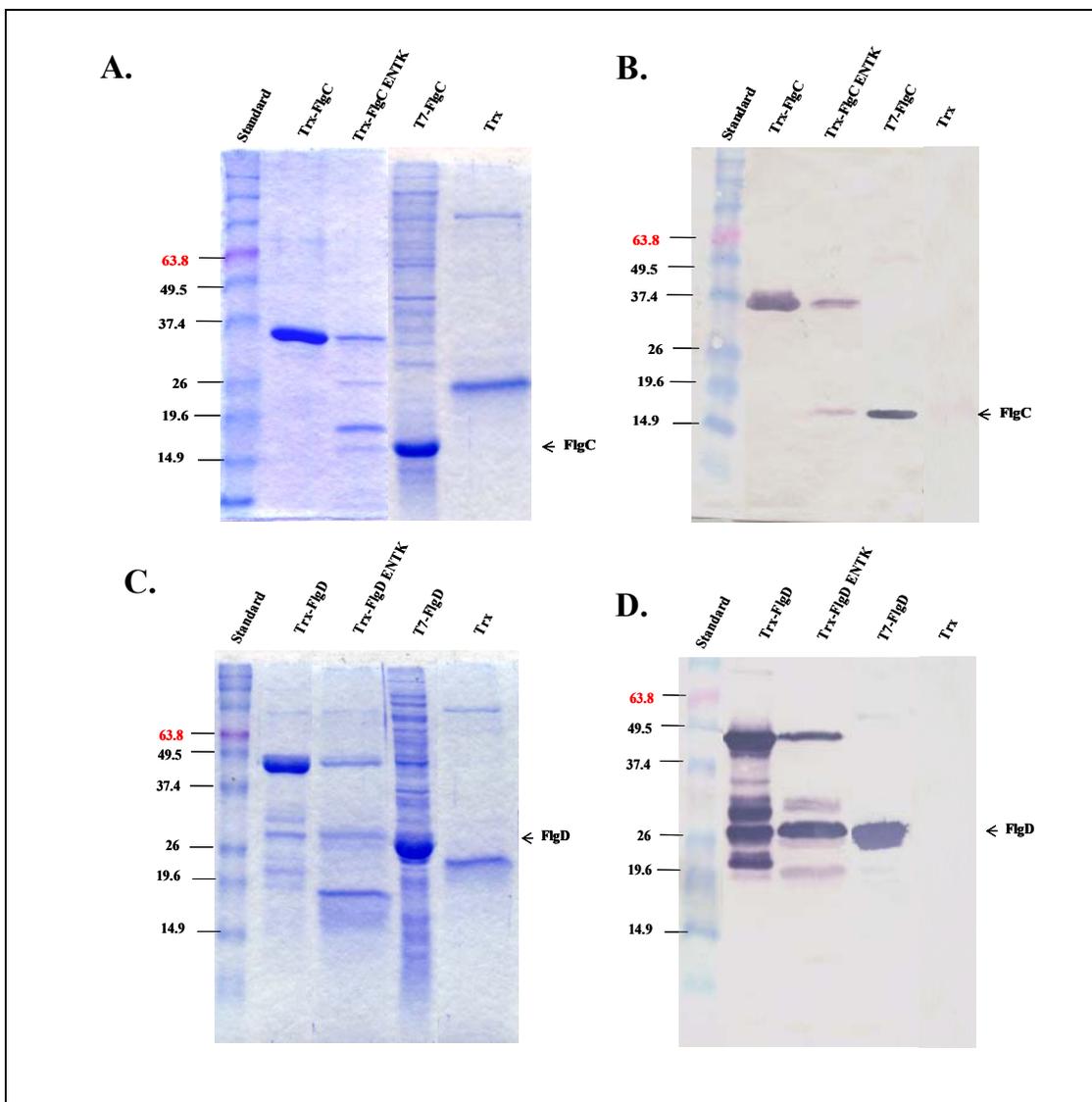


Figura 14. Análisis de distintas proteínas recombinantes de FlgC y FlgD mediante geles de poliacrilamida y *Western blot* con sus respectivos anticuerpos monoclonales α -FlgC 5E12 y α -FlgD 7B2.

A: Gel con diferentes proteínas recombinantes de FlgC, incluyendo además Trx. B: Membrana de *Western blot* con el mismo orden de carga de las proteínas, realizado con el monoclonal 5E12. C: Gel con diferentes proteínas recombinantes de FlgD incluyendo además Trx. D: Análisis por *Western blot* con el anticuerpo monoclonal 7B2 contra FlgD. Standard de peso molecular en KDa. ENTk: proteína fusionada a Trx digerida con enteroquinasa.

6. ESTUDIO DE LA MORFOLOGIA Y EXPRESION DE LOS GENES *FLGC* Y *FLGD* DE *P. SALMONIS* BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO.

Con el fin de investigar si *flgC* y *flgD* se expresan *in vivo* y si la bacteria puede desarrollar una estructura flagelar funcional, se incubaron muestras de *P. salmonis* en distintas condiciones de estimulación. Para esto la bacteria se incubó en agua de mar o PBS salino, lo que asemejaría las condiciones naturales de la bacteria en su ambiente marino al salir del huésped, etapa en la que podría expresar un flagelo (ver Materiales y Métodos). Las muestras se incubaron durante distintos tiempos, ya que no hay certeza del tiempo necesario para la expresión de un flagelo en sus distintos niveles. Además se probaron diferentes temperaturas, ya que en el mar ocurren ciertas fluctuaciones de temperaturas que también podrían afectar la expresión de un posible flagelo. En cada una de las condiciones de incubación se tomaron muestras para ser analizadas según las siguientes aproximaciones experimentales.

En primer lugar se analizaron muestras mediante microscopía, lo que ofrece una ventaja para la detección de estructuras que indiquen la expresión de los genes flagelares. El flagelo es una estructura de considerable tamaño y que puede ser observada por distintas técnicas de microscopía. En segundo lugar se analizó si existe transcripción de estos genes y producción de ARNm para cada uno de ellos, lo cual se determinó mediante la técnica de RT-PCR. Finalmente se analizó la expresión de las proteínas FlgC y FlgD en extractos totales de *P. salmonis* utilizando los anticuerpos monoclonales obtenidos contra las proteínas recombinantes.

A. Análisis de la morfología y la presencia de flagelo en *P. salmonis* mediante microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión.

Se analizaron muestras de *P. salmonis* de distintas condiciones de cultivo mediante microscopía de fluorescencia utilizando la tinción de Nanorange (Grossart y col., 2000), que ha sido descrita en la literatura como una eficiente y simple tinción para detectar flagelo en bacterias. Se observaron muestras de *P. salmonis* cultivadas en MEM (control), así como también incubadas con agua de mar y PBS salino de distintos tiempos (30 min, 1 h y 4 h) y temperaturas (8 °C y 16°C). Los resultados muestran a *P. salmonis* con una morfología circular, de un tamaño aproximado de entre 0,5 a 1 µm de diámetro, generalmente separadas unas de otras, y sin presencia de estructura flagelar (Figura 15A). En ninguna de las condiciones de incubación analizadas se observó una estructura semejante a un flagelo y no hubo diferencia aparente entre las distintas preparaciones. Paralelamente como control positivo para el reactivo de Nanorange se analizó una muestra de *Vibrio ordalli* aislado de peces infectados en el sur de Chile. En este caso se observaron bacterias en forma de bacilo con estructura flagelar polar. La presencia de flagelo es mayoritaria en la población de estas bacterias, las que presentan motilidad y que generalmente se encuentran agregadas unas con otras (Figura 15C).

A pesar de que no fue posible observar un flagelo en *P. salmonis* en ninguna de las observaciones hechas, ocasionalmente se observaron extrañas extensiones filamentosas que provenían de algunas bacterias, en una frecuencia aproximada de 1 cada 200 bacterias. Estas estructuras tenían morfología irregular, sin motilidad, de variada

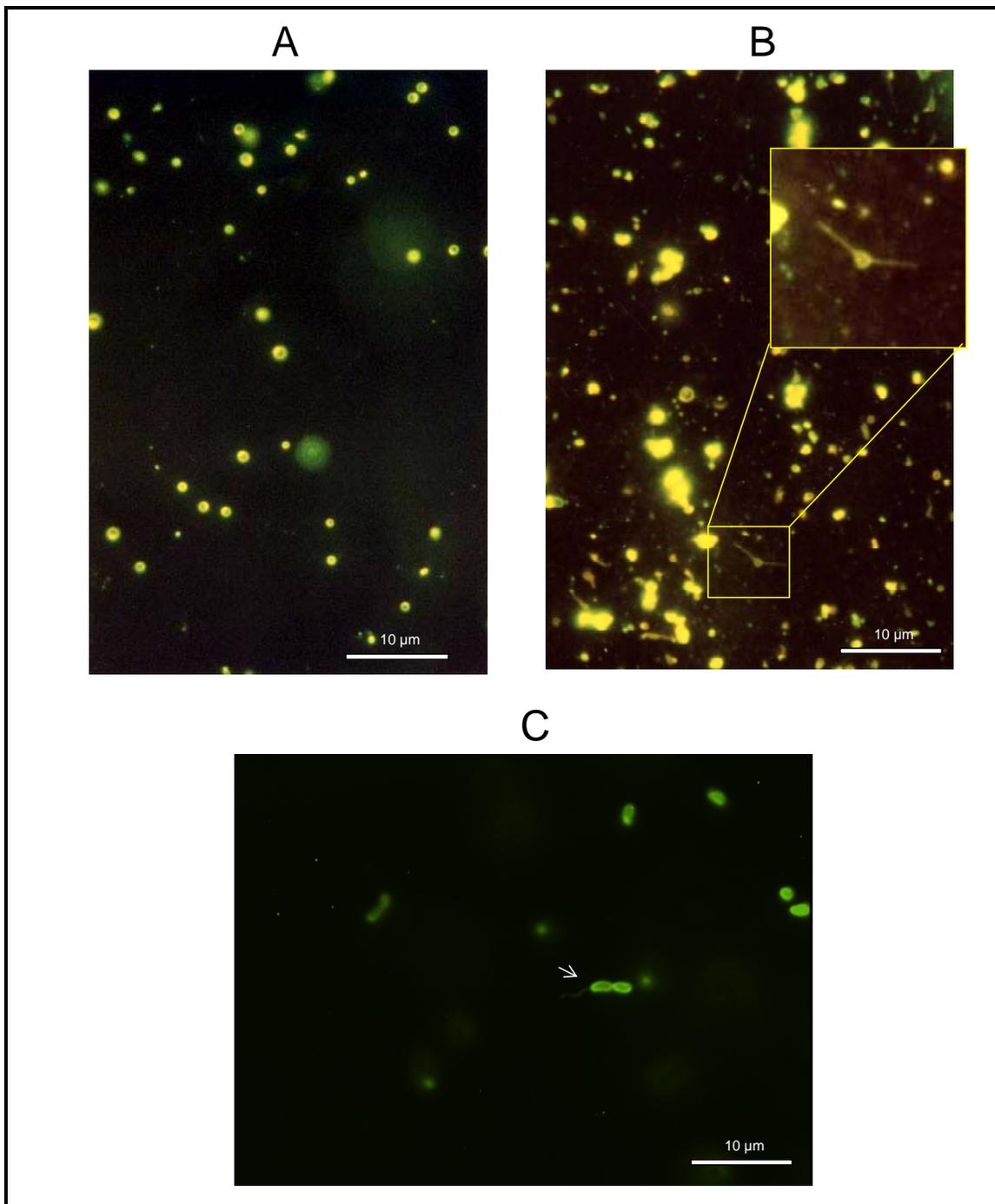


Figura 15. Microscopía de fluorescencia con tinción de Nanorange de *P. salmonis* y *Vibrio ordalli*.

A: imagen de *P. salmonis* a los 30 min de incubada en MEM. B: imagen de *P. salmonis* incubada con agua de mar por 30 min, con presencia de extrañas extensiones. C: imagen de *V. ordalli* en que se denota la presencia de un flagelo. Imágenes obtenidas con aumento de 100X.

longitud, muchas veces duplicando el tamaño de la bacteria, y en alguna oportunidad esta se encontraba conectando 2 o mas bacterias (Figura 15B). Esta descripción no concuerda con lo observado para un flagelo bacteriano que generalmente es 2 a 5 veces mas largo que el cuerpo de la bacteria, siendo un filamento fino y de morfología regular, y con presencia de motilidad. Se desconoce el origen de estas estructuras, pero se podría especular que son algún tipo de prolongación de la membrana, dado lo ondulada y desapegada que es la membrana externa del cuerpo de *P. salmonis*.

Un estudio mas detallado de las muestras se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión. Se analizaron cortes de muestras de *P. salmonis* de 30 min de incubación con agua de mar y MEM, a 16°C. Se utilizaron sólo estas condiciones ya que mediante la microscopía de fluorescencia no se observó ninguna diferencia evidente (en términos de expresión de una estructura flagelar) entre todas las condiciones. Además los extraños apéndices observados se vieron más frecuentemente en estas condiciones.

El resultado muestra bacterias de estructura circular, de tamaño aproximado de 1 μm , con una membrana externa ondulada y desapegada del cuerpo de la bacteria (Figura 16). No se observó estructura flagelar en ninguna de las preparaciones analizadas. Tampoco se observó la presencia de filamentos flagelares o estructuras similares, que pudieran haberse desprendido de las células producto del tratamiento. Por otro lado gran parte de las muestras presentaba estructuras circulares no densas a los electrones en su interior, las que pueden ser producto de la manipulación al ser fijadas para la microscopía. La morfología y la presencia de estas estructuras fueron similares en las muestras de cultivo normal y las tratadas con agua de mar.

También se analizaron cultivos de *P. salmonis* mediante microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa. Esta técnica permite favorecer la visualización de estructuras de tipo flagelar, ya que no se analizan cortes de las muestras sino que bacterias completas adheridas a la grilla. De igual manera, los resultados mostraron que no fue posible detectar la presencia de una estructura flagelar en *P. salmonis* en ninguna de las condiciones analizadas (datos no mostrados).

Los resultados de esta primera aproximación experimental a nivel de la morfología de la bacteria sugieren que no habría expresión de un flagelo en *P. salmonis* en las condiciones analizadas.

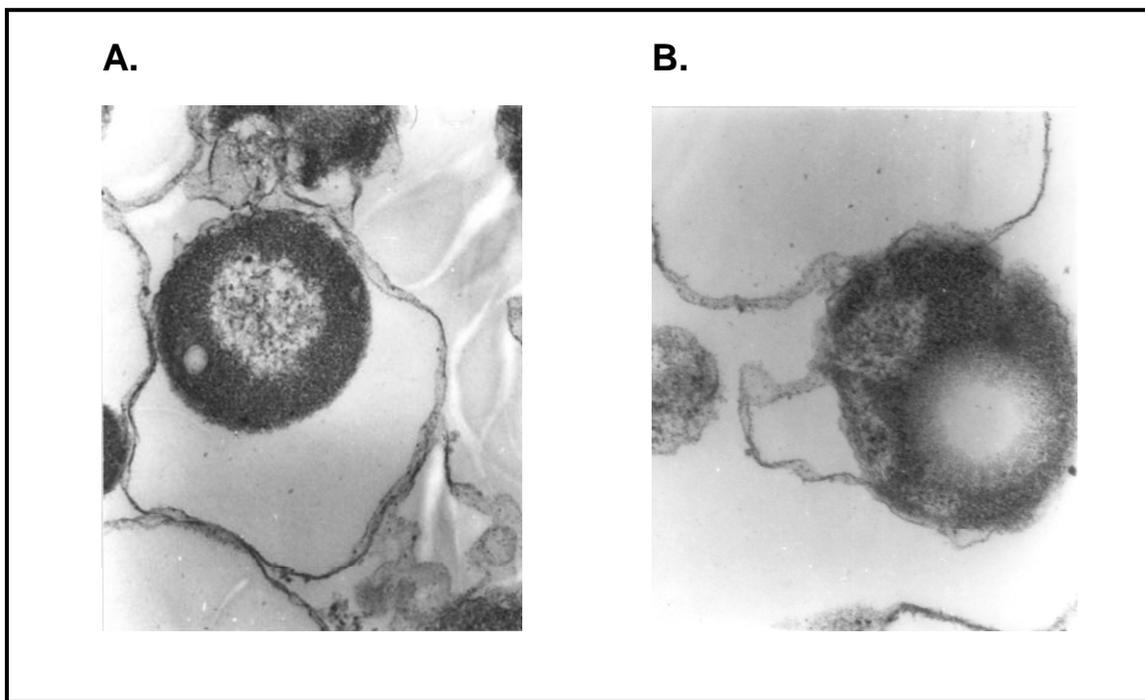


Figura 16. Microscopía electrónica de transmisión de *P. salmonis* cultivadas en medio MEM y en agua de mar.

A: *P. salmonis* de cultivo en medio MEM a 16°C con aumento de 50.000 X. B: *P. salmonis* con aumento de 50.000 X obtenida de cultivo incubado con agua de mar a 16°C.

B. Análisis de la expresión de los genes *flgC* y *flgD* a nivel transcripcional mediante RT-PCR

Como estrategia para determinar si los genes *flgC* y *flgD* son transcritos en las distintas condiciones de incubación estudiadas se procedió a realizar estudios mediante RT-PCR. Para esto, se prepararon extractos de ARN total de *P. salmonis* en condiciones de cultivo normal e incubadas con agua de mar por 30 min 1 h y 4 h, a 8 °C y 16 °C (Figura 17A). El ARN luego se trató con DNasa para eliminar la contaminación con el ADN genómico y luego se cuantificó. La reacción de transcripción reversa se realizó en presencia de inhibidores de RNasas con la enzima M-MLV transcriptasa reversa, utilizando los partidores específicos antisentido para ambos genes. Luego el producto de la reacción de transcripción reversa se utilizó como templado para la reacción de PCR utilizando los partidores específicos de cada gen. Además se incluyó para cada una de las condiciones un control negativo correspondiente al mismo ARN sin transcripción reversa como templado para el PCR, para descartar la posible contaminación con ADN en la reacción.

Los resultados muestran que con los partidores específicos para *flgC* se obtuvo un amplificado de mediana intensidad en ambas condiciones de incubación, cuyo tamaño es coincidente con aquel del control positivo con ADN genómico (Figura 17B). No se observan amplificados en los controles negativos, indicando que el amplificado es producto de la transcripción reversa del ARNm de *flgC*. El producto de la reacción se purificó, clonó en pGEM-T y se secuenció, confirmando que este codifica para *flgC* (Ver Anexo secuencias).

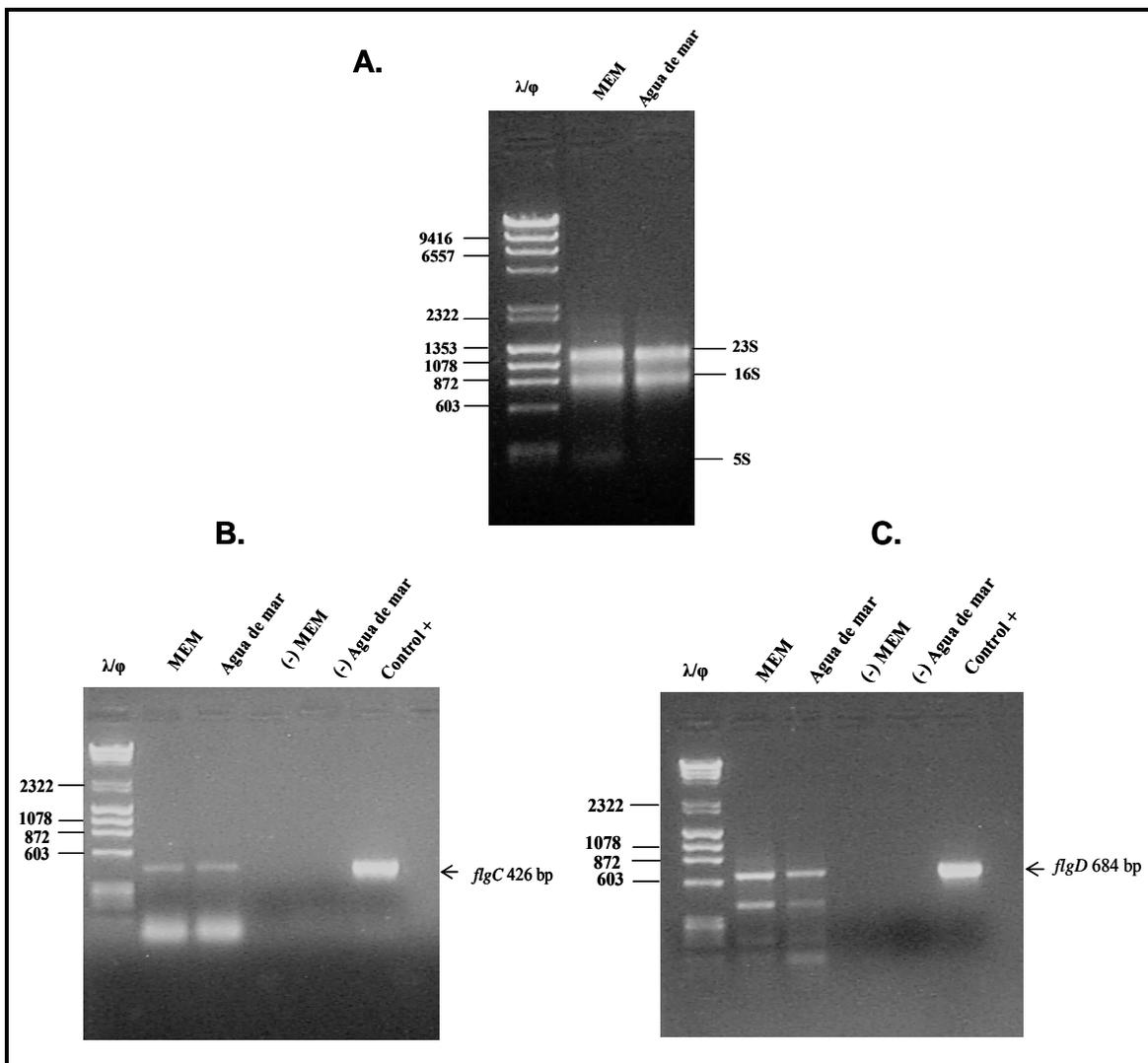


Figura 17. Análisis por electroforesis en geles de agarosa del ARN total de *P. salmonis* y de los fragmentos de cADN amplificados mediante RT-PCR para los genes *flgC* y *flgD*.

A: ARN total de *P. salmonis* obtenida bajo condiciones de cultivo normal (MEM) e incubada con agua de mar. B: RT-PCR con partidores específicos de *flgC* a partir ARN de bacterias cultivados en MEM e incubados con agua de mar a 16°C por 30 min. C: RT-PCR con partidores específicos de *flgD* a partir de ARN de bacterias cultivados en MEM e incubados con agua de mar a 16°C por 30 min. En B. y C. se incluyen los controles negativos del RT-PCR utilizando ARN sin transcripción reversa como templado y el control positivo utilizando ADN genómico como templado. Los RT-PCR se analizaron en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. λ/ψ Estándar de peso molecular.

Con los partidores específicos para *flgD* también se obtuvo un amplificado del mismo tamaño al amplificado a partir de ADN genómico (Figura 17C). Sin embargo aparece otra banda de menor tamaño que no correspondería a *flgD*. Para su identificación ambos amplificados se clonaron y secuenciaron. Los resultados confirman que la banda de mayor tamaño corresponde a *flgD*. El amplificado de menor tamaño no corresponde a ninguna secuencia conocida al hacer un análisis de alineamiento contra la base de datos del NCBI. Esta banda puede ser producto de amplificación inespecífica de fragmentos de ARNm presentes en la muestra y no tiene relación aparente con *flgD*.

Además se pudo amplificar el gen *flgC* mediante PCR (utilizando los partidores específicos para *flgC*), usando como templado el ADNc obtenido de la reacción de transcripción reversa con el partidador antisentido específico para *flgD* (datos no mostrados). Esto estaría confirmando que estos genes estarían siendo expresados como una sola unidad transcripcional producto de su organización en forma de operón, como se ha descrito en otros organismos.

Los resultados de estos experimentos sugieren que existe un nivel detectable de transcritos de los genes *flgC* y *flgD*. Estos genes se transcribirían en condiciones normales de cultivo con medio MEM, así como cuando se incuban con agua de mar, en todas las condiciones de tiempo y temperatura analizadas. Aun cuando este ensayo no es de tipo cuantitativo, no se observa una diferencia que sugiera que existiría una estimulación de la transcripción de *flgC* y *flgD* en presencia de agua de mar. Estos resultados dan un primer indicio de que estos genes sí estarían siendo expresados, a nivel transcripcional, aunque por microscopía no se ha podido visualizar un flagelo en estas condiciones. Se puede concluir que tal vez existe alguna regulación a nivel traduccional o

postranscripcional que impide la posible expresión de estas proteínas y de todo el flagelo, sin embargo no es mucha la evidencia respecto a este tipo de regulación en estos genes en otros sistemas flagelares descritos.

C. Análisis de la expresión de FlgC y FlgD mediante *Western blot*

Luego de confirmar la especificidad de los anticuerpos anti FlgC y anti FlgD, estos se utilizaron para detectar la expresión de estas proteínas *in vivo* en *P. salmonis*. Se tomaron muestras de la bacteria de las distintas condiciones de incubación, y se prepararon extractos totales de proteínas (ver Materiales y Métodos, sección 8 y 12 respectivamente). Luego se analizó las fracciones solubles e insolubles de las preparaciones mediante *Western blot* con los anticuerpos monoclonales específicos para FlgC y FlgD. Se utilizó como control positivo un anticuerpo monoclonal obtenido en el laboratorio que reconoce una proteína de membrana de 31 KDa que estaría constitutivamente expresada en *P. salmonis*.

Los resultados indican que bajo ninguna de las condiciones experimentales usadas se detectó expresión de FlgC y FlgD en *P. salmonis*. En la Figura 18 se muestra los resultados usando cultivos control en MEM e incubados en agua de mar, a 16°C por 1 h. Las proteínas recombinantes FlgC y FlgD usadas como control positivos se detectaron con los anticuerpos monoclonales respectivos. Además se detectó claramente la proteína de 31 KDa (control positivo) en todas las fracciones celulares utilizadas y en todas las condiciones analizadas. Aparentemente, por los resultados obtenidos con la proteína de

31 KDa, no existe diferencia entre las preparaciones de bacterias tratadas o sin tratar con lisozima, para disolver componentes de la pared y que contribuye a liberar proteínas en la fracción soluble. Se utilizaron distintas cantidades de proteína total de *P. salmonis*, desde 20 µg hasta 100 µg, sin embargo no se observó ningún cambio en el resultado y no hubo detección de FlgC ni de FlgD.

La falta de detección de FlgC y FlgD pudo ser consecuencia del bajo número de copias por bacteria de estas proteínas (supuestamente 6 para FlgC y 5 para FlgD) (Macnab, 2003), por lo que se intentó, como nueva aproximación experimental, realizar una inmunoprecipitación. Usando esta metodología sería posible detectar niveles más bajos de proteínas indetectables mediante un *Western blot*. Los resultados obtenidos de la inmunoprecipitación también fueron negativos, en todas las condiciones de cultivo, no encontrándose reacción con ninguno de los anticuerpos para FlgC y FlgD (datos no mostrados). En este caso también se utilizó como control positivo el monoclonal específico para la proteína de 31Kda, el cual detectó la proteína eficientemente.

Estos resultados muestran que al menos en las condiciones analizadas no se detectó expresión de las proteínas FlgC y FlgD en cultivos de *P. salmonis*. Al parecer la transcripción de estos genes observada por RT-PCR no se correlacionaría con estos resultados, sugiriendo que la falta de expresión de estas proteínas podría ser debida a alguna regulación a nivel traduccional. Las posibles razones de estos resultados serán expuestas en la discusión.

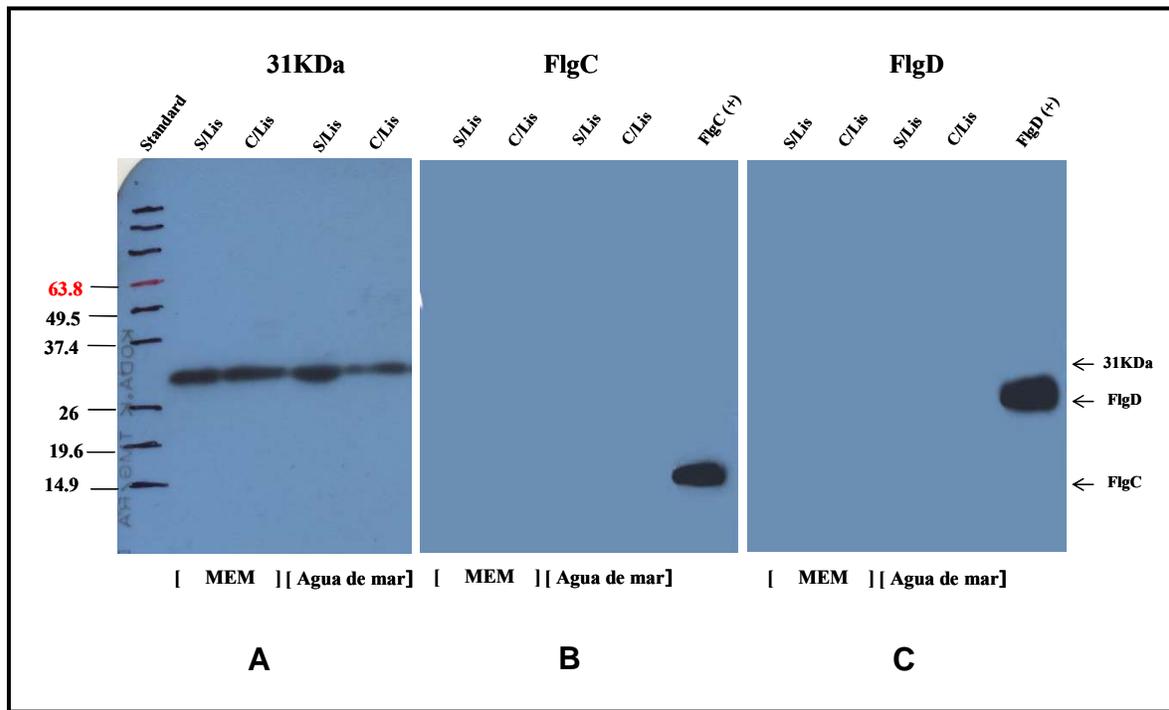


Figura 18. Análisis mediante *Western blot* de extractos totales de *P. salmonis* con anticuerpos monoclonales 5E12 (FlgC), 7B2 (FlgD) y anti-31KDa.

A: Reacción del anticuerpo específico de la proteína de 31 KDa como control positivo del experimento. B: Reacción del anticuerpo 5E12 con extracto de *P. salmonis* y con proteína recombinante FlgC inducida en pET21a. C: Reacción del anticuerpo 7B2 con extracto de *P. salmonis* y con proteína recombinante FlgD Inducida en pET21a. El experimento se realizó a 16°C con incubaciones de *P. salmonis* de cultivo control MEM e incubadas con agua de mar durante 1 h. Se utilizó 20 µg de proteína total en geles de poliacrilamida al 12,5% que luego se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para ser analizados con los anticuerpos anti 31 KDa, anti FlgC y anti FlgD. S/lys corresponde a extracto preparado sin lisozima, C/lys corresponde a extracto preparado con lisozima

IV. DISCUSION

La salmonicultura en Chile es de gran relevancia para todo el ámbito productivo nacional, es así como cada día se tiene nuevas noticias del crecimiento, modernización y proyecciones de esta industria (Industria del salmón, 2004). Debido a todo esto es que también se esta realizando un esfuerzo por mejorar la calidad de la producción y por combatir las enfermedades que la aquejan.

El síndrome rickettsial salmonideo (SRS) provocado por *Piscirickettsia salmonis* ha tenido grandes impactos en la industria y desde su descubrimiento se han intentado varias metodologías para combatirla, desde el uso de agentes químicos hasta el desarrollo de vacunas. En todo este entorno es importante conocer más de la biología del patógeno que causa el problema y de la relación que existe entre el patógeno y el huésped. Un conocimiento detallado del patógeno permitirá elaborar estrategias específicas para combatirlo, como la identificación de mejores antígenos para el desarrollo de una vacuna, vías metabólicas y sustratos esenciales. Así mismo es importante conocer de la interacción entre el patógeno y la célula huésped, para esclarecer los mecanismos involucrados en la transmisión de esta infección.

Es así como la hipótesis planteada en esta tesis sobre la posible presencia de un flagelo en *P. salmonis* durante alguna etapa de su ciclo de vida, en especial mientras está fuera de la célula hospedera y en contacto con agua de mar, ayudaría a entender un posible mecanismo hasta ahora desconocido en la interacción patógeno-huésped. La evidencia principal para plantear esta hipótesis fue el descubrimiento en su genoma de secuencias que codificaban para una serie de genes flagelares o relacionados a estos.

Como se puede ver en la Tabla 1, se encontraron aproximadamente 36 genes, entre los cuales hay genes estructurales, de biosíntesis, motor y quimiotaxis. La presencia de estos 36 genes dentro de un borrador de un genoma es considerable, tomando en cuenta que otros organismos poseen una totalidad de entre 40 a 50 genes, esenciales para el funcionamiento de un flagelo, según se ha descrito por la literatura (Berg, 2003; Macnab, 2003). Por esto se decidió caracterizar alguno de ellos y estudiar su expresión en cultivos de la bacteria. Para este trabajo se seleccionaron los genes *flgC* y *flgD*, debido a que las proteínas que codifican son fundamentales en el ensamblaje y funcionamiento del flagelo.

Los genes *flgC* y *flgD* se obtuvieron a partir del ADN genómico de *P. salmonis*, se clonaron y secuenciaron, comprobando que efectivamente codifican para FlgC y FlgD respectivamente. Ambos presentaron un significativo nivel de homología (aproximadamente un 50% de identidad) con otras proteínas FlgC y FlgD de organismos descritos como flagelados, lo que se analizó mediante alineamiento de secuencias. Además los genes se encontraron ordenados y agrupados en la misma forma descrita para otros genes flagelares bacterianos, con un espacio intergénico mínimo (Ver anexo genes *fliE* y *fliF*). Este tipo de organización es altamente conservada para los genes flagelares, y se ha mantenido entre la mayoría de los genomas bacterianos. Estos resultados indican que las regiones codificadoras de *flgC* y *flgD* están completas y no presentan mutaciones o deleciones propias de genes que habrían perdido su funcionalidad.

Una vez confirmada la integridad de estos genes se procedió a expresar las respectivas proteínas recombinantes. Ambas proteínas se expresaron eficientemente como FlgC y FlgD en forma de fusión con una tioredoxina, así como también fusionadas

a un péptido del fago T7, obteniéndose las proteínas del tamaño esperado. A partir de estas proteínas se desarrollaron anticuerpos monoclonales que demostraron ser específicos para FlgC y FlgD.

Todo lo anterior se hizo con el fin de estudiar si estos genes estaban siendo expresados *in vivo* en *P. salmonis* en presencia de agua de mar, emulando sus condiciones naturales al exterior de la célula huésped. Se probaron distintas condiciones de estimulación: con agua de mar filtrada y con tampón PBS con NaCl 200 mM. Ambas condiciones se probaron además con distintas temperaturas de incubación, a 8°C y 16°C y con distintos tiempos de incubación desde 30 min hasta 4 h. Sin embargo no se detectó las proteínas FlgC ni FlgD bajo ningunas de las condiciones analizadas mediante *Western blot* y ELISA. Una posible explicación de la falta de detección de estas proteínas sería que el método no fue lo suficientemente sensible para poder detectar estas proteínas y que estaba fuera de rango, esto debido a que el número de copias de cada una de las proteínas por célula podría ser muy bajo. Según lo descrito en la literatura una bacteria produce 1 o 2 flagelos, en caso de que estos sean polares, y cada una de estas estructuras tiene aproximadamente 6 copias para FlgC y 5 copias para FlgD. Tomando en cuenta que solo algunas bacterias pudieran expresar un flagelo, la cantidad de FlgC y FlgD podría estar bajo el límite de detección por *Western blot*. Debido a esto se optó por incluir un procedimiento experimental en el cual las proteínas son concentradas mediante inmunoprecipitación antes de ser analizadas por *Western blot*, procedimiento que aumenta significativamente la posibilidad de detección. Nuevamente no se pudo detectar FlgC ni FlgD en los extractos de *P. salmonis*, lo que sugiere que aparentemente la bacteria no las estaría expresando bajo las condiciones analizadas. No se puede descartar

que los anticuerpos monoclonales contra las proteínas recombinantes fusionadas a tioredoxina no tengan afinidad por la proteína nativa presente en los extractos de *P. salmonis*, aunque los anticuerpos reconocen las proteínas recombinantes escindidas de Trx y también aquellas proteínas recombinantes fusionadas al péptido del fago T7, que es bastante más pequeño (14 aminoácidos), y en las cuales su conformación no debería estar tan alterada respecto a la proteína nativa.

En paralelo se analizó si estos genes eran transcritos a ARN mensajero, el cual aparentemente no sería traducido. Esto se realizó mediante experimentos de RT-PCR a partir de ARN total de *P. salmonis*. El experimento se realizó en todas las condiciones antes mencionadas de estimulación, y en todas ellas se detectó que los genes *flgC* y *flgD* están siendo transcritos en *P. salmonis*. No hubo diferencias aparentes entre los cultivos incubados con agua de mar y aquellos controles sin estimulación, indicando que la transcripción de estos genes no es producto de la estimulación con agua de mar. La detección fue más evidente con menor tiempo de incubación (30 min), debido posiblemente a que a medida que aumenta su estadía en forma extracelular, la degradación del ARNm podría aumentar. Por otra parte, el hecho de que producto de la reacción de transcripción reversa con un partidador antisentido específico para el gen *flgD*, sirviera como templado para amplificar *flgC*, situado río arriba de *flgD*, indica que ambos genes son parte de una misma unidad transcripcional. Esto concuerda con la organización propuesta para estos genes en forma de operón y confirma el modelo descrito para la obtención de los genes. Este operón de clase II, también llamado de genes intermedios estaría compuesto además por otros genes, partiendo desde el gen *flgB*, hasta el gen *flgK*

todos genes flagelares estructurales. La presencia de estos otros genes y la integridad del operón quedan por ser confirmada.

Además se observaron las bacterias mediante microscopía de fluorescencia y electrónica, con el fin de identificar la aparición de un flagelo o de algún cambio morfológico en la bacteria producto de su incubación con agua de mar. Los resultados mostraron una bacteria no flagelada, sin cambios morfológicos aparentes debido a su incubación con agua de mar, en comparación con las muestras control. Esto fue contrareestado con la observación de muestras de *Vibrio*, que poseen un flagelo claramente visible mediante microscopía de fluorescencia.

A partir de los resultados obtenidos las evidencias son las siguientes: (i) los genes *flgC* y *flgD* se encuentran íntegros y en una organización semejante a la encontrada en otras bacterias flageladas (lo cual se podría extrapolar a los otros genes flagelares encontrados en los *contigs*), (ii) ambos genes están siendo transcritos como una sola unidad transcripcional, en condiciones de cultivo normal y cuando son incubados con agua de mar, (iii) no se detectó expresión de las proteínas FlgC ni FlgD *in vivo* mediante ninguna técnica utilizada y en ninguna de las condiciones, (iv) no se observó la presencia de flagelo en ninguna de las muestras de *P. salmonis* analizadas por microscopía. A partir de estos resultados cabe plantearse las siguientes interrogantes, ¿Porqué estos genes están siendo transcritos y no expresados en proteínas? ¿Que explicación tiene que la bacteria tenga este grupo de genes, de carácter más bien atípico, y que no cumplen alguna función aparente?

En primer lugar, la falta de expresión de estos genes en proteínas puede deberse a una regulación a nivel postranscripcional. Mecanismos de este tipo pueden ocurrir por la atenuación de la transcripción debida a la formación de estructuras secundarias por parte del ARNm (Jones y col., 1989; Chan y col., 1998), debido a la presencia de secuencias complementarias, que podrían impedir su correcta interacción con la ARN polimerasa y la terminación del transcrito. Asimismo los sitios de unión a ribosomas podrían estar bloqueados y el proceso de traducción impedido. Por otra parte, pueden existir otro tipo de mecanismos como la presencia de un antisense específico para estos genes flagelares, la regulación de la transcripción por productos de estos mismos genes, y la presencia de distintas zonas promotoras para los operones. Estas posibilidades de regulación son mas bien teóricas, y principalmente caracterizadas respecto a genes flagelares de expresión mas tardía (Anderson y Newton, 1997; Bonifield y col., 2000, 2003), por lo que sería muy interesante develar algún posible mecanismo de este tipo para estos genes.

Por otro lado, como se mencionó en la introducción, los genes flagelares están dispuestos en una organización jerárquica, en que genes tempranos dan paso a la expresión de genes más tardíos. Esta regulación ocurre en 3 o mas niveles de genes, y la carencia o falla de alguno de estos niveles impide por completo el funcionamiento de los siguientes, y la ausencia de un flagelo funcional como consecuencia (Boyd y Gober, 2001; Dasgupta y col., 2003). Es así como la posibilidad de que uno de estos componentes, presente en algún otro operón de genes flagelares de *P. salmonis*, esté ausente o que presente alguna mutación que altere su función, y que debido a esto el proceso no puede llegar a completarse. Esta hipótesis es muy probable, ya que se ha

demostrado en otras bacterias que mediante la generación de mutantes, la falta de algún gen en particular puede ser vital en el funcionamiento y síntesis de toda la estructura. En el caso de los genes *flgC* y *flgD*, estos son parte de la categoría de genes intermedios, ubicados en un operón compuesto por genes estructurales, el cual aparentemente sí está siendo transcrito. Esto quiere decir que al menos los componentes anteriores a ellos estarían funcionando correctamente y que la falla podría estar ocurriendo en genes de expresión más tardía, y que impiden la formación del complejo. Además es importante destacar que gran parte de estos genes están siendo regulados por una serie de factores transcripcionales, algunos de ellos codificados en los mismos operones flagelares, y que la falta de alguno de estos, como por ejemplo el factor σ^{28} de la RNA polimerasa específico para genes flagelares tardíos, puede afectar el normal funcionamiento de un operón posterior (Karlinsky y col., 2000). La regulación de la transcripción de los genes flagelares involucra una serie de pasos y componentes, que no siempre son conservados y que hacen muy compleja su organización.

Además se podría pensar que a pesar de las condiciones de incubación utilizadas en que la bacteria pudiera expresar un flagelo, ninguna de estas fue la adecuada. Cabe recordar que las variables utilizadas, basadas en las condiciones de cultivo de los salmones, fueron sólo variaciones de salinidad y temperatura, sin embargo existen varios otros factores, como pH, concentración de sustratos, niveles de AMPc y factores de control del ciclo celular entre otros (Chilcota y Hughes, 2000; Macnab, 2003). Si este fuera el caso, aun existiría la posibilidad de que *P. salmonis* exprese un flagelo bajo un estímulo aún no conocido. Durante la mayor parte de su vida esta bacteria es un patógeno

intracelular, condición en la que ha sido descrita como no flagelada, y no ha sido posible aislarla en su estadio extracelular, por lo tanto todos los experimentos realizados en la tesis son solo una simulación de su supuesta condición real.

Con respecto a la gran similitud descrita entre el sistema de secreción de proteínas específico para el flagelo y el sistema de secreción de tipo III (TTSS), se podría pensar que en realidad sólo parte de los genes encontrados estén funcionando, formando un sistema de secreción de proteínas o factores de virulencia, análogo al TTSS (Young y col., 1999). Dentro de este sistema no todos los genes flagelares presentan homólogos a los genes del TTSS, por lo que no todos serían necesarios. Si este fuera el caso, la presencia de FlgC y de FlgD sería más bien innecesaria, ya que no se han descrito genes homólogos a estos en el TTSS, aunque debido a la función que cumplen las proteínas dentro de la estructura (al menos para *flgC*) probablemente sí exista alguno que aun no se ha descrito. Las proteínas flagelares que si se han descritos como homólogas a las presente en el TTSS son FlhA, FlhB, FliH, FliI, FliJ, FliO, FliP y FliR, todas ellas componentes del sistema de secreción del flagelo (Minamino y Macnab, 1999; Abadía y col., 2003). Este sistema se caracteriza por exportar proteínas y factores de virulencia a través de la membrana, y generalmente se relaciona con la patogenicidad e infectividad de la bacteria. Esta idea se podría relacionar con los resultados descritos por Larenas (Larenas y col., 2003), en que se describen estructuras llamadas “complejos de adhesión”, que pueden ser producto de la modulación de algún factor de virulencia secretado por la bacteria con la organización del citoesqueleto de la célula huésped.

El origen de estos genes flagelares en *P. salmonis* es mas bien incierto, si se considera que son genes mas bien atípicos para una bacteria descrita como no mótil, y con características similares a una *rickettsia*. Como punto de comparación se podría mencionar casos como el de *Aeromona salmonicida* (Umelo y Trust, 1997), *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei* (Tominaga y col., 1994), *Bordetella pertusiss* y *Bordetella parapertussis* (Leigh y col., 1993), bacterias descritas como no móviles, que poseen genes flagelares, los cuales pueden llegar a expresarse en algunos casos y a producir un flagelo, en condiciones específicas de estimulación y en baja frecuencia.

Ante estas evidencias de la presencia de genes flagelares en organismos descritos como no móviles, se podrían dar dos posibilidades para su origen. La primera sería que estos provienen de su ancestro y que son parte de su genoma hace mucho tiempo. Otra posibilidad es que estos genes sean producto de algún evento reciente de transmisión horizontal de genes desde una bacteria flagelada.

En el caso de un origen ancestral, se ha descrito que muchos microorganismos conservan genes crípticos (o genes silenciados), que no degeneran en secuencias de ADN inservibles. Esto debido a que estos genes pueden ser utilizados o activados mediante mutaciones, en condiciones de presión selectiva del medio (Hall y col., 1983; Li, 1984). Condiciones de alta selección ambiental sobre una población, provocan la activación de cualquier mecanismo que pueda ayudar a la supervivencia de la especie. Es así como mantener la maquinaria para poder desarrollar un flagelo no es tan extraño, ya que en casos de fuerte presión ambiental puede ser una poderosa herramienta para aumentar la motilidad y virulencia de la bacteria. Esto se podría adecuar a las condiciones de *P. salmonis* en los últimos años en el sur de Chile. El estallido de la enfermedad y la rápida

propagación de la especie han sido favorecidas por las condiciones creadas por la industria de los salmones. Dentro de este ambiente la bacteria se ve altamente beneficiada por la alta concentración de hospederos y por las condiciones de aglomeración de los peces en que es fácil la propagación de la bacteria por contacto directo. Así la presión selectiva sobre *P. salmonis* es mínima, por lo que la presencia de un flagelo no es necesaria.

En el caso de un evento de transmisión horizontal de genes, se debe considerar que estos son mecanismos a través de los cuales los organismos adquieren nuevos genes y características, expandiendo así su repertorio genético (Ochman y col., 2000; Betran y Long, 2002). La frecuencia de estos eventos es más común de lo que uno esperaría y puede ocurrir a través de varios mecanismos como inserción de nuevas secuencias de ADN mediante fagos, conjugación entre bacterias o ya sea transformación con ADN foráneo del ambiente. La adquisición de nuevos grupos de genes u operones confiere nuevas capacidades al organismo, por lo la hipótesis de la adquisición de estos genes flagelares suena llamativamente como una mejora evolutiva a *P. salmonis*, principalmente por ser una característica muy acorde a su medio ambiente y estilo de vida (Koonin, 2003; Lawrence y Hendrickson, 2003). El ambiente de *P. salmonis* esta también ocupado por otras bacterias, algunas de ellas flageladas, como *Vibrio* y *Aeromona*, las que podrían transmitir este tipo de genes. Así mismo se ha descrito recientemente la presencia de fagos asociados a *P. salmonis* siendo una primera evidencia de este tipo de contacto (Yuksel y col., 2001). Para confirmar si en realidad estos genes son producto de un evento de transmisión horizontal, habría que hacer análisis de la composición de sus secuencias, en términos de uso de codones, % de G+C, y compararlas con el resto del

genoma de *P. salmonis*, buscando diferencias y similitudes. Referente a estas ideas existen evidencias preliminares en el laboratorio sobre la presencia de plásmidos de gran tamaño en *P. salmonis*, los cuales aun no han sido caracterizados. Una vez que estos hayan sido descritos se debería analizar si estos plásmidos contiene alguno de estos operones flagelares, y si es así cual es su origen.

Finalmente, *P. salmonis* es solo parte de un nuevo grupo de patógenos de “tipo-rickettsial” que causan enfermedades en otras especies de peces alrededor del mundo (Mauel y Miller, 2002, 2003). La presencia de genes flagelares en otros organismos de este tipo no ha sido descrita, por lo que el caso de *P. salmonis* podría ser mas bien un hecho aislado, y no una característica común del género. Esto deberá ser confirmado a futuro a medida que se tenga mas información de estas nuevas especies de *Piscirickettias*, lo que será de gran utilidad en las conclusiones referentes a la presencia de genes flagelares en *P. salmonis* y a la caracterización del género *Piscirickettsia*.

V. CONCLUSIONES

- Los genes flagelares *flgC* y *flgD* se amplificaron a partir del ADN genómico de *P. salmonis* confirmando la organización de operón propuesta. Los genes se clonaron y secuenciaron, y se expresaron las proteínas recombinantes FlgC y FlgD, a partir de las cuales se produjeron anticuerpos monoclonales.
- No se comprobó la presencia de las proteínas FlgC y FlgD en extractos de *P. salmonis* mediante ELISA, *Western blot* e inmunoprecipitación, en las bacterias de cultivo así como tampoco en las tratadas con agua de mar.
- Se comprobó, sin embargo que los genes *flgC* y *flgD* están siendo transcritos, y que esto ocurre tanto en bacterias en cultivo normal o cuando son tratadas con agua de mar.
- Las muestras analizadas por microscopía denotan una bacteria circular, con una membrana externa desapegada al cuerpo de la bacteria y sin presencia de estructura flagelar.
- La ausencia de flagelo en *P. salmonis* puede ser debida a que: (i) las condiciones de estimulación no fueron las adecuada para que este haya sido expresado; (ii) a que a pesar de contener la mayoría de los genes flagelares carece de alguno que es esencial para la formación de la estructura; (iii) la presencia de estos genes sólo es evidencia de algún resabio evolutivo, o de algún evento de transferencia horizontal de genes, y que no tendría características funcionales.

VI. REFERENCIAS

1. Abdallah, A.I., Commander, N.J., Woodward, M.J., Spencer, S., Hart, C.A., Winstanley, C. (2003). Type III secretion homologs are present in *Brucella melitensis*, *B. ovis*, and *B. suis biovars* 1, 2, and 3. *Curr. Microbiol.* 46: 241-245.
2. Aizawa, S.I., Kubori, T. (1998). Bacterial flagellation and cell division. *Genes Cells.* 3: 625-634.
3. Almendras, F.E., Fuentealba, I.C., Jones, S.R.M., Markham, F. (1997). Experimental infection and horizontal transmission of *Piscirickettsia salmonis* in freshwater-raised Atlantic salmon, *Salmo salar*. *J. Fish Dis.* 20: 409-418.
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. Aqunoticias. Piscirickettiosis: el desafío de mantener el control. Agosto 2003. 57-62. (www.aqunoticias.cl).
6. Berg, H.C. (2003). The rotary motor of bacterial flagella. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 19-54.
7. Betran, E., Long, M. (2002). Expansion of genome coding regions by acquisition of new genes. *Genetica.* 115: 65-80.
8. Blair, D.F. (2003). Flagellar movement driven by proton translocation. *FEBS Letters.* 545: 86-95.

9. Bonifield, H., Hughes, K. (2003). Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism. *J. Bacteriol.* 185: 3567-3574.
10. 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.
11. Boyd, C.H., Gober, J.W. (2001). Temporal regulation of genes encoding the flagellar proximal rod in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 183: 725-735.
12. Bravo, S., Campos, M. (1989). Coho salmon syndrome in Chile. *American Fisheries Society/Fish Health Section Newsletter.* 17: 3.
13. Chan, V.L., Louie, H., Joe, A. (1998). Expression of the *flgFG* operon of the *Campylobacter jejuni* in *Escherichia coli* yields and extra fusion protein. *Gene.* 225: 131-141.
14. Chilcott, G.S., Hughes, K.T. (2000). Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 694-708.
15. Dasgupta, N., Wolfgang, M.C., Goodman, A.L., Arora, S.K., Jyot, J., Lory, S., Ramphal, R. (2003). A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 50: 809-824.
16. DeRosier, D.J. (1998). The turn of the screw: the bacterial flagellar motor. *Cell.* 93:17-20.

17. Fryer J., 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.
18. Fryer, J., Lannan, C., Giovannoni, S., Wood, N. (1992). "*Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 120-126.
19. Fryer, J., Lannan, C., Giovannoni, S., Wood, N. (1997). "The rickettsia: an emerging group of pathogens in fish". *Emerg. Infect. Dis.* 3: 137-144.
20. Fryer, J. (2001). "Clarification of the systematics of *Piscirickettsia salmonis*", *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Department of Microbiology Oregon State University.
21. Fryer, J.L., Hedrick, R.P. (2003). *Piscirickettsia salmonis*: a gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *J. Fish Dis.* 26: 251-262.
22. Fundación Terram. (2001). "Salmonicultura en Chile: Desarrollo, proyecciones e impacto". (2002). *Crecimiento infinito: el mito de la salmonicultura en Chile.*
23. Gophna, U., Ron, E.Z., Graur, D. (2003). Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene.* 312: 151-163.
24. Guiliani, N., Bengrine, A., Oise, B.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*. *Microbiology.* 143: 2179-2187.

25. Grossart, H., Steward, G.F., Martinez, J. (2000). A simple, rapid method for demonstrating bacterial flagella. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3632-3636.
26. Grünenfelder, B., Gehrig, S., Jenal, U. (2003). Role of the cytoplasmic C terminus of the FliF motor protein in flagellar assembly and rotation. *J. Bacteriol.* 185: 1624-1633.
27. Hall, B.G., Yokoyama, S., Calhoun, D.H. (1983). Role of cryptic genes in microbial evolution. *Mol. Biol. Evol.* 1: 109-124.
28. Hirano, T., Minamino, T., Namba, K., Macnab, R.M. (2003). Substrate specificity classes and the recognition signal for *Salmonella* type III flagellar export. *J. Bacteriol.* 185: 2485-2492.
29. Hueck, C.J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbio. Mol. Biol. Rev.* 62: 379-433.
30. Industria del salmón. El Mercurio, Santiago, Chile, Marzo 2004. Ediciones especiales.
31. 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.
32. Karlinsey, J.E., Tanaka, S., Bettenworth, V., Yamaguchi, S., Boos, W., Aizawa, S., Hughes, K.T. (2000). Completion of the hook-basal body complex of *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and *fliC* transcription. *Mol. Microbiol.* 37: 1220-1231.
33. Kim, Y., McCarter, L. (2000). Analysis of the polar flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 182: 3693-3704.

34. Koonin, E.V. (2003). Horizontal gene transfer: the path to maturity. *Mol. Microbiol.* 50: 725–727.
35. Kubori, T., Shimamoto, N., Yamaguchi, S., Namba, K., Aizawa, S. (1992). Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* 226: 433-446.
36. Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galán, J.E., Aizawa, S. (1998). Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science.* 280: 602-605.
37. Kutsukake, K., Ohya, Y., Iino, T. (1990). Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 172: 741-747.
38. Kutsukake, K., Doi, H. (1994). Nucleotide sequence of the *flgD* gene of *Salmonella typhimurium* which is essential for flagellar hook formation. *Biochim. et Biophys. Acta.* 1218: 443-446.
39. Larenas, J., Contreras, J., Smith, P. (1998). “Estado actual de la Piscirickettsiosis en salmones”. *Aquatic.* 5: 1-21.
40. Larenas, J.J., Bartholomew, J., Troncoso, O., Fernández, S., Ledesma, 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. Organ.* 56: 24-30.
41. Lawrence, J.G., Hendrickson, H. (2003). MicroReview: Lateral gene transfer: when will adolescence end?. *Mol. Microbiol.* 50: 739-749.
42. Leigh, A.F., Coote, J.G., Parton, R., Duggleby, C.J. (1993). Chromosomal DNA from both flagellate and non-flagellate *Bordetella* species contains sequences

- homologous to the *Salmonella* H1-flagellin gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 111: 225-231.
43. Li, W. (1984). Retention of cryptic genes in microbial populations. *Mol. Biol. Evol.* 1: 213-219.
44. Mael, M.J., Giovannoni, S.J. & Fryer, J.L. (1999). Phylogenetic analysis of *Piscirickettsia salmonis* by 16S, internal transcribed spacer (ITS) and 23S ribosomal DNA sequencing. *Dis. Aquat. Org.* 35: 115-123.
45. Mael, M.J., Miller, D.L. (2002). Piscirickettsiosis and piscirickettsiosis-like infections in fish: a review. *Vet. microbiol.* 87: 279-228.
46. Mael, M.J., Miller, D.L. (2003). Characterization of a Piscirickettsiosis-like disease in Hawaiian tilapia. *Dis. Aquat. Org.* 53: 249-255.
47. Macnab, R.M. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 77-100.
48. McCarter, L.L. (2001). Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 445-462.
49. Minamino, T., Macnab, R.M. (1999). Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J. Bacteriol.* 181: 1388-1394.
50. Minamino, T., Yamaguchi, S., Macnab, R.M. (2000). Interaction between FliE and FlgB, a proximal rod component of the flagellar basal body of *Salmonella*. *J. Bacteriol.* 182: 3029-3036.
51. Morgan, D., Khan, S. (2001). Bacterial flagella. *Encyclopedia of Life Sciences*. 1-8.

52. Muller, V., Jones, C.J., Kawagishi, I., Aizawa, S., Macnab, R.M. (1992). Characterization of the *fliE* genes of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* and identification of the FliE protein as a component of the flagellar hook-basal body complex. *J. Bacteriol.* 174: 2298-2304.
53. Ochman, H., Lawrence, J., Groisman, E. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature.* 405: 299-304.
54. Ohnishi, K., Ohto, Y., Aizawa, S., Macnab, R.M., Iino, T. (1994). FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 176: 2272-2281.
55. 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.
56. Ottemann, K.M., Millar, J.F. (1997). Role for motility in bacterial-host interactions. *Mol. Microbiol.* 24: 1109-1117.
57. ProChile New York. (2003). "Perfil del mercado de los productos del mar en Estados Unidos". (www.chileinfo.com).
58. Ran, K.Y., Haeng, R.J. (2003). Flagellar basal body flg operon as a virulence determinant of *Vibrio vulnificus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304: 405-410.
59. Saijo-Hamano, Y., Uchida, N., Namba, K., Oosawa, K. (2004). *In vivo* characterization of FlgB, FlgC, FlgF, FlgG and FliE, flagellar basal body proteins of *Salmonella*. *J. Mol. Biol.* 339: 423-435.

60. Sambrook, Fritsch, Maniatis. Molecular cloning, a laboratory Manual. (1989).
Second edition.
61. 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.
62. Umelo, E., Trust, T. (1997). Identification and molecular characterization of two tandemly located flagellin genes from *Aeromonas salmonicida* A449. J. Bacteriol. 179: 5292-5299.
63. Valenzuela, P.D.T., Burzio, L.O., Roseblatt, M., Yudelevich, A., Bernales, S. (2001). Sequence and applications of the *Piscirickettsia salmonis* genome. Biol Res. 34: R17.
64. Young, G., Schmiel, D., Miller, V. (1999). 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. USA. 96: 6456-6461.
65. Yuksel, S.A., Thompson, K.D., Ellis, A.E., Adams, A. (2001). Purification of *Piscirickettsia salmonis* and associated phage particles. Dis. Aquat. Org. 44: 231–235.

VII. ANEXO GENES FLAGELARES *FLIE* Y *FLIF*

Paralelamente a los resultados obtenidos para los genes *flgC* y *flgD*, y siguiendo el modelo propuesto para la organización de los genes flagelares (Ver Figura 3) se intentó clonar los genes flagelares *fliE* y *fliF*. El gen *fliE* codifica para una proteína estructural del cuerpo basal del flagelo, mas específicamente en el eje central proximal, muy similar a *flgC*. Su función hasta el momento no ha sido bien caracterizada pero se supone que participaría en el comienzo de la formación del complejo basal interactuando con *flgB* y *fliF* (Muller y col., 1992; Minamino y col., 2000). Por su parte *fliF* codifica para la subunidad estructural del anillo MS del cuerpo basal. Este anillo es el que da sustento a la estructura flagelar completa, anclándola a la membrana citoplasmática y comunicando la estructura flagelar externa con el motor y sistema de exportación de proteínas (Grunenfelder y col., 2003). Estos genes se encontrarían en un operón diferente al de los genes *flgC* y *flgD*, en el cual se encontrarían uno al lado de otro, según el orden demostrado en otros organismos flagelados.

Se identificó el *contig* 641 que contenía la primera parte de la región amino terminal de *fliE* y casi la totalidad del gen que codifica para un regulador del factor sigma 54. Además se identificó el *contig* 1230 que contenía la mitad carboxilo terminal de *fliF* y la región amino terminal de *fliG*. A partir de estos *contigs* y en base a el esquema propuesto (Figura 19), se diseñaron partidores con el fin de amplificar la región que faltaba entre los *contigs* 641 y 1230, y así obtener la totalidad de *fliE* y *fliF*. Los partidores que se utilizaron son los siguientes:

- Fragmento entre *sigma 54* y *fliF*:
 Partidor directo: 5'- AGAACATTACGTTATAAGCTTGCA - 3'
 Partidor inverso: 5'- CGACAACCTCACCTTCTAATGC - 3'
- *fliE* con sitios de restricción
 Partidor directo: 5' - CAGGGATCCATGGGTAAGATCTATAATGCTAG - 3'
 Partidor inverso: 5' - GTCGAATTCTCATACCGGCATATTCATTACTT - 3'
- *fliF* con sitios de restricción
 Partidor directo: 5' - CAGGGATCCATGATAGGTTTATCTGTGAGTAT - 3'
 Partidor inverso: 5' - GTCGAATTCTCACTGCTCATCTTCACTTAC - 3'
 Partidor interno directo: 5' - AAAAAGAGGCGCGAGCATCAGTA - 3'
 Partidor interno inverso: 5' - CCTCAATGGAATCACCGGCGG - 3'

Los resultados muestran la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1000 pares de bases, tamaño esperado para el fragmento resultante entre el *contig* 641 y 1230 (Figura 19A). Este fragmento se clonó y secuenció y a partir de esta secuencia se diseñaron partidores con sitios de restricción para amplificar independientemente los genes *fliE* y *fliF*. En el caso de *fliE* se obtuvo un fragmento de 333 pares de bases (Figura 19B), el cual se clonó y secuenció (ver anexo secuencias). Luego se confirmó mediante alineamiento contra la base de datos de NCBI, en la que se obtuvo un e-value de $9e-12$ y un 44% de identidad con su ortólogo mas cercano en *P. fluorescens*. Así mismo, para *fliF*

se obtuvo un amplificado de 1590 pares de bases (Figura 19C), el que también se clonó y secuenció. A partir de la secuencia de este se diseñaron partidores internos para obtener la secuencia completa del gen. Una vez obtenida la secuencia completa esta se alineó con la base de datos del NCBI obteniéndose un e-value de e^{-105} y un porcentaje de identidad de un 38% con su ortólogo en *P. aeruginosa*.

Estos resultados complementan a los obtenidos para los genes *flgC* y *flgD*, reafirmando que la organización propuesta para los genes flagelares en *P. salmonis* sería muy similar a otros organismos flagelados descritos. En conclusión al menos 4 de los genes flagelares encontrados en los *contigs* obtenidos de la secuenciación del genoma de *P. salmonis*, pudieron ser obtenidos completamente, lo cual se podría extrapolar a los demás genes presentes (Tabla 1).

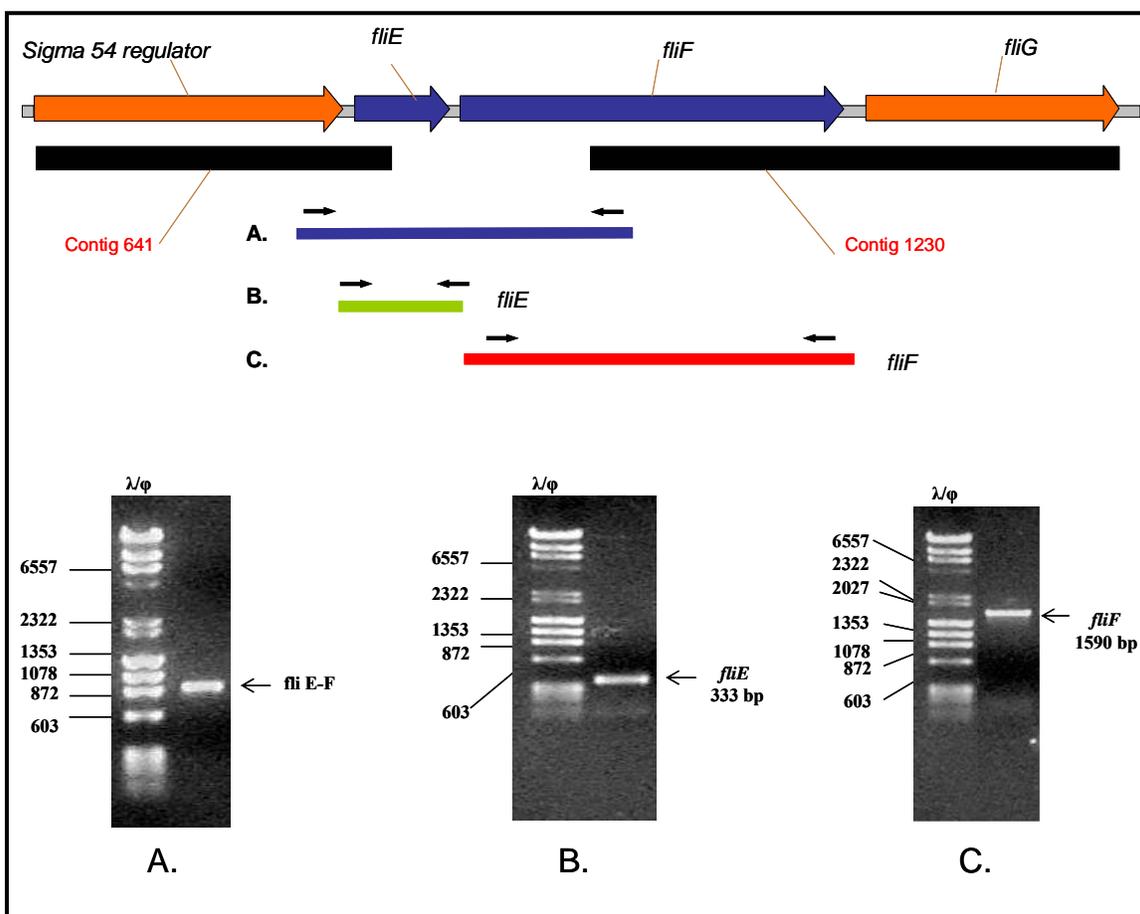


Figura 19. Esquema de organización de los genes regulador sigma 54, *fliE*, *fliF* y *fliG* en *P. aeruginosa* y alineamiento de los *contigs* 641 y 1230 de *P. salmonis*.

En A: fragmento de 1000 pares de bases obtenido por PCR que corresponde al segmento entre el *contig* 641 y 1230. En B: se observa el amplificado de *fliE* de 333 pares de bases obtenido por PCR. En C: se observa el amplificado de *fliF* de 1590 pares de bases obtenido por PCR. Análisis en gels de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio [0,3 $\mu\text{g/mL}$].

VIII. ANEXO SECUENCIAS

A continuación se presentan las secuencias nucleotídicas de los genes *flgC*, *flgD*, *fliE* y *fliF* aislados en esta tesis. Además se incluye la secuencia aminoacídica traducida en el correcto marco de lectura.

flgC : 423 Pares de bases, 141 Aminoácidos

```

atgttttcagtgtttgaaatcgcagggctgccatgatggcgcagagtattcgtttgaat
M F S V F E I A G S A M M A Q S I R L N
acgaccgcgagtaatcttgctaataattaatagtgtaagcagcagcattgatacgacgtat
T T A S N L A N I N S V S S S I D T T Y
cgctcaagacagcctgtctttgcaccgattgctgcaagtatgcgagatgaattttccca
R S R Q P V F A P I A A S M R D E F F P
aatcgtgcaccagggcgtggagtacaggtccttggatagttgaaagtgacgcaccttta
N R A P G R G V Q V L G I V E S D A P L
gagcagcgttttgatccggatcacccgatggccaatgaagagggctatattttcttacca
E Q R F D P D H P M A N E E G Y I F L P
aatgtgaaccctgttgaggcgatggatgaatatgatctcagcatcgcagtccttatcgggtc
N V N P V E A M V N M I S A S Q S Y R V
aatgttgaggcatttaataacttctaagcaacttatgcagcaaacgctacggttggcgcag
N V E A F N T S K Q L M Q Q T L R L A Q
cag
Q

```

fliE : 333 Pares de bases, 111 Aminoácidos

```

atgggtaagatctataatgctagtgctgaacaagccgttttaaatgttatgcaacagcta
M G K I Y N A S A E Q A V L N V M Q Q L
gcggctaaggctgcaaatgaaaagactgctgctggaagtgggtgttggtgataatcatgca
A A K A A N E K T A A G S G V G D N H A
aatacattctctaatttgctaaaagtaagcttaataactgtaaataaacaccaaataaat
N T F S N L L K V S L N T V N K H Q I N
tctgctaatttgcaaaaatcatttgaagttgggtgaggcaactttgcctgaggttattgtc
S A N L Q K S F E V G E A T L P E V I V
gccatgcaaaaagcgcgctgtcatttacagcaattaaagaagtgcgtaataagttaata
A M Q K A S V S F T A I K E V R N K L I
gatgcgtatcgtcaagtaataatgcccggatga
D A Y R Q V M N M P V -

```

flgD : 681 Pares de bases, 227 Aminoácidos

atggcagagattaattcaaccgattcagttgccaatctttataaaaatttaggcttaacg
 M A E I N S T D S V A N L Y K N L G L T
 tcatctgatgcaaccttagaaaagaagagctaggccaagatgatttttttaaattatta
 S S D A T L E K K E L G Q D D F L K L L
 acgacgcagcttaagcatcaagatccgatgcagccacaagaaaacggtgagttcttagcg
 T T Q L K H Q D P M Q P Q E N G E F L A
 caaatggcacaatttagtacggttgatggatattaatagcattaatgatgccgttggtagt
 Q M A Q F S T V D G I N S I N D A V G S
 ttagtcgctgagttaaaatcaacaacggcattgcaagcttcagcacttggtgggcttct
 L V A E L K S T T A L Q A S A L V G R S
 gtgttagccgagtcagacaaaggcttactgattgagggggaagagtttaaagcagatatc
 V L A E S D K G L L I E G E E F K A D I
 gaagtgccgaaaaatgccaaagaggttaaagtcaatatatttacggatgggtggcagctta
 E V P K N A K E V K V N I F T D G G S L
 gtcagacaggttgaaattgggtgatttagccgatggtaattatagctttggtgggatggc
 V R Q V E I G D L A D G N Y S F V W D G
 aaagatgaaaatggcaatgtaatgccggcagggcgctatcaatttgccgctgaggccca
 K D E N G N V M P A G R Y Q F A A E A R
 gtggaaggtgaaactcagcaattaccacttgcagtgatgccaatattgacagcgtgatt
 V E G E T Q Q L P L A V Y A N I D S V I
 ttaggcaaaaatggcgaagaaacacaagtgagcttatctggtattgggtcaggtgggtatt
 L G K N G E E T Q V S L S G I G Q V G I
 tcaggaattaaacagcttgga
 S G I K Q L G

fliF : 1590 pares de bases, 530 Aminoácidos

atgataggtttatctgtgagatattgcatcgggcgtggcggtgattatgtggacaaaaacc
 M I G L S V S I A S G V A V I M W T K T
 tcaaatatgagcctgtttttccagtggtgattcattaagtttgccctcatattgttcaa
 S N Y E P V F S S V D S L S L P H I V Q
 tcattaaagcaaagcaatatagaatttaaattagacgaaagaagaaatattaatttttagtc
 S L K Q S N I E F K L D E R R N L I L V
 gctaaagatcaggttaataaggcgcggatggcgcttgctgaaaatgggtgtagtgggcgt
 A K D Q V N K A R M A L A E N G V S G R
 attagcaccggcctttgaaagtttaggcaaggactcaagttttggcactagccaatttatg
 I S T G F E S L G K D S S F G T S Q F M
 gaaaccgtacgttatcgtcatgcattagaaggtgagttgtcgcggacaatttcacgatt
 E T V R Y R H A L E G E L S R T I S S I
 cagggggtgctgtagttctcgggtgcatttagcaatccctaagcaatcttcatttttaaaa
 Q G V R S S R V H L A I P K Q S S F L K
 tcacaaaaagaggcgcgagcatcagtatatttaatttgagggcggttatctggaaaag
 S Q K E A R A S V F I N L Q G G Y L E K
 tccaagtggcagcgattgtgaacttagttgcatctagcgtaccgaatttaaaaagaagt
 S Q V A A I V N L V A S S V P N L K R S
 caggtttcagtggtcgaccagcacggtaatcttttaactcatgcatggaaggaggtggt
 Q V S V V D Q H G N L L T H A M E G G G
 tttgctgcaacagaaaggcagtttgcttatcagcgtcaggttgagtcagcgtatgtacag
 F A A T E R Q F A Y Q R Q V E S A Y V Q

cgtatnttaaatatcctggagcctatcgttggctctggtaatgtgcgagcacaagtgacg
R I L N I L E P I V G S G N V R A Q V T
gcaaagtgttgatttcactaagtctgaaaaaacacaagaaacctttaatccagatatgaaa
A N V D F T K S E K T Q E T F N P D M K
gcggtacgcagtgagtttttattaacgaagaaaaaagtggggaagctggcttaggtggg
A V R S E F L L N E E K S G E A G L G G
atccctgggtgcacttagtaatcagccgcccgggattgggtactgcacctgaaaaggcagta
I P G A L S N Q P P G I G T A P E K A V
ggcgaggagggcgcggaaaaaaccaagcaaacaccgaccagtaaaagaaacgagtcaacg
G E E G A E K T K Q T P T S K R N E S T
cgtaactatgaggtggaccgcttaattagtcatacgcgcgggtcagttaggacgggtgatg
R N Y E V D R L I S H T R G Q L G R V M
cgcttgacagtcgctggtgtactcaataataaacgacgagggatgataaagaaaaata
R L T V A V V L N N K T T R D D K G K I
accgctgcggcgataaaaacaagatgaaattaatcgatatagcgcaactgggttcgcatgca
T A A A I K Q D E I N R I A Q L V R D A
gtagggtttgatggtgcacgtgggtgatagcttaaatggtgtaatttgccggttgtaaaa
V G F D V A R G D S L N V V N L P F V K
gaggtcaccgcaagccgcccgggtgattccattgtgggaacaaggggtgggtttatttcatta
E V T A K P P V I P L W E Q G W F I S L
ttaaacaagtgctcgggtggattatnttttaatacttagtgctctttatnttaaggccg
L K Q V L G G L F I L I L V L F I L R P
acactgcgctcttttagcaggcaaatctaaagccgaactctttgatcaaaaaatgcagctg
T L R S L A G K S K A E L F D Q K M Q L
gctcgagaggtagggattgagttggacgccaatggtaatcccattggtcctgaggaagag
A R E V G I E L D A N G N P I V P E E E
ccagtggtggatgaatnttgagcggccggttagatnttgcccatgattctgatgatcaggag
P V V D E F E R P L D L P H D S D D Q E
cgcaatattaatnttgcaaacagttgggtcgaaaaagatgccaagttgggtggctcaagtg
R N I N F V K Q L V E K D A K L V A Q V
atntaaagaatgggtaagtgaagatgagcag
I K E W V S E D E Q