

03081

14  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DEL POSGRADO DEL C.C.H.  
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

Sobre el papel de la proteína Flil en el  
proceso de exportación del flagelo de  
*Salmonella typhimurium*

Tesis que para obtener el Grado de Doctora en  
Investigación Biomédica Básica presenta  
Eugenia Luisa Silva-Herzog Márquez

México D. F., Junio de 1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

275818



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del doctor  
Georges Dreyfus C. en el Departamento de Genética  
Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
El trabajo fué apoyado por el CONACyT (donativo  
No. 320p-N967) y la DGAPA (donativo No. IN204595).

No es la respuesta la que ilumina sino la pregunta.  
Eugene Ionesco (1963)

La experiencia no se equivoca , tan solo es nuestro  
juicio el que lo hace , cuando promete resultados  
que no proceden de nuestros experimentos.  
Leonardo Da Vinci (1510)

“... se te aparece como un todo en el que ningún deseo se pierde y del que tú formas parte... Tal es el poder, que a veces dicen maligno, a veces benigno, tiene Anastasia, ciudad engañosa: si durante ocho horas al día trabajas tallando ágatas ónices crsopacios, tu afán que da forma al deseo toma del deseo su forma, y crees que gozas de toda Anastasia cuando sólo eres su esclavo.”

Italo Calvino, *Las ciudades invisibles*.(1973)

# Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por ser un espacio plural y diverso donde todos podemos aprender y trabajar todos los días. Por permitirme trabajar en lo que más me gusta y por dejarme ser yo. Espero que siempre siga así.

Agradezco especialmente a Roberto Seira, por haberme apoyado todos estos años de necesidad, por compartir mis ilusiones y mi vida y sobretodo por ser el amor de mi vida. A mis hijos Rodrigo y Santiago y molcas por hacer que mi vida sea divertida y valga la pena.

Agradezco a mis padres que me inculcaron el amor al trabajo, la honestidad y el respeto por los demás.

Agradezco a mis maestros de todos estos años, al doctor Gomez Puyou, al doctor Mancilla, y por supuesto al doctor Dreyfus.

Agradezco a Georges Dreyfus el haberme acogido en su laboratorio, por muchos muchos años de trabajo y por tantas discusiones siempre fructíferas.

Agradezco a todos los flagelólogos del 322 Tere, Bertha, Mark, Javier, Hilario y recientemente Axelle, por hacer el trabajo diario más fructífero y más divertido, pero sobretodo por su amistad. A nuestros colaboradores y amigos de Biomédicas Laura y Sebastián. A Tere por todas las platicas mañaneras y muchos consejos.

Agradezco la invaluable ayuda técnica de la QFB Ma. Teresa Ballado y del Q. Francisco Javier de la Mora. A la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular a Jorge Sepulveda, a Rodolfo Paredes, y recientemente Mark West. También a la Unidad de Computo del Instituto a Gerardo, Ana, Juan y Rodrigo por innumerables sacadas de apuros.

Agradezco a Ariane, Robert, Claudia, a Gerardo, a "los Celis", a "los Diegos" por su amistad y por hacer los días mas divertidos. A mis alumnetos de ciencias, que me enseñaron mas de lo que se imaginan.

Agradezco a mi comité tutorial: Dr. Adolfo García Sainz, Dr. Alejandro Zentella y el Dr. Georges Dreyfus por todos sus consejos que ayudaron a encaminar y mejorar este trabajo.

Agradezco al mi jurado la Dra. Imelda López Villaseñor, la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, la Dra. Laura Camarena, el Dr. Armando Gómez Puyou, el Dr. Adolfo García Sainz, el Dr. Diego González Halphen y el Dr. Antonio Lazcano Araujo, por todos sus comentarios que enriquecieron esta tesis.

Agradezco la ayuda y apoyo de Lupita, Domi y Jenny.

Agradezco a mis amigas de siempre: Martha Yolanda, Ximenola, Georgina, Gabichu, Luz María, Lila, MariCa, y a mi amiga Irene, por siempre estar ahí conmigo.

Agradezco a mi familia: mis hermanos Tere y Chucho, a mi abuela que es ideal, a mi mamá, a mi papá, que siempre me han apoyado.

Agradezco a todos los cronopios y famas de mi vida, que la hacen siempre interesante y maravillosa.

Si pude.

# Contenido

Lista de figuras.	.....	página i
Lista de tablas	.....	página iv
Lista de abreviaturas	.....	página v
Resumen	.....	página vi
Abstract	.....	página viii
I. Introducción.	.....	página 1
A. . Motilidad y quimiotaxis.	.....	página 2
B. . Estructura y función flagelar	.....	página 20
C. Morfogénesis flagelar y regulación de la expresión de los genes flagelares y quimiotacticos	.....	página 32
D. Planteación del problema y objetivos del trabajo	.....	página 48

II.	Materiales y métodos	.....	página 50
	A.	Cepas bacterianas y plásmidos	.....página 50
	B.	Transformación bacteriana	.....página 51
	C.	Determinación de proteína	.....página 51
	D.	Ensayo de hidrólisis de ATP y	
		determinación de fosfato liberado	.....página 52
	E.	Electroforésis en geles desnaturalizantes	
		de poliacrilamida	.....página 52
	F.	Preparación de anticuerpos específicos	.....página 53
	G.	Inmunorréplica tipo “Western”	.....página 54
	H.	Inmunorréplica de afinidad	.....página 55
	I.	Cosedimentación de FliI con flagelina	.....página 55
	J.	Purificación de flagelina (FliC)	.....página 56
	K.	Purificación de la proteína del gancho (FlgE)	.....página 57
	L.	Sobreproducción y purificación de FliI	.....página 58
III.	Resultados	.....	página 60
	1.	Sobreproducción y purificación de FliI	.....página 60
	2.	Purificación de dos substratos de exportación:	
		flagelina y la proteína del gancho	.....página 65
	3.	Caracterización de la actividad enzimática de FliI	.....página 67



4.	Interacción de FliI con substratos de exportación	.....	página 70
A.	Inmunorréplica de afinidad	.....	página 71
B.	Cosedimentación de FliI con FliC	.....	página 74
C.	Estimulación de la actividad enzimática de FliI		página 76
IV.	Discusión y conclusiones.	.....	página 84
V.	Perspectivas	.....	página 93
VI.	Apéndice. Trabajo publicado	.....	página 95
VII.	Referencias	.....	página 106

# Lista de Figuras

Figura 1. Patrones de flagelación en distintas especies bacterianas	página 3
Figura 2. Diferencias del flagelo procarionte y eucarionte	.....página 4
Figura 3. Movimiento bacteriano	.....página 6
Figura 4. Curso temporal de la respuesta quimiotáctica.	.....página 7
Figura 5. Sistema quimiotáctico de transducción de señal.	.....página 11
Figura 6. Receptores quimiotácticos de membrana	.....página 13
Figura 7. Estructura del flagelo bacteriano de <i>S. typhimurium</i>	.....página 20
Figura 8. Dominios de la flagelina en la estructura final y en la secuencia primaria	.....página 22
Figura 9. Polimorfismo del filamento de <i>S. typhimurium</i>	.....página 23
Figura 10. Fotografía de microscopio electrónico de gancho de <i>S. typhimurium</i>	.....página 24
Figura 11. Estructura del cuerpo basal de <i>Salmonella typhimurium</i> .	página 25
Figura 12. Modelo propuesto de la interacción de las proteínas	

Mot con la estructura del flagelo. ....	página 28
Figura 13. Esquema de ensamblaje del flagelo de <i>S. typhimurium</i> . ....	página 33
Figura 14. Esquema de regulación de la expresión de los genes flagelares .....	página 38
Figura 15. Esquema de los tres sistemas de exportación en bacterias .....	página 45
Figura 16. Inducción de FliI a 37 °C .....	página 60
Figura 17. Fotografía de microscopio electrónico de la cepa MGT7 / pIK2101 inducida a 37 °C .....	página 61
Figura 18. Inducción de FliI a 25 °C .....	página 62
Figura 19. Purificación de FliI de la columna de azul de Cibacron .....	página 63
Figura 20. Fracción final de la purificación de FliI .....	página 64
Figura 21. Fracción final de la purificación de la FliC .....	página 65
Figura 22. Fracción final de la purificación de FlgE .....	página 66
Figura 23. La actividad de hidrólisis de FliI es insensible a azida de sodio .....	página 67
Figura 24. Cinética para ATP de FliI .....	página 68
Figura 25. Dependencia de cationes de la actividad de hidrólisis de ATP de FliI .....	página 69
Figura 26. Fotografías de microscopio electrónico de células con diferentes genotipos de <i>fliI</i> .....	página 70

Figura 27. Inmunorréplica de afinidad (extracto celular)	.....	página 72
Figura 28. Inmunorréplica de afinidad (proteínas puras)	.....	página 73
Figura 29. Cosedimentación de FliI con flagelina polimérica	.....	página 75
Figura 30. Estimulación de la actividad de ATPasa de FliI en función de la concentración de FliC y FlgE	.....	página 76
Figura 31. Estimulación de la actividad de hidrólisis de FliI por FliC y FlgE	.....	página 77
Figura 32. Cinética para ATP de FliI y del complejo FliC:FliI	.....	página 78
Figura 33. Estimulación de la actividad de hidrólisis de FliI por flagelina monomérica y polimérica	.....	página 79
Figura 34. La estimulación de la actividad de FliI no es aditiva	.....	página 81
Figura 35. FliI tiene un sitio común de unión a substrato de exportación.	.....	página 82

# Lista de Tablas

Tabla 1. Receptores quimiotáticos o MCP .....	página 13
Tabla 2. Estequiometría de las proteínas que forman el flagelo .....	página 27
Tabla 3. Parámetros físicos del motor flagelar de <i>S. typhimurium</i> .....	página 29
Tabla 4. Componentes del regulón quimiotático-flagelar .....	página 36
Tabla 5. Homología de las proteínas del aparato exportador con las proteínas de los sistemas de exportación tipo III .....	página 43
Tabla 6. Cepas y plásmidos utilizados .....	página 50
Tabla 7. Reversibilidad del efecto estimulador de FliC .....	página 80

## Abreviaturas.

ATP	Adenosín 5'-trifosfato
ATPasa	Adenosín Trifosfatasa
BSA	Albúmina sérica bovina
CW	Rotación en sentido de las manecillas del reloj
CCW	Rotación en contra del sentido de las manecillas del reloj
DNasa	DNA hidrolasa
DTT	Ditiotreitol
D.O.	Densidad óptica
EDTA	Acido etilendiamino tetraácetico
F <sub>1</sub>	Sector hidrofílico y catalítico de la ATPasa
FliC	Flagelina
FlgE	Proteína del gancho
GuCl	Hidrocioruro de Guanidina
GST	Glutación S-Traransferasa
HEPES	ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazineetanesulfonico
IPTG	Isopropil tiogalactosido
µm	micrómetros
µg /ml	microgramos por mililitro
min	minutos
nm	nanómetros
nmol	nano molas
P <sub>i</sub>	Fosfato inorgánico
SAM	S-adenosil metionina
SAS	Sulfato de amonio saturado
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TNP-ATP	2'(3')- O-(2,4,6,-trinitrofenil)-adenosin-5' trifosfato
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano

## Resumen.

La morfogénesis del flagelo bacteriano, requiere del correcto funcionamiento del aparato exportador específico de éste organelo. Este aparato exportador es uno de los sistemas de exportación denominados tipo III, característico también de los sistemas de exportación de factores de patogenicidad y virulencia.

El aparato exportador específico del flagelo está compuesto por las proteínas FlhA, FlhB, FliH, FliI, FliO, FliP, FliQ, y FliR. Entre éstas, FliI es de especial interés y motivo de este estudio.

FliI muestra similitud con la subunidad catalítica de las  $H^+$ -ATP sintetasas tanto de procariontes como de eucariontes. Estudios previos han demostrado que la hidrólisis de ATP por FliI es esencial para la morfogénesis flagelar. Se ha propuesto que esta proteína interacciona con otros componentes del aparato exportador y provee la energía necesaria para el proceso de exportación. En este trabajo se determinaron las constantes cinéticas para la actividad hidrolítica de ATP de FliI :  $V_{max} = 0.12 \text{ nmol Pi min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  y  $K_m$  para MgATP de 0.35 mM. La interacción entre FliI y dos substratos de exportación: la flagelina (FliC) y la proteína del gancho (FlgE) se demostró por ensayos de inmunorréplica de afinidad, así como por ensayos de coprecipitación. La presencia de flagelina y de la proteína del gancho, estimula la actividad enzimática de FliI de forma específica y reversible. Las constantes cinéticas de la actividad de

hidrólisis cambian acorde con este efecto, la  $V_{max}$  en presencia de flagelina es de 0.35  $\text{nmol Pi min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  y la  $K_m$  es de 1.1 mM.

La interacción entre FliI y al menos dos sustratos de exportación es específica y reversible, lo cual sugiere un papel central de FliI en el proceso de exportación donde esta interacciona tanto con los componentes membranales del aparato exportador como con los sustratos de exportación..



## Abstract.

Flagellar protein FliI is a key component of the flagellar export apparatus in *Salmonella typhimurium*. FliI catalyzes the hydrolysis of ATP which is essential for flagellar assembly. Flagellin and hook protein were used as model to test for specific interaction of FliI with export substrates. These two proteins form the majority of the external filament of the bacterial flagellum. Affinity blot experiments as well as copurification studies with purified proteins, demonstrate that FliI interacts specifically with at least these two flagellar substrates.

The interaction of either of the two proteins with FliI, increases the intrinsic ATPase activity. The presence of either flagellin or hook protein stimulates ATPase activity in a specific and reversible manner. A  $V_{max}$  of  $0.122 \text{ nmol Pi min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  and a  $K_m$  for ATP of  $0.35 \text{ mM}$  was determined for the unstimulated FliI; the presence of flagellin increased the  $V_{max}$  to  $0.35 \text{ nmol Pi min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  and the  $K_m$  for ATP to  $1.1 \text{ mM}$ . The stimulation induced by the export substrates is fully reversible, suggesting a direct link between the catalytic activity of FliI and the export process.

# I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias tienen una gran versatilidad metabólica, lo que les permite vivir y crecer en condiciones ambientales muy diversas. No obstante, muchas especies bacterianas poseen además la habilidad de migrar hacia ambientes más favorables, lo cual les confiere una ventaja adaptativa importante. Este comportamiento, conocido como respuesta de taxis, requiere de un mecanismo de motilidad (nado o deslizamiento), un mecanismo para monitorear el medio ambiente (receptores y transportadores) y un mecanismo para modular el movimiento celular en respuesta a la información ambiental. Este proceso es uno de los comportamientos biológicos más estudiados y mejor entendidos.

La motilidad de los organismos y en particular de las bacterias ha sido motivo de numerosos estudios a lo largo de la historia. En el siglo XVII Antonie van Leeuwenhoek observó por primera vez pequeñas partículas o “animalillos” que se movían, supuso entonces que las partículas estaban vivas porque se movían y lo hacían con una aparente direccionalidad. A mediados del siglo XIX Pfeffer y Engelmann observaron que las bacterias se mueven en respuesta a estímulos ambientales y no al azar. Ya en el siglo XX se han identificado los mecanismos de motilidad y de monitoreo del medio ambiente, así como diversos factores que modifican este comportamiento, los cuales describiré a continuación.

## Sección A.

### Motilidad y taxis.-

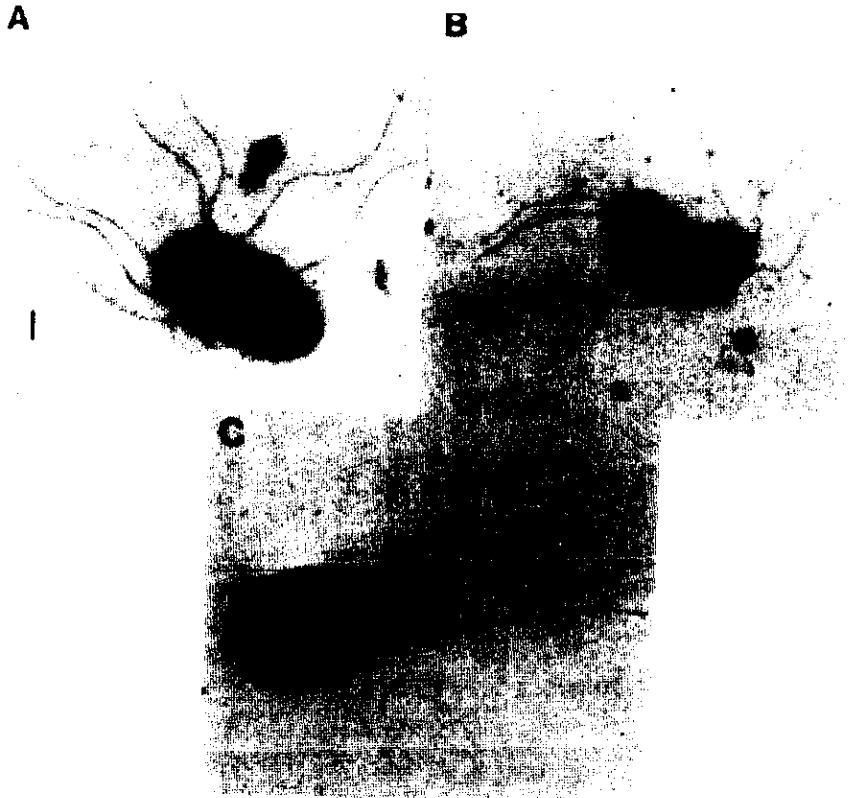
Los microorganismos móviles buscan activamente ambientes ricos en nutrientes, moviéndose de un sitio a otro al modificarse las condiciones del medio en el que se encuentran. Las especies bacterianas han desarrollado dos estrategias de motilidad, el deslizamiento y el nado.

El **deslizamiento** es un movimiento sobre superficies sólidas, cuyo mecanismo aunque poco entendido, se cree involucra organelos de motilidad probablemente en la pared celular, así como una secreción extracelular. Es un movimiento característico de especies como *Myxobacterias*, *Beggiatoaceas*, *Proteus* y *Flavobacterium* (antes *Cytophaga*), cuya rapidez varía entre 5 y 10  $\mu\text{m seg}^{-1}$  (Weibull, C., 1960). Se sabe muy poco de este tipo de movimiento bacteriano; y apenas recientemente se han identificado los primeros tres genes (*gldA*, *gldB*, *gldC* de *Flavobacterium johnsoniae*) directamente involucrados en este mecanismo (Agarawal, S., et al 1997).

La mayoría de las especies bacterianas viven en medios líquidos, y su estrategia de movimiento es el **nado**. Este movimiento está caracterizado por la rotación de apéndices u organelos llamados flagelos, que impulsan a la célula a través del medio; la rapidez de este movimiento es mayor a la del deslizamiento, siendo de entre 25 y 50  $\mu\text{m seg}^{-1}$  ( $\approx 25 - 50$  cuerpos celulares por segundo), y llegando a ser de hasta 600  $\mu\text{m seg}^{-1}$  en la bacteria marina *Thiovulum majus* (García Pichel, F. 1989), que nada aún más rápido que muchos eucariontes.

**Figura 1. Patrones de flagelación en algunas especies bacterianas.**

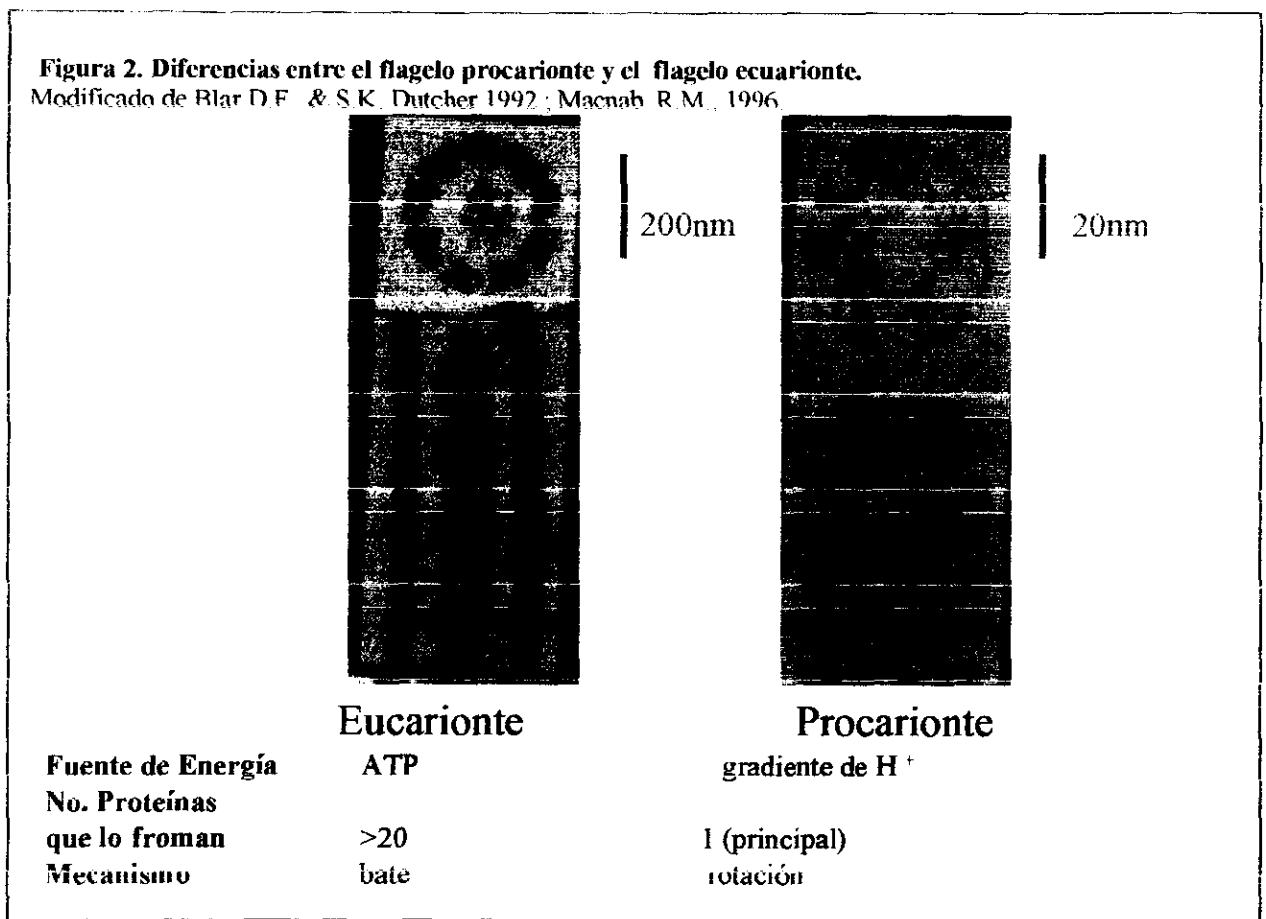
Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de distintas especies bacterianas. Todas las fotografías fueron tomadas en la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular. A. Flagelos peritricos *Salmonella typhimurium*. B. Flagelos lopotricos : *Rhodospirillum rubrum* C. Flagelo monotrico: *Rhodobacter sphaeroides*.



Existen representantes flagelados en las eubacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis*), Gram negativas (*Salmonella typhimurium*), espiroquetas (*Spirochaeta zuelzerae*), y en arqueobacterias (*Halobacterium salinarium*). La localización y número de flagelos varía considerablemente en las diferentes especies. Existen bacterias con flagelo interno, entre la membrana interna y externa, como en el caso de las espiroquetas (*Spirochaeta zuelzerae*), y bacterias con flagelo externo a la célula. Las bacterias con flagelo externo pueden tener uno o varios flagelos con distintos patrones de localización; con un solo flagelo polar (monotrico) *Pseudomonas aëginosa*, con varios flagelos en ambos polos (lopotricos) como *Rhodospirillum rubrum*, con un solo flagelo subpolar

(monotrico subpolar) como *Rhodobacter sphaeroides* o con varios flagelos alrededor de todo el cuerpo celular (peritricos) como en *Escherichia coli* o *S. typhimurium* (ver Figura 1).

El flagelo bacteriano es aparentemente parecido a su homónimo eucarionte, sin embargo, difieren completamente es decir, se trata de organelos análogos y no homólogos (Blair, D.F., & S.K. Dutcher 1992) (ver Figura 2).



A diferencia del flagelo eucarionte que bate para impulsar al organismo, el flagelo bacteriano rota. La fuerza de rotación o torca es generada en la base del flagelo procarionte y transmitida a las estructuras externas generando un impulso mecánico (ver

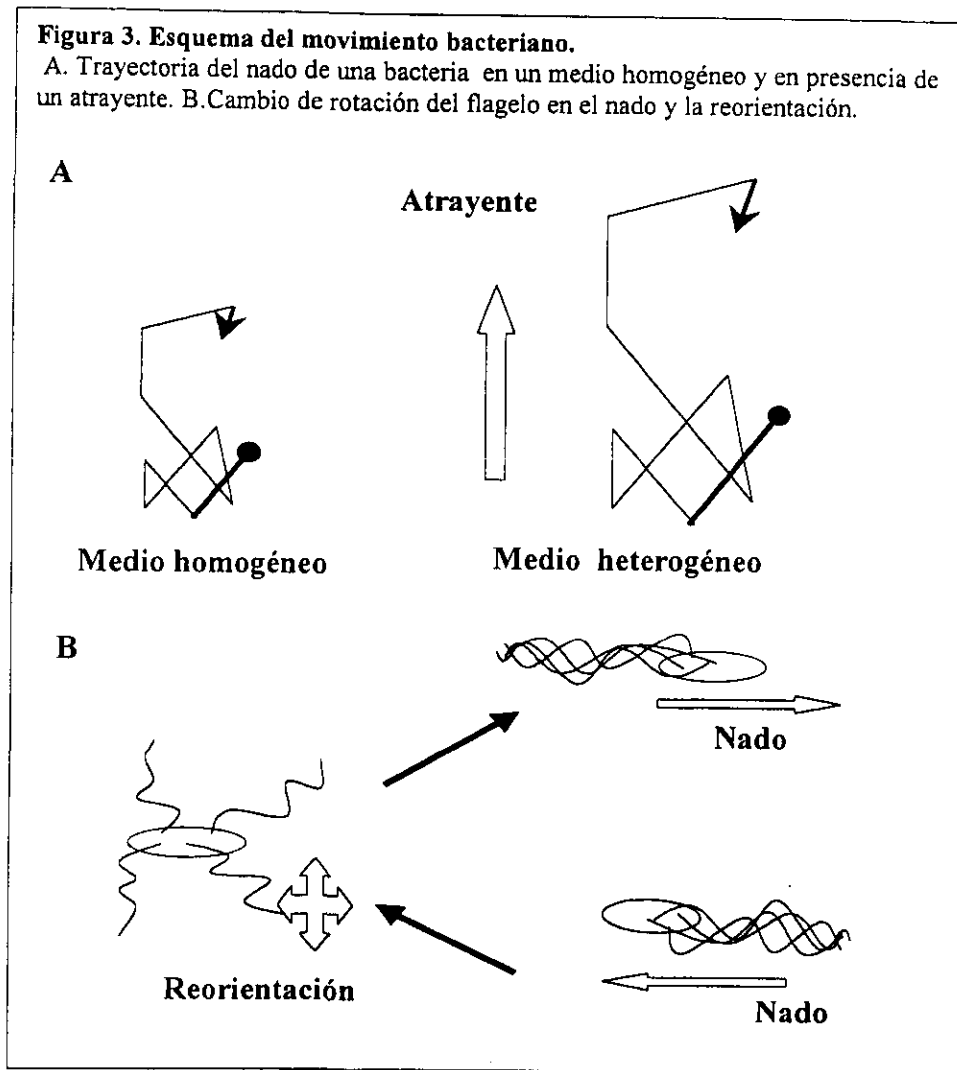
Sección B. Estructura y función flagelar). Por otro lado, en el flagelo eucarionte los componentes generadores de la fuerza de rotación se encuentran dentro de la propia estructura del organelo. Uno de estos componentes es la dineína, cuya hidrólisis de ATP es utilizada directamente para promover el deslizamiento de los microtubulos que forman este flagelo. La fuente de energía para la rotación del flagelo procarionte es la fuerza protón-motriz y no la hidrólisis de ATP, como en el caso eucarionte.. Por otro lado, en el flagelo procarionte cualquiera de los dos componentes de la fuerza-protón-motriz: el potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) o el gradiente transmembranal de pH ( $\Delta\text{pH}$ ), pueden dar la energía para sostener la rotación flagelar (Larsen, S. H. *et. al.* 1974). El origen de la fuerza-protón-motriz varía: en condiciones respiratorias, la cadena de electrones es la principal fuente, mientras que en condiciones de glicólisis anaerobia, la hidrólisis de ATP via la  $\text{H}^+$ -ATPasa es la responsable. Es interesante notar que las bacterias alcalófilas utilizan como fuente de energía la fuerza-sodio-motriz en lugar de la fuerza-protón-motriz. La generación del torque ocurre probablemente por el flujo de  $\text{H}^+$  o de iones  $\text{Na}^+$  a través del motor, por un mecanismo aún no completamente establecido (para una mayor explicación ver Sección Estructura flagelar ).

El movimiento bacteriano es un movimiento aleatorio con sesgo en tres dimensiones (biased random walk); está caracterizado por una serie de nados en una dirección, con interrupciones que resultan en la reorientación de la célula en el medio (Armitage, J.P., 1992) (ver Figura 3).

En *E. coli* y en *S. typhimurium* el movimiento hacia adelante se produce por la rotación de derecha a izquierda ("CCW" en sentido contrario a las manecillas del reloj por sus siglas en inglés), de cada uno de los flagelos presentes en la célula, lo cual promueve

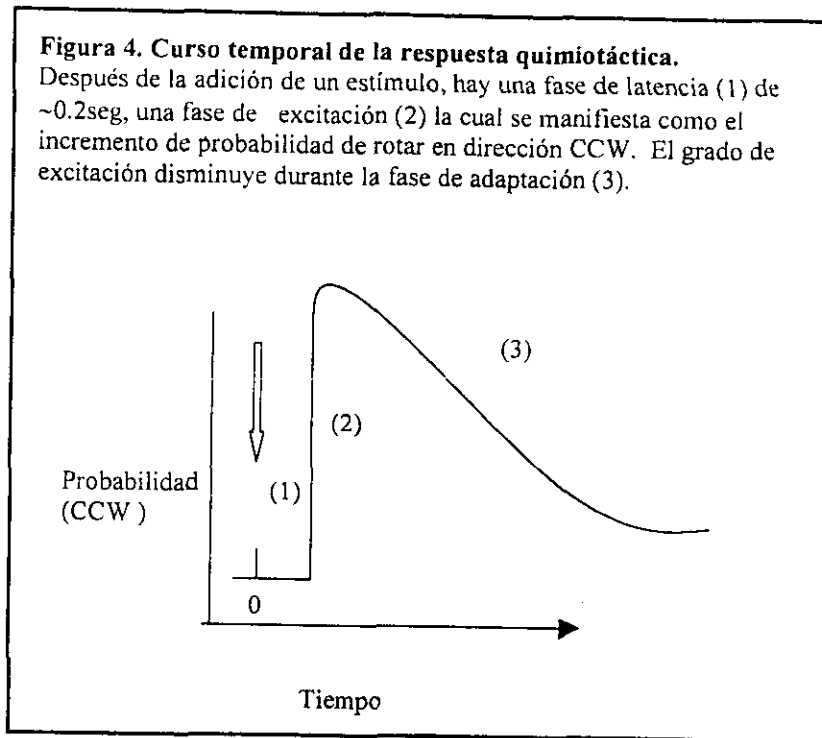
que estos se ordenen en un haz o trenza flagelar, que impulsa a la célula en el medio como una propela.

El cambio en la dirección de rotación de cada uno de los flagelos de izquierda a derecha ("CW" o en sentido de las manecillas del reloj por sus siglas en inglés), desordena el



haz flagelar; durante este periodo, la célula no tiene velocidad lineal sino una gran velocidad angular (Berg, H. C. & D.A. Brown 1972), lo que le permite reorientarse. Posteriormente, al rotar los filamentos una vez más de derecha a izquierda (CCW), se reordena el haz flagelar, y la célula nada entonces en una dirección diferente a la inicial (ver Figura 3).

En ausencia de un estímulo externo, los eventos de nado ( $\approx 1$  segundo), son interrumpidos por eventos breves de reorientación ( $\approx 0.1$  segundo). La presencia de un estímulo positivo (adición de un nutriente o remoción de un repelente), disminuye la frecuencia de interrupciones o reorientaciones, prolongando así el tiempo de movimiento continuo, lo que resulta en un movimiento aleatorio influenciado o sesgado ("biased



random walk). Por otro lado, el incremento de estímulos negativos, como la adición de repelentes o la remoción de nutrientes, produce un incremento en la frecuencia de interrupciones,

resultando en una mayor frecuencia en el cambio de dirección de la célula.

Al moverse, la célula percibe el cambio de composición del medio comparando la composición actual con la composición unos segundos anteriores, esto es, la célula percibe un gradiente temporal (Macnab, R. M. & D. E., Koshland 1972). El análisis de los cambios en la dirección de rotación del flagelo durante un estímulo, ha mostrado ser una respuesta trifásica (ver Figura 4), que consiste en una fase de latencia de *ca* 0.2 seg,



una fase de excitación durante la cual hay un cambio en la dirección de rotación del motor flagelar, y una fase de adaptación que dura entre segundos y minutos dependiendo del tamaño del estímulo, y que es fundamental en el comportamiento final de la bacteria. Este proceso de adaptación permite a la célula responder a cualquier variación en el medio ambiente y no solo a concentraciones específicas de un compuesto.

Los estímulos reconocidos por las bacterias son muy diversos, y pueden ser estímulos químicos a compuestos orgánicos e inorgánicos, o estímulos físicos.

*Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* utilizan dos estrategias de transducción para migrar a microambientes óptimos. En el comportamiento de **taxis independiente del metabolismo** o **quimiotaxis**, un cambio en la concentración de moléculas unidas a receptores transmembranales constituye la señal que produce el cambio en comportamiento. En la conducta de **taxis dependiente de metabolismo**, o **taxis-energética**, las moléculas señal deben de ser metabolizadas para producir una señal que refleja su nivel energético. La bacteria integra ambas conductas, lo cual resulta en una migración hacia un medio ambiente más favorable. En condiciones de crecimiento exponencial, la quimiotaxis es el principal determinante de la conducta en *E. coli* y *S. typhimurium*. Otras bacterias como *Rhodobacter sphaeroides* y *Sinorhizobium meliloti*, la taxis-energética es el mecanismo determinante.

Utilizando cualquiera de estas dos vías de transducción, la célula es capaz de percibir e integrar las distintas condiciones del medio.

### Estímulos dependientes de metabolismo:

➤ El **oxígeno** o respuesta **aereotáctica** fue inicialmente descrita en el siglo XIX por Pfeffer y Engelman. Bacterias móviles migran hacia ambientes donde la concentración de oxígeno es la óptima para su crecimiento y son repelidas por concentraciones ya sea mayores o menores a ésta. Las diferentes especies tienen un microambiente óptimo distinto, por ejemplo: *Bacillus subtilis*, aerobio obligado, busca concentraciones de oxígeno en el rango de 200  $\mu\text{M}$ ; *E. coli*, anaerobio facultativo de 50  $\mu\text{M}$ , y el aerotolerante *Desulfovibrio vulgaris* de 0.4  $\mu\text{M}$  (Taylor, B. & Zhulin, I., 1998). Diversas evidencias sugieren que la señal en la respuesta aereotáctica es un cambio en el transporte de electrones y la fuerza protón motriz durante la reducción del oxígeno (Taylor, B.L. 1983 ; Lazlo, D.J. & Taylor, B.L., 1981).

➤ La respuesta a la **luz** o respuesta **fototáctica** es un estímulo importante en bacterias fotosintéticas como *Rhodobacter sphaeroides*, y *Rhodospirillum rubrum* (Harayama, S. & Iino, T., 1976). Esta respuesta requiere también del transporte de electrones, y se ha propuesto que éste transporte regula tanto la respuesta aereotáctica como la fototáctica en estas especies bacterianas.

➤ El **pH del medio externo** actúa también como estímulo ambiental. Ensayos de capilaridad han demostrado que *E. coli* migra de ambientes con pH ácido o alcalino hacia medios con pH neutro (Tso, W.W., & Adler, J., 1974). La identidad de la señal en esta conducta no ha sido identificada con certeza, aunque se ha propuesto que el transporte de electrones y la fuerza proton-motriz están involucrados.

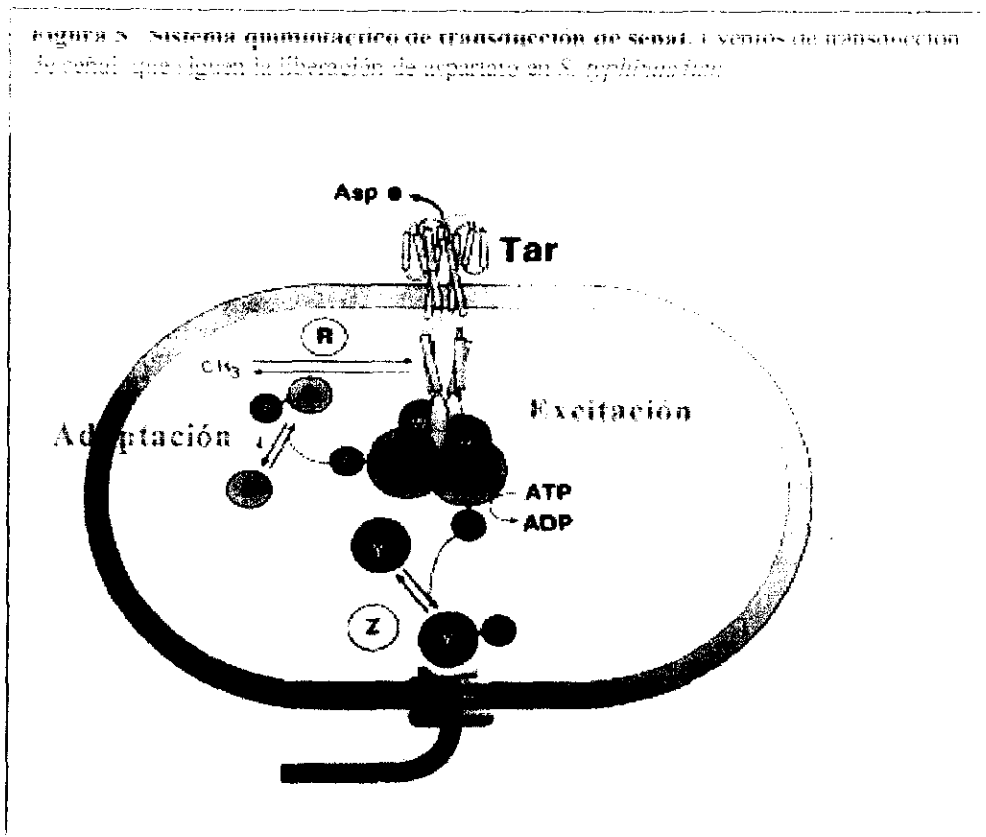
➤ Incrementos o disminuciones en la **temperatura** , dentro de un rango entre 20 y 37 °C, actúan como atrayente o repelente; la **presión**, la **osmolaridad** y la **viscosidad** del medio e inclusive el **campo magnético** terrestre actúan como estímulos en distintas especies bacterianas (Armitage, J.P. 1992). **Cationes divalentes** como el  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$  son atrayentes (Ingolia, T., & D.E. Koshland Jr. 1979), mientras que el  $Co^{2+}$  y el  $Ni^{2+}$  actúan como repelentes (Tso, W.W. & Adler, J., 1974) en algunas especies bacterianas.

#### **Estímulos independientes de metabolismo:**

La respuesta a compuestos orgánicos independiente de metabolismo, es probablemente la respuesta más importante en el comportamiento de las bacterias. Estos estímulos actúan a través de la unión a receptores específicos y desencadenan un proceso de transducción de señal que es particular al sistema de quimiotaxis. A pesar de no requerir del metabolismo celular, los atrayentes más poderosos son compuestos centrales a éste: aminoácidos, oligopéptidos, azúcares y ácidos carboxílicos.

## Mecanismo de quimiotaxis.

La información del medio ambiente es percibida por receptores membranales de la bacteria, y procesada e integrada por los componentes citoplásmicos del sistema quimiotáctico de transducción de señal (Sistema Che) y transmitida al flagelo como



un cambio en la dirección de rotación (ver Figura 5).

La quimiotaxis bacteriana es uno de los modelos de los sistemas regulatorios de dos componentes. Los sistemas de dos componentes son sistemas de transducción de señal a través de las membranas biológicas, que permiten a la célula reconocer y responder a su ambiente. Estos sistemas se han denominado así, puesto que contienen proteínas con dominios "transmisor" y "receptor" característicos, que permiten el flujo

de información entre el medio ambiente y la célula. Estos sistemas incluyen al control de la asimilación del nitrógeno, al proceso de esporulación en *B. subtilis*, al proceso de osmoregulación, a la regulación redox y el regulón de porinas, entre otros ( Hoch, J.A., & T.J. Silhavy 1992).

#### Receptores quimiotácticos.-

Existen dos tipos de receptores que perciben los estímulos del medio; las **proteínas quimiotácticasceptoras de metilos (MCPs** de sus siglas en inglés Methyl-accepting Chemotactic Proteins) ( Hazelbauer, G. L. 1992); y a las **proteínas periplásmicas de unión** como son la proteína de unión a maltosa, a ribosa, a galactosa, y a dipéptidos.

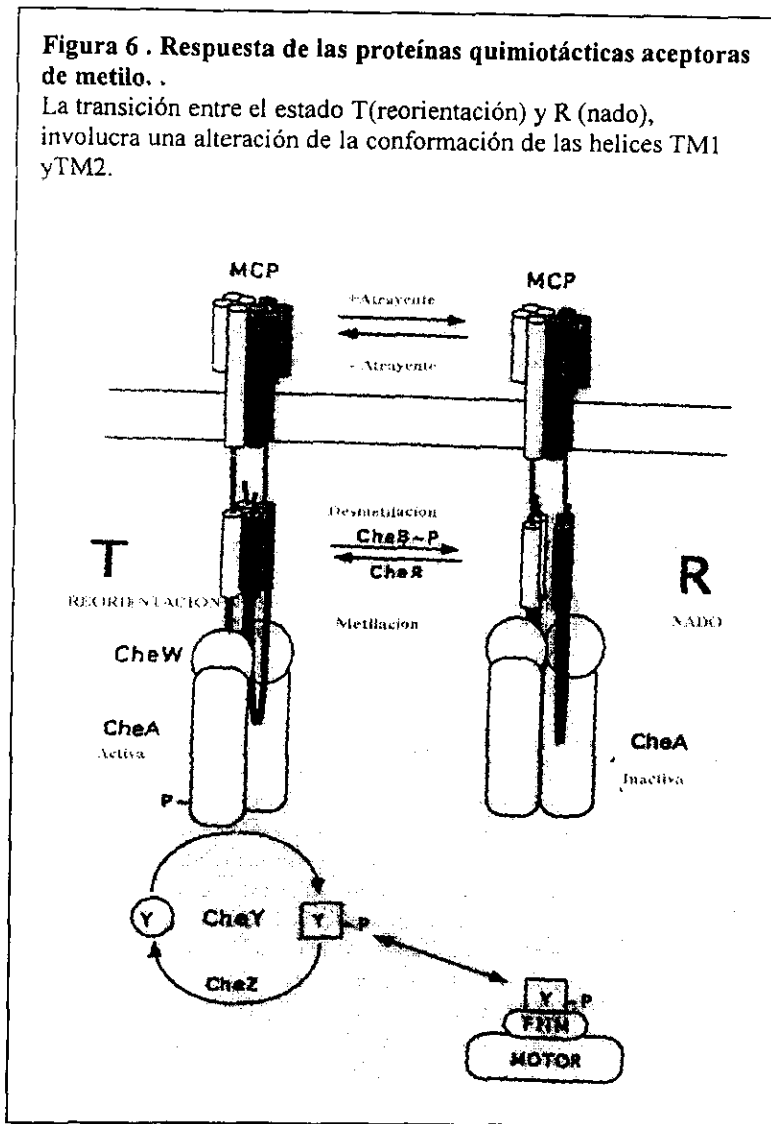
➤ Las **proteínas periplásmicas de unión**, son proteínas monoméricas de peso molecular entre 23,000 y 52,000 daltones (Higgins, C.F., 1992). La unión de ligando promueve un cambio conformacional que le permite interactuar con el dominio periplásmico de los receptores quimiotácticos MCPs a través de los cuales ejerce su acción. (Levit, M.N., 1998).

➤ Las **proteínas quimiotácticasceptoras de metilos** son proteínas diméricas transmembranales de entre 55,000 y 60,000 de peso molecular. Se han identificado cuatro MCPs en *E. coli* y cinco en *S. typhimurium*, dependiendo de su especificidad por el ligando, y se han localizado formando grupos en los polos de la célula (Madock, J.R., & L. Shapiro 1993).

Tabla 1 . Receptores Quimiotácticos o MCP

RECEPTOR	ATRACTANTE	REPELENTE
Tar	Aspartato, Glutamato y MBP	Ni <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>
Tsr	Serina, Alanina, Glicina, Aminoisobutirato	
Trg	RBP (Ribosa) y GBP (Galactosa, Glucosa)	
Tap	Dpp (dipéptidos)	
Tcp	Citrato	Fenol

Datos tomados de Stock, J. & Surette, M.G. 1998.



Los receptores quimiotácticos tienen un alto grado de similitud entre sí; están compuestos por un segmento amino-terminal, un segmento citoplásmico, dos secuencias transmembranales TM1 y TM2 separadas por un dominio

periplásmico de unión a ligando, un dominio señal citoplásmico rodeado de dos hélices de metilación MH1 y MH2, y un dominio citoplásmico C-terminal variable ( ver Figura 6).

La información del estado de ocupación del receptor es transferida a un sistema de transducción de señal tipo “sistema de dos componentes”, compuesto por las proteínas Che (del inglés chemotaxis). En este sistema el dominio receptor estaría en CheA y el regulador de la respuesta sería CheY.

El receptor de Tar, que monitorea los niveles de aspartato en el medio, se ha utilizado como modelo de la estructura y función de los MCPs. Fisiológicamente se ha determinado que, a pesar de ser un dímero, Tar une una sola molécula de aspartato, lo cual estabiliza la conformación del dímero. Estudios de cristalografía de rayos X y de mutación dirigida llevados a cabo por el grupo de Koshland ( Yeh, J.I., *et. al.* 1993), muestran que el aspartato se une cerca de la interfase del dímero en el sitio de unión de uno de los monómeros, lo cual se ve reflejado en una cooperatividad negativa en la unión de aspartato; la Kd es de 0.1 a 2  $\mu$ M para el primer y el segundo aspartato respectivamente (Bienmann, H.P., & D.E. Koshland Jr. 1994).

El dominio transmembranal está compuesto por 4  $\alpha$ -hélices transmembranales, dos de cada monómero (TM1, TM2, TM1' y TM2'). El mecanismo de transducción de señal propuesto (Pakula, A. A. & M. I. Simon 1992; Lynch, B.A., & D.E. Koshland Jr. 1991), sugiere que la unión de ligando en el dominio periplásmico induce un movimiento conformacional en la hélice transmembranal TM2 con respecto a la hélice TM1 (ver Figura 6). Este cambio conformacional se traduce en una modificación de la actividad del dominio citoplásmico. El dominio citoplásmico está formado por un

dominio aceptor de grupos metilo donde interaccionan las proteínas quimiotácticas **CheR** y **CheB**, esenciales para la adaptación de la respuesta, y un dominio señal donde interaccionan las proteínas quimiotácticas **CheW** y **CheA** involucradas en la transferencia de la señal hasta el motor flagelar ( Liu,J., & J.S. Parkinson 1989).

La liberación del ligando del receptor resulta en la formación de un complejo ternario: MCP-CheW-CheA; esto a su vez promueve la autofosforilación de la cinasa CheA (Ninfa,A. *et. al.* 1988). Che A-P fosforila a CheY (regulador de la respuesta) en el residuo Asp57 (Sanders, D.A., *et. al.* 1989), el cual en su estado fosforilado aumenta su afinidad por el complejo del switch flagelar (FliG, FliM y FliN, ver más adelante en la Sección B Estructura y función flagelar) (Toker,A.S., & R.M. Macnab, 1997 ; Bren A. & Eisenbach, M 1998). La unión de CheY-P a FliM induce un cambio en la dirección de rotación del flagelo hacia “CW”, desordenando la trenza flagelar y reorientando a la célula. La cinasa CheA, fosforila también a la proteína CheB, metilesterasa del receptor. La metilación del receptor inhibe la autofosforilación de CheA, y por lo tanto la respuesta del receptor en ambientes constantes, proceso al cual se le conoce como adaptación (ver Figura 5).

Los niveles de CheY-P y CheB-P son regulados ya sea por la fosfatasa CheZ o por la actividad de atutofosfatasa , para manter al sistema en equilibrio capaz de responder a cambios en el medio ambiente

A continuación describiré brevemente cada uno de los componentes del sistema Che y su papel en la respuesta quimiotáctica.

➤ La proteína **CheA** es una proteína soluble de 59,976 daltones de forma alargada que media la transferencia de información entre los MCPs y los componentes



citoplasmáticos de la respuesta quimiotáctica. Es miembro de la familia de las cinasas de histidina de los sistemas de dos componentes, involucradas en diversos procesos de transducción de señal en microorganismos procariontes y eucariontes incluyendo plantas. Se han aislado y secuenciado mas de 100 miembros de esta familia y todas comparten una estructura similar: una región de fosfotransferencia en el extremo NH<sub>2</sub>-terminal, una región de unión al regulador de la respuesta (CheY), una región de cinasa y en el extremo carboxilo una región de unión a CheW (Stock,A., *et. al.* 1988).

➤ **CheW** es una proteína soluble de 18,000 daltones, que junto con CheA se une al dominio señal del MCP formando un complejo ternario de estequiometría 2 :2 :2. CheW posee sitios de unión independientes para CheA y MCP (Swanson, R.V. *et. al.* 1993).

➤ **CheY** es una proteína soluble monomérica de 14,000 daltones, de forma globular. Che Y es homóloga a proteínas de la familia de reguladores de respuesta en los sistemas de dos componentes, cuya función es modular la respuesta del efector a estímulos sensoriales (Stock,A. *et. al.* 1985). Estudios de cristalografía de rayos X y NMR, tanto en CheY como CheY~P, han mostrado un cambio conformacional en CheY~P probablemente responsable de aumentar su afinidad por FliM (Welch, M. *et. al.* 1993). Por otro lado, con estudios de mutación dirigida y de mutaciones supresoras se han identificado que CheY ~ P interacciona con la región amino terminal de FliM (Sockett, H., *et. al.* 1992 ; Bren, A. & M. Eisenbach 1998).

➤ **CheZ** es una fosfatasa soluble de 24,000 daltones cuya función *in vivo* es controlar los niveles de CheY~P acelerando su desfosforilación (Hess,J.F. *et.al.* 1988).

➤ **CheR** es una proteína soluble monomérica de 30,000 daltones; cataliza la transferencia de grupos metilo de la S-adenosilmetionina (SAM) a residuos de ácido glutámico del receptor (Springer, M.S., *et. al.* 1977). Su actividad está regulada por los niveles de SAM en la célula y la conformación del receptor. Tiene una  $K_m$  de entre 10 y 20  $\mu M$  para SAM y 2  $\mu M$  para Tar. Los cambios de metilación en el receptor modulan la actividad de autofosforilación de CheA en el complejo ternario.

➤ **CheB** cataliza la hidrólisis de los ésteres de metilo introducidos por CheR (Stock, J.B., & D.E. Koshland Jr. 1978). CheB actúa también como amidasa generando más residuos de glutámico a partir de residuos de glutamina en la secuencia del receptor. CheB es una proteína de 37,500 daltones compuesta por dos dominios (Simms, S.A., *et. al.* 1985). Un dominio regulatorio N-terminal homólogo a dominios aceptores de fosfato en la superfamilia de reguladores de respuesta (incluyendo a CheY), y un dominio catalítico C-terminal que desmetila o desamida al receptor. El dominio regulador de CheB, es fosforilado por CheA~P, al igual que su homólogo CheY, lo cual incrementa su actividad hasta 10 veces. Las constantes catalíticas de ambas transferencias son similares, y ambas son reguladas por estímulos sensoriales reflejados en el complejo ternario MCP-CheW-CheA (Lupas, A. & J. Stock 1989). CheB-P tiene una actividad de autofosfatasa alrededor de diez veces mayor a CheY-P, por lo que no requiere de una fosfatasa como CheZ para regular su actividad.

Los cambios en la metilación/amidación del receptor regulan la actividad de autofosforilación de CheA en el complejo MCP-CheW-CheA. Altos niveles de metilación incrementan hasta 100 veces esta actividad, mientras que niveles bajos la

*inhiben. El papel de la metilación en la respuesta se ha explicado con un modelo de receptor de dos estados. Un estado promotor de la reorientación T ( del inglés tumble), resultando en una proteína CheA activa; y un estado promotor del nado R (del inglés run) con CheA inactiva. En este modelo la metilación modifica la interacción entre los dominios MH1 y MH2 del receptor. La presencia de repelentes promueven tanto la metilación como la estabilización del estado T, mientras que la desmetilación, promovida por la presencia de atrayentes, estabiliza el estado R (Stock ,J. & Surette, M.G. 1996).*

De esta forma, la respuesta de fosforilación del complejo MCP-CheW-CheA es controlada por un balance entre el efecto del ligando en el dominio sensorial del MCP y el grado de metilación de los residuos de ácido glutámico en las regiones MH1 y MH2 del mismo receptor. Los niveles de metilación de las hélices MH1 y MH2 son a su vez modulados por cambios conformacionales del receptor inducidos por el estado de ocupación de ligando.

Con el afán de explicar los mecanismos en las respuestas sensoriales de los organismos se han propuesto modelos que involucran dos procesos, el de excitación y el de adaptación. En el caso de la respuesta quimiotáctica de los microorganismos, se ha modelado experimentalmente analizando la respuesta de nado de las células en un medio homogéneo, que es súbitamente cambiado a otro medio distinto pero también homogéneo. Las células responden nadando, si el cambio es a un medio con mayor concentración de atrayente, o reorientándose si éste tiene repelente o menor concentración de atrayente. Este comportamiento continúa por unos minutos, después del cual la célula regresa a un patrón de nado característico de un estado sin estímulo,

con fluctuaciones entre nado y reorientación al azar. Durante la respuesta quimiotáctica *in vivo* las células responden y se adaptan a un estímulo en un intervalo de tiempo de 1 segundo. El efecto de la metilación de los receptores es un mecanismo que funciona en una escala de tiempo de minutos, y es responsable de mantener a los receptores en un equilibrio que les permita responder a cualquier variación en el medio ambiente.

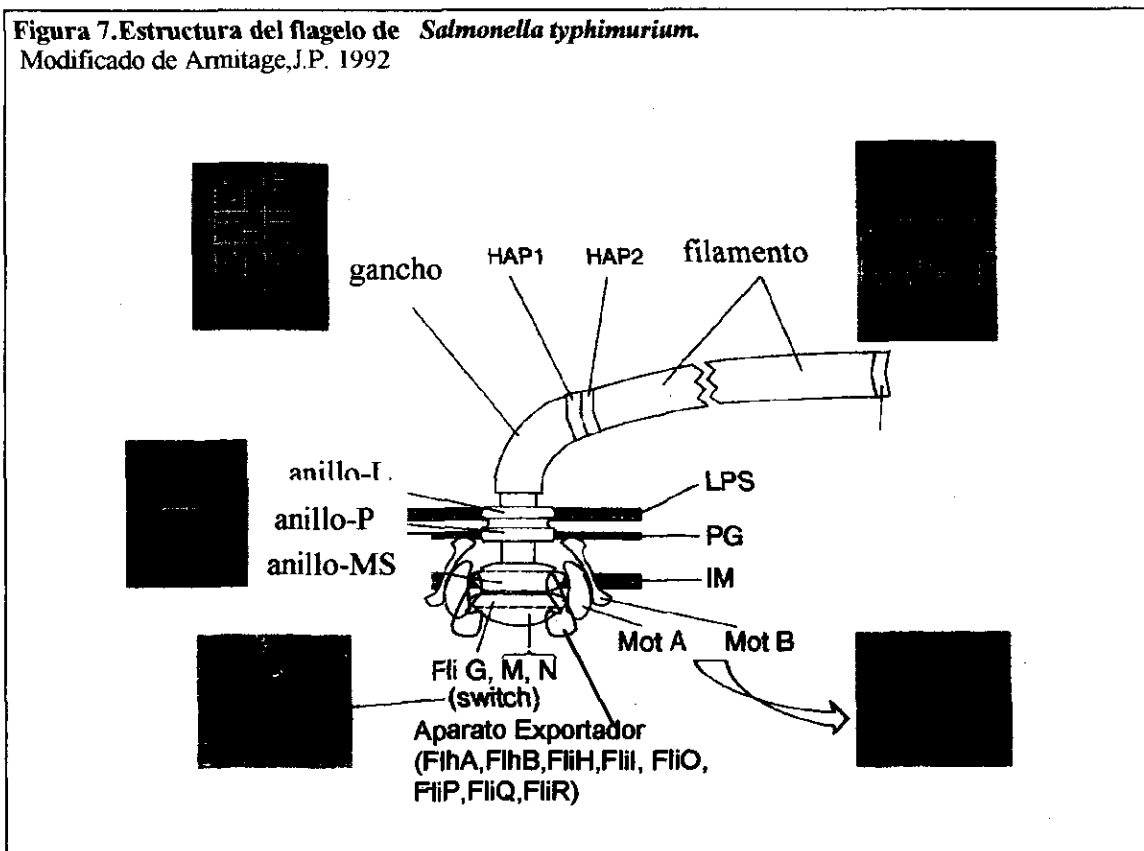
## Sección B.

### Estructura y Función Flagelar.

Una vez integrados los estímulos del medio ambiente, la respuesta de la célula depende de la rotación del flagelo.

El flagelo bacteriano es uno de los complejos multiproteínicos mejor entendidos tanto a nivel genético, estructural, funcional y morfogenético; por ello, se ha utilizado como modelo de estudio de un motor biológico a nivel molecular.

La estructura general del flagelo (ver Figura 7), compuesta por tres partes principales: filamento, gancho y cuerpo basal embebido en la membrana, se ha conservado en el reino procarionte desde arqueobacterias, hasta eubacterias gram positivas, gram negativas, y espiroquetas.



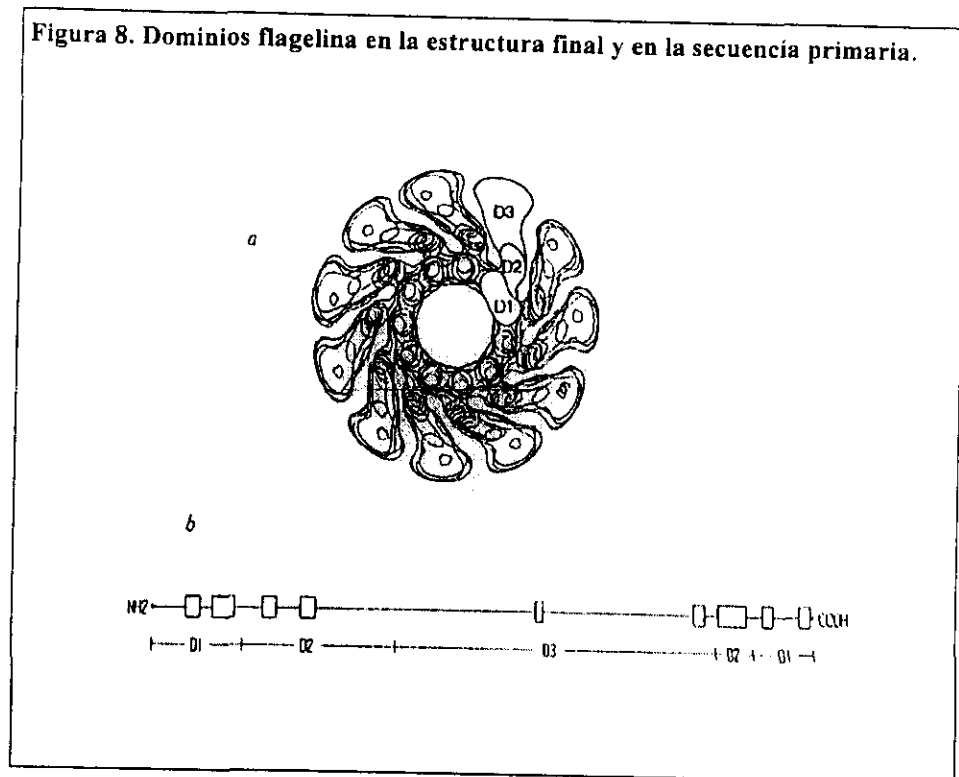
A continuación describiré cada uno de los componentes del flagelo bacteriano.

### **Filamento.-**

El filamento está localizado extracelularmente, y constituye el componente propulsor del flagelo, que genera el trabajo hidrodinámico en el medio. No tiene actividad enzimática, ni forma parte del sistema mecánico generador del torque. El filamento está constituido como un polímero de flagelina (FliC); tiene un diámetro de  $0.02 \mu\text{m}$  y una longitud variable entre  $5$  y  $10 \mu\text{m}$ . Es el componente más abundante del flagelo, en cuanto a masa total (y por lo tanto costo biosintético), y es clínicamente significativo por ser un potente antígeno. Posee características estructurales especiales; tiene un coeficiente de flexión de  $ca 10^{-15}$  dinas  $\times$   $\text{cm}^2$ , dos órdenes de magnitud mayor a la actina, y forma una macrohélice orientada hacia la izquierda con una longitud de onda de  $2.5 \mu\text{m}$ . Estas dos características permiten que la fuerza de rotación o torca generada en la base del flagelo se transforme en una fuerza de translación que produce un “empuje mecánico” que impulsa a la célula (Namba, K., & F. Vonderviszt 1997).

La flagelina es una proteína compuesta por 3 dominios: los dominios amino- y carboxilo terminal conservados en diferentes especies bacterianas e involucrados en la exportación y ensamblaje de las subunidades, y el dominio central variable e involucrado en la especificidad antigénica (Figura 8).

Estudios de difracción de rayos X y reconstitución de imágenes indican que los extremos amino- y carboxilo terminal se localizan en la parte central del filamento formando las paredes de un canal central a la estructura, mientras que el dominio central, variable, está expuesto al exterior de la estructura (Namba, K., *et. al.* 1989 ; Morgan, D.G. *et. al.* 1995).



Las subunidades de flagelina se ordenan en 11 hileras longitudinales casi perpendiculares a la membrana, formando un filamento hueco (Ruiz, T., *et. al.* 1993). La flagelina se puede polimerizar en dos conformaciones distintas, lo cual determina la longitud de onda y la amplitud de la hélice; existen filamentos de hélice izquierda, hélice derecha, rectos o “rizados” (ver Figura 9).

La forma natural del filamento en *S. typhimurium* y *E. coli* es de una hélice izquierda, siendo ésta la estructura más estable en condiciones fisiológicas y la utilizada durante la

propulsión. Como

mencionamos

anteriormente, el

flagelo de *S.*

*typhimurium* y de

*E. coli* puede rotar

en dos direcciones,

este cambio de

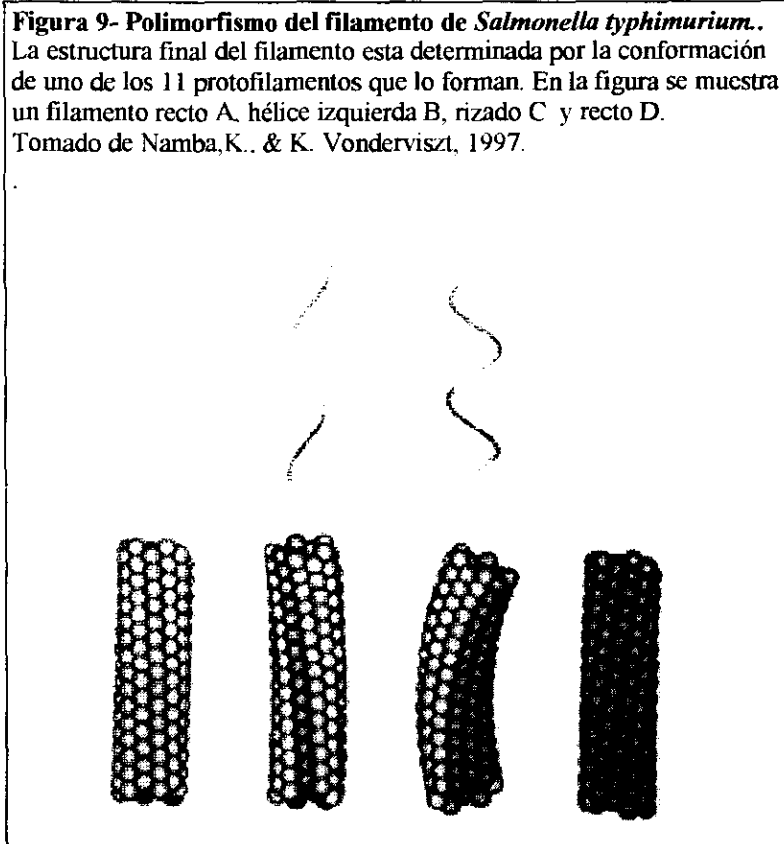
dirección de

rotación produce

cambios en la

longitud de onda y

la dirección de la



hélice, lo cual desordena la trenza flagelar y genera un nado desordenado (ver Sección

A. Motilidad y Quimiotaxis). En otras especies como *R. sphaeroides*, el flagelo no

cambia de dirección de rotación sino de estructura. Al nadar, el flagelo tiene una hélice

de longitud de onda larga. Al reorientarse éste flagelo detiene la rotación produciéndose

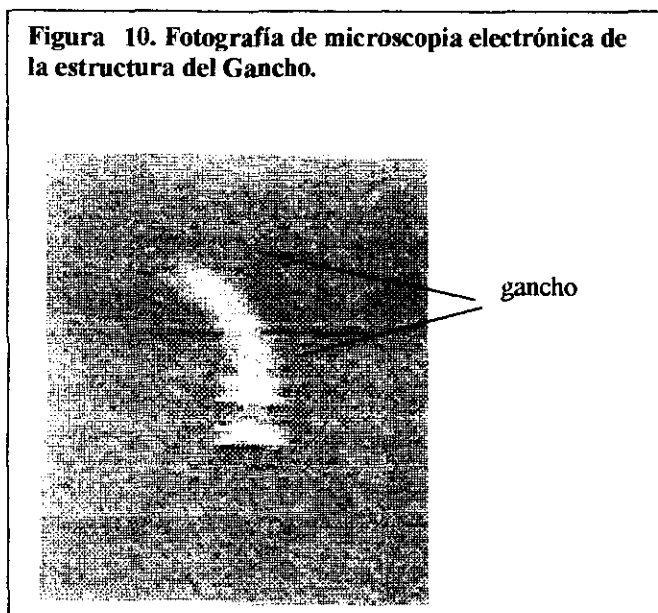
un cambio en la estructura, la cual cambia a tener una longitud de onda corta, resultando

en un flagelo encogido (ver Figura 1 panel C).



## Gancho.-

El filamento se conecta a la célula a través de una estructura curvada, conocida como gancho, que funciona como un acoplador flexible entre el filamento rígido y el motor flagelar. El gancho es estructuralmente similar al filamento, y es un homopolímero de la proteína FlgE. La secuencia de amino ácidos de FlgE muestra



regiones de alta similitud con la flagelina (entre 25 y 30% de similitud), principalmente en los extremos amino y carboxilo terminales (Homma, M. *et al* 1990). El gancho posee una estructura helicoidal caracterizada por 11 fibrillas, formando un canal

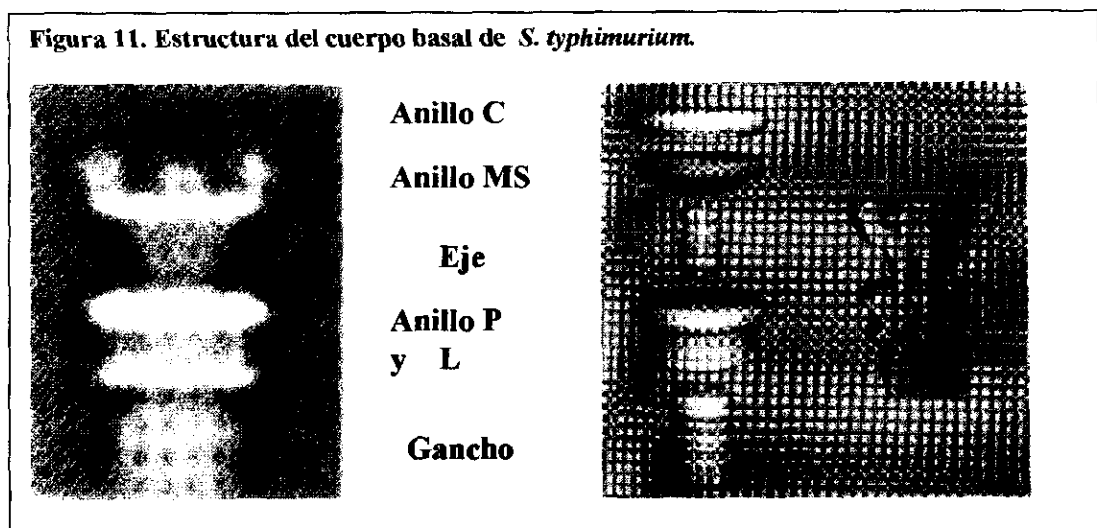
central, igual a la descrita para el filamento. Sin embargo, su longitud de onda es menor: 130 nm comparada con 2.5  $\mu\text{m}$ , y posee una longitud fija de entre  $55 \pm 6$  nm, lo cual genera su apariencia característica (ver Figura 10) (Morgan, D.G., *et. al.* 1993).

A pesar de ser estructuralmente similares, las propiedades mecánicas del gancho son muy distintas al filamento. El gancho es una estructura menos rígida que el filamento, consistente con la función propuesta de acoplador flexible, que permite la transmisión del torque generado perpendicularmente a la célula y el acoplamiento de varios flagelos individuales en un haz flagelar que la impulsa.

Mediando la unión entre el gancho y el filamento se encuentran dos proteínas, conocidas como proteínas de unión gancho filamento o HAPs por sus siglas en inglés (Hook Associated Proteins) ( Homma, M. *et. al* 1985 y 1990), las cuales actúan como adaptadores mecánicos entre estas dos estructuras.

### Cuerpo Basal.-

El gancho está conectado a la célula a través de un complejo conocido como Cuerpo Basal, que se encuentra embebido en la membrana. Estructuras de filamento- cuerpo basal se pueden aislar en el laboratorio como se muestra en la figura 11.



El Cuerpo Basal es una estructura con simetría cilíndrica, que consiste en un eje central probablemente hueco, montado sobre una estructura en forma de anillo (anillo MS), y rodeado por dos anillos externos ( P y L). El anillo MS (de las siglas en ingles

Membrane and Supramembrane) se encuentra en la membrana citoplásmica y parte en el citoplasma. Los anillos P y L se encuentran en la capa de Peptidoglicano y en la membrana externa de Lipoproteínas, respectivamente. Recientemente se ha identificado la presencia de una cuarta estructura, el anillo C, que se encuentra completamente embebida en el Citoplasma.

El cuerpo basal es una estructura pasiva, que no está directamente involucrada en la generación de la fuerza de rotación o en el cambio de dirección. Sin embargo, es la primera estructura que rota. Se cree que el anillo MS actúa como plancha de montaje para los componentes del switch, del motor flagelar, así como del aparato exportador, y que funciona como base de transmisión de la fuerza de rotación generada en el motor hacia el filamento (Macnab,R.M.,1996). Los anillos externos forman un cilindro a través del cual el eje rota libremente transmitiendo el torque del motor hacia el gancho y el filamento. El modelo actual propone que el anillo MS, el eje, el gancho y el filamento constituyen una sola unidad rotatoria.

La estequiometría de las proteínas que forman el flagelo se muestra en la siguiente tabla.

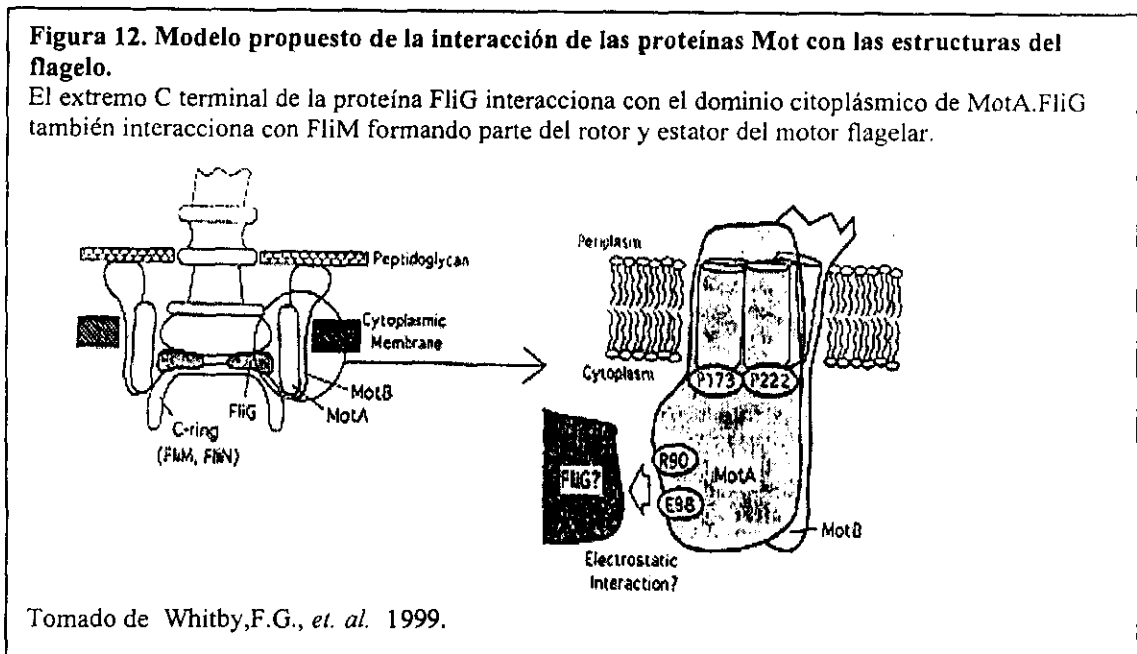
**Tabla 2. Estequiometría de las proteínas que forman el flagelo.**

ESTRUCTURA	PROTEÍNA	SUBUNIDADES	LOCALIZACIÓN
Filamento	FliC	> 20,000	Extracelular
Gancho	FlgE	120	Extracelular
Zona de union gancho filamentoso 1,3,2 (HAP)	FlgK	10-15	Extracelular
	FlgL	10-30	
	FliD	6-12	
Eje proximal	FlgB, FlgC, FlgF FlgG	6	Periplasma
Eje distal		26	
Zona de union eje anillo MS	FliE	9	Periplasma
Anillo P	FlgH	26	Capa de Peptidoglicano
Anillo L	FlgI	26	Membrana Externa
Anillo MS	FliF	26	Membrana citoplásmica
Anillo C	FliG, FliM y FliN	26 ?	Citoplasma
Aparato Exportador	FliP, FlhA, FlhB,	9 ?,?	Membrana Membrana y citoplasma
	FliO, FliR, FliQ	¿?	
	FliH, FliI	¿? ~ 1,500	Membrana y citoplasma Citoplasma
			Citoplasma /membrana
Motor	MotA, MotB	8	Membrana citoplasmica

Modificado de Namba, K., & F. Vondervizst 1997 ; Macnab, R.M. 1996, y otros.

## Función y Composición del Motor Flagelar.-

El motor flagelar es un aparato reversible que acopla el potencial electroquímico de la membrana a la rotación del filamento. Las proteínas MotA y MotB, son necesarias para la rotación del motor, sin serlo para el ensamblaje del flagelo o el cambio de dirección de rotación de éste (Blair, D.F., & H.C. Berg, 1988). Se trata de proteínas integrales a la membrana citoplásmica, que en imágenes de criomicroscopía electrónica se muestran como “nudos” alrededor del cuerpo basal (ver Figura 7 y 12).



MotB contiene un solo segmento transmembranal y una región de unión a peptidoglicano (Chun, S.Y. & J.S. Parkinson, 1988), por lo cual se ha propuesto que forma parte del estator del motor flagelar, es decir, se trata de una proteína de anclaje que conecta la estructura que genera la fuerza de rotación a una estructura rígida como la pared celular.

MotA contiene cuatro regiones transmembranales y dos asas periplásmicas (Dean, G.E. et al 1984). La interacción de las regiones transmembranales de Mot A con MotB

forman un canal de  $H^+$  el cual está directamente involucrado en la generación de la torca (Blair, D.F., & H.C. Berg, 90). Esta proteína a su vez interacciona con el extremo carboxilo-terminal de FliG, que es un componente del switch flagelar, para transmitir la energía del paso de  $H^+$  a la estructura flagelar y generar la rotación (ver Figura 12).

La Tabla 3 muestra algunas características cuantitativas relevantes del motor flagelar.

**Tabla 3. Parámetros físicos del motor flagelar de *Salmonella typhimurium*.**

Numero de flagelos por célula	3-15 (típicamente 10)
Longitud del filamento	0 – 20 $\mu$ m (típicamente 5-10 $\mu$ m)
Fuente de Energía	Fuerza protón motriz ( $H^+$ )
Rango linear para la rotación	ca 25 – 125 mV
Velocidad de rotación (en saturación)	~ 100Hz = 300rps = 18,000rpm (hasta 100,000 en algunas bacterias)
Numero de $H^+$ por revolución	ca 1200

Modificado de Berg; H.C. 1993 ; Derosier, D.J. 1998.

El motor flagelar es muy eficiente, y opera cerca del equilibrio. Tiene una fuerza de rotación constante en un amplio rango de carga, pero que no es proporcional a la fuerza protón-motriz, tampoco depende de la temperatura, y opera igual con fuerza protón-motriz de ambas polaridades y la rotación en ambas direcciones es equivalente en términos de torca.

Se han propuesto muchos modelos que pretenden explicar el mecanismo molecular del motor, aunque todavía no hay consenso en uno solo. Un modelo presentado por el grupo de H. C. Berg ( Berg, H. C., 1993 ) propone que el potencial de protones se usa para desviar la difusión de los generadores del torque dentro del motor. La energía se guarda en un “elastic tethering” de casi igual magnitud al del potencial de  $H^+$ .

Otro modelo presentado por el grupo de DeRosier propone que los sitios de unión de protones están formados por la unión entre el rotor y el estator (FliG y MotA-MotB, respectivamente). El paso de los protones empuja al rotor, el cuál hace girar a el anillo MS, posteriormente este movimiento se propaga secuencialmente al eje, gancho y filamento ( DeRosier,D.J. 1998).

Como se mencionó anteriormente, el motor flagelar es capaz de rotar en dos direcciones en respuesta a cambios en el medio ambiente. Esta respuesta es el resultado de la acción de tres proteínas FliG, FliM y FliN que constituyen el complejo del switch o del cambio de dirección de rotación del flagelo. El complejo del “switch” forma parte del anillo C o citoplásmico, que se encuentra unido al cuerpo basal (ver Figura 7). Estudios de mutación dirigida en genes que codifican para estas proteínas han mostrado que éstas se requieren tanto durante el proceso de ensamblaje, como durante el proceso de transmisión o generación de la fuerza de rotación , así como en el proceso de cambio de dirección de rotación del flagelo (Macnab,R.M, 1996).

➤ **FliG** está directamente unida al anillo MS (FliF) y estabiliza la unión entre el cuerpo basal , el anillo C y el motor (Francis, N. R., *et. al.* 1992). Se ha demostrado que el extremo carboxilo-terminal de FliG interacciona directamente con Mot A, por lo cual se ha propuesto como la proteína que transmite la energía para generar la rotación del flagelo ( Whitby,F.G., *et. al.* 1999).

➤ **FliM** es la proteína con la cual interacciona CheY~P, promoviendo el cambio en la dirección de rotación del flagelo (Sockett, H., *et al* 1992). Estudios recientes han

identificado a la región carboxilo terminal de FliM como la involucrada en esta interacción (Tocker, A.S. & R.M.Macnab, 1997 ; Bren, A., & M. Eisenbach, 1998).

➤ FliN, es una proteína que se ha involucrado e la interacción con el aparato exportador, ya que mutaciones en esta proteína resultan en defectos de ensamblaje del flagelo (ver Sección C Morfogénesis flagelar y regulación de la expresión de los genes flagelares y quimiotácticos).

Se han propuesto dos modelos para explicar el mecanismo de cambio de dirección de rotación del flagelo:

Un modelo, llamado determinista, propone que el switch cambia de conformación cuando un número fijo de moléculas de CheY~P se unen a FliM; en cambio, el modelo probabilístico propone que el número de CheY~P unido determina únicamente la probabilidad de rotación CW o CCW, y el switch cambia constantemente por fluctuaciones térmicas propias de la molécula. Numerosos grupos de investigación están trabajando para elucidar este mecanismo.

El aparato exportador específico de flagelo también forma parte de la estructura de éste. Aunque no se conoce del todo ni su composición ni su localización, se sabe que las proteínas FlhA, FlhB, FliH, FliI, FliO, FliP, FliQ y FliR forman parte de este complejo, y que su localización es cercana al anillo MS y el anillo C (Vogler, A. P., *et al* 1992; Dreyfus, G. *et al*. 1993; Ohnishi, K. *et al* 1997). Una discusión más extensa del aparato exportador y del proceso de exportación se describe mas adelante en la siguiente sección: Morfogénesis flagelar y regulación de la expresión de los genes flagelares y quimiotácticos.



## **Sección C.**

### **Morfogénesis flagelar y Regulación de la expresión de los genes flagelares y quimiotácticos.**

El proceso de formación del flagelo o morfogénesis es uno de los aspectos más interesantes del estudio de ésta estructura. Este proceso tiene características especiales de interés biológico fundamental:

El ensamblaje es un proceso ordenado que se lleva a cabo mediante la adición secuencial de monómeros en el extremo distal de la estructura.

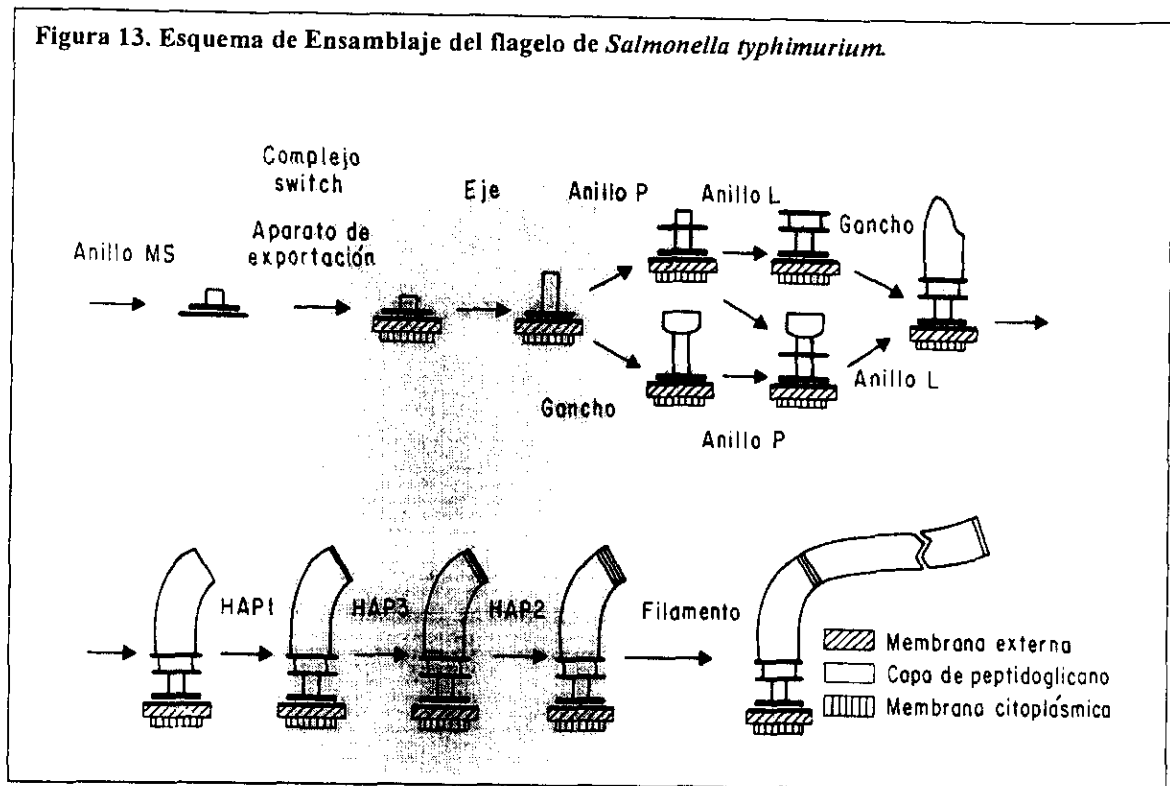
La exportación de los componentes requiere de dos sistemas de exportación independientes: el sistema de exportación tipo II (sistema de exportación general de la célula) y un sistema de exportación tipo III (el aparato de exportación específico de flagelo).

El ensamblaje de la estructura y la expresión de los genes, están acoplados en un complejo sistema de regulación

El proceso tiene al menos tres niveles de regulación: transcripcional, traduccional y a nivel de la especificidad de los substratos exportados.

La secuencia de este proceso morfogenético en *Salmonella typhimurium*, ha sido estudiado y dilucidado gracias al trabajo de distintos grupos de investigación (Suzuki, T. *et. al.* 1978, Kubori T. *et al* 1992, Jones,C.J. *et al* 1990).

Los pasos principales del ensamblaje flagelar se esquematizan en la figura 13.



En *S. typhimurium*, el proceso se inicia con la formación del anillo MS, constituido por una sola proteína (FliF) en la membrana citoplásmica. Posteriormente se forma el anillo C, el cual se extiende hacia el citoplasma e incluye al aparato exportador específico del flagelo (sistema de exportación tipo III) y a las proteínas que controlan la dirección de rotación del flagelo (sistema del switch: FliG, FliM, FliN). La siguiente estructura que se ensambla es el eje (FlgB, FlgC, FlgF, FlgG y FliE), que se extiende del anillo MS hasta la capa de lipopolisacáridos. Este paso es seguido por el inicio del ensamblaje del gancho (FlgE), que está mediado por la proteína FlgD. Esta proteína promueve la polimerización de las subunidades del gancho en su conformación final, y está involucrada en la transición entre el ensamblaje del gancho y el filamento. La

elongación del gancho está físicamente bloqueada por la pared de peptidoglicano y la capa de lipopolisacáridos, por lo que requiere de la formación de los anillos P y L (FlgI y FlgH) o anillos externos. La formación de estos anillos requiere además de los genes estructurales, de la acción de una muramidasa flagelo- específica, FlgJ, y de la proteína accesoria FlgA. Los anillos externos permiten que el eje rote libremente y que la rotación iniciada en el anillo MS sea transmitida hasta las estructuras extracelulares. Es importante notar que el ensamblaje de los componentes extracitoplásmicos del complejo gancho-cuerpo basal, requiere de la acción del sistema de exportación tipo III (el aparato exportador específico del flagelo), mientras que la exportación de los anillos P y L ocurre a través del sistema de exportación tipo II (sistema general de la célula). La formación de la estructura gancho- cuerpo basal con anillos externos, es uno de los “puntos de control” del proceso de morfogénesis flagelar. La presencia de esta estructura es parte del sistema de acoplamiento entre el ensamblaje y la expresión de los genes flagelares (ver mas adelante).

Una vez ensamblados los anillos, el gancho sigue su elongación hasta alcanzar su tamaño final. La longitud final del gancho está determinada por el producto del gen *fliK*, a través de un mecanismo aún no bien entendido. El modelo actual, sugiere que FliK determina el tamaño del gancho y que, al alcanzar éste alrededor de 55nm ( $\pm$  6nm), manda una señal al aparato exportador, específicamente a la proteína FlhB. Esta señal resulta en un cambio de especificidad en la exportación de los substratos, que cambian de exportar subunidades de gancho, a exportar flagelina (FliC), proteínas de la zona de unión gancho filamento (FlgK, FlgL y FliD), y el factor anti-sigma FlgM. Este

evento constituye un segundo “punto de control” en el proceso de morfogénesis, donde el grado de ensamblaje regula la expresión de los genes flagelares (ver mas adelante). El siguiente paso es el reemplazo de la proteína FlgD por FlgK y el inicio de la formación de la zona de unión gancho-filamento (FlgK, FlgL, FliD). Una vez formada esta zona de unión, se inicia la formación del filamento. Las subunidades de flagelina se polimerizan primero entre la zona de coronamiento (FliD) y la zona de unión gancho filamento (FlgL) y finalmente entre la zona de coronamiento y el extremo distal del filamento creciente. FliD forma una estructura de coronamiento en el extremo distal del flagelo, que además de promover la polimerización de la flagelina evita su secreción al medio. Se ha propuesto que la proteína FliD reconoce los extremos desordenados amino- y carboxilo terminal de la flagelina, y promueve su polimerización a través de la formación de una  $\alpha$ -hélice “coiled-coil”, que facilita la interacción entre las subunidades (Vonderviszt, F., *et al* 1998).

El filamento de *Salmonella typhimurium* crece continuamente, sin pausa alguna durante el ciclo celular. Sin embargo, la velocidad de crecimiento del filamento varia inversamente con su longitud, de tal forma que filamentos cortos ( $\sim 4 \mu\text{m}$ ) crecen a una velocidad de  $5 \mu\text{m}$  por hora, mientras que filamentos largos ( $\sim 16 \mu\text{m}$ ) crecen a una velocidad de  $2 \mu\text{m}$  por hora. Esto resulta en una gran variabilidad en la longitud final del filamento ( $7- 20 \mu\text{m}$ ) (Aizawa, S-I & T. Kubori, 1998).

Este proceso está finamente regulado, y los genes involucrados en la estructura, función y ensamblaje del flagelo están organizados en un regulón constituido por mas de 50 genes (ver Tabla 4). La expresión y ensamblaje del flagelo están coordinados con

el ciclo celular y la composición del medio, y acoplado al grado de ensamblaje de la estructura misma.

Tabla 4. Componentes del regulón quimiotactico-flagelar de *S. typhimurium* y *E. coli*.

GEN	FUNCIÓN	JERARQUIA DE EXPRESIÓN
<i>flhD</i>	Activador transcripción. clase 2	Clase 1
<i>flhC</i>	Activador transcripción	Clase 1
<i>fliA</i>	Factor sigma clase3	Clase 2
<i>fliE</i>	Ensamblaje eje/ accesoria	Clase 2
<i>fliF</i>	Anillo MS	Clase 2
<i>fliG</i>	Motor/switch	Clase 2
<i>fliH</i>	Ap. exportador	Clase2
<i>fliI</i>	ATPasa Ap. exportador	Clase2
<i>fliJ</i>	Ap. exportador. Chaperona FliC	Clase2
<i>fliK</i>	Regulador longitud del gancho.	Clase2
<i>fliM</i>	Motor/switch	Clase2
<i>fliL</i>	Desconocida	Clase 2
<i>fliN</i>	Motor/switch/ ap. exportador	Clase 2
<i>fliO</i>	Ap. exportador $\zeta$ ?	Clase2
<i>fliP</i>	Ap. exportador	Clase2
<i>fliQ</i>	Ap. exportador	Clase2
<i>fliR</i>	Ap. exportador	Clase2
<i>flhE</i>	Desconocido	Clase 2
<i>flhA</i>	Ap. exportador	Clase2
<i>flhB</i>	Ap. exportador/ especificidad substratos $\zeta$ ?	Clase2
<i>flgA</i>	Ensamblaje anillo P	Clase2
<i>flgB</i>	Eje	Clase2
<i>flgC</i>	Eje	Clase2
<i>flgD</i>	Tapa gancho/ andamiaje	Clase2
<i>flgE</i>	Gancho	Clase2
<i>flgF</i>	Eje	Clase2
<i>flgG</i>	Eje	Clase2
<i>flgH</i>	Anillo L	Clase2
<i>flgI</i>	Anillo P	Clase2
<i>flgJ</i>	Muramidasa	Clase2
<i>fliK</i>	Acoplador ensamblaje anillos-gancho	Clase 2

<i>flgM</i>	Factor anti-sigma	Clase 2 y 3a
<i>flgK</i>	Zona de unión gancho filamento	Clase 3a
<i>flgL</i>	Zona unión gancho filamento	Clase 3a
<i>fliD</i>	Proteína de coronamiento	Clase 3a
<i>fliS</i>	Ap. exportador /Chaperona FliC	Clase 3a
<i>fliT</i>	Ap. exportador ¿?	Clase 3a
<i>fliC</i>	Flagelina	Clase 3b
<i>fljA</i>	Represor gen de la flagelina fase 1	Clase 3a
<i>fljB</i>	Flagelina fase 2	Clase 3b
<i>cheZ</i>	Fosfatasa de CheY	Clase 3b
<i>cheY</i>	Regulador del switch	Clase 3b
<i>cheB</i>	Metilesterasa del quimio-receptor	Clase 3b
<i>cheR</i>	Metiltransferasa del quimio-receptor	Clase 3b
<i>tar</i>	Quimiorreceptor aspartato	Clase 3b
<i>tap</i>	Quimiorreceptor a dipéptidos	Clase 3b
<i>cheW</i>	Regulador positivo fosforilación CheA	Clase 3b
<i>cheA</i>	Cinasa CheY y CheB	Clase 3b
<i>motB</i>	Motor – rotación	Clase 3b
<i>motA</i>	Motor-rotación	Clase 3b

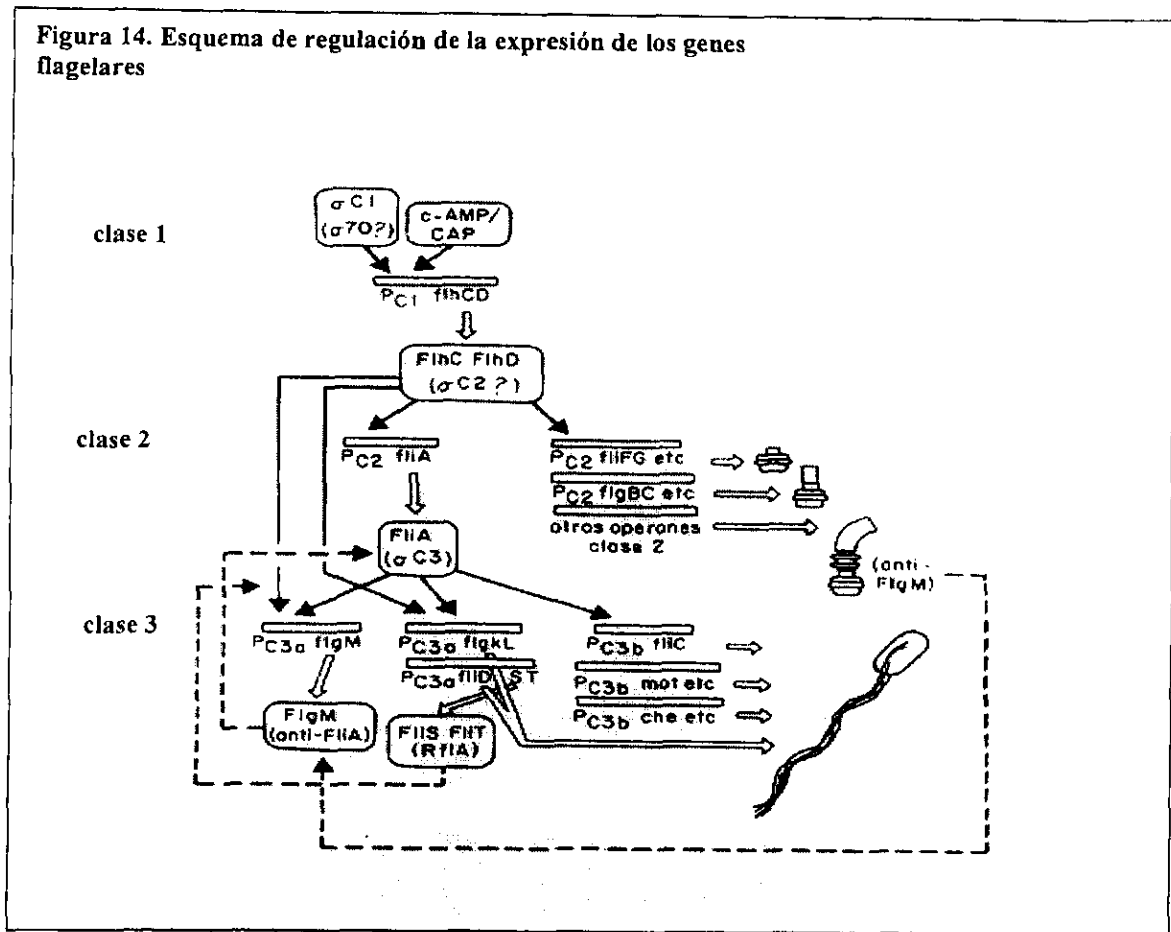
Modificado de Macnab, R.M. 1992 y Karlinsey, J. E., *et al* 1998

La expresión de este regulón flagelar está organizada en una jerarquía con tres principales niveles o clases de expresión (ver Figura 14 y tabla 4) (Kutsukake, K. *et al* 1990).

Los genes **clase 1**, *flhC* y *flhD*, representan lo más alto de la jerarquía transcripcional del flagelo. Se transcriben a partir de un promotor dependiente de  $\sigma^{70}$ , el cual está regulado por una gran cantidad de señales globales de la célula como el nivel de carbohidratos, la temperatura y la presión osmótica (Kutsukake, K. 1997 ; Liu, X., & Matsumura, P., 1994). Las proteínas FlhD y FlhC forman un complejo activador de la transcripción, que promueve la transcripción de los promotores  $\sigma^{70}$ - dependientes de los

genes clase 2. Estas proteínas se requieren para la expresión del resto de los genes del regulón.

Los genes clase 2 codifican a las proteínas requeridas en la formación y ensamblaje de la estructura de gancho-cuerpo basal, al factor  $\sigma^{28}$  (FliA), y sus factores regulatorios (*flgM*, *flk*).



Los genes clase 3 incluyen a los genes  $\sigma^{28}$  (FliA)- dependientes y codifican para proteínas necesarias en la fase final del ensamblaje del flagelo (*flgK*, *flgL*, *fliD*, *fliC* y *fliB*). En ésta clase también se encuentran los genes necesarios para la formación del

sistema quimiotáctico de transducción de señal y del motor flagelar. Existen dos tipos de genes clase 3: los genes clase 3 a, que además de expresarse desde promotores clase 3  $\sigma^{28}$ , se expresan basalmente desde promotores clase 2 (~20% de la expresión total); esta clase incluye a los genes *flgK*, *flgL*, y *fliD*. La clase 3 b incluye al resto de los genes, los cuales son transcritos a partir de promotores  $\sigma^{28}$  – dependientes (Kutsukake, K. & T. Iino, 1994).

Los genes clase 3 se definieron originalmente por que su expresión depende de la existencia de una estructura gancho-cuerpo basal funcional en cuanto a exportación (Kutsukake, K. *et al* 1990). Este acoplamiento entre la expresión de genes clase 3 y la detección del estado de ensamblaje de la estructura del gancho-cuerpo basal, está mediado por la proteína FlgM, que se expresa tanto como clase 2 como clase 3 (Gillen, K.L. & K.T. Hughes 1991). FlgM es un factor anti- $\sigma^{28}$  (Ohnishi, K., *et al* 1992), que en la estructura del gancho-cuerpo basal incompleta (o defectuosa), interacciona directamente con FliA, inhibiendo su actividad como factor transcripcional. FlgM detecta que la estructura esta completa y funcional (exportación- competente), puesto que ella misma es una proteína que se exporta al medio (Hughes, K.T, *et al* 1993). La exportación de FlgM constituye uno de los “puntos de control” antes mencionados donde el grado de ensamblaje de la estructura, es traducido a un cambio en la expresión de los genes; la secreción de FlgM permite la expresión de los genes clase 3 y un cambio en la especificidad de las proteínas que van a ser exportadas.

Recientemente se ha descrito otro gen regulador, *flk*, cuyo papel aparentemente es el de detectar el ensamblaje de los anillos P y L del cuerpo basal. El papel propuesto para *flk* es el de regular negativamente la traducción del gen *flgM*, liberando parcialmente a



FliA, y permitiendo la expresión basal de las proteínas clase 3 (Karlinsky, J.E. *et al* 1998).

De igual forma en que se ha descrito una jerarquía de expresión de los genes flagelares, el grupo de R.M. Macnab recientemente ha propuesto la existencia de una jerarquía de exportación compuesta por al menos dos clases de substratos de exportación, cuya exportación se ve modulada por cambios en la especificidad del aparato exportador (Minamino, T. & R. M. Macnab, 1999).

- **clase eje-gancho** incluye la proteína del gancho, la proteína FlgD y las proteínas del eje.
- **clase filamento** incluye la flagelina, las proteínas de unión gancho-filamento y la proteína de coronamiento.

Este sistema de regulación se ve complicado aun más por el descubrimiento de que la mayoría de los genes flagelares se expresan a partir de múltiples promotores, dándole una mayor versatilidad al proceso.

En resumen: la formación del flagelo procarionte es un proceso muy complejo, donde la expresión de los genes involucrados está coordinada transcripcionalmente, traduccionalmente y a nivel de la especificidad de la exportación, con el estado de ensamblaje de la estructura flagelar.

Uno de los componentes más importantes en este proceso es el aparato exportador específico del flagelo, que es uno de los sistemas de exportación tipo III recientemente descritos. El aparato exportador evita la exportación de proteínas no flagelares y

permite el paso de las proteínas flagelares en un orden y estequiometría regulados, al canal central del flagelo. El resto del proceso es de difusión, al llegar al destino final las proteínas se autoensamblan, como las proteínas de la zona de unión gancho filamento, o se ordenan con ayuda de otras proteínas como es el caso de la flagelina o el gancho, que requieren de la presencia de FliD y FlgD respectivamente para formar la estructura final.

A pesar de que se han identificado y secuenciado muchas, sino todas, las proteínas exportadas, no se ha logrado identificar una secuencia de secreción consenso en todas ellas. Diversos estudios han mostrado que la información necesaria para la exportación se encuentra en la región amino-terminal (Kuwajima, G. *et al* 1989). Algunos grupos proponen que los motivos SGL y ANNLAN, así como una región de heptadas repetidas de residuos hidrofóbicos, forman una estructura secundaria específica que es reconocida como la señal de exportación (Homma, M. *et. al.* 1990). Otros estudios han mostrado que todos los monómeros de las proteínas axiales tienen extremos amino-terminal desordenados, los cuales pueden directa o indirectamente ser la señal de exportación (Vondervitz, F. *et. al.* 1992 y 1995).

Cualquiera que sea la señal esta parece ser similar en diferentes organismos, como lo muestra la exportación de flagelina de *Pseudomonas aeruginosa* al ser expresada en *E. coli* (Kelly-Wintenberg, K., & T.C. Montie 1989).

Por otro lado, es importante recalcar, como se mencionó anteriormente, que este sistema reconoce distintos sustratos durante las diferentes etapas del proceso de ensamblaje, probablemente a través de la modificación de la especificidad del sistema dada por diferentes señales de exportación (Minamino, T. & R. M. Macnab 1999 ; Chilcott, G. S. & K.T. Hughes 1998). Esto implicaría que no hay una señal única de

exportación “flagelo-específica”, sino varias señales y por esto no se ha logrado identificar la “señal” de exportación.

Los componentes del aparato exportador no han sido identificados completamente. Sin embargo, diversos estudios sugieren que las proteínas FlhA, FlhB, FliH y FliI son parte indispensable de éste aparato. Las proteínas FliJ, FliK, FliO, FliP, FliS son componentes accesorios en los diferentes pasos del proceso y la proteína FliN tiene una función indirecta, tal vez como soporte estructural del aparato (Vogler, A. *et. al.* 1991; Minamino, T. & R.M. Macnab 1999 ; Ohnishi, K.. *et. al.* 1997).

Todas las proteínas que forman este aparato exportador, son homólogas con proteínas involucradas en procesos de exportación de factores de virulencia de bacterias patógenas, tanto de plantas como de animales, que son sistemas de exportación tipo III (ver Tabla 5) (Dreyfus, G. *et. al.* 1993; VanGijesen, G. *et. al.* 1995). Se ha propuesto que en estos sistemas, éstas proteínas forman una estructura supramolecular por la cual son exportados los factores de virulencia (Kubori, T. *et al.* 1998).

Tabla 5. Homología de las proteínas del aparato exportador con las proteínas de los sistemas de exportación tipo III.

Proteínas Flagelares	Proteínas de sistemas de Exportación de Factores de Virulencia				Localización subcelular
	<i>Yersinia spp</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. amylovora</i>	
<b>FliA</b>	LcrD	MxiA	InvA	HrcV	Memb. interna
<b>FliB</b>	YscU	Spa S /40	InvG	Hrc T	Memb. interna
<b>FliF</b>	YscJ	MxiJ	PrgK/SsaJ	HrcJ	Memb. interna
<b>FliG</b>	YscD	--	SpiB	HrpQ	Memb. interna
<b>FliH</b>	YscL	--	Ssa K	Hrp E	Memb. interna
<b>FliI</b>	YscN	SpaL/47	InvC	HrcN	Citoplasmica
<b>FliP</b>	YscR	SpaP/24	SpaP/SsaR	HrcR	Memb. interna
<b>FliQ</b>	YscS	SpaQ/9	SpaQ/SsaS	HrcS	Memb. interna
<b>FliR</b>	YscT	SpaR/29	SpaR/SsaT	HrcT	Memb. interna
<b>FliN</b>	YscQ	SpaO/33	SpaO/SsaQ	HrcQ	Citoplasma asociado a memb. interna

Modificado de Hueck, C. J. 1998.

El sistema de exportación tipo III es uno de tres sistemas de exportación descritos para bacterias.

El sistema tipo II, o sistema *sec*, está caracterizado por la presencia de una secuencia señal (~ 30 aminoácidos principalmente hidrofóbicos) en el extremo amino terminal de la proteína exportada. Esta secuencia señal ayuda a la exportación y es cortada por una peptidasa periplásmica específica. En *E. coli* esta vía está compuesta por: los componentes membranales SecD, SecE, SecF y SecY, una ATPasa citoplásmica asociada a membrana SecA, que provee la energía para la exportación, una chaperona citoplásmica, SecB, que une a las proteínas a ser exportadas y la peptidasa de secuencia señal en el periplasma. Este sistema requiere de varias proteínas accesorias para su

funcionamiento normal (Pugsley, A.P. 1993). En el caso de la lipoproteína pululanasa de *Klebsiella oxytoca*, el ejemplo mas estudiado de este sistema, se requieren 14 factores de secreción adicionales (PulC–PulO y PulS), para su correcta secreción. Este sistema es la vía de exportación principal de enzimas degradativas en bacterias Gram negativas.

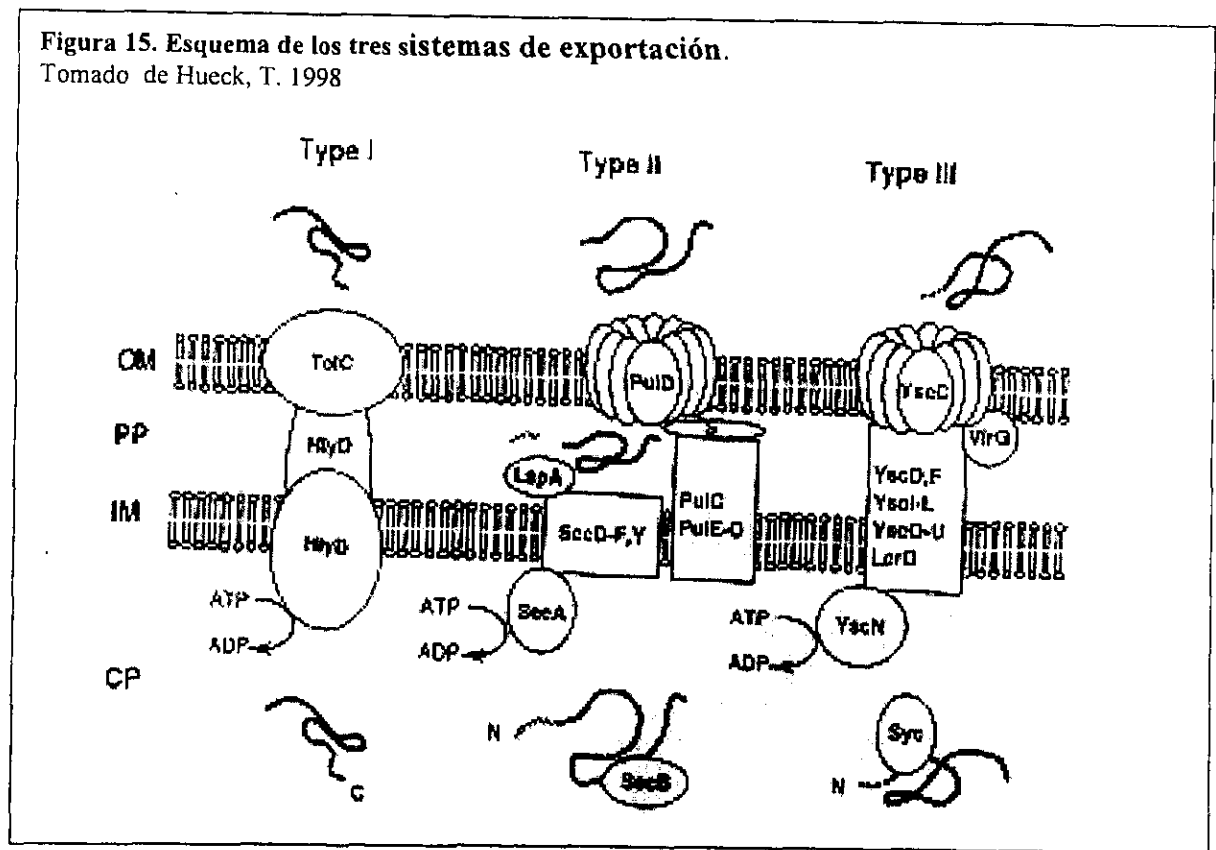
El sistema tipo I, *sec* independiente no involucra el procesamiento del extremo amino-terminal de las proteínas exportadas. Este es un proceso continuo, sin la presencia de intermediarios periplásmicos. Este sistema está ejemplificado por la exportación de la  $\alpha$ -hemolisina en *E. coli*. Este sistema requiere de tres proteínas: una ATPasa de transporte en la membrana interna (ABC), que provee la energía necesaria para la secreción (HlyB en el sistema de exportación de la hemolisina), y una proteína en la membrana externa (exportada por el sistema *sec*), una proteína unida a la membrana interna que protruye hasta el espacio periplásmico.

Las proteínas secretadas por el sistema I no son digeridas por peptidasas, y la señal de secreción esta localizada en el extremo carboxilo terminal. La secuencia señal es específica para las distintas subfamilias de este sistema de exportación (Fath, M.J. & R. Kolter 1993).

El sistema tipo III, también es independiente del sistema *sec*. Está compuesto por alrededor de 20 proteínas localizadas principalmente en la membrana interna, una de las cuales es una ATPasa citoplásmica probablemente asociada a membrana. Este proceso no incluye intermediarios periplásmicos. Al igual que las proteínas secretadas por el sistema tipo I, las proteínas secretadas por el sistema tipo III no tienen un procesamiento del extremo amino-terminal. Sin embargo, sí requieren de chaperonas, probablemente

para prevenir interacciones prematuras con otros componentes del sistema , o bien para promover su llegada al aparato exportador en la conformación adecuada. Los sistemas de exportación tipo III parecen ser maquinarias dedicadas a la translocación de factores de patogenicidad al citosol de células eucariontes. A pesar de que el mecanismo de secreción es el mismo en todos los casos, las proteínas secretadas varían considerablemente. La secreción de proteínas de virulencia tanto de *Yersinia* como de *Shigella* (Yops e Ipas), esta regulada por el contacto de la bacteria con la célula blanco.

La figura 15 muestra un esquema de los tres sistemas de exportación.



No se conoce aún el mecanismo por el cual el aparato exportador específico del flagelo, o cualquier sistema de exportación tipo III, selecciona a los substratos de exportación y los dirige al canal central de la estructura. Como ya mencionamos, en el caso del sistema de exportación del flagelo bacteriano son varias las proteínas involucradas en este proceso : FlhA, FlhB, FliH, FliI, FliO, FliP, FliQ y FliR. Entre ellas FliI tiene especial interés. Se sabe que proteínas homólogas a FliI están presentes en todos los sistemas de secreción tipo III descritos, y que esta se encuentra dentro de las proteínas más conservadas de estos sistemas. El gen *fliI* se ha identificado en una gran variedad de especies flageladas incluyendo *Bacillus subtilis* (Gram<sup>+</sup>), *Borrelia burgdorferi* (espiroqueta), *Rhodobacter sphaeroides* (fotosintética), *Helicobacter pylori* (patógena).

La familia de proteínas homólogas a FliI, muestran similitud con la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de la  $F_0F_1$  H<sup>+</sup>-ATP sintasa de *E. coli*, y a las subunidades catalíticas de ATPasas tanto eucariontes como de arqueobacterias. Hay tres regiones especialmente conservadas dentro de los miembros de esta familia: los dominios de unión a nucleótidos (motivos Walker A y B) localizados en el centro de la proteína, y el dominio de unión a Mg<sup>2+</sup>. La funcionalidad de estos dominios en FliI, YscC e InvC se confirmó por estudios de mutación dirigida en aminoácidos esenciales para la catálisis en la subunidad  $\beta$  de la  $F_0F_1$  H<sup>+</sup>-ATP sintasa de *E. coli* (Dreyfus, G. *et. al.* 1993), así como por la delección en fase de 8 aminoácidos dentro del motivo Walker A (Eichelberg, K. *et. al.* 1994).

FliI es el único miembro de la familia que ha sido localizado subcelularmente. Esta proteína tanto en *Salmonella* como en *Caulobacter*, ha sido encontrada en solución en el citoplasma y asociada a la membrana interna (Dreyfus, G. *et. al.* 1993 ; Stephens,

*C. et. al.* 1997). Es interesante notar que FliI es la única proteína flagelar con homología a subunidades de la H<sup>+</sup>-ATP sintetasa y una de las dos proteínas flagelares con actividad enzimática, la otra es FlgJ que tiene actividad de muramidasa, esencial para el ensamblaje de los anillos externos, e irrelevante en el proceso de exportación. Se ha propuesto que FliI interacciona con componentes membranales del aparato exportador tipo III para proveer la energía necesaria en el proceso de exportación, o bien como chaperona que promueve la transferencia de los substratos exportados a otros componentes del aparato exportador.



## **Sección D.**

### **Planteamiento del problema y objetivos del trabajo.**

La proteína FliI muestra similitud con la subunidad catalítica de las ATPasas tanto de procariontes como de eucariontes. Se le ha localizado tanto en la membrana citoplásmica como soluble en el citoplasma. Esto ha llevado a proponer a FliI como la subunidad catalítica del aparato exportador específico del flagelo, así como SecA y HlyB lo son para los sistemas de exportación tipo II y I respectivamente.

Al inicio de este trabajo, aunque se había demostrado la unión de nucleótidos a FliI, no se había logrado demostrar su hidrólisis. En el curso de este trabajo, nuestro grupo y otros han mostrado que FliI hidroliza ATP, y que esta actividad es esencial para la formación del flagelo. Así, una pregunta fundamental para el correcto entendimiento de este proceso es la de determinar el papel de esta proteína en el proceso de morfogénesis. ¿Interacciona FliI directamente con los sustratos de exportación? ¿Interacciona con otros componentes del aparato exportador? O interacciona con ambos.

La estrategia seguida en este trabajo ha sido, primero caracterizar la actividad enzimática de esta proteína, y posteriormente preguntar si esta proteína interacciona con los sustratos de exportación, y si esta interacción resulta en una modificación de su actividad enzimática. Como sustratos de exportación se utilizaron la flagelina y la proteína del gancho, ya que ambos forman la mayor parte de la estructura flagelar en cuanto a masa.

El objetivo principal de este trabajo ha sido el de estudiar el papel de la proteína flagelar FliI en el proceso de morfogénesis del flagelo en *Salmonella typhimurium*..

Específicamente, los objetivos de este trabajo son:

1. Purificar a la proteína FliI silvestre.
2. Caracterizar su actividad enzimática.
3. Determinar si FliI interacciona con otros componentes del flagelo bacteriano, principalmente con substratos del sistema de exportación tipo III del flagelo.
4. Determinar si FliI interacciona con otros componentes del sistema de exportación tipo III del flagelo.

## II. Materiales y métodos

### A. Cepas bacterianas y plásmidos.

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

Tabla 6. Cepas y plásmidos utilizados

CEPA	FENOTIPO RELEVANTE	REFERENCIA
SJW1103	<i>S. typhimurium</i> WT	Yamaguchi, S. <i>et. al.</i> 1984
SJW880	<i>S. typhimurium</i> poligancho	Patterson, J. <i>et. al.</i> 1973
YK4178	<i>S. typhimurium</i> <i>fliF</i>	Dreyfus, G. <i>et. al.</i> 1993
MGT7	<i>E. coli</i> gen RNAPolimerasa de T7 en el cromosoma	Dreyfus, G. <i>et. al.</i> 1993
<b>PLASMIDOS</b>		
pIK22101	Sobreproductor <i>FliI</i> wt. Inducible IPTG promotor T7	Dreyfus, G. <i>et. al.</i> 1993
pIFF1500	Productor <i>FliI</i> wt.	Fan Fan y R.M. Macnab Sin publicar

Todos los cultivos se crecieron en medio Luria (LB) compuesto por: triptona 1% extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, con los antibióticos apropiados: ampicilina 200µg/ ml.

## **B. Transformación bacteriana.**

La introducción de DNA plasmídico a células bacterianas se realizó utilizando células competentes obtenidas por el método de  $\text{CaCl}_2$ .

El DNA plasmídico se agrega a las células competentes y se introduce mediante un choque de calor. Después de un periodo de recuperación, las células se cultivan en el medio de selección deseado.

## **C. Determinación de Proteína.**

Se utilizó el método de TCA-Lowry (Peterson, G.L. 1977), para cuantificar las proteínas utilizadas.

La fracción de proteína a cuantificar se disuelve en 1 ml de agua bidestilada, y se le agrega 0.1 ml de desoxicolato de Na 0.15%. Después de 10 minutos de incubación, se agrega 0.1 ml de TCA 72% y se centrifuga por 10 minutos a 10,000 r.p.m. en una microcentrifuga. El precipitado se resuspende en 1 ml de solución de  $\text{CuSO}_4$  0.5% : citrato de Na 1% : carbonato de Na 0.4% y NaOH 0.08%, y después de 10 minutos se agrega 0.1 ml de una solución de Folin Cicoalteau 1N. Se determinó la absorbancia a 750 nm. Para la curva estándar se utilizó albúmina sérica bovina en un rango de 2 a 20  $\mu\text{g}$ . Todas las determinaciones se hicieron por duplicado a dos diluciones diferentes.

## **D. Ensayo de hidrólisis de ATP y determinación de fosfato liberado.**

La reacción de hidrólisis de ATP se realizó incubando a la proteína en cuestión a 30°C en el medio de reacción que contiene: HEPES 30mM (pH 8.0), KCl 30mM, NaCl 50mM, MgOAc 5mM y glicerol 10%, y se inicia la reacción agregando ATP 4mM. El fosfato liberado en la reacción se cuantificó utilizando una modificación del método de Lanzetta y colaboradores (Lanzetta, P.A. *et. al.* 1979 ; Eichelberg, K. *et. al.* 1994).

Una alícuota de 0.1 ml de la reacción de hidrólisis se agregó a 0.8 ml del reactivo de Lanzetta (Hidrocloreuro de verde de malaquita 0.045 % : molibdato de amonio 4.2 % en HCl 4N en una proporción de 3:1) deteniéndose así la reacción. Un minuto después se agregó 0.1 ml de ácido cítrico 34 %, se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, y se determinó la absorbancia a 660 nm. La curva estándar se hizo con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en un rango de 1 a 20 nmolas. Todos los experimentos se realizaron por duplicado, un mínimo de seis veces; se muestra un experimento representativo de cada caso.

## **E. Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.**

La separación de la proteína en geles de poliacrilamida se realizó según el método de Laemli (Laemli, U.K. 1970) utilizando geles separadores al 12.5%. Estos geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie R 250 al 0.2% en metanol 50%, ácido acético 10 %. Se utilizaron marcadores de peso molecular de Biorad, que contienen: fosforilasa b 116,250 Da, albúmina sérica bovina 66,200 Da, ovalbumina 45,000 Da, anhidrasa carbónica 31,000 Da, inhibidor de tripsina 21,500 Da y lisozima 14,400 Da.

## **F. Preparación de anticuerpos específicos.**

La preparación de los anticuerpos específicos en contra de las proteínas FliI, flagelina (FliC) y la proteína del gancho (FlgE), se llevo a cabo utilizando las proteínas purificadas (ver más adelante el método de purificación de cada una de éstas). Se utilizaron conejos machos de 1.5 a 2 Kg, cuidados y mantenidos en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular.

La inyección primaria se realizó intramuscularmente con 10 µg de proteína en suspensión con adyuvante completo de Freund en una relación de 1 : 1 (volumen : volumen) después de ser mezclada vigorosamente por 90 minutos en un agitador tipo "vortex". Posteriormente se aplicaron tres refuerzos con 50 µg de proteína en suspensión con adyuvante incompleto de Freund en una relación 1 : 4 (volumen : volumen) con intervalos de tres semanas. Después del tercer refuerzo, se verificó la presencia de anticuerpos en contra de la proteína a través de un ensayo de inmunorréplica tipo "Western". Una vez confirmada la presencia de los anticuerpos, el conejo se sangro a blanco. La sangre se incubó 30 minutos a 37 °C para facilitar la formación del cuagulo. Posteriormente, éste se separó del tubo, e incubo toda la noche a 4 °C. Esta suspensión se centrifugó a 10,00 x g por 10 minutos para separar el suero de las células. Los anticuerpos se purificaron precipitando con sulfato de amonio siguiendo el siguiente protocolo: se precipitó el suero con 0.5 volúmenes de sulfato de amonio saturado (SAS) por 6 horas a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 3,000 x g por 30 minutos y el sobrenadante se precipitó una vez más con 0.5 volúmenes de SAS y centrifugó como se describió anteriormente. La pastilla final se resuspendió en 0.5

volumenes de PBS (NaCl 137mM, KCl 3mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18mM) y se dializó a 4° C contra el mismo buffer con tres cambios por toda la noche.

La potencia de los anticuerpos se estimó con ensayos de inmunorréplica tipo “Western” utilizando varias diluciones de los anticuerpos. A lo largo del trabajo, todos los anticuerpos se utilizaron a una dilución de 1: 10,000.

Los anticuerpos anti citocromo c son una donación del laboratorio del Dr. Diego Gonzalez Halphen.

## **G. Inmunorréplica tipo “Western”.**

El procedimiento consiste en la transferencia de las proteínas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa y la identificación de estas por anticuerpos específicos. Una vez transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, ésta se bloquea toda la noche con una solución al 3% de leche liofilizada y descremada (marca comercial SLVELTY) en TTBS (Tris base 0.02M, NaCl 0.5M, Tween 20 0.05%), con agitación constante. Después se lava 3 veces cada 5 minutos con TTBS y se incuba 1 hora con el antisuero deseado a una dilución de 1: 10,000 o 1: 5,000 en TTBS-Leche 0.1%. Posteriormente, se lava 3 veces cada 5 minutos con la misma solución y se incuba 1 hora con anticuerpo secundario anti-conejo marcado con peroxidasa. Finalmente se lava 3 veces con el mismo buffer y se revela la presencia del anticuerpo primario con un anticuerpo secundario quimiolumincente anti conejo, siguiendo el protocolo descrito para los reactivos de ECL (Amersham).

## **H. Inmunorréplica de afinidad (Affinity blot).**

Este procedimiento identifica la presencia de una proteína inmovilizada (proteína blanco) en un papel de nitrocelulosa por su interacción específica con una segunda proteína (proteína señal), la cual a su vez se identifica con anticuerpos específicos. Este procedimiento involucra la transferencia de proteínas separadas y transferidas a un papel de nitrocelulosa. Después de bloquear toda la noche con 3 % leche en TTBS, y lavar con TTBS, la membrana se incuba con una solución de la proteína señal 0.05-0.1 mg/ml en TTBS-leche 0.1 %, por una hora a temperatura ambiente y agitación constante. La presencia de la proteína señal se revela con anticuerpos específicos siguiendo el protocolo descrito para la inmunorréplica tipo "Western".

## **I. Cosedimentación de FliI con flagelina .**

El ensayo de cosedimentación se ha utilizado para identificar proteínas que interaccionan entre sí. La sedimentación o precipitación se realizan ya sea por el uso de anticuerpos o por centrifugación. En este caso utilizamos el hecho de que la flagelina polimérica se sedimenta después de una centrifugación a 75,000 x g por 90 minutos. Una fracción de flagelina polimérica se preincubó con FliI en una proporción de 1:1 mol: mol, o con una proteína no relacionada como lo es el citocromo c, por 30 minutos a 30 °C. Posteriormente esta solución se centrifugó a 75,000 x g por 90 minutos y se analizaron tanto la fracción soluble como la sedimentada, por geles de poliacrilamida y ensayos de inmunorréplica tipo "Western" utilizando anticuerpos específicos en contra de FliI y de citocromo c según el caso.



## **J. Purificación de flagelina (FliC) .**

La purificación de flagelina se hizo a partir de la cepa silvestre de *Salmonella typhimurium* siguiendo una modificación del protocolo descrito por R.M Macnab (1987).

Las células se crecen toda la noche a 37 °C con agitación constante, en medio LB; se cosechan por centrifugación a 10,000 x g por 10 minutos, y se resuspenden en un volumen pequeño (1/20 del volumen inicial) de Tris 10 mM (pH 8.0), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM (TEN). Los filamentos se desprenden por agitación violenta de alícuotas de 2ml, en un agitador tipo “vortex” durante 2 minutos. Las células enteras se separan por centrifugación a 12,000 x g por 15 minutos. El sobrenadante, se limpia a través de 3 centrifugaciones a esta misma velocidad, descartando el precipitado cada vez. El sobrenadante final, que contiene los filamentos, se centrifuga a 60,000 x g por 90 minutos. El precipitado se resuspende en TEN, se centrifuga a 8,000 x g por 20 minutos para descartar los agregados, y el sobrenadante se centrifuga una vez mas a 60,000 x g por 90 minutos. El precipitado final se resuspende en TEN. Esta solución que contiene flagelina polimérica (en forma de filamentos), como fue comprobado por observaciones de microscopía electrónica, es almacenada a 4 °C. Para obtener flagelina monomérica, la solución de flagelina polimerica se calentó 5 minutos a 65 °C y centrifugo 1 minuto en una microcentrifuga de mesa a máxima velocidad, para eliminar el material agregado. La figura 21 muestra una electroforesis en gel con la preparación final de flagelina.

## **K. Purificación de la proteína del gancho (FlgE).**

La proteína del gancho se purificó a partir de la cepa SJW880, cuyo fenotipo es de poligancho, siguiendo el método descrito por Aizawa y colaboradores (Aizawa, S-I., *et al.* 1980). Se crecen las células toda la noche en medio LB a 37 °C con agitación vigorosa y se cosechan por centrifugación a 10,000 x g por 10 minutos. Se resuspenden en un volumen pequeño (1/20 del volumen inicial) de Tris 10mM (pH 8.0), NaCl 150mM, PMSF 1mM (TN). Los poliganchos se desprenden por agitación violenta en una licuadora doméstica a máxima velocidad. Este homogenado se centrifuga a 12,000 x g por 15 minutos, y el sobrenadante que contiene a los poliganchos se limpia por centrifugación 3 veces a la misma velocidad. El sobrenadante final, se sedimenta a 75,000 x g por 90 minutos. El precipitado se resuspende en TN y se lava una vez mas por centrifugación a baja velocidad, se resuspende en buffer que contiene Urea 1M, en buffer de fosfatos 100mM (pH 7.0), y se resedimenta por centrifugación a alta velocidad. El pellet se resuspende en un volumen pequeño y se aplica a un gradiente de CICs que se centrifuga a 55,000 x g en un rotor de columpio. Después de 19 horas, se forma una banda alrededor de 2.5 cm del fondo que contiene los poliganchos. Se colecta y lava con Tris 0.1M (pH 8.0). Esta fracción contiene poliganchos, lo cual fue comprobado por estudios de microscopía electrónica.

Para generar proteína del gancho monomérica, la solución se calentó a 70 °C por 5 minutos y se centrifugó en una microcentrífuga de mesa a máxima velocidad para eliminar el material agregado. La figura 22 muestra una electroforesis en gel con la preparación final.

## L. Sobreproducción y purificación de FliI.

La cepa MGT7, se transformó con el plásmido pIK2101, que contiene el gen completo de *fliI* de *Salmonella typhimurium* bajo el control del promotor de T7. Las transformantes se crecieron toda la noche a 37 °C en medio LB con ampicilina 200 µg/ml. Este cultivo se utilizó para inocular 1 litro del mismo medio el cual se creció a 37 °C con agitación continua, hasta alcanzar la fase logarítmica media (D.O. <sub>600nm</sub> 0.6-0.8). En este punto se agregó isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1mM, y se continuó el crecimiento por 6 horas más. La inducción de la proteína FliI se puede observar en la figura 16, en la Sección de Resultados.

Las células se cosecharon por centrifugación a 10,000 x g por 10 minutos, se lavaron en Buffer A (Hepes 25 mM (pH 7.5), NaCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM y glicerol 10 %) con PMSF 1mM como inhibidor de proteasas y se almacenaron a -70 °C, hasta su uso. Las células inducidas son sonicadas en alícuotas de 5 ml, por 3 pulsos de 45 segundos a intervalos de 30 segundos cada una. El lisado se centrifugó a 10,000 x g para sedimentar las células completas. El sobrenadante se centrifugó a 16,000 x g por 20 minutos para separar la proteína soluble de la proteína agregada en cuerpos de inclusión.

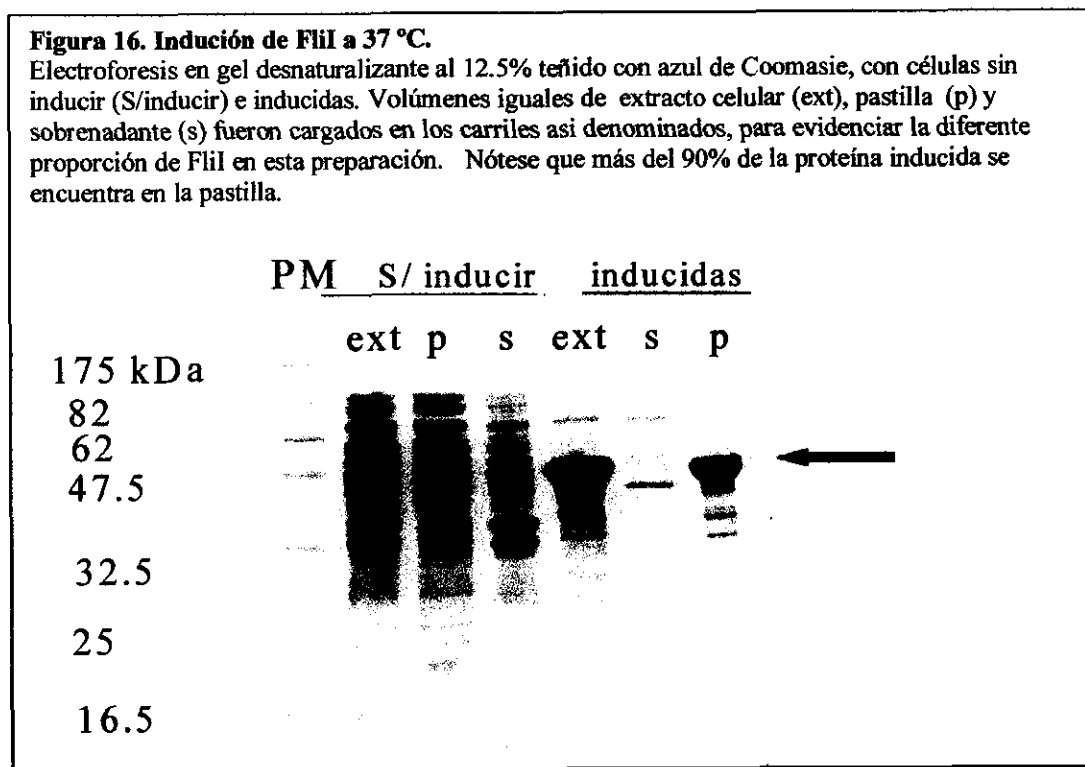
Con el fin de obtener a la proteína FliI en forma soluble, se prosiguió a inducir la cepa MGT7/pIK2101 a una temperatura de 25 °C, siguiendo el mismo protocolo anterior. La inducción a esta temperatura resulta en una menor sobreproducción de FliI, pero con una mayor proporción de proteína soluble.

La purificación de esta proteína soluble se realizó siguiendo el siguiente protocolo. Las células inducidas y almacenadas, se descongelan y se rompen con 3 pasos a 6,000 psi en la prensa de French. Este lisado se centrifugó a 17,500 x g por 15 minutos para sedimentar a las células completas y a los cuerpos de inclusión. El sobrenadante se incubó con DNasa I 10 µg/ml y MgCl<sub>2</sub> 5 mM por 30 minutos en hielo, y se precipitó con una solución de sulfato de amonio saturado (SAS) a una concentración final de 20 %. Esta suspensión se centrifugó a 12,000 x g por 15 minutos y el sobrenadante se precipitó una vez más con SAS, ahora al 55 %. Esta suspensión se centrifugó a 12,000 x g por 15 minutos y la pastilla se resuspendió en 10 ml de Buffer A. Esta fracción, enriquecida en la proteína FliI, se dializó en una membrana de Spectrapore 2 (corte de peso molecular de 14 Kda) contra el mismo buffer por toda la noche en el cuarto frío. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 x g por 10 minutos para eliminar la proteína agregada y el sobrenadante (25-35 mg proteína), se paso por una columna de azul de Cibacron 3GA (Sigma) (22 cm X 1.5 cm) equilibrada con el mismo buffer. Después de aplicada la muestra, la columna se lavó con 4 volúmenes del mismo buffer, y la proteína FliI se eluyó con un gradiente de ATP (0-20 mM) seguido de un incremento en la fuerza iónica del Buffer A con 2 M NaCl. Se colectaron fracciones y analizaron por actividad de hidrólisis de ATP y electroforesis en gel de poliacrilamida. FliI eluye al final del gradiente de ATP y al inicio del incremento en NaCl. El resultado de este procedimiento se muestra en la figura 19 en la Sección de Resultados.

### III. RESULTADOS

#### 1. Sobreproducción y purificación de FliI.-

La sobreproducción de la proteína FliI se realizó induciendo la célula MGT7/pIK2101 el cuál contiene el gen completo de *fliI* de *Salmonella typhimurium* bajo el control del promotor de T7 con IPTG, siguiendo el protocolo descrito en la sección de Materiales y métodos. La inducción realizada a 37 °C resulta en una importante sobreproducción de FliI , sin embargo como se puede observar en la figura 16 esta proteína se encuentra insoluble en la pastilla.



Estudios de microscopía electrónica realizados en la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular, de estas células inducidas, muestran la presencia de cuerpos de inclusión donde esta agregada la proteína FliI (ver Figura 17).

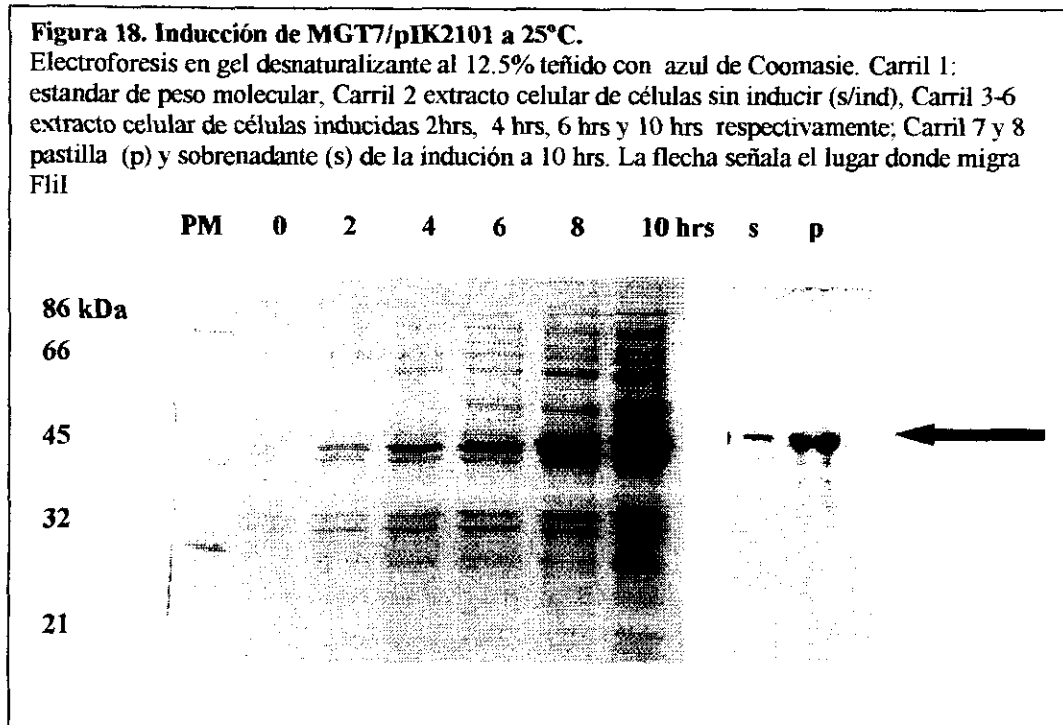
**Figura 17. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión de MGT7/pIK2101 inducida a 37°C.**

Las células MGT7/pIK2101 se indujeron por 10 hrs a 37 °C. Después de lavarse , las células se incluyeron en la resina LR-White. Cortes de esta preparación se tiñeron con acetato de uranilo y se observaron al microscopio electrónico de transmisión. Preparación realizada en la Unidad de Microscopía Electrónica del IFC. (CI cuerpos de inclusion) .



Se realizaron numerosos esfuerzos para renaturalizar a la proteína FliI solubilizada de cuerpos de inclusión a una conformación nativa con actividad, sin resultados positivos.

Con el fin de obtener a la proteína FliI en forma soluble, se prosiguió a inducir la cepa MGT7/pIK2101 a una temperatura de 25 °C, siguiendo el mismo protocolo anterior. La figura 18 muestra que la inducción a esta temperatura resulta en una menor sobreproducción de FliI, pero con una mayor proporción de proteína soluble.

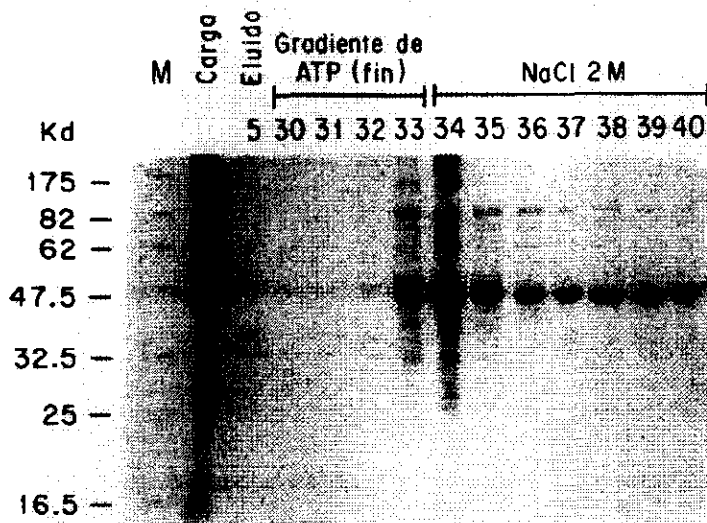
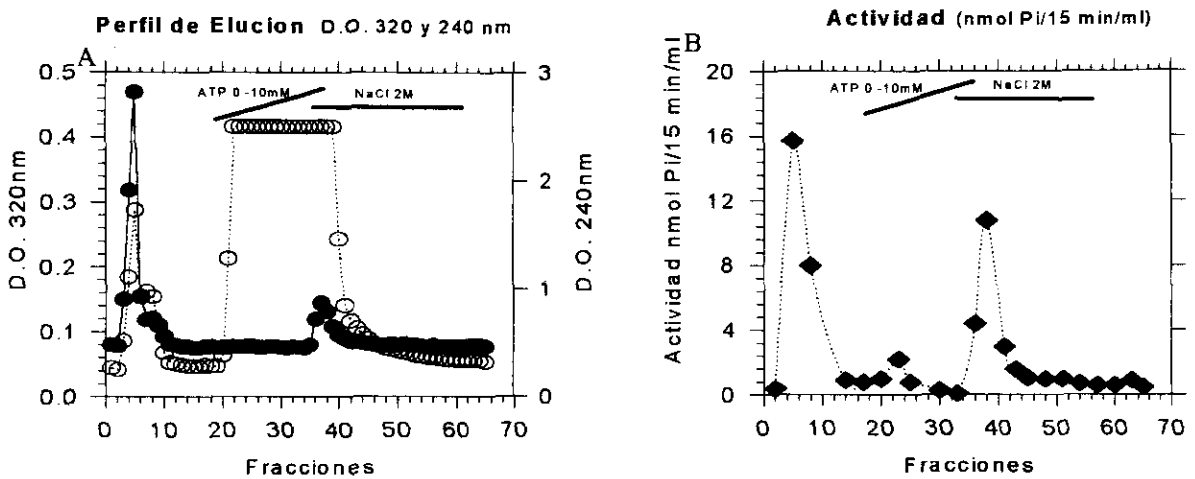


La proteína FliI se purificó a partir de células MGT7/ pIK2101 inducidas a 25 °C, según el protocolo descrito en la sección de Materiales y métodos. Inicialmente se separó la fracción soluble de los cuerpos de inclusión y el material agregado en éstas células. Después de dos pasos de precipitación diferencial con sulfato de amonio, esta fracción enriquecida en FliI se paso por una columna de azul de Cibacron 3GA. Esta columna tiene un sitio de unión a nucleótidos, por lo que se ha utilizado en la purificación de diversas ATPasas y otras proteínas que unen nucleótidos. El perfil de

elución y la determinación de la actividad hidrolítica de las fracciones de esta columna se muestra en la figura 19, así como la electroforesis en gel de éstas.

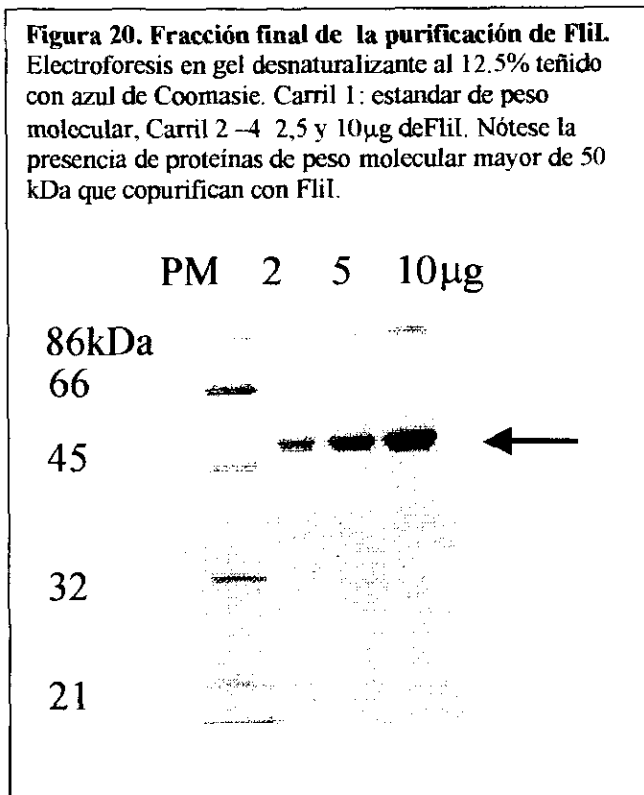
**Figura 19. Purificación de FliI en la columna de Azul de Cibaron**

Las fracciones de la columna se analizaron por (A) D.O.  $320\text{nm}$  para seguir la elución de proteína y a  $240\text{nm}$  para seguir la presencia de nucleótidos, y (B) por actividad de hidrólisis de ATP. El panel C muestra una electroforesis en gel de las fracciones.



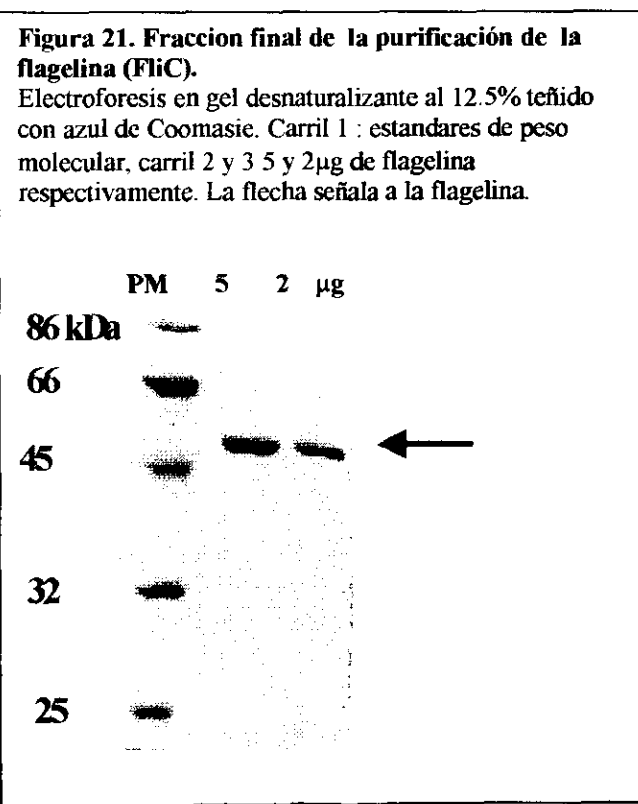


Las fracciones con FliI con actividad de ATPasa se juntaron y después de una diálisis contra Buffer A sin NaCl, la muestra se precipitó con SAS al 70%. El precipitado se resuspendió en Buffer A y dializó una vez más contra el mismo buffer. La fracción final de esta preparación se muestra en la figura 20, y es la que se utilizó a lo largo del trabajo.



## 2. Purificación de dos sustratos de exportación: flagelina (FliC) y proteína del gancho (FlgE).

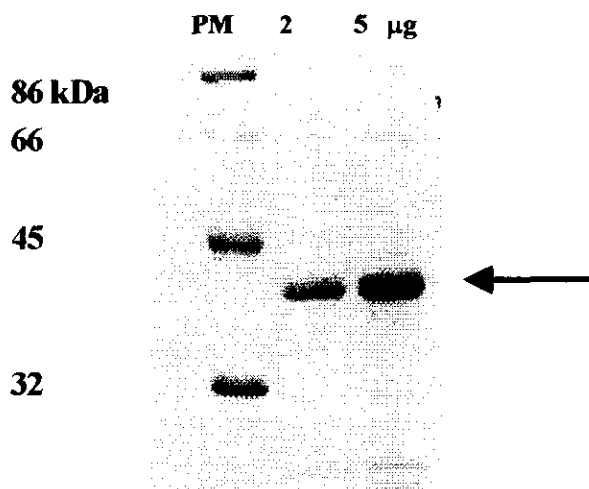
La purificación de la flagelina (FliC) se realizó a partir de la cepa silvestre de *Salmonella typhimurium* SJW1103, siguiendo el protocolo descrito en la sección de Materiales y métodos. Las células se crecen hasta la fase estacionaria y después de cosechar se resuspenden en un volumen pequeño. Dado que el filamento es una estructura rígida, este se desprende por la agitación violenta de un agitador tipo “vortex”. Posteriormente se separan las células enteras del material roto por medio de una serie de centrifugaciones de baja velocidad y una centrifugación final de alta velocidad. La figura 21 muestra un gel con la preparación final de la flagelina (FliC) >98% pura a



juzgar por estimaciones de densitometría en gel, así como por fotografías de microscopio electrónico de la preparación polimérica.

La purificación de la proteína del gancho (FlgE) se realizó a partir de la cepa mutante con fenotipo poligancho SJW880, siguiendo el protocolo descrito en la sección de Materiales y métodos. Después de crecidas las células se cosechan y resuspenden en un volumen pequeño para incrementar la fricción. Los poliganchos, al igual que el filamento, siendo rígidos, se desprenden por agitación violenta. El homogenado se centrifugó a baja velocidad con e fin de separar células enteras de la fracción soluble que contiene los poliganchos. Esta fracción se limpia por una serie de centrifugaciones a baja velocidad y finalmente en un gradiente de CsCl. La figura 22 muestra un gel con la preparación final de la proteína del gancho con una pureza mayor al 95% a juzgar por estimaciones de densitometría en gel , asi como por fotografías de microscopio electrónico de transmisión de la proteína polimérica.

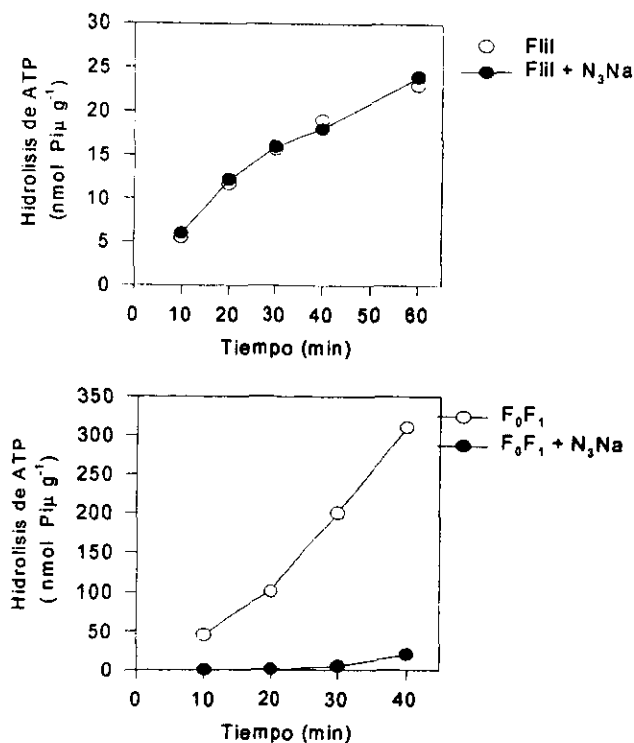
**Figura 22. Fracción final de la purificación de la proteína del gancho (FlgE) monomérica.**  
Electroforesis en gel desnaturalizante al 12.5% teñido con azul de Coomasie. Carril 1 estandar de peso molecular, carril 2 y 3 2 y 5µg de la proteína del gancho respectivamente. La flecha señala a la proteína del gancho.



### 3. Caracterización de la actividad enzimática de FliI.

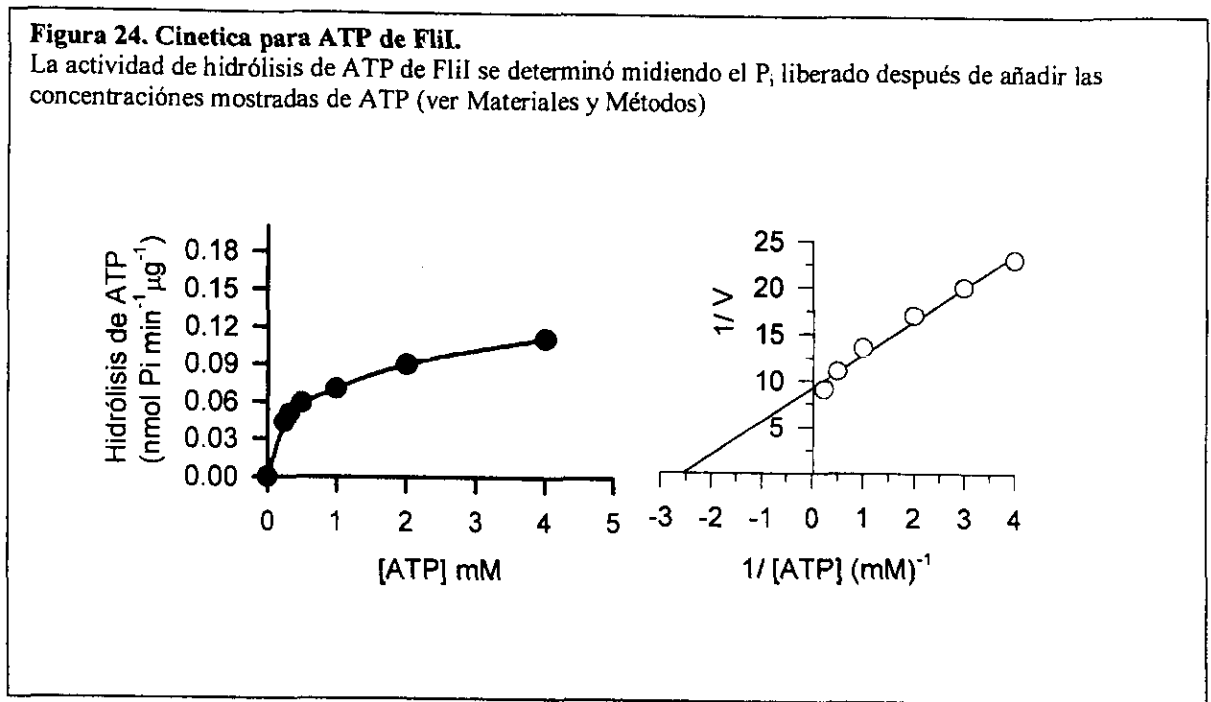
Estudios preliminares de éste laboratorio (Dreyfus, G. *et. al.* 1993), habían mostrado que la proteína FliI solubilizada de cuerpos de inclusión y renaturalizada una TNP ATP (análogo fluorescente de ATP), pero no hidroliza ATP. Sin embargo, la proteína FliI purificada a partir de células inducidas a 25 °C sí hidroliza ATP. Probablemente la proteína solubilizada y renaturalizada no se encuentra en su conformación nativa. La actividad hidrolítica de FliI es insensible a azida de sodio, que es un inhibidor de ATPasas bacterianas tipo  $F_0F_1$  y de la ATPasa del sistema de exportación tipo II, SecA (ver figura 23).

**Figura 23. La actividad de hidrólisis de FliI es insensible a 5mM de azida de sodio ( $N_3Na$ ).**  
FliI (o  $F_1$ ) se preincubó con azida de sodio ( $N_3Na$ ) 10mM por 10 minutos a 30 °C. Posteriormente se determinó la actividad de hidrólisis de ATP por el método de Lanzetta y colaboradores (ver Materiales y métodos).



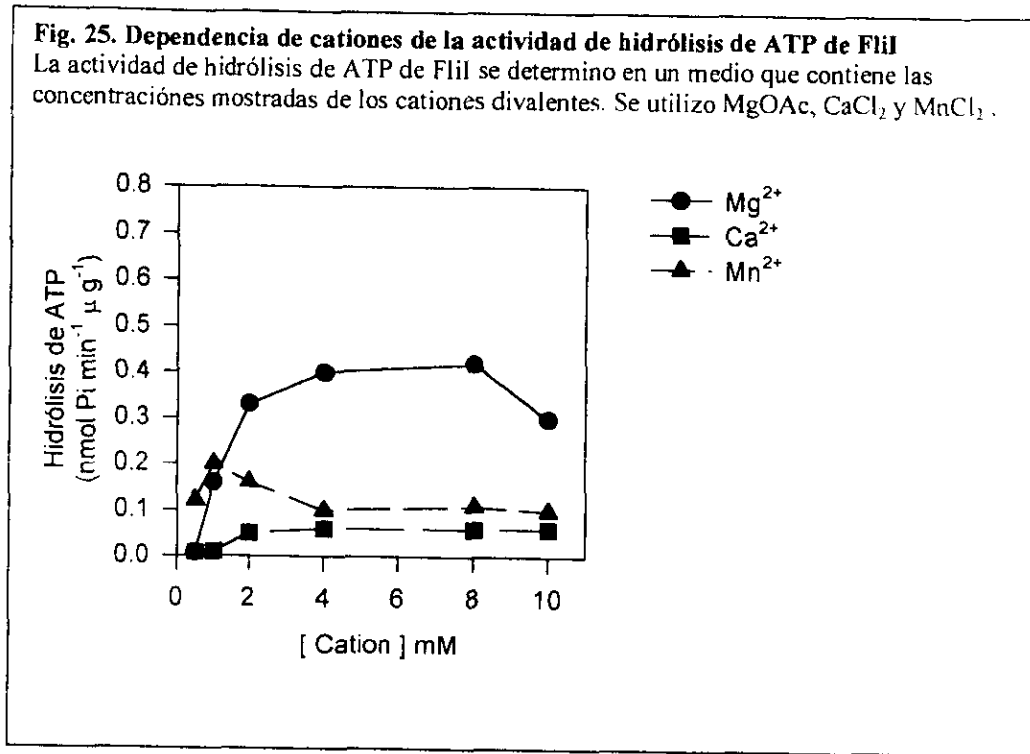
La actividad enzimática de FliI es insensible también a vanadato, inhibidor de ATPasas tipo P o E<sub>1</sub>E<sub>2</sub> y de la ATPasa del sistema de exportación tipo I.

La reacción sigue una cinética de tipo Michaelis-Menten, con una V<sub>max</sub> de 0.12 μmol P<sub>i</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> y una K<sub>m</sub> para ATP de 0.3 mM (ver Figura 24).



La actividad hidrolítica de las ATPasas bacterianas del tipo F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> así como de las ATPasas de los sistemas de exportación tipo I y II requieren de metales divalentes, preferentemente Mg<sup>2+</sup>; en el caso de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>, el Ca<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup> lo pueden reemplazar. La reacción de hidrólisis de ATP de FliI también requiere de cationes divalentes, siendo el Mg<sup>2+</sup> el mejor sustrato, con una K<sub>m app</sub> para Mg<sup>2+</sup> de 1 mM.

En este caso, el  $Mn^{2+}$  puede reemplazarlo a algunas concentraciones, mientras que el  $Ca^{2+}$ -ATP no es sustrato de hidrólisis por FliI (ver Figura 25).

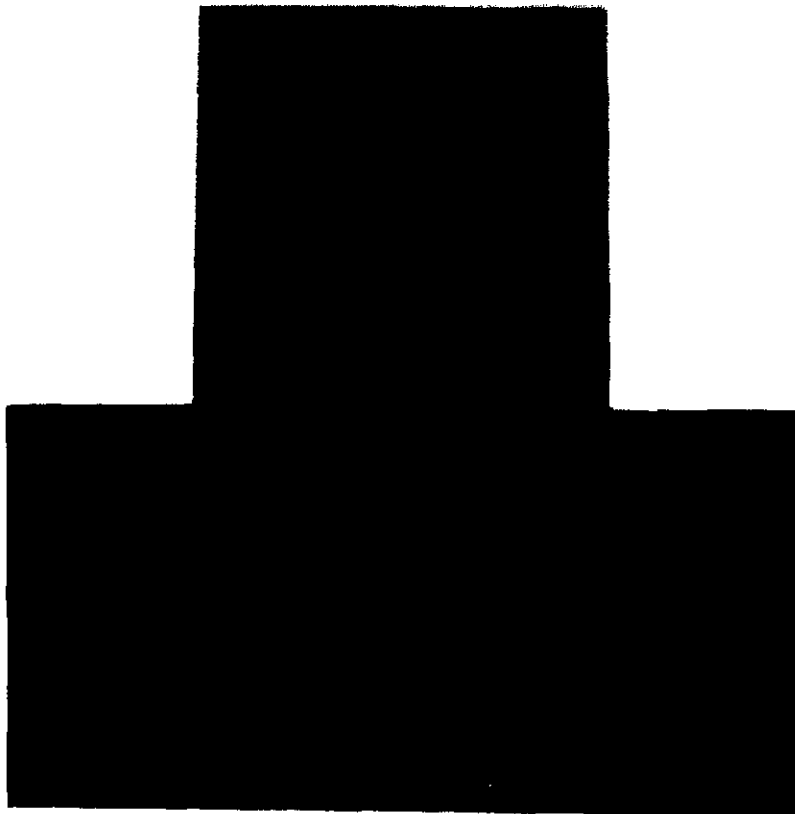


#### 4. Interacción de FliI con substratos de exportación.-

El papel de la proteína FliI en el proceso de exportación es esencial, como lo muestra el hecho de que ablaciones o deleciones del gen, o mutaciones en los aminoácidos esenciales para la hidrólisis, resultan en células no flageladas (ver Introducción. Sección C). Más aún, la transformación de una célula silvestre de *S. typhimurium* con un plásmido sobreproductora de FliI, resulta en una célula hiperflagelada (ver Figura 26).

**Figura 26. Fotografía de microscopía electrónica de células con diferentes genotipos de *fliI*.**

Cultivos en fase exponencial de (A) SJW1103 cepa silvestre, (B) YK4178; *fliI*<sup>-</sup>, y (C) SJW1103 /pIFF1500 ; sobreproductora de FliI. Los cultivos se lavaron y procesaron para su observación al microscopio electrónico de transmisión. en la unidad de Microscopía Electrónica del IFC



Como ya habíamos mencionado, se ha propuesto a FliI como el componente energizador del proceso exportador. También se ha sugerido que FliI podría tener un papel de chaperona en el proceso; sin embargo FliI difiere de manera importante de otras chaperonas reportadas tanto generales, como chaperonas de los sistemas de exportación tipo III (Minamino, T., & R.M, Macnab 1999). Como componente energizador, FliI podría reconocer directamente a los substratos exportados, o indirectamente a través de otro componente del sistema exportador y translocarlos hacia la vía de exportación. Este trabajo se centra en la determinación de una interacción directa y específica entre FliI y los substratos exportados. Hemos utilizado como modelo de sustrato de exportación a la flagelina (FliC) y a la proteína del gancho (FlgE), puesto que son los componentes principales, en cuanto a masa, del filamento (ver Introducción. Sección B Estructura del Flagelo). Más aun, la flagelina es el único componente del flagelo que se está exportando continuamente.

Con el fin de demostrar la posible interacción entre FliI y flagelina o la proteína del gancho, recurrimos a tres enfoques principales: la inmunorréplica de afinidad, la coprecipitación y el análisis de la actividad enzimática en presencia o ausencia de estos componentes.

#### **A. Inmunorréplica de afinidad.-**

El ensayo de inmunorréplica de afinidad identifica la interacción entre dos proteínas utilizando una modificación de la inmunorréplica tipo “Western”. La proteína inmovilizada se incuba con una segunda proteína cuya presencia se revela con anticuerpos específicos (ver Materiales y métodos para una mayor descripción). El

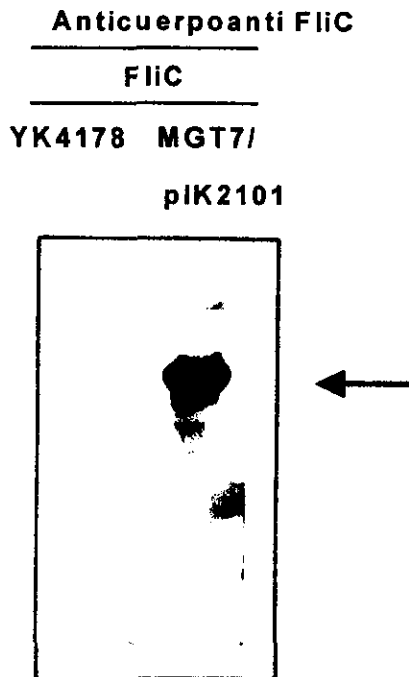


reconocimiento de la proteína blanco depende de un cierto grado de renaturalización de ésta durante la transferencia a la membrana, o de que el reconocimiento sea de la secuencia primaria. Este método ha sido utilizado para identificar substratos de la proteína -cinasa C (Robles-Flores M., & A. J. García-Sainz 1994 ) y para demostrar interacciones entre componentes del “switch” flagelar como CheY~P –FliM , FliM – FliN y FliG –FliM (Tocker, A.S. & R.M. Macnab, 1997).

La figura 27 muestra un primer ensayo donde se analizó la interacción de la flagelina con extractos celulares de las cepas YK4178 (*fliI*<sup>-</sup>) y MGT7/pIK2101

**Fig 27. Inmunorréplica de afinidad.**

Extractos celulares de la cepa *fliI* (YK4178), y la cepa sobreproductora de FliI (MGT7/pIK2101) se corrieron y transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Después de ser bloqueados para evitar unión inespecífica, la membrana se incubó con flagelina (FliC) (0.1mg/ml) y la presencia de FliC se reveló con anticuerpos específicos. (ver Materiales y métodos). La flecha señala la altura de migración de FliI.



(sobreproductora de FliI). Los extractos celulares se separaron en un gel de poliacrilamida, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con una solución de 0.1mg/ml de flagelina en TTBS-leche 0.1%. Después de lavar, para eliminar el pegado inespecífico, se evidenció la presencia de flagelina con anticuerpos específicos.

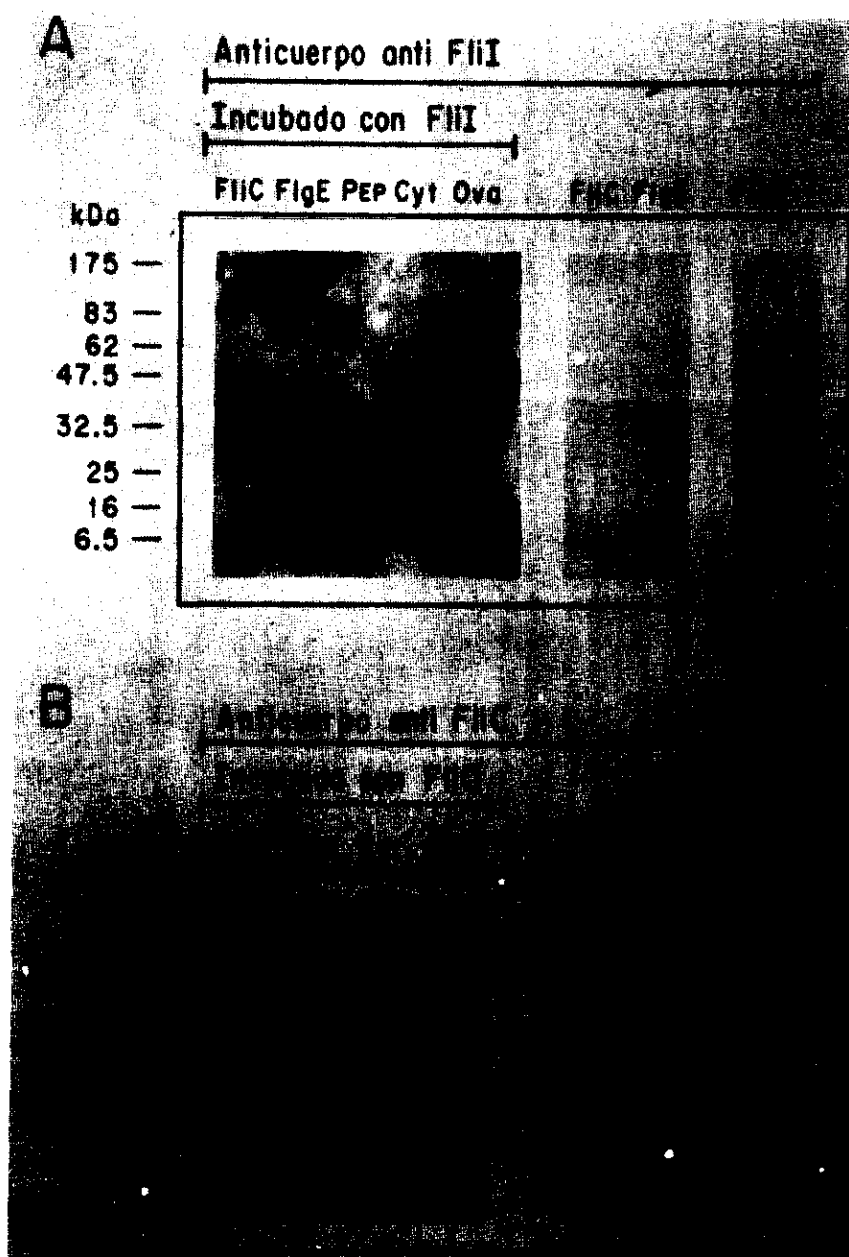
En esta figura se puede observar que la flagelina se une a la proteína FliI sobreproducida,

mientras que en la cepa mutante en *fliI* no se observa ninguna banda.

Con el fin de investigar si la interacción entre estas proteínas es específica utilizamos fracciones purificadas de FliI, flagelina, gancho, así como de tres proteínas no relacionadas (pepsina, citocromo c, y ovalbumina) en dos series de experimentos de inmunorréplica de afinidad (ver Figura 28).

**Figura 28. Inmunorréplica de afinidad.**

Las proteínas purificadas FliI, flagelina (FliC), proteína del gancho (FlgE), pepsina (Pep), citocromo C (cyt), ovalbumina (Ova), se corrieron y transfirieron a un papel de nitrocelulosa, se incubaron con FliI (panel A) o FliC (panel B) y se probaron con los anticuerpos correspondientes (ver Materiales y métodos).



El primer grupo de experimentos (panel A) se muestra que FliI reconoce a la flagelina (FliC), a la proteína del gancho (FlgE) inmovilizadas en la membrana, pero no al citocromo c, pepsina u ovalbúmina. En el extremo derecho de la figura se muestra que el anticuerpo es específico para FliI y no cruza con flagelina o la proteína del gancho. En el segundo grupo de experimentos (panel B), se hizo el experimento inverso.

Este experimento muestra que la flagelina reconoce a FliI inmovilizada en la membrana específicamente, mientras que ni el citocromo c, ni la pepsina, o la ovalbúmina son reconocidos por la flagelina. La especificidad del anticuerpo se muestra en el extremo derecho de la figura. Es interesante notar la presencia de tres bandas de peso molecular entre 65 y 85 KDa en el carril de FliI, que son identificadas por flagelina pero que con la tinción de azul de Coomassie apenas son detectables (ver Figura 20). La proteína del gancho (FlgE) también reconoce a FliI inmovilizada en la membrana de nitrocelulosa (datos no mostrados).

Estos experimentos demuestran que FliI interacciona específicamente con ambos substratos de exportación.

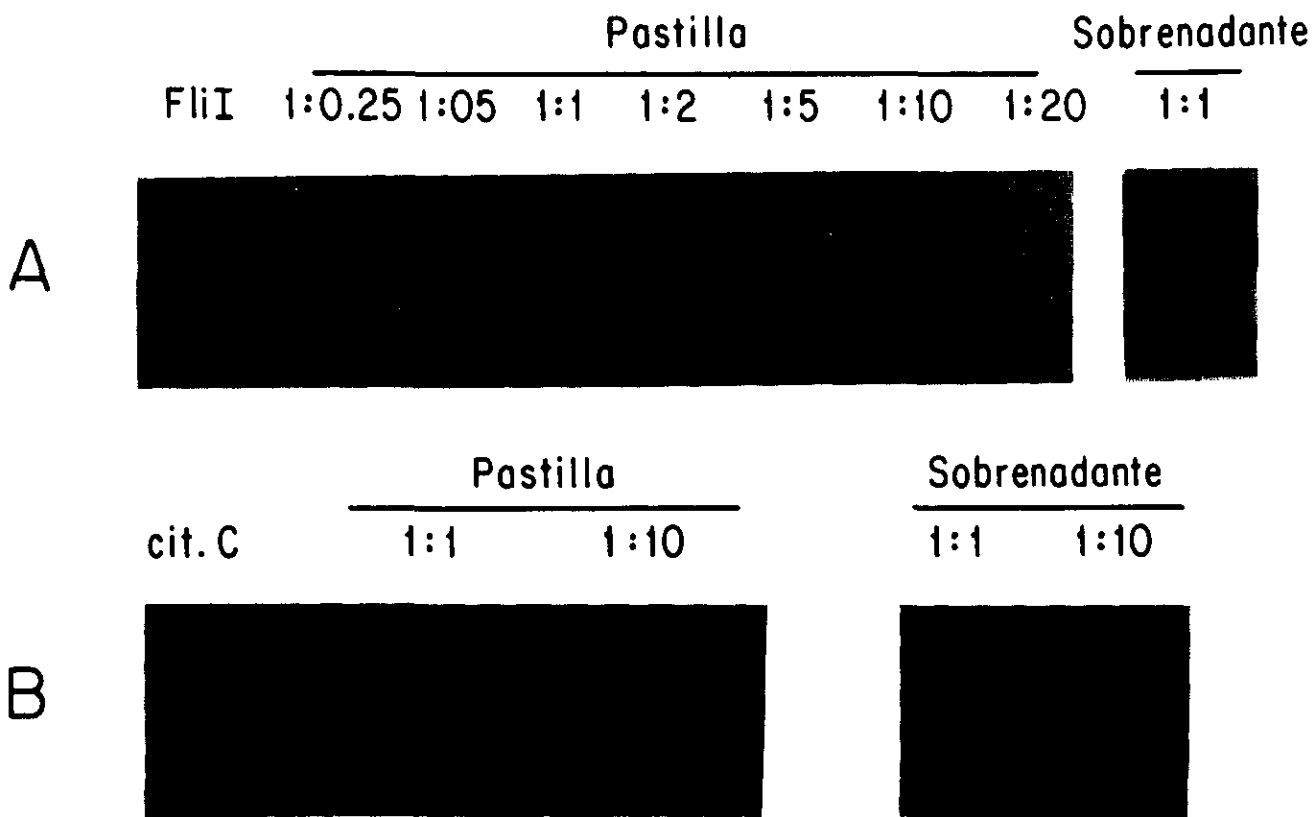
### **B. Cosedimentación de FliI con FliC**

El ensayo de cosedimentación es otra forma de evidenciar la interacción entre dos proteínas. Una de estas se sedimenta por el uso de anticuerpos o por centrifugación, y acarrea durante este proceso a aquellas proteínas con las que esté interaccionando. En este caso aprovechamos el hecho de que la flagelina polimérica se sedimenta fácilmente después de una centrifugación a alta velocidad (ver Materiales y métodos). Después de

una preincubación de esta preparación de flagelina con FliI o con citocromo c , como proteína control, se analizó la fracción sedimentada y la soluble tanto por gel de poliacrilamida como por inmunorréplica tipo "Western". La figura 29 muestra como FliI cosedimenta con flagelina mientras que el citocromo c permanece en la fracción soluble.

**Figura 29. Cosedimentación. de FliI y flagelina.**

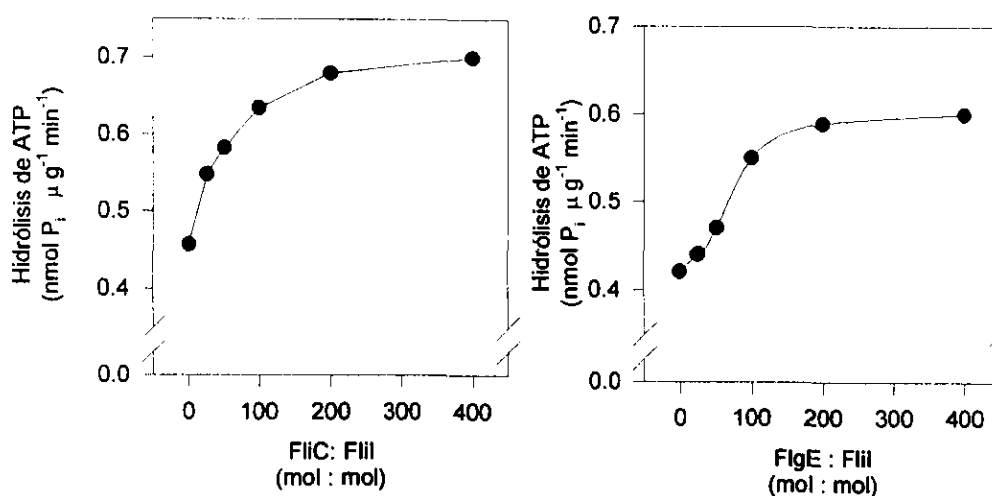
Flagelina polimérica se preincubó por 10 minutos a 30 °C a diferentes relaciones molares con FliI o citocromo c. Posteriormente se ultracentrifugó y se analizó tanto la pastilla como el sobrenadante por inmunorréplica tipo "Western" con anticuerpos específicos anti FliI o anti citocromo c (ver Materiales y Métodos).



### C. Estimulación de la actividad enzimática.-

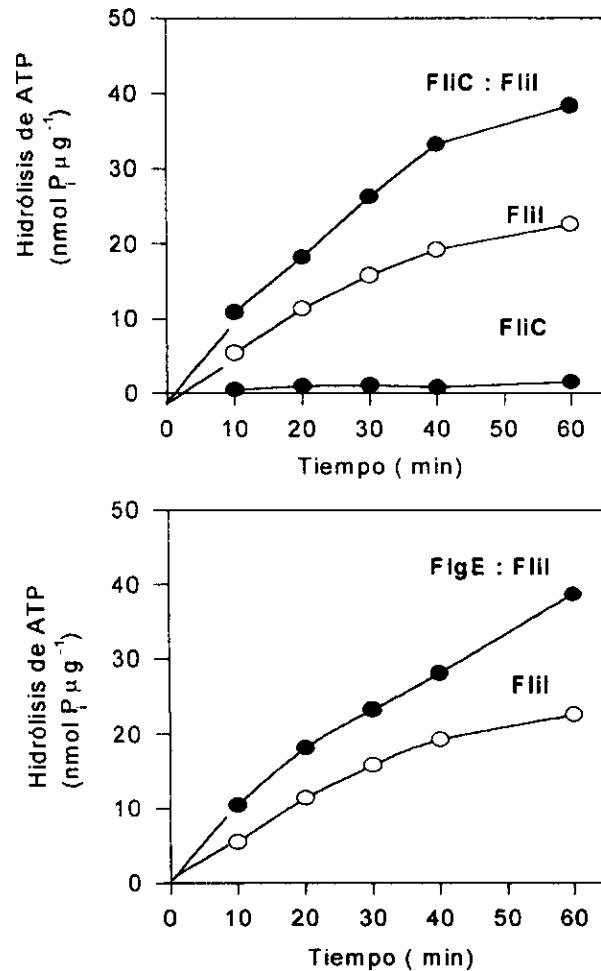
Dado que FliI reconoce específicamente a la flagelina y a la proteína del gancho, exploramos la posibilidad de que ésta interacción se reflejara en las propiedades cinéticas de la proteína. Hay que recordar que la actividad de ATPasa de FliI juega un papel esencial durante el proceso de exportación, probablemente proveyendo la energía para la translocación de los substratos exportados.

**Fig. 30. Estimulación de la actividad de ATPasa de FliI en función de la concentración de FliC y FlgE.** FliI (1  $\mu\text{g}$ ) se preincubó a 30 °C con flagelina (FliC) o proteína del gancho (FlgE) monoméricos a las concentraciones mostradas. La actividad de ATPasa se midió por 15 minutos y el  $\text{P}_i$  liberado se determinó siguiendo el método de Lanzetta y colaboradores (ver Materiales y métodos).



En la figura 30 se muestra que incrementos en la relación molar de sustrato exportador a FliI, estimula la actividad de hidrólisis de ATP de FliI. Es importante recalcar que la relación molar mínima necesaria para producir una estimulación de esta actividad es de 25 a 50 a 1 y que se la estimulación llega a un máximo en una relación molar de 200 a 1 (sustrato de exportación : FliI).

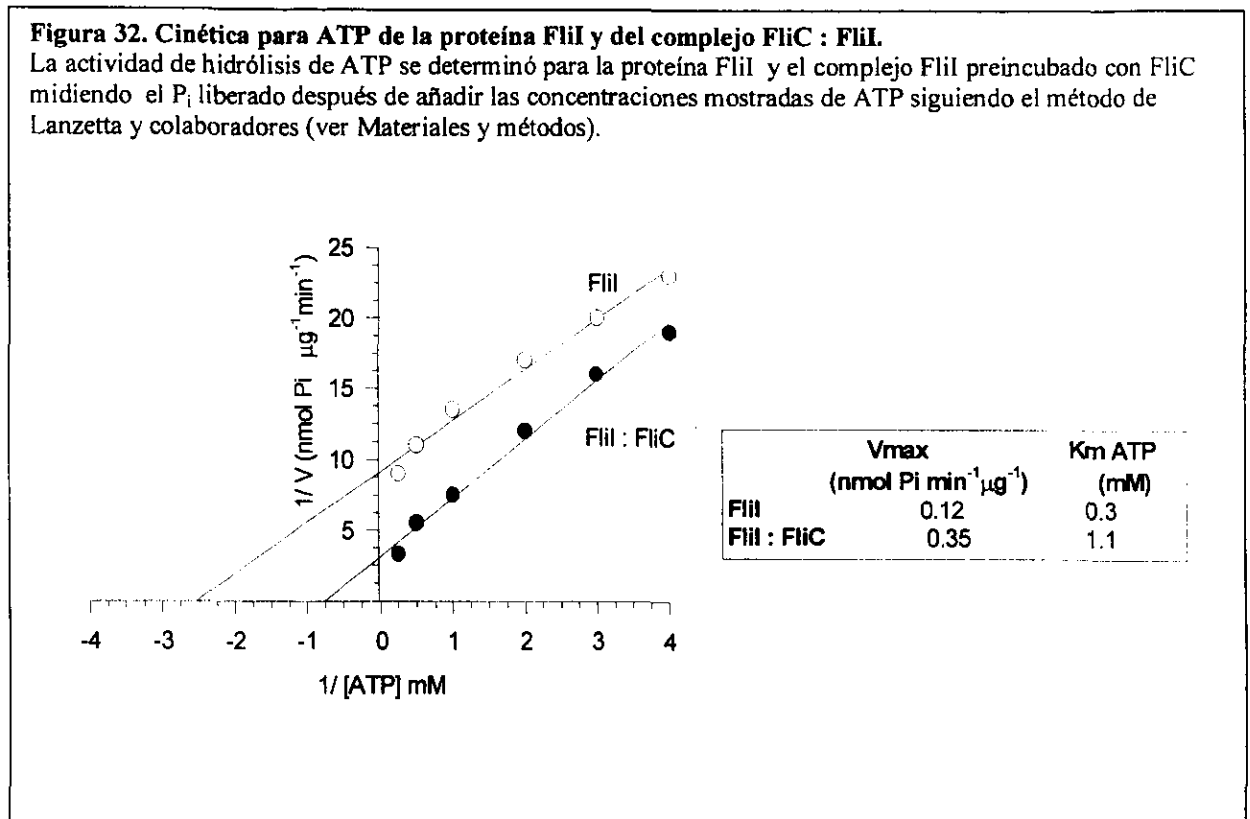
**Figura 31. Estimulación de la actividad hidrolítica de FliI por FliC y FlgE.** FliI (1  $\mu\text{g}$ ) se preincubó con flagelina o proteína del gancho monomérica a una relación molar de 100:1 (substrato de exportación : FliI). Después de la adición de ATP se determinó la liberación de  $\text{P}_i$  en el tiempo siguiendo el método de Lanzetta y colaboradores (ver Materiales y métodos). Nótese que la proteína FliC no tiene actividad alguna.



La estimulación de la actividad de FliI por flagelina o proteína del gancho es específica y continua, como se muestra en el curso temporal de la figura 31. La presencia de lisozima o albúmina sérica bovina a concentraciones equivalentes no tiene efecto alguno sobre la

actividad hidrolítica de FliI. Es importante mencionar que ni la flagelina(FliC), ni la proteína del gancho poseen actividad de hidrólisis de ATP por si mismas.

La estimulación de la actividad hidrolítica de FliI se ve reflejada en las características cinéticas de esta proteína como se muestra en la figura 32.

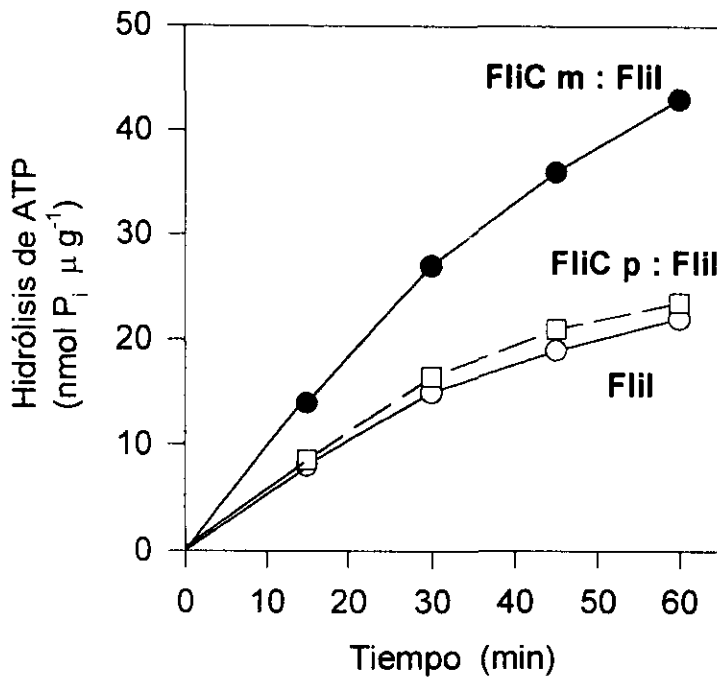


El proceso de morfogénesis es un proceso ordenado, donde se exportan subunidades de cada una de las subestructuras. Esto implica que el componente del aparato exportador que identifica a los substratos los reconoce como monómeros. La figura 33 muestra que la

actividad de FliI se estimula únicamente con flagelina monomérica y no con flagelina polimérica, *i.e.*, filamentos, como se esperaría si FliI tuviese ese papel.

**Figura 33. Estimulación de la actividad de hidrólisis de FliI por flagelina monomérica y polimérica.**

FliI (1  $\mu\text{g}$ ) se preincubó con flagelina monomérica (■) o polimérica (▲) en una relación de 100 : 1 sustrato de exportación: FliI, a 30 °C. Después de la adición de ATP se siguió la actividad de ATPasa en el tiempo determinando el  $\text{P}_i$  liberado siguiendo el método de Lanzetta y colaboradores (ver Materiales y Métodos). FliC m : flagelina monomérica, FliC p : flagelina polimérica.



Con el fin de corroborar si la interacción de estas proteínas con FliI es reversible, se hicieron ensayos de dilución. Después de la preincubación de la flagelina (FliC) con FliI, en una relación molar de 100:1 (sustrato de exportación : FliI) a 30 °C, se tomó una alícuota y se diluyó 5 veces con medio de reacción (ver Materiales y métodos). Posteriormente se determinó la velocidad inicial tanto del complejo FliC : FliI como de la



proteína FliI sola. La tabla 7 muestra que la dilución de la concentración de la flagelina presente, resulta en la pérdida de la estimulación de la actividad hidrolítica de FliI. Estos datos sugieren una interacción dinámica entre FliI y FliC, y una constante de afinidad de la flagelina (FliC) por FliI muy baja.

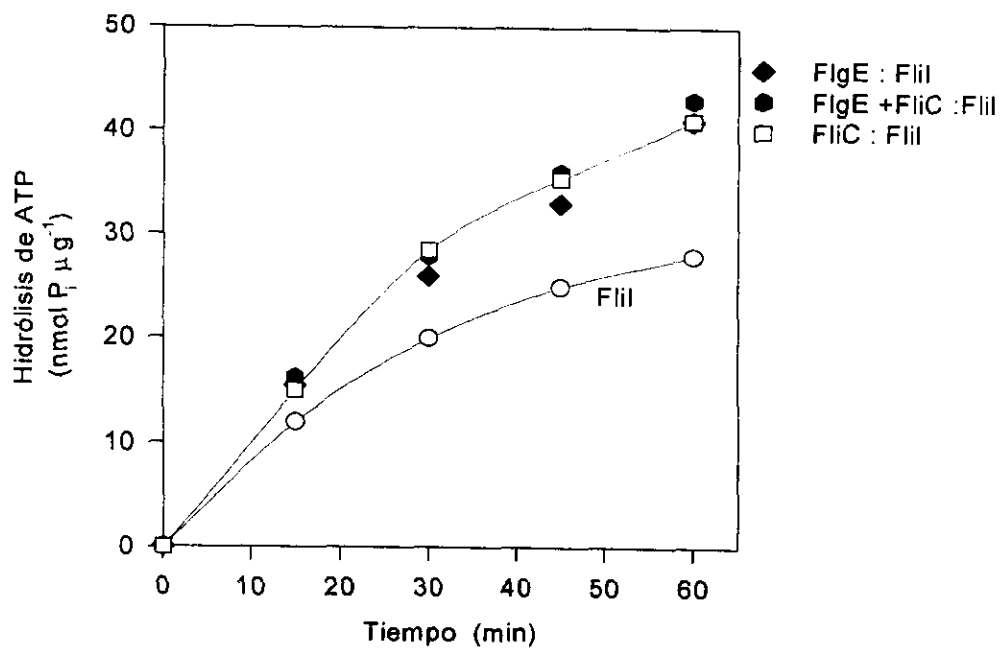
**Tabla 7 . Reversibilidad del efecto estimulador de FliC**

	<b>VELOCIDAD INICIAL</b> (mmol P <sub>i</sub> min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )
<b>FliI</b>	0.5 ± 0.06
<b>FliI (diluido 5X)</b>	0.46 ± 0.06
<b>FliC : FliI</b>	0.88 ± 0.08
<b>FliC : FliI (diluido 5X)</b>	0.5 ± 0.04

Con el fin de analizar si el efecto estimulador de la flagelina y la proteína del gancho es aditivo, se analizó la actividad de FliI en presencia de cada una de estas proteínas por separado y en conjunto. La figura 34 muestra que no hay un efecto aditivo en la estimulación de la actividad por estos dos substratos de exportación.

**Figura 34. La estimulación de la actividad de FliI por FliC no es aditiva.**

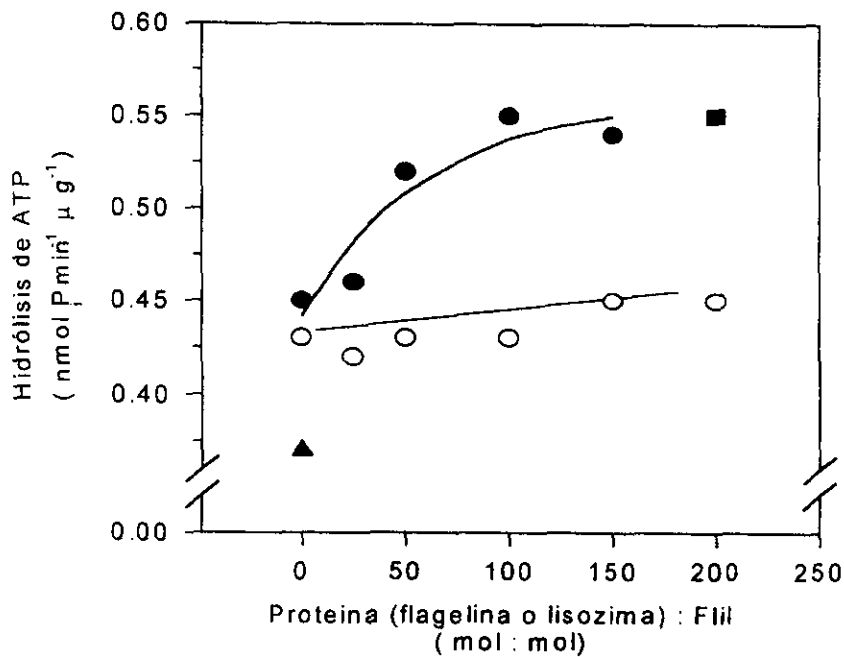
FliI se preincubó con flagelina monomérica ( $\square$ ) o con la proteína del gancho ( $\blacklozenge$ ), o ambos ( $\bullet$ ) juntos a  $30^{\circ}\text{C}$  a una relación molar de 100:1 (substrato de exportación : FliI). La actividad de ATPasa se determinó siguiendo el método de Lanzetta y colaboradores (ver Materiales y métodos).



Dado que la presencia de ambos substratos de exportación no produce una estimulación adicional, cabe la posibilidad de que ambos estén interaccionando en un sitio común en FliI (“dominio de unión a substrato de exportación”). Para analizar esta posibilidad, se preincubó a FliI con la proteína del gancho (FlgE) en una relación submáxima de 50:1 (substrato de exportación: FliI), y se agregaron concentraciones crecientes de flagelina (FliC) (●) o de lisozima como control (○).

**Figura 35. Un sitio común de unión a substratos de exportación en FliI.**

FliI (1  $\mu\text{g}$ ) se preincubó con proteína del gancho a una relación molar de 50 : 1 (FlgE: FliI) al cual se le añadieron concentraciones crecientes de flagelina (●) o lisozima (○). La actividad de FliI sola se muestra como ▲ y la actividad del complejo FliC:FliI a una relación molar de 200:1 como ■.



Como se muestra en la figura 35, el complejo FlgE :FliI es estimulado por flagelina hasta llegar a una saturación, mientras que la presencia de lisozima no modifica la actividad del complejo. La adición de flagelina a FliI en una relación molar de 200:1, resulta en el mismo grado de estimulación que el conjunto de 50 + 150 de proteína del gancho + flagelina. Esto es, el nivel de estimulación de la actividad de hidrólisis de ATP, es equivalente si se agrega flagelina sola o una mezcla de ambos substratos de exportación. Ello sugiere un sitio común de interacción para estos substratos en FliI .

## IV. Discusión y Conclusiones

El proceso de formación del flagelo de *Salmonella typhimurium* ha sido extensamente estudiado (ver Sección C. Morfogénesis flagelar y regulación de la expresión de los genes flagelares y quimiotácticos). Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo por el cuál las proteínas son transportadas a través de la estructura flagelar. Se sabe que las proteínas FlhA, FlhB, FliH, FliI, FliO, FliP, FliQ y FliR están directamente involucradas en éste proceso. De ellas, FliI ha sido de especial interés para nosotros. Se han identificado proteínas homólogas a FliI en todos los sistemas de exportación tipo III, y homólogos al gen *fliI* en todas las especies flageladas que han sido caracterizadas a nivel genético. Esta familia de proteínas muestra homología con la subunidad  $\beta$  de la  $F_0F_1$ -ATPasa, especialmente en los dominios de unión a nucleótidos. El papel de FliI es esencial en el proceso de exportación y formación del flagelo bacteriano, como lo demuestran mutaciones y ablaciones del gen (Vogler, A.P. *et. al.* 1991). Sin embargo, se desconoce el papel que juega en el proceso de exportación. La función de FliI podría ser la del componente que provee la energía

para el proceso de exportación, o bien la de una chaperona que promueva la translocación de los sustratos de exportación.

Este trabajo se centró en la purificación de la proteína FliI silvestre, en su caracterización enzimática, así como la identificación y caracterización de la interacción de esta proteína con dos sustratos de exportación.

El primer enfoque utilizado fue el de purificar a la proteína FliI a partir de cuerpos de inclusión de bacterias sobreproductoras de FliI. Esta preparación solubilizada con GuCl y renaturalizada con TNP-ATP, pero no presenta actividad enzimática debido probablemente a que no adopta su conformación nativa. A diferencia de la proteína purificada a partir de cuerpos de inclusión, cuando FliI es purificada a partir de la fracción soluble, ésta presenta actividad de hidrólisis de ATP. Esta actividad ha sido demostrada para proteínas recombinantes con un "marcador" de histidinas (Fan, F., & R.M. Macnab 1996) y para la proteína de fusión con la glutatión-S-transferasa (A. Williams 1996), pero no lo había sido para la proteína silvestre.

La proteína FliI silvestre tiene una actividad de  $0.12 - 0.16 \text{ nmol Pi min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  (figura 24). Esta actividad de hidrólisis de ATP es comparable con la actividad reportada para proteínas recombinantes ( $0.12$  y  $0.15 \text{ nmol P}_i \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  proteína con marcador de histidinas y GST respectivamente) y, más aún, comparable con la actividad de ATPasa de otros sistemas de exportación, incluyendo a InvC ( $0.23 \text{ nmol P}_i \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ ) (Eichelberg, K. *et. al.* 1994), una proteína homóloga de FliI en el sistema

de exportación de factores de virulencia de *Salmonella*. Por otra parte, esta actividad es mas baja que la actividad multisitio de la F<sub>1</sub>-ATPasa (25 μmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>), y mayor que la unisitio de la subunidad β aislada (0.82 nmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) (Parsonage, D. *et. al.* 1987 y G. Pérez comunicación personal).

La actividad de ATPasa de FliI es insensible a asida de sodio, inhibidor de ATPasas tipo F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> de bacterias y de ATPasas del sistema de exportación tipo II (SecA), al igual que al vanadato, que es un inhibidor de ATPasas tipo E<sub>1</sub>E<sub>2</sub> y ATPasas del sistema de exportación tipo I (HylB) (ver figura 23).

La especificidad para cationes (figura 25), también muestra diferencias con la F<sub>1</sub>-ATPasa de *E. coli*, ya que el Mg<sup>2+</sup> estimula la actividad de FliI hasta concentraciones de 10 mM, mientras que en la F<sub>1</sub> concentraciones mayores a 5 mM son inhibitorias. Por otro lado, el Ca<sup>2+</sup> no es sustrato para la hidrólisis de ATP en FliI, mientras que en la F<sub>1</sub> si lo es (Parsonage, D., *et. al.* 1987). Estos datos sugieren que, a pesar de la similitud en la secuencia de aminoácidos entre FliI y la subunidad β de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPasa, el mecanismo de reacción de ambas enzimas posee algunas diferencias, que probablemente reflejan los diferentes procesos y microambientes en los que están involucradas.

El hecho de que la actividad de hidrólisis de ATP de FliI sea esencial para la morfogénesis flagelar ha sido ampliamente demostrado, tanto por mutaciones en los aminoácidos esenciales para ello, como por deleciones completas del gen (Vogler,

A.P. *et. al.* 1991; Dreyfus, G., *et. al.* 1993). La figura 26 muestra que el fenotipo de una célula con una delección completa del gen *fliI* es el de una célula no flagelada. Por otro lado, resulta sorprendente que el fenotipo de la célula sobreproductora de FliI es el de una célula hiperflagelada. Esto sugiere que FliI no sólo es esencial para el proceso de exportación, sino que tal vez influye en el número de flagelos producidos en la célula, sin embargo no hay otros datos que apoyen esta hipótesis. La pregunta de cuantos flagelos se hacen en una célula, así como su localización, es tema de numerosas discusiones en el campo.

Dentro de la célula, FliI probablemente forma parte de un complejo multiproteínico donde interacciona con otros componentes del aparato exportador, y donde la hidrólisis de ATP estaría acoplada al proceso de exportación. En que punto del proceso de exportación se requiere la hidrólisis de ATP no se sabe. Una posibilidad es que sea el donador de energía durante la translocación de las proteínas; otra alternativa es que FliI posea actividad de chaperona para de algún o algunos substratos de exportación. Sin embargo, FliI difiere en forma significativa tanto en secuencia como en las propiedades fisicoquímicas como carga, tamaño, y alto contenido de  $\alpha$  hélice, de las chaperonas generales como DnaK (Schmid, D., *et. al.* 1994), o de las chaperonas del sistema de exportación flagelar como FliJ y FliS (Stephens, C., *et. al.* 1997 y Minamino, T. & R.M. Macnab 1999) o de SycE, SycH del sistema de exportación de factores de virulencia (Hueck, C. 1998).



SecA es el componente donador de la energía para la translocación, en los sistemas de exportación tipo II. Esta proteína reconoce la secuencia señal en el extremo NH<sub>2</sub>-terminal de las proteínas exportadas por este sistema, durante el proceso de traducción. El complejo SecA : substrato de exportación interactúa con el poro de secreción, y en este punto la hidrólisis de ATP conduce la translocación del substrato de exportación a través de la membrana y la liberación de SecA (ver Introducción sección C). Uno de los modelos de función del aparato exportador propone que FliI podría tener un papel similar, interactuando con substratos de exportación y promoviendo su translocación. Para analizar esta posibilidad fue que se diseñaron los descritos en este trabajo, con el propósito de probar la interacción de FliI con al menos dos substratos de exportación: la flagelina y la proteína del gancho. Estas proteínas forman la subestructura principal del flagelo, el filamento, el cual está formado por alrededor de 20,000 subunidades de flagelina y el gancho formado por 120 subunidades de la proteína del gancho.

Como se ha presentado en este trabajo, la interacción de FliI con estos substratos de exportación se estudió por dos métodos principales: la inmunorréplica de afinidad y la cosedimentación. La inmunoreplica de afinidad ha sido utilizada, con buenos resultados, por diversos grupos (Robles-Flores, M. & A.J. García Sainz 1994 ; Toker, A. & R.M. Macnab 1997) para demostrar la interacción entre proteínas. La figura 28 muestra como FliI reconoce específicamente a la flagelina (FliC) y a la proteína del

gancho (FlgE). Es interesante notar que este reconocimiento se da también de forma inversa, esto es, la flagelina reconoce específicamente a FliI (ver figura 27 y 28), aunque la interacción es menos intensa que la de FliI por la flagelina en el mismo tipo de análisis. Más aún, la flagelina reconoce a tres proteínas de peso molecular entre 65 y 85 kDa, proteínas apenas detectables en una tinción con azul de Coomassie. La identidad de estas proteínas se desconoce, sin embargo se puede especular que puedan ser parte del aparato exportador o interactuar con él. Las proteínas FlhA y FliF coinciden en cuanto al peso molecular (65 kDa y 75 kDa respectivamente), sin embargo hay que recordar que estas proteínas tienen un dominio membranar, lo cual hace poco probable su copurificación con FliI. La identificación de estas proteínas será motivo de estudios posteriores. El ensayo de cosedimentación mostrado en la figura 29 muestra que FliI cosedimenta específicamente con la flagelina, corroborando así la hipótesis de la interacción entre estas dos proteínas.

Estos dos enfoques demuestran una interacción directa y específica de FliI con la flagelina y la proteína del gancho, ambos substratos de exportación del sistema de exportación del flagelo.

La siguiente pregunta que nos hicimos fue la de probar si esta interacción de FliI con los substratos de exportación se ve reflejada en las propiedades cinéticas de la proteína. Como lo demuestran los resultados mostrados en las figuras 30 y 31 la

presencia tanto de la flagelina (FliC) como de la proteína del gancho (FlgE), estimulan la actividad hidrolítica de FliI en forma específica.

Cabe mencionar que a pesar de que FliI cosedimenta con la flagelina polimérica, su actividad hidrolítica no se ve estimulada por esta conformación de la proteína, y solo se estimula con la flagelina monomérica ( ver figura 33). Creemos que la interacción de FliI con la flagelina polimérica se da a través de los extremos desordenados de esta estructura. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que la cosedimentación de ambas proteínas es máxima en una relación de 1 a 1 (mol:mol). El hecho de que la actividad de FliI solo se estimule por la proteína monomérica apoya la hipótesis de que FliI interacciona con los sustratos de exportación, ya que la morfogénesis flagelar se da por la adición de subunidades al extremo distal de la estructura naciente, y no por la adición de subestructuras o polímeros preformados. El papel propuesto para FliI en el proceso de exportación como donador de energía para la translocación de sustratos de exportación requiere de una interacción dinámica entre esta proteína y los sustratos de exportación. Como se puede ver en la tabla 7, la interacción de FliI con flagelina es una interacción reversible, lo que apoya esta posibilidad. En el experimento reportado en la tabla 7 se determinó la actividad del complejo FliI:C: FliI antes y después de ser diluido; los resultados muestran que después de una dilución de 5 veces la actividad del complejo regresa a su estado no

estimulado. Estos datos también concuerdan con el hecho de que se necesita una gran cantidad de cualquiera de los sustratos para lograr una estimulación.

De acuerdo también con el papel propuesto para FliI, los experimentos de la figura 34 y 35 muestran que ésta proteína tiene un sitio común de unión para los sustratos de exportación. Estos experimentos muestran que la presencia de ambos sustratos, la flagelina y la proteína del gancho, no producen un efecto mayor al alcanzado con cada una de estas por separado (figura 34), y que la presencia de uno de estos sustratos o del conjunto de ellos a una misma relación final (por ejemplo 200  $\mu$ g FliC o 50 $\mu$ g de FlgE +150  $\mu$ g FliC) producen el mismo efecto estimulador de la actividad de FliI (figura 35).

Los resultados de este trabajo demuestran que FliI interacciona al menos con dos sustratos de exportación específicos del sistema de exportación tipo III del flagelo. Sugiero, por ello, que FliI posee una función similar a la ATPasa del sistema de exportación tipo II SecA, en cuanto a que interacciona reversiblemente con sustratos de exportación, y que ello modifica su actividad de hidrólisis de ATP.

Estudios recientes (Minamino, T. & R.M. Macnab 1999), proponen el siguiente modelo del aparato exportador del flagelo: en el poro de secreción se encuentran FliO, FliP, FliQ, y FliR y los dominios transmembranales de FlhA y FlhB. Tanto FlhA como FlhB poseen dominios hidrofílicos que protruyen al citoplasma dentro de la cavidad formada por el anillo C. De acuerdo con éste modelo que los sustratos de

exportación, tal vez con la ayuda de FliJ o FliS, interaccionan con FliI y probablemente con FliH. Posteriormente, estos interaccionan con los dominios citoplásmicos de FlhA y FlhB, liberando a los sustratos que son entonces translocados a través de la membrana por el complejo compuesto por FliO-R y los dominios transmembranales de FlhA y FlhB.

Los datos presentados en este trabajo apoyan este modelo, ya que proveen evidencia de una interacción directa entre FliI y los sustratos de exportación. Se puede especular que el requerimiento de una gran cantidad de sustrato de exportación para revelar una estimulación de la actividad hidrolítica de FliI *in vitro*, se debe a la ausencia ya sea de los otros componentes del aparato exportador como pueden ser FlhB, FlhA y FliH o de las chaperonas específicas de estos sustratos FliJ y FliS. Sin embargo, esta posibilidad será motivo de estudios posteriores.

## V. Perspectivas

Son muchos los caminos que se abren con este trabajo. Un primer camino será el de aislar el complejo Flil : substrato de exportación. Esto se realizará a través de columnas de filtración molecular en diversas condiciones que permitan la asociación de las proteínas mencionadas; otro enfoque será el de utilizar entrecruzadores para unir covalentemente estas dos proteínas. Una vez aislado el complejo, podremos determinar la estequiometría y las constantes de asociación – disociación del mismo.

Un segundo punto importante será el de identificar las regiones o dominios de la proteína Flil involucrados en la interacción con los substratos de exportación. Con este propósito, se realizará un estudio de ablaciones (deleciones) eliminando series de 10 aminoácidos, y se determinará la actividad enzimática de la proteína mutante y su capacidad de interaccionar con substratos de exportación, tanto por la estimulación de la actividad como por inmunorréplica de afinidad.

La meta final de este estudio sería el de poder reconstituir el aparato exportador en una membrana. Sin embargo, hay aún un largo camino que recorrer para poder lograr esto.

El paso inmediato sería el purificar a las proteínas FliH y los dominios citoplásmicos de FlhA y FlhB como los componentes del aparato exportador, y a las chaperonas FliJ y FliS.

Utilizando el mismo tipo de experimentos reportador en este trabajo, buscaría determinar si FliI interacciona con los componentes del aparato exportador mencionados, principalmente con FliH, ya que además del modelo propuesto por el grupo de Macnab , se han descrito mutaciones supresoras de FliI, en la proteína FliH. Posteriormente, determinaría si la presencia de las chaperonas, FliJ o FliS, producen una mayor estimulación de la hidrólisis de FliI y del probable complejo FliI-FliH.

Con estas proteínas aislaría el complejo mínimo estable que interaccione con FliI, para determinar una constante de asociación entre el complejo del aparato exportador (FliI-FliH-FlhA-FlhB ¿?) y los substratos de exportación FliC o FlgE en presencia de las chaperonas FliJ o FliS. La localización de estas proteínas en la estructura final del flagelo con inmunomicroscopía electrónica también sería de gran interés en el campo.

## VI. Apéndice

Parte de los resultados presentados en esta tesis han sido publicados en la revista *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure* Vol. 1431 / 2 del mes de Mayo de 1999, con el título de : **Interaction of FliI, a component of the flagellar export apparatus, with flagellin and hook protein.** E. Silva-Herzog and G. Dreyfus.

Se adjunta el trabajo.



# Interaction of FliI, a component of the flagellar export apparatus, with flagellin and hook protein

and?  
Eugenia Silva-Herzog, Georges Dreyfus \*

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apdo. Postal 70-600, 04510 México D.F., México

Received 1 December 1998; received in revised form 23 February 1999; accepted 1 March 1999

## Abstract

FliI is a key component of the flagellar export apparatus in *Salmonella typhimurium*. It catalyzes the hydrolysis of ATP which is necessary for flagellar assembly. Affinity blotting experiments showed that purified flagellin and hook protein, two flagellar axial proteins, interact specifically with FliI. The interaction of either of the two proteins with FliI, increases the intrinsic ATPase activity. The presence of either flagellin or hook protein stimulates ATPase activity in a specific and reversible manner. A  $V_{max}$  of 0.12 nmol  $P_i$   $min^{-1} \mu g^{-1}$  and a  $K_m$  for MgATP of 0.35 mM was determined for the unstimulated FliI; the presence of flagellin increased the  $V_{max}$  to 0.35 nmol  $P_i$   $min^{-1} \mu g^{-1}$  and the  $K_m$  for MgATP to 1.1 mM. The stimulation induced by the axial proteins was fully reversible suggesting a direct link between the catalytic activity of FliI and the export process. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Bacterial flagellum; Flagellar export; Flagellin; Hook protein; FliI; Protein–protein interaction

## 1. Introduction

Many bacteria, such as *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*, move about their environment by rotation of their flagella in response to external stimuli. The flagellum of these and other bacteria consists of a helical filament and a hook, both of which are completely external to the cell; it also has a basal body composed of inner and outer rings which span the cytoplasmic membrane, periplasmic space and outer membrane (see [1–3] for reviews). The construction of the flagellum involves the export of many flagellar proteins from the cytoplasm to their final destination. Two proteins of the outer

rings, FlgH and FlgI, are exported by the general secretory pathway [4,5]. The rest of the flagellar components do not undergo N-terminal signal peptide cleavage and are presumably exported by a unique flagellum-specific pathway [6,7]. These axial proteins, namely the subunits of the filament cap, filament, hook–filament junction, hook and rod are thought to travel through a channel that exists within the structure [8,9]. The flagellar assembly process starts from the MS-ring in the inner membrane and proceeds in inward and outward directions. Assembly of the switch complex and the export apparatus probably proceeds in the inward direction. In the outward direction protein subunits are added to the distal end of the growing structure [10–12].

The flagellar export system is one of the three types of protein secretory systems that have been described in bacteria [17]. The type I secretion system

\* Corresponding author. Fax: +52-5-616-2282;  
E-mail: gdreyfus@ifisiol.unam.mx

is a signal peptide-independent pathway that contains an ABC transporter or traffic ATPase [18]. The type II secretion or general secretory pathway (GSP) [19], involves the cleavage of a N-terminal signal sequence. The type III secretion pathway [17,20–22] is utilized by plant and mammalian pathogens for the export of virulence factors or pathogenic determinants. At least eight components of the virulence export pathway share homology with proteins involved in flagellar export, suggesting a common origin [23]. The export apparatus of the type III secretion pathway translocates target proteins that do not have a consensus amino-terminal signal sequence through the inner and outer membranes without cleavage of their amino termini. This system is probably organized as a macromolecular complex spanning both membranes. In the case of the flagellum, the flagellar structure itself constitutes the pathway of export. [3,8,9]. The export apparatus is thought to be located on the cytoplasmic face of the basal body at the base of the flagellum; it consists of several components, FlhA, FlhB, FliH, FliI, FliO, FliP, FliQ and FliR, some of which are integral membrane proteins [12–16].

The deduced amino acid sequence of FliI [14], one of the components of the flagellar export apparatus, shows similarity with that of the catalytic  $\beta$  subunit of the proton translocating  $F_0F_1$ -ATPase. The level of similarity is particularly high in those regions of the  $\beta$  subunit that conform the nucleotide binding site and catalytic center. Site-directed mutagenesis of residues in FliI that correspond to those that are essential for hydrolysis by the  $\beta$  subunit result in a non-flagellated phenotype [24], demonstrating that ATPase activity of FliI is essential for flagellar morphogenesis. Attempts to identify proteins that interact with FliI have so far been unsuccessful ([2] and references therein). It was our goal to determine if any of the targeted proteins interact in vitro with FliI, and if this interaction affects the ATPase activity.

We explored the interaction of a soluble overexpressed FliI with two of the major components of the flagellum, hook protein (FlgE) and flagellin (FliC), both of which are exported through the flagellar specific export apparatus.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains, plasmids and media

SJW1103 is a wild-type strain of *S. typhimurium* [26], and SJW880 is a polyhook mutant [27]. YK4178 is a *fliI*<sup>-</sup> strain [24]. MGT7 is an *E. coli* strain which contains a chromosomally encoded copy of T7 RNA polymerase [24]. Plasmid pIK2101 contains the complete *fliI* gene from *S. typhimurium* [24]. All cultures were grown in Luria broth (LB) containing ampicillin (200  $\mu$ g/ml).

### 2.2. Overexpression and purification of FliI

Plasmid pIK2101 was used to transform *E. coli* strain MGT7. Transformants were grown overnight at 37°C in 10 ml LB medium containing ampicillin. The overnight culture was used to inoculate 1 l of the same medium which was grown at 25°C to an OD<sub>600 nm</sub> of 0.6. At this point isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added to a final concentration of 1 mM, and growth was continued for another 6 h. Cells were harvested by centrifugation at 10 000  $\times$  g for 10 min, washed in 25 mM Hepes (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glycerol with 1 mM PMSF (buffer A), and resuspended in 40 ml of the same buffer. Induced cells were frozen and stored at -70°C. Frozen cells were thawed and disrupted by three passes through a French press at 6000 psi. The lysate was centrifuged at 17 500  $\times$  g for 15 min to pellet unlysed cells and inclusion bodies. DNase I (Sigma) at 10  $\mu$ g/ml and 5 mM MgCl<sub>2</sub> were added to the supernatant which was incubated on ice for 30 min. A saturated solution of ammonium sulfate, pH 7.3 (SAS) was slowly added to a final concentration of 20%, and the mixture incubated on ice with gentle agitation for 30 min. The suspension was centrifuged at 12 000  $\times$  g for 15 min and the pellet discarded. SAS was added to the supernatant (55% final concentration), and the solution incubated on ice for 30–60 min and centrifuged at 12 000  $\times$  g for 15 min. The pellet was resuspended in 10 ml of buffer A and dialyzed overnight in a Spectrapore 2 membrane against two changes of the same buffer.

The sample was centrifuged at 10 000  $\times$  g for 10 min to eliminate protein aggregates and applied to

a Cibacron Blue 3GA agarose column (Sigma) (22×1.5 cm) previously equilibrated with buffer A. A sample (25–35 mg protein in 8–10 ml) was loaded on the column and washed with 3–4 volumes of buffer A to remove unbound protein, and bound FliI eluted with a linear gradient of ATP (0–20 mM) in buffer A followed by a step of 2 M NaCl in buffer A. Fractions of 3.5 to 4 ml were collected. FliI eluted at the end of the ATP gradient in the NaCl step. Protein and ATP absorbance was followed at 240 and 320 nm respectively, the fractions were assayed for ATP hydrolysis, and analyzed by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE). The fractions containing active FliI were pooled and dialyzed against buffer A without NaCl, to remove excess NaCl. The sample was precipitated with SAS at a final concentration of 70%, incubated on ice for 30 min with gentle agitation, centrifuged at 12 000×g for 15 min, and the pellet resuspended and dialyzed overnight at 4°C against two changes of buffer A. This preparation was used in all subsequent studies.

### 2.3. Flagellin purification

Flagellin was purified from wild-type *S. typhimurium* SJW1103 by the following method. Cells were grown overnight with vigorous agitation in LB medium at 37°C, harvested by centrifugation at 12 000×g for 10 min, and resuspended in 10 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (buffer C). Filaments were detached by vigorous vortexing of 2-ml aliquots for 2 min. Whole cells were pelleted by low speed centrifugation at 12 000×g for 15 min and the supernatant further cleared by three successive centrifugations at the same speed. The supernatant was centrifuged at 60 000×g for 90 min, the pellet soaked on ice in buffer C overnight, and resuspended in the same buffer. This suspension was centrifuged at 8 000×g for 20 min to remove aggregated material and the supernatant centrifuged at 60 000×g for 60 min. The pellet was resuspended in the same buffer. This solution contained polymeric flagellin (i.e., flagellar filament) based on electron microscopy; it was stored at 4°C. To generate monomeric flagellin the solution was heated at 65°C for 5 min, and microcentrifuged for 1 min at full speed to remove aggregated material.

### 2.4. Hook protein purification

Hook protein was purified from a polyhook mutant, SJW880, following the method previously described by Aizawa et al. [28]. Cells were grown overnight in LB medium at 37°C with agitation, harvested by centrifugation at 10 000×g, resuspended in 10 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl containing protease inhibitor PMSF, and homogenized at maximum speed in a blender for 5 min to detach polyhooks from cells. The homogenate was centrifuged at 12 000×g for 15 min, and the supernatant containing the polyhooks was sedimented at 75 000×g for 90 min, washed by low speed centrifugation, resuspended in a buffer containing 1 M urea, 5 mM PO<sub>4</sub> (pH 7.0) and resedimented by centrifugation at 75 000×g for 90 min. The pellet was then resuspended in a small volume of 100 mM Tris (pH 8.0), 5 mM EDTA, and mixed with 13 ml of a 30% CsCl solution. After centrifugation at 55 000×g in a swinging bucket rotor for 19 h, a sharp band containing the polyhooks was formed. The band was collected and washed with 100 mM Tris (pH 8.0). This sample contained polymeric hook proteins as judged by electron microscopy. To generate monomeric hook protein, the solution was heated at 70°C for 5 min, and microcentrifuged at full speed for 1 min to remove aggregated material.

### 2.5. Immunoblotting and affinity blotting

Proteins were separated by SDS–PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (BioRad, Richmond, CA, USA) with a Hoefer SemiPhor apparatus. Membranes were blocked overnight at room temperature in Tris-buffered saline+0.1% (v/v) Tween-20 (TTBS) and 5% non-fat milk powder. For immunoblotting, these membranes were probed with the corresponding polyclonal antibody at a 1:10 000 dilution in TTBS solution containing 0.1% non-fat milk powder. Detection was performed using the ECL immunoblotting detection kit (Amersham International, Little Chalfont, UK) following manufacturers' recommendations.

For affinity blotting experiments, nitrocellulose membranes were incubated with purified FliI or purified flagellin (FliC) (0.05–0.1 mg/ml) in TTBS solution containing 0.1% milk. After 1 to 2 h mem-

anes were probed with anti-FliI or anti-FliC polyclonal antibodies at a 1:10000 dilution. Detection as performed as described for immunoblots. The purified proteins pepsin, cytochrome *c*, and ovalbumin were used to test for antibody cross-reactivity and non-specific interactions.

### 6. ATPase activity measurements

A modification of the malachite green ATPase assay of Lanzetta [29] as described by Eichelberg et al. [30] was used to measure ATP hydrolysis. The reaction mixture contained FliI and a buffer containing 50 mM Hepes (pH 8.0), 5 mM NaCl, 30 mM KCl, 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 10% glycerol, 0.5 mg/ml BSA (reaction mixture buffer). The reaction was started with the addition of 5 μM ATP (pH 7.0) and incubated at 30°C. At various time points 100-μl aliquots were removed and added to tubes containing 800 μl of freshly prepared malachite green–ammonium molybdate reagent (0.045% malachite green: 4.2% ammonium molybdate in 4 M HCl/0.1% Triton X-100 in a 3:1:0.02

ratio) at room temperature. After incubating the mixture for 1 min at room temperature, 100 μl of 34% citric acid was added to stop color development.

When assaying for activation of ATP hydrolysis by flagellin, hook protein or other proteins, experiments were done in the same manner except that the assay mixture plus protein was preincubated for 10 min at 30°C in the absence of ATP. When assaying for metal cation specificity of ATP hydrolysis by FliI, ATP concentration was held constant at 4 mM. 100 mM stock solutions of Mg(OAc)<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> and MnCl<sub>2</sub> were used. Experiments to test the reversibility of flagellin and FliI interaction were done in the same manner as activation experiments except that after preincubation, samples (0.2 ml) were drawn out and diluted fivefold (to 1 ml) with reaction mixture buffer and incubated at 30°C for 10 min, at which time 100-μl aliquots for the diluted sample, or 20 μl for the undiluted sample, were assayed for ATPase activity.

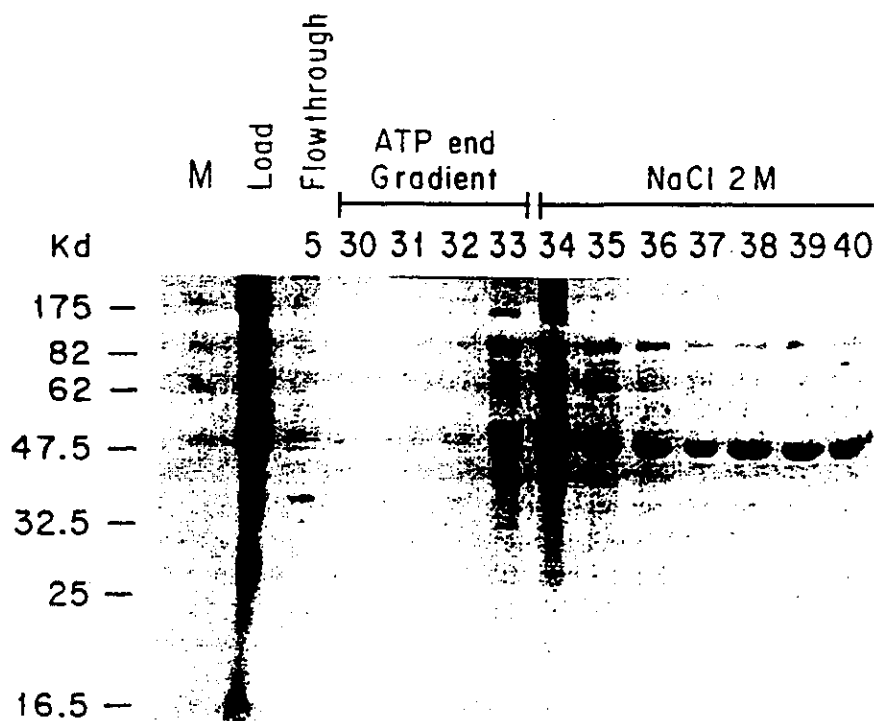


Fig. 1. Purification of wild-type overproduced FliI. Coomassie blue-stained SDS-PAGE (12.5%). Lanes were loaded with the same fraction volume (50 μl). M, molecular mass markers.

## 2.7. SDS-PAGE

Samples were prepared by methanol/chloroform precipitation. Sodium dodecyl sulfate 12.5% (w/v) polyacrylamide gels were run on a Mighty Small II apparatus (Hoefer, San Francisco, CA, USA). Gels were stained with Coomassie Brilliant blue.

Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid protein assay (BCA) (Pierce, Rockford, IL, USA), according to manufacturers' recommendations, or by TCA-Lowry [31].

## 3. Results

### 3.1. Overproduction and purification of FliI

The overproduction of functional wild-type FliI was carried out using plasmid pIK2101 which contains a wild-type *fliI* gene under the control of a T7 RNA polymerase promoter as described in Section 2. Fig. 1 shows the elution profile of FliI from a Cibacron blue column. The identification of this protein as FliI was confirmed by western blots using anti-FliI-specific antibodies (data not shown). The protein is ca. 85–90% pure as determined by SDS-PAGE and possesses an azide-insensitive,  $Mg^{2+}$ -dependent, ATPase activity of  $0.12 \text{ nmol } P_i \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ .

### 3.2. Interaction of FliI with flagellin and hook protein

In our interest to explore the role of FliI in the process of export, we looked by affinity blotting for possible physical interactions between FliI and proteins exported by this system. This assay has been previously used as direct proof of interaction between different proteins such as flagellar switch proteins FliM, FliN [33] as well as protein kinase C and its substrates [34]. The assay relies on the fact that one of the two potentially interacting proteins is denatured in SDS and partially renatured during transfer to the blotting membrane. We included a number of unrelated proteins as controls that allowed us to distinguish between specific interactions and artifacts. Flagellin (FliC) and hook protein (FliE) were chosen because they constitute the majority of the flagellar structure and are secreted by this system. Two sets of affinity blotting experiments were per-

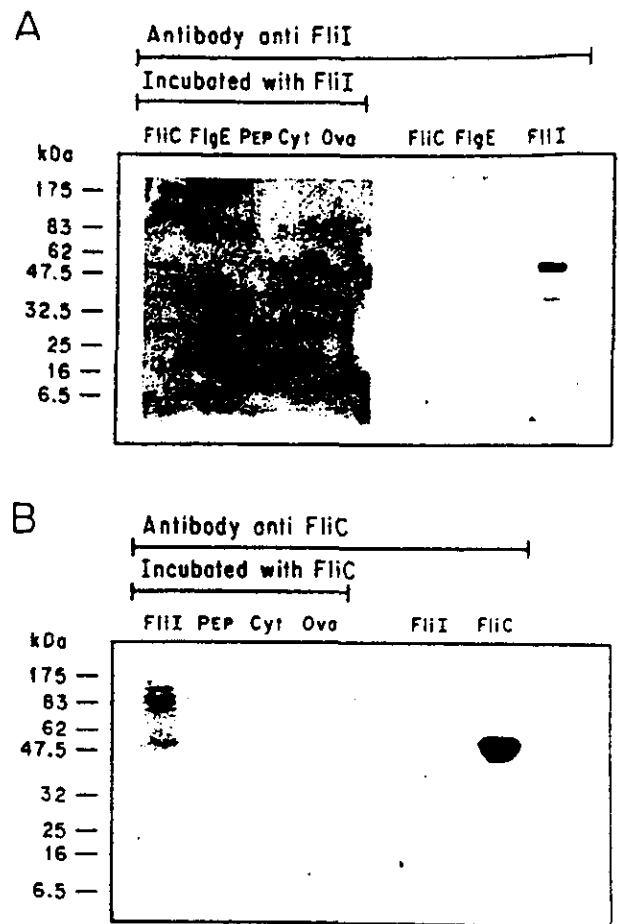


Fig. 2. Affinity blotting. Proteins: FliI, flagellin (FliC), hook protein (FliE), pepsin (Pep), cytochrome *c* (Cyt), and ovalbumin (Ova), were run in SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, incubated with FliI (0.1 mg/ml; A) or FliC (0.1 mg/ml; B), and probed with the corresponding antibodies (see Section 2). The right side of each panel shows that the antibodies are specific and do not cross-react.

formed. In the first (Fig. 2A) the interaction of FliI with various purified proteins was examined. Flagellin, hook protein, pepsin, cytochrome *c* and ovalbumin, were run in SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes, which were incubated with purified FliI (0.05–0.1 mg/ml in TTBS, 0.1% non-fat dry milk) for 1 h at room temperature. The membranes were then probed with anti-FliI antibody to detect binding of FliI to proteins immobilized on them. We found that FliI bound specifically to flagellin and hook protein. The antibody is specific for FliI and does not cross-react with flagellin or hook protein (right panel of Fig. 2A). Further experiments

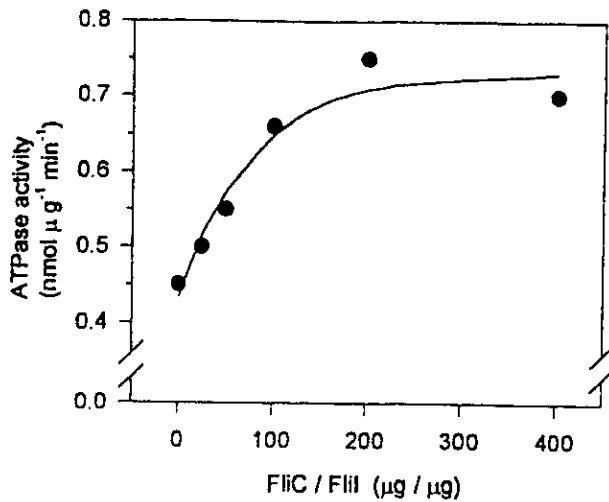


Fig. 3. Stimulation of ATPase activity of FliI as a function of flagellin (FliC) concentration. FliI (1 μg) was preincubated at 30°C with monomeric flagellin at the concentrations shown. ATPase activity was assayed for 15 min, and P<sub>i</sub> liberated, determined using the malachite green method (see Section 2). Molecular masses: FliI, 49.5 kDa; FliC, 49.0 kDa.

showed that flagellin bound only to FliI but not to pepsin, cytochrome *c* and ovalbumin (Fig. 2B). The anti-flagellin antibody does not cross react with FliI, as shown in the right panel of Fig. 2B. It is noted that three bands of molecular mass ca. 85 and 65 kDa, that co-purify with FliI, also bind flagellin. These proteins could be part of the export apparatus (e.g., FlhA, 75 kDa) or interact with it (e.g., FliF, 65 kDa). In order to rule out the possibility of nonspecific binding we carried out affinity blots using whole cell extracts of a *fliI*<sup>-</sup> strain (see Section 2). As expected, affinity blots did not show binding of flagellin to the blotted cell extract (data not shown).

### 3.3. Stimulation of ATP hydrolysis

Given that FliI interacts *in vitro* specifically with flagellin and hook protein, we explored if this interaction was reflected in the kinetic properties of the ATPase activity of FliI. Our initial data [32] showed that the ATPase activity of FliI was stimulated by the presence of flagellin. The concentration of flagellin required to produce maximal stimulation of ATPase activity was determined. Fig. 3 shows that as the molar ratio of flagellin to FliI was raised, the rate of ATP hydrolysis increased, reaching a plateau at a

molar ratio of 150:1. The same was observed for hook protein (data not shown).

Time-course assays of ATP hydrolysis were performed in the presence or absence of monomeric flagellin or hook protein. The two proteins stimulated ATP hydrolysis by FliI to a similar extent (Fig. 4A,B). Proteins unrelated to the flagellar system, namely lysozyme or bovine serum albumin, or polymeric structures of flagellin had no effect on the ATPase activity of FliI (data not shown).

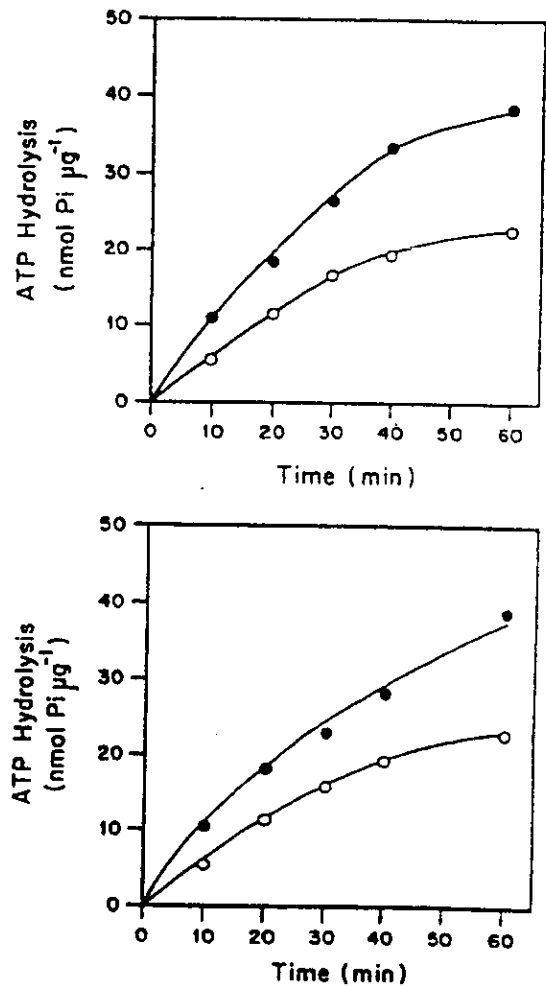


Fig. 4. Time course of stimulation of FliI ATPase activity by flagellin (FliC) or hook protein (FigE). FliI (1 μg) was preincubated at 30°C with monomeric flagellin (A) or hook protein (B) at a molar ratio of 100:1 (effector protein: FliI). After the addition of ATP, 100-μl aliquots were drawn out at different time intervals and assayed for ATPase activity using the malachite green method (see Section 2). (○) FliI, (●) FliC:FliI in A; (○) FliI, (●) FigE:FliI in B.

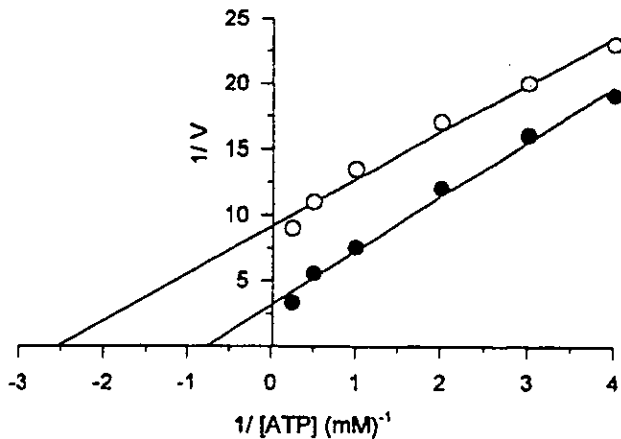


Fig. 5. Kinetic parameters of FliI ATP hydrolysis. Lineweaver-Burk plot for the hydrolysis of ATP in the presence (●) or absence (○) of FliC. ATPase activity was determined by measuring  $P_i$  liberated using the malachite green method (see Section 2).

#### 3.4. Effect of flagellin on the kinetics of ATPase activity of FliI

Lineweaver-Burk plots of ATPase activity of FliI with and without flagellin showed that the presence of flagellin increased  $V_{max}$  from  $0.12 \pm 0.03$  to  $0.35 \pm 0.015$   $\text{nmol } P_i \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ . Flagellin also increased the  $K_m$  for MgATP from  $0.35 \pm 0.04$  to  $1.2 \pm 0.09$  mM (see Fig. 5). In agreement with the work of Fan and Macnab using a His-tagged FliI [25], we found that wild-type FliI also requires  $Mg^{2+}$  for ATP hydrolysis both in the absence and in the presence of flagellin (data not shown).

A time course experiment showed that the stimulation of ATPase activity produced by flagellin and hook protein are not additive (Fig. 6). This could reflect a common site of interaction. An alternative way to test if FliI interacts with flagellin and hook protein through a single site is shown in Fig. 7. In this experiment hook protein and FliI were preincubated at a 50:1 molar ratio followed by addition of increasing amounts of either flagellin (filled circles) or lysozyme (open circles). ATPase activity was further stimulated when flagellin was the effector protein on top of the previously added hook protein; whereas when lysozyme is added ATPase activity remains at the stimulated level reached by the presence of hook protein alone. It should be pointed out that when flagellin is added to FliI at a molar ratio

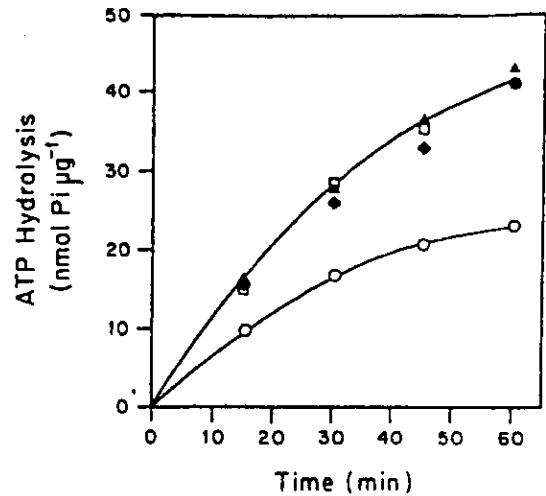


Fig. 6. Activation of flagellin and hook protein are not additive. FliI (1  $\mu\text{g}$ ) was preincubated with monomeric flagellin (FliC) and hook protein (FlgE) at  $30^\circ\text{C}$  at a molar ratio of 100:1 (effector protein: FliI). Assay was performed as in Fig. 4. (○) FliI, (□) FliC:FliI, (◆) FlgE:FliI, (▲) FlgE+FliC:FliI.

of 200:1 (Fig. 7, filled square), the level of stimulation of ATPase activity is equivalent to that reached when a combination of hook protein and flagellin are present (Fig. 7, filled circle).

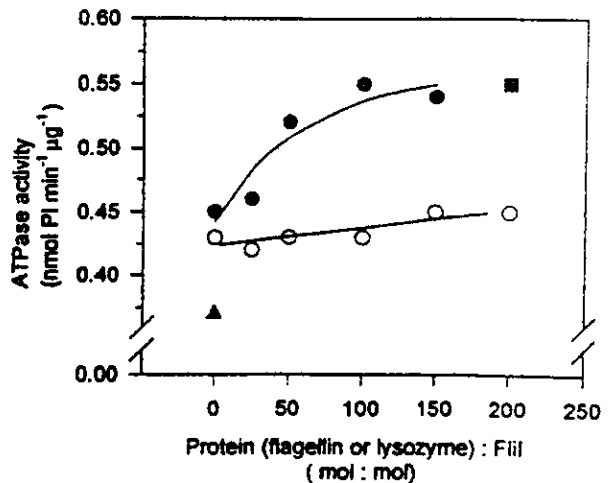


Fig. 7. Interaction of FliI with flagellin and hook protein. FliI (1  $\mu\text{g}$ ) was preincubated with hook protein in a 50:1 molar ratio (hook protein: FliI) to which increasing concentrations of flagellin (●) or lysozyme (○) were added. ATPase activity of FliI alone is shown (▲). ATPase activity of flagellin and FliI at a molar ratio of 200:1 (■).

Table 1  
Reversibility of the effect of flagellin on the ATPase activity of FliI<sup>a</sup>

	Initial velocity (nmol P <sub>i</sub> min <sup>-1</sup> μg <sup>-1</sup> )
FliI	0.5 ± 0.06
FliI (diluted 5X)	0.46 ± 0.06
FliI: FliC	0.88 ± 0.08
FliI: FliC (diluted 5X)	0.5 ± 0.04

<sup>a</sup>Mean value of six measurements.

### 3.5. Reversibility of the effect of flagellin on the ATPase activity of FliI

Dilution experiments to test the reversibility of the interaction between FliI and flagellin were performed. After the preincubation of flagellin and FliI at a 200:1 molar ratio in a volume of 0.6 ml (see Section 2), a sample of 0.2 ml was diluted to a final volume of 1 ml. The initial velocity of the undiluted and diluted samples was determined. Table 1 shows that the ATPase activity of the diluted flagellin:FliI sample is equivalent to that of FliI alone.

## 4. Discussion

The flagellar morphogenetic pathway of *S. typhimurium* has been studied extensively (see [2,3] for reviews). Nevertheless the process by which many flagellar proteins are translocated from the cytosol to the distant end of the growing structure is not understood. Several proteins encoded by flagellar genes are thought to be implicated (FliA, FliB, FliH, FliI, FliO, FliP, FliQ, FliR) [11–16]. One of these, FliI, is similar to the catalytic subunit of the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase and also to one of the proteins of the type III secretion system [14,24]. This protein has been identified in many diverse bacterial species such as *Bacillus subtilis* [35], *Caulobacter crescentus* [41], the spirochete *Borrelia burgdorferi* [36], and the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* [37,38]. The role of FliI in the export process is not clearly understood; it could be as an energy-supplying component of the export apparatus or as a chaperone-like protein to maintain the secreted protein in a conformation that allows it to be exported. Initial studies [24], did not find that FliI exhibited ATPase activity. In these experiments FliI was obtained from

inclusion bodies and treated with denaturants. Therefore it is possible that FliI did not fold to the correct catalytic active conformation. Using a soluble fraction of wild-type overproduced FliI, we have observed ATPase activity (unpublished results). On the other hand, a recent study has shown that a His-tagged version of FliI shows ATPase activity and is fully functional in complementation tests [25].

FliI may have a role similar to that of SecA of the general secretory pathway, since both of them hydrolyze ATP [25,39,40] and interact with secretion substrates. SecA recognizes the N-terminal signal peptide of the polypeptides to be secreted while the proteins are still being translated. The secretion signal in type III secretion substrates is not yet fully identified, although a common motif in all flagellar axial proteins is thought to be located at the N-terminal domain [7]. Our observation that FliI can directly bind two of these export substrates is consistent with a SecA-like function of this flagellar ATPase. Using affinity blotting experiments, we found that there is a specific physical interaction between FliI and flagellin or hook protein. Moreover, we suggest that flagellin and hook protein interact with the same site in FliI given that maximal ATP hydrolysis of FliI is reached with either a combination of hook protein and flagellin or only flagellin.

In the general secretory pathway, the SecA-substrate complex, often together with other components of this system, interact with the secretory pore, and at this point ATP hydrolysis drives partial insertion of the substrate into the membrane, and allows SecA to retract from it. FliI has been localized both in the membrane and cytosolic fractions [24,41]. Our observations that ATP hydrolysis of FliI is stimulated by the presence of secretion substrates (flagellin and hook protein) is consistent with an active role of FliI during the protein export process. It should be noted that flagellin and hook protein are needed in considerable excess over FliI in order to stimulate ATP hydrolysis, perhaps indicating that it requires the rest of the export apparatus, including its membrane-bound components for optimal interaction with the secreted proteins. Regarding the events that lead to the stimulation of the ATPase activity of FliI by flagellin it might be mechanistically important that the N-terminal domain has been implicated in the interaction of FliI with other flagellar



components [25]. Purified N-terminal His-tagged FliI of Frank Fan and Robert Macnab) does not inhibit FliC stimulation of ATPase activity (data not shown). This may indicate that the wild-type form of FliI that we used in this work contains minute amounts of other components of the export apparatus (see Fig. 2B).

Fan and Macnab [25] have described the kinetic properties of the His-tagged version of FliI, and calculated a  $V_{\max}$  of  $0.2 \text{ nmol P}_i \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ . With this value they conclude that such an ATPase activity can sustain protein export through the assembly process. In this work, using wild-type FliI, we calculated similar kinetic values; a  $V_{\max}$  of  $0.12 \text{ nmol P}_i \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  and a  $K_m$  for MgATP of  $0.3 \text{ mM}$ , as well as a similar cation requirement. It should be noted that wild-type cells under normal conditions are continually regenerating their flagellar filaments, thus flagellin is exported constantly at rates that could demand a higher turnover number of ATP hydrolysis. Our observation that in the presence of flagellin the  $V_{\max}$  of ATP hydrolysis is increased from  $0.12$  to  $0.35 \text{ nmol P}_i \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  would be consistent with a higher energy demand during active protein translocation by the export apparatus.

The results shown in this study demonstrate that FliI interacts in vitro specifically with two proteins, flagellin and hook protein, that have to be secreted during the assembly process. This interaction leads to a reversible stimulation of the catalytic activity, further suggesting a direct link between ATP hydrolysis and the flagellar export process.

#### Acknowledgements

The authors wish to thank Teresa Ballado and F. Javier De la Mora for their valuable technical assistance; Armando Gomez Puyou and Mark West for helpful discussions and for critically reading the manuscript; Shin-Ichi Aizawa for strain SJW880 and for his valuable help for the purification of hook protein (FlgE); Fan Fan for sharing his results before publication and for helpful discussions; and Bob Macnab for helpful discussions throughout this project and for helpful comments on this manuscript. Part of this work was presented at the 5th Bacterial Locomotion and Signal Transduction Meeting

(BLAST V), January 1999. This work was funded partially by Grant No. 3290P-N9607 from CONA-CyT and Grant IN204595 from DGAPA.

#### References

- [1] D.F. Blair, How bacteria swim, *Annu. Rev. Microbiol.* 49 (1995) 489–522.
- [2] R.M. Macnab, Flagella and motility, in: F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low Jr., B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger (Eds.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed., ASM Press, Washington, DC, 1996, pp. 123–145.
- [3] K. Namba, F. Vonderviszt, Molecular architecture of bacterial flagellum, *Q. Rev. Biophys.* 30 (1997) 1–165.
- [4] C.J. Jones, M. Homma, R.M. Macnab, L-, P- and M-ring proteins of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*: gene sequences and deduced protein sequences, *J. Bacteriol.* 171 (1989) 3890–3900.
- [5] G.J. Schoenhals, R.M. Macnab, Physiological and biochemical analyses of FlgH, a lipoprotein forming the outer membrane ring of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 4200–4207.
- [6] M. Homma, D.J. DeRosier, R.M. Macnab, Flagellar hook and hook-associated proteins of *Salmonella typhimurium* and their relationship to other axial components of the flagellum, *J. Mol. Biol.* 213 (1990) 819–832.
- [7] G. Kuwajima, I. Kawagishi, M. Homma, J.-I. Asaka, E. Kondo, R.M. Macnab, Export of an N-terminal fragment of *Escherichia coli* flagellin by flagellum specific pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 4953–4957.
- [8] K. Namba, I. Yamashita, F. Vonderviszt, Structure of the core and central channel of bacterial flagella, *Nature* 342 (1989) 648–654.
- [9] T. Ruiz, N.R. Francis, D.G. Morgan, D.J. DeRosier, The size of the export channel in the flagellar filament of *Salmonella typhimurium*, *Ultramicroscopy* 49 (1993) 417–425.
- [10] T. Iino, Polarity of flagellar growth in *Salmonella*, *J. Gen. Microbiol.* 56 (1969) 227–239.
- [11] T. Kubori, N. Shimamoto, S. Yamaguchi, K. Namba, S.-I. Aizawa, Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*, *J. Mol. Biol.* 226 (1992) 433–446.
- [12] T. Suzuki, T. Iino, T. Horiguchi, S. Yamaguchi, Incomplete flagellar structures in nonflagellate mutants of *Salmonella typhimurium*, *J. Bacteriol.* 133 (1978) 904–915.
- [13] C.J. Jones, R.M. Macnab, Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*: analysis with temperature-sensitive mutants, *J. Bacteriol.* 172 (1990) 1327–1339.
- [14] A.P. Vogler, M. Homma, V.M. Irikura, R.M. Macnab, *Salmonella typhimurium* mutants defective in flagellar filament regrowth and sequence similarity of FliI to  $F_0F_1$  vacuolar and archaeobacterial ATPase subunits J, *Bacteriol.* 173 (1991) 3564–3572.

- [15] F. Fan, K. Ohnishi, N.R. Francis, R.M. Macnab, The FliP and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*, putative components of the type III flagellar export apparatus, are located in the flagellar basal body, *Mol. Microbiol.* 26 (1997) 1035–1046.
- [16] K. Ohnishi, F. Fan, G.J. Schoenhals, M. Kihara, R.M. Macnab, The FliO, FliP, FliP, and FliR proteins of *Salmonella typhimurium* putative components for flagellar assembly, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 6092–6099.
- [17] G.P.C. Salmund, P.J. Reeves, Membrane traffic wardens and protein secretion in gram-negative bacteria, *Trends Biochem. Sci.* 18 (1993) 7–12.
- [18] I. B. Holland, M.A. Blight, B. Kenny, The mechanism of secretion of hemolysin and other polypeptides from Gram-negative bacteria, *J. Bioenerg. Biomemb.* 22 (1990) 473–491.
- [19] A.P. Pugsley, The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria, *Microbiol. Rev.* 57 (1993) 50–108.
- [20] J.E. Galán, J.B. Bliska, Cross-talk between bacterial pathogens and their host cells, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 12 (1996) 221–255.
- [21] C.M. Collazo, J.E. Galán, The invasion-associated type III protein secretion system in *Salmonella* – a review, *Gene* 192 (1997) 51–59.
- [22] T. Kubori, Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. Lara-Tejero, A. Sukhan, J.E. Galán, S.-I. Aizawa, Supramolecular structure of *Salmonella typhimurium* Type III protein secretion system, *Science* 280 (1998) 602–605.
- [23] F. Van Gijsegem, C. Gough, C. Zischek, E. Niqueux, M. Arlat, S. Genin, P. Barberis, S. German, P. Castello, C. Boucher, The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solaeacearum* which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of bacterial flagellar biogenesis complex, *Mol. Microbiol.* 15 (1995) 1095–1114.
- [24] G. Dreyfus, A.W. Williams, I. Kawagishi, R.M. Macnab, Genetic and biochemical analysis of *Salmonella typhimurium* FliI. A flagellar protein related to the catalytic subunit of the  $F_0F_1$  ATPase and to virulence proteins of mammalian and plant pathogens, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 3131–3138.
- [25] F. Fan, R.M. Macnab, Enzymatic characterization of FliI. An ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 31981–31988.
- [26] S. Yamaguchi, H. Fujita, T. Taira, K. Kutsukake, M. Homma, T. Iino, Genetic analysis of three additional *fla* genes in *Salmonella typhimurium*, *J. Gen. Microbiol.* 130 (1984) 3339–3342.
- [27] J. Patterson-Delafield, R.J. Martinez, B.A.D. Stocker, S. Yamaguchi, A new *fla* gene in *Salmonella typhimurium* – *flaR* – and its mutant phenotype – superhooks, *Arch. Microbiol.* 90 (1973) 107–120.
- [28] S.-I. Aizawa, S. Kato, S. Asakura, H. Kagawa, S. Yamaguchi, In vitro polymerization of polyhook protein from *Salmonella* SJW880, *Biochim. Biophys. Acta* 625 (1980) 291–303.
- [29] P.A. Lanzetta, L.J. Alvarez, P.S. Reinach, O.A. Candia, An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate, *Anal. Biochem.* 100 (1979) 95–97.
- [30] K. Eichelberg, C.C. Ginocchio, J.E. Galán, Molecular and functional characterization of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invB* and *invC*: homology of *InvC* to the  $F_0F_1$  ATPase family of Proteins, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 4501–4510.
- [31] G.L. Peterson, A simplification on the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable, *Anal. Biochem.* 87 (1977) 386–396.
- [32] E. Silva-Herzog, G. Dreyfus, 1Vth BLAST Meeting, Cuernavaca, Mexico, 1997.
- [33] S.A. Toker, R.M. Macnab, Distinct regions of bacterial flagellar switch protein FliM interact with FliG, FliN, and CheY, *J. Mol. Biol.* 273 (1997) 623–634.
- [34] M. Robles-Flores, J.A. García-Sáinz, Immunological Cross-reactivity of G-Protein  $\beta$  subunit and receptors for activated C-kinase, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34 (1994) 465–473.
- [35] A.M. Albertini, T. Caramori, W.D. Crabb, F. Scoffone, A. Galizzi, The *flaA* locus *Bacillus subtilis* is part of a large operon coding for flagellar structures, motility functions and an ATPase-like polypeptide, *J. Bacteriol.* 173 (1991) 3573–3579.
- [36] Y. Ge, I. Old, I.S. Girons, D.B. Yelton, N.W. Charon, FliH and FliI of *Borrelia burgdorferi* are similar to flagellar and virulence factor export proteins of other bacteria, *Gene* 168 (1996) 73–75.
- [37] T. Ballado, A. Campos, L. Camarena, G. Dreyfus, Flagellar genes from *Rhodobacter sphaeroides* are homologous to genes of the *fliF* operon of *Salmonella typhimurium* and to the type-III secretion system, *Gene* 170 (1996) 69–72.
- [38] I.G. Goodfellow, C.E. Pollit, R.E. Sockett, Cloning of the *fliI* gene from *Rhodobacter sphaeroides* WS8 by analysis of a transposon mutant with impaired motility, *FEMS Lett.* 142 (1996) 111–116.
- [39] R. Lill, W. Dowhan, W. Wickner, The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY and the leader and mature domains of precursor proteins, *Cell* 60 (1990) 271–280.
- [40] R. Lill, K. Cunningham, L.A. Brundage, K. Ito, D. Oliver, W. Wickner, SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of *Escherichia coli*, *EMBO J.* 8 (1989) 961–966.
- [41] C. Stephens, C. Mohr, C. Boyd, J. Maddock, J. Gober, L. Shaprio, Identification of the *fliI* and *fliJ* components of the *Caulobacter* flagellar type III protein secretion system, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 5355–5365.

## VII. Referencias

- Aizawa, S-I, & T. Kubori, (1998). Bacterial flagellation and cell division. *Genes to Cells* 3: 624-634
- Aizawa, S-I., S. Kato, S. Asakura, H. Kagawa, & S. Yamaguchi, (1980). In vitro polymerization of polyhook protein from *Salmonella* SJW88. *Biochim. Biophys. Acta* 625: 291-303
- Agarawal, S., D.W. Hunnicutt, M.J. McBride, (1997). Cloning and characterization of *Flavobacterium johnsoniae* (*Cytophaga johnsonae*) gliding motility gene, *gldA*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12139-12144
- Armitage, J.P. (1992). Bacterial motility and chemotaxis. *Sci. Progress Oxford* 76:451-477
- Berg, H. C. & D.A. Brown, (1972). Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature* 239: 500-504
- Berg, H., (1993). Torque generated by the flagellar motor. *Biophysics J.* 65:2201-16
- Bienmann, H.P. & D.E. Koshland Jr., (1994). Aspartate receptors of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* bind ligand with negative and half-of-the-sites cooperativity. *Biochemistry* 33: 629-634
- Blair, D.F. & H.C. Berg, (1988). Restoration of torque flagellar motors. *Science* 242: 1678-1681

Blair, D.F. & H.C. Berg ,(1990). The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor. *Cell* 60: 439-449

Blair, D.F., & S.K. Dutcher, (1992). Flagella in prokaaryotes and lower eucaryotes. *Curr. Op. Genet. and Develop.* 2: 756-767

Bren, A., & M. Eisenbach, (1998). The N-terminus of the flagellar switch protein FliM, is the binding domain of the chemotactic response regulator , CheY. *J. Mol. Biol.* 278: 507-514

Chilcott, G. S. & K.T. Hughes, (1998). The type III secretion determinants of the flagellar anti-transcription factor, FlgM, extend from the amino-terminus into the anti- $\sigma^{28}$  domain. *Mol. Microbiol.* 30:1029-1040

Chun,S.Y. & S. Parkinson, (1988). Bacterial motility: membrane topology of the *Escherichia coli* Mot B protein. *Science* 239, 276-278

DeRosier, D.J. ,(1998). The turn of the screw: the bacterial flagellar motor. *Cell* 93: 17-20

Dean, G.E. , R. M. Macnab, J. Stader, P. Matsumura, & C. Burke, (1984). Gene sequence and predicted amino acid sequence of the MotA protein, a membrane associated protein required for flagellaar rotation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 159: 991-999

Dreyfus,G. , A. W. Williams, I. Kawagishi, & R.M. Macnab, (1993). Genetic and biochemical analysis of *Salmonella typhimurium* FliI, a flagellar protein related to the catalytic subunit of the  $F_0F_1$  ATPase and to virulence proteins of mammalian and plant pathogens. *J. Bacteriol.* 175: 3131-3138

Eichelberg, K., C.C. Ginocchio, & J.E. Galán, (1994). Molecular and functional characterization of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invB* and *invC* : homology of InvC to the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase family of proteins. *J. Bacteriol.* 176: 4501-4510

Fan F., & R.M. Macnab, (1996). Enzymatic characterization of FliI. *J. Biol. Chem.* 271: 31981-3988

Fath, M.J. & R. Kolter, (1993). ABC Transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev.* 57:945-1017

Francis, N.R., V.M. Irikura, S. Yamaguchi, D. J. DeRosier, & R.M. Macnab, (1992). Localization of the *Salmonella typhimurium* flagellar switch protein to the cytoplasmic M-ring face of the basal body . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6304-6308

Garcia-Pichel, F. , (1989). Rapid bacterial swimming measured in swarming cells of *Thiovulum majus*. *J. Bacteriol.* 171: 3560-3563

Gillen, K.L. & K.T. Hughes, (1991). Negative regulatory loci coupling flagellin synthesis to flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 173: 2301-2310

Harayama, S., (1977). Phototaxis and membrane potential in photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* 145,35-42

Hazelbauer, G. L., (1992). Bacterial chemoreceptors. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 505-510

Hess, J.F., K. Oosawa, N. Kaplan & M.I. Simon, (1988). Phosphorylation of three proteins in the signaling pathways of bacterial chemotaxis. *Cell* 53: 79-87

Higgins, C.F., (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8: 67-113

Hoch, J.A. & T. J. Silhavy eds., (1995). Two component Signal transduction. ASM Press. Washington D.C.

Homma, M., Kutsukake, K. & T. Iino, (1985). Structural genes for flagellar hook-associated proteins in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 163: 464-471

Homma, M., D.J. DeRosier, & R.M. Macnab, (1990). Flagellar hook and hook associated proteins of *Salmonella typhimurium* and their relationship to other axial components of the flagellum. *J. Mol. Biol.* 213: 819-832

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

Hughes, K.T, K. Gillen, M. Semon, J. Karlinsey, (1993). Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* 262: 1277-1280

Ingolia, T.D., & D. E., Koshland, (1979). Response to a metal ion-citrate complex in bacterial sensing. *J. Bacteriol.* 140: 798-804

Jones, C.J. & R.M. Macnab, (1990). Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*: analysis with temperature-sensitive mutants. *J. Bacteriol.* 172: 1327-1339

Karlinsey, J. E., T. Ho-Ching, M.E. Winkler, & K.T. Hughes, (1998). Flk couples *flgM* translation to flagellar ring assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 180: 5384-5397

Kelly-Wintenberg, K., & T.C. Montie, (1989). Cloning and expression of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171: 6357-6362

Kubori T., N. Shimamoto, S. Yamaguchi, K. Namba, & S-I. Aizawa, (1992). Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* 226: 433-446

- Kubori, T., Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. Lara-Tejero, A. Sukhan, J. Galán, & S-I. Aizawa, (1998). Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 280: 602-605
- Kutsukake, K., (1997). Autogenous and global control of the flagellar master operon, *flhDC*, in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* 254: 440-448
- Kutsukake, K. & T. Iino, (1994). Role of the FliA-FlgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 176: 3598-3605
- Kutsukake, K., Y. Ohya, & T. Iino, (1990). Transcriptional analysis of the flagellar regulon in *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* 172: 741-747
- Kuwajima, G., I. Kawagishi, M. Homma, J. Asaka, E. Kondo & R.M. Macnab, (1989). Export of an N-terminal fragment of *Escherichia coli* flagellin by a flagellum specific pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4953-4957
- Laemmli, U.K. ,(1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lanzetta, P.A., L.J. Alvarez, P.S. Reinach, & O.A. Candia, (1979). An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* 100: 95-97
- Larsen, S. H., J. Adler, J.J Gargus, & R.W. Hogg, (1974). Chemomechanical coupling without ATP: the source of energy for motility and chemotaxis in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 1239-1243
- Lazlo, D.J. & B.L. Taylor , (1981). Aerotaxis in *Salmonella typhimurium*: role of electron transport. *J. Bacteriol.* 145, 990-1001
- Levit, M.N. ,Y.Liu, & J.B. Stock, (1998). Stimulus response coupling in bacterial chemotaxis: receptor dimers in signalling arrays. *Mol. Microbiol.* 30, 459-466

- Liu, X., & P. Matsumura, (1994). The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J. Bacteriol.* 176: 7345-7351
- Liu, J. & J.S. Parkinson, (1989). Role of CheW protein in coupling membrane receptors to the intracellular signalling system of bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8703-8707
- Lupas, A. & J. Stock, (1989). Phosphorilation of an N-terminal regulatory domain activates the CheB methylesterase in bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 264: 17337-17342
- Lynch, B.A. & D.E. Koshland, Jr., (1991). Disulfide cross-linking studies of the transmembrane regions of the aspartate sensory receptor of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10402-10406
- Macnab, R. M. & D. E., Koshland, (1972). The gradient- sensing mechanism in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2509-2512
- Macnab, R. M., (1992). Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu. Rev. Genet.* 26: 131-158
- Macnab, R.M., (1996). Flagella and motility. En *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. 2nd Edition. Neidhart, F.C. , J.C. Ingraham, J.C. Low , B. Magazanik, M. Schaechter, M. & H.E. Umbarger eds. Washington D. C. American Society for Microbiology Press
- Macnab, R.M., (1987). Comunicación personal.
- Madock, J. R. & L. Shapiro, (1996). Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science* 259:1717-1723
- Minamino, T. & R.M. Macnab, (1999). Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J. Bacteriol.* 181: 1388-1394



Morgan, D. G., R.M. Macnab, N.R. Francis, & D.J. DeRosier, (1993). Domain organization of the subunit of the *Salmonella typhimurium* flagellar hook. *J. Mol. Biol.* 229: 79:84

Morgan, D.G., C. Owen, C., L.A. Melanson, & D. J. DeRosier, (1995). Structure of the bacterial flagellar filaments at 11 Å resolution: packing of the  $\alpha$ -helices. *J. Mol. Biol.* 249: 88-110

Namba, K., I. Yamashita, & F. Vonderviszt, (1989). Structure of the core and central channel of bacterial flagella. *Nature* 342: 648-654

Namba, K., & F. Vonderviszt, (1997). Molecular architecture of bacterial flagellum. *Quart. Rev. Bioph.* 30: 1-65

Ninfa, A.J., E.G. Ninfa, A.N. Lupas, A. Stock, B. Magasanik, & J. Stock, (1988). Cross-talk between bacterial chemotaxis signal transduction proteins and the regulators of transcription of the Ntr regulon: evidence that nitrogen assimilation and chemotaxis are controlled by a common phosphotransfer mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5492-5496

Ohnishi, K., K. Kutsukake, H. Suzuki & T. Iino, (1992). A novel transcriptional regulatory mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium* : an anti-sigma factor inhibits the activity of the flagellum specific sigma factor  $\sigma^{28}$ . *Mol. Microbiol.* 6: 3149-3157

Ohnishi, K., F. Fan, F.J. Schoenhals, M. Kihara, & R. M. Macnab, (1997). The FliO, FliP, FliQ and FliR proteins of *Salmonella typhimurium* : putative components for flagellar assembly. *J. Bacteriol.* 179: 6092-6099

Pakula, A. A. & M.I. Simon, (1992). Determination of transmembrane protein structure by disulfide cross-linking: the *Escherichia coli* Tar receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4144-4148

Parsonage, D., S. Wilke-Mounts, & A.E. Senior, (1987). Directed mutagenesis of the  $\beta$  subunit of  $F_1$  ATPase from *Escherichia coli*. *J.Biol. Chem.* 262: 8022-8026

Patterson-Delafield, J. R.J. Martinez, B.A.D. Stocker, S. Yamaguchi, (1973). A new *fla* gene in *Salmonella typhimurium* – *flaR*- and its mutant phenotype – superhooks. *Arch. Microbiol.* 90: 107-120

Peterson, G.L., (1977). A simplification on the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 87: 386-396

Pugsley, A.P., (1993). The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 50-108

Robles-Flores, M. & J.A. García-Sáinz, (1994). Immunological cross-reactivity of G-protein  $\beta$  subunit and receptors for activated C-kinase. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34: 465-473

Ruiz, T., N. Francis, D.G. Morgan, & D.J. DeRosier, (1993). Size of the export channel in the flagellar filament of *Salmonella typhimurium*. *Ultramicroscopy.* 48: 417-425

Sanders, D.A., B.L. Gillece-Castro, A.M. Stock, A.L. Burlinane, & D.E. Koshland Jr., (1989). Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. *J. Biol. Chem.* 264: 21770-21778

Schmid, D., A. Baici, H. Gehring, P. Christen, (1994). Kinetics of molecular chaperone action. *Science* 263: 971-973

Simms, S. A., A. M. Stock & J. B. Stock, (1987). Purification and characterization of the S-adenosylmethionine:glutamyl methyltransferase that modifies membrane chemoreceptor proteins in bacteria. *J. Biol. Chem.* 262: 8537-8543

Sockett, H., S. Yamaguchi, M. Kihara, V.M. Irikura, & R.M. Macnab, (1992). Molecular analysis of the flagellar switch protein FliM of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 174: 793-806

Sosinsky, G.E., N.R. Francis, M.J.B. Stallmeyer, & D.J. DeRosier, (1992). Substructure of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* 223: 171-184

Springer, M. S., M.F. Goy, & J. Adler, (1977). Sensory transduction in *Escherichia coli*: two complementary pathways of information processing that involve methylated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3312-3316

Stephens, C., C. Mohr, C. Boyd, J. Maddock, J. Gober, L. Shapiro, (1997). Identification of the *fliI* and *fliJ* components of the *Caulobacter* flagellar type III protein secretion system. *J. Bacteriol.* 179: 5355-5365

Stock, J. B. & D.E. Koshland Jr., (1978). A protein methyltransferase involved in bacterial sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3659-3663

Stock, A., T. Chen, D. Welsh, & J. Stock, (1988). CheA protein, a central regulator of bacterial chemotaxis, belongs to a family of proteins that control gene expression in response to changing environmental conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1403-1407

Stock, A., D.E. Koshland Jr., & J. Stock, (1985). Homologies between the *Salmonella typhimurium* CheY protein and proteins involved in the regulation of chemotaxis, membrane protein synthesis, and sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7989-7993

Stock, J. & M.G. Surette, (1996). Chemotaxis. En *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. 2nd Edition. Neidhart, F.C., J.C. Ingraham, J.C. Low, B. Magazanik, M. Schaechter, M. & H.E. Umbarger eds. Washington D. C. American Society for Microbiology Press

Suzuki, T., T. Iino, T. Horiguchi, & S. Yamaguchi, (1978). Incomplete flagellar structures in nonflagellate mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 133: 904-915

Swanson, R.V., R.B. Bourret, & M.I. Simon, (1993). Intermolecular complementation of the kinase activity of CheA. *Mol. Microbiol.* 8: 435-441

Taylor, B.L. & I.B. Zhulin, (1998). In search of higher energy: metabolism-dependent behavior in bacteria. *Mol. Microbiol.* 28: 683-690

Taylor, B.L., (1983). Role of the proton motive force in sensory transduction in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 37, 551-573

Tocker, A.S. & R.M. Macnab, (1997). Distinct regions of bacterial flagellar switch protein FliM interact with FliG, FliN and CheY. *J. Mol. Biol.* 273: 623-634

Tso, W.W. & J. Adler, (1974). Negative chemotaxis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 118, 60-63

Van Gijsegem, F., C. Gough, C. Zischek, E. Niqueux, M. Arlat, S. Genin, P. Barberis, S. German, P. Castello & C. Boucher, (1995). The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Mol. Microbiol.* 15: 1095-1114

Vogler, A. P., M. Homma, V.M. Irikura, & R.M. Macnab, (1991). *Salmonella typhimurium* mutants defective in flagellar filament growth and sequence similarity of FliI to F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>, vacuolar, and archaebacteria ATPase subunits. *J. Bacteriol.* 173: 3564-3572

Vondervitz, F., R. Ishima, K. Akasaka, & S-I. Aizawa, (1992). Terminal disorder: a common structural feature of the axial proteins of bacterial flagellum? *J. Mol. Biol.* 226: 575-579

Vondervitz, F., P. Zavodszky, M. Ishimura, H. Uedaira, & K. Namba, (1995). Structural organization and assembly of flagellar hook protein from *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* 251: 520-532

Vonderviszt, F., K. Imada, Y. Furukawa, H. Uedaira, H. Taniguchi, & K. Namba, (1998). Mechanism of self-association and filament capping by flagellar HAP2. *J. Mol. Biol.* 284: 1399-1416

Welch, M., K. Oosawa, S.-I. Aizawa, & M. Eisenbach, (1993). Phosphorylation dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8787-8793

Weibull, C. (1960) Movement. En *Bacteria*. ASM Press. Washington D.C.

Whitby, F. G., S.A. Lloyd, D.F. Blair, C.P. Hill, (1999). X-ray crystal structure of the C-terminal domain of FliG. BLAST IV 1999

Williams, A. (1987) Comunicación personal.

Yamaguchi, S., H. Fujita, T. Taira, K. Kutsukake, M. Homma, T. Iino, (1984). Genetic analysis of three additional *fla* genes in *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* 130: 3339-3342

Yeh, J.I., H.P. Bienmann, J. Pandit, D.E. Koshland Jr. & S.-H. Kim, (1993). The three-dimensional structure of ligand-binding domain of a wild-type bacterial chemotaxis receptor. *J. Biol. Chem.* 268: 9787-9792