



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Análisis genético y bioquímico de la muramidasa flagelar
de *Rhodobacter sphaeroides***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I O L O G O
P R E S E N T A:**

Manuel Osorio Valeriano



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Georges Dreyfus Cortés**

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Índice.

AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
El flagelo bacteriano	5
Filamento	7
Gancho	11
Cuerpo Basal	13
Motor	14
Anillos	15
Aparato de exportación	16
Eje	19
Vía de secreción Sec	20
Secuencia o péptido señal	22
Pared celular de peptidoglicano	23
Transglicosilasas líticas	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	34
RESULTADOS	43
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	59
PERSPECTIVAS	60
REFERENCIAS	62
ANEXOS	70

Agradecimientos.

- El presente trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Georges Dreyfus Cortés en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Agradezco al Dr. Francisco Javier de la Mora Bravo por su estrecha colaboración a lo largo de todo el trabajo y a la Q. F. B. Teresa Ballado Nava por su asesoría técnica.
- A los miembros de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por su ayuda con la secuenciación del ADN utilizado en este trabajo.
- A la Unidad del taller de mantenimiento del Instituto de Fisiología Celular, Ing. Aurey Galván e Ing. Manuel Ortíz por la reparación y mantenimiento de los equipos utilizados en este trabajo.
- A la Biblioteca del Instituto de Fisiología Celular, en particular a la M. en C. Sandra Moncada.
- Agradezco a los miembros del jurado por la revisión de esta tesis, los doctores: Georges Dreyfus Cortés, Rosa Laura Camarena Mejía, Bertha González Pedrajo, Antonio Eusebio Lazcano Araujo y Diego González Halphen.
- Agradezco a la DGAPA por la beca que me otorgó para la elaboración de esta tesis, (donativo de PAPIIT IN206811).
- Este trabajo fue apoyado por el CONACyT con el donativo 106081 y por la DGAPA con el donativo PAPIIT IN206811-3.

Resumen.

El flagelo bacteriano es un complejo macromolecular formado aproximadamente por 30 proteínas, el cual le permite a un amplio número de especies bacterianas desplazarse en medio líquido (swimming) o sobre superficies semisólidas (swarming). El flagelo se extiende desde la cara interna de la membrana citoplasmática hacia el exterior de la célula y su ensamblaje procede de manera orquestada desde las estructuras proximales hacia las distales. Durante la formación del flagelo, la pared de peptidoglicano debe ser degradada para permitir la penetración del eje.

En *Salmonella enterica*, una proteína de 316 residuos de aminoácidos llamada FlgJ posee un dominio de ensamblaje en la región N-terminal cuya función es permitir la correcta asociación de las proteínas que forman al eje y un dominio de glucosaminidasa en la región C-terminal que degrada la pared de peptidoglicano. El homólogo de FlgJ en *Rhodobacter sphaeroides* únicamente contiene el dominio de ensamblaje; se ha propuesto que la transglicosilasa lítica SlfF, es la responsable de degradar la pared en el sitio de formación del eje flagelar, al interactuar con FlgJ.

En este trabajo demostramos que la exportación de SlfF al periplasma ocurre a través de la vía de secreción Sec y no de la vía específica del flagelo. El análisis de la secuencia de SlfF nos permitió agruparla dentro de la familia 1 de transglicosilasas líticas, particularmente relacionada con la subfamilia 1 o MltD.

El análisis bioinformático también nos permitió identificar una región de 48 residuos en el C-terminal que no forma parte del dominio catalítico, sin embargo, es esencial para su función en la biogénesis flagelar. Nuestros esfuerzos por caracterizar el papel de dicha región nos permitieron identificar su participación en la interacción de SlfF con FlgJ; proponemos que esta región de SlfF tiene un efecto negativo sobre la interacción SlfF-FlgJ, esto permite que el ensamblaje se lleve a cabo de manera exitosa.

Adicionalmente, el C-terminal de SlfF participa en la interacción de esta proteína consigo misma, esta interacción muy probablemente es la responsable de la formación de dímeros como lo demostraron nuestros ensayos de cromatografía líquida de exclusión molecular.

Este trabajo complementa el modelo propuesto para la penetración de la pared celular por parte del eje flagelar en *R. sphaeroides*, el cual podría extenderse a otras especies bacterianas que poseen una FlgJ monodominio.

Introducción.

El dominio Bacteria es el linaje más antiguo que conocemos sobre la faz de la Tierra, se estima que apareció hace aproximadamente 3,500 millones de años y desde su aparición ha experimentado un intenso y constante proceso evolutivo. Como resultado de dicho proceso, las bacterias han desarrollado un enorme número de estrategias que les han permitido colonizar de manera exitosa prácticamente todos los ambientes en el planeta (Golovlev, 2001).

Contrario a lo que se piensa comúnmente, las bacterias son entidades muy activas capaces de explorar, colonizar y modificar su entorno; por mencionar un ejemplo, son las responsables de la composición química de la atmósfera actual (De Marais, 2000; Dismukes et al, 2001) y sin lugar a dudas son la base que sostiene la vida en nuestro planeta.

Además de su versatilidad metabólica, una de las estrategias que ha significado una adaptación mayor en el grupo, es la capacidad de desplazarse por sí mismas, pues les permite explorar el ambiente en busca de fuentes de alimento y alejarse de condiciones desfavorables. El movimiento direccionado ocurre como resultado de una estrecha comunicación entre el sistema de motilidad empleado por la bacteria y la capacidad de detectar las condiciones del medio, fenómeno conocido como taxia (Krell et al, 2011; Porter et al, 2011).

Algunos de los sistemas de motilidad que se han descrito en las bacterias son: el "gliding" que involucra el desplazamiento sobre superficies sólidas sin la participación visible de organelos extracelulares (Nan & Zusman, 2011). Otra estrategia de locomoción es el "twitching" que también permite el desplazamiento sobre superficies sólidas pero a diferencia del gliding, este requiere de la participación del pili tipo IV, cuya retracción genera la fuerza suficiente para promover el desplazamiento (Kaiser, 2000).

Una tercera estrategia de locomoción sobre superficies semisólidas es el "swarming" o movimiento en enjambre, el cual es considerado como un comportamiento social pues las bacterias se mueven en grupo. En este caso el organelo extracelular responsable del movimiento es el flagelo bacteriano.

Por último, la que con toda seguridad es la estrategia más ampliamente distribuida dentro del dominio Bacteria, el “swimming” o nado en medio líquido que al igual que el *swarming* requiere de la participación del flagelo (Kearns, 2010). El flagelo bacteriano es un complejo macromolecular formado aproximadamente por 30 proteínas. Históricamente el flagelo ha sido dividido en 3 componentes estructurales principales: filamento, gancho y cuerpo basal (Figura 1) (Macnab, 2003).

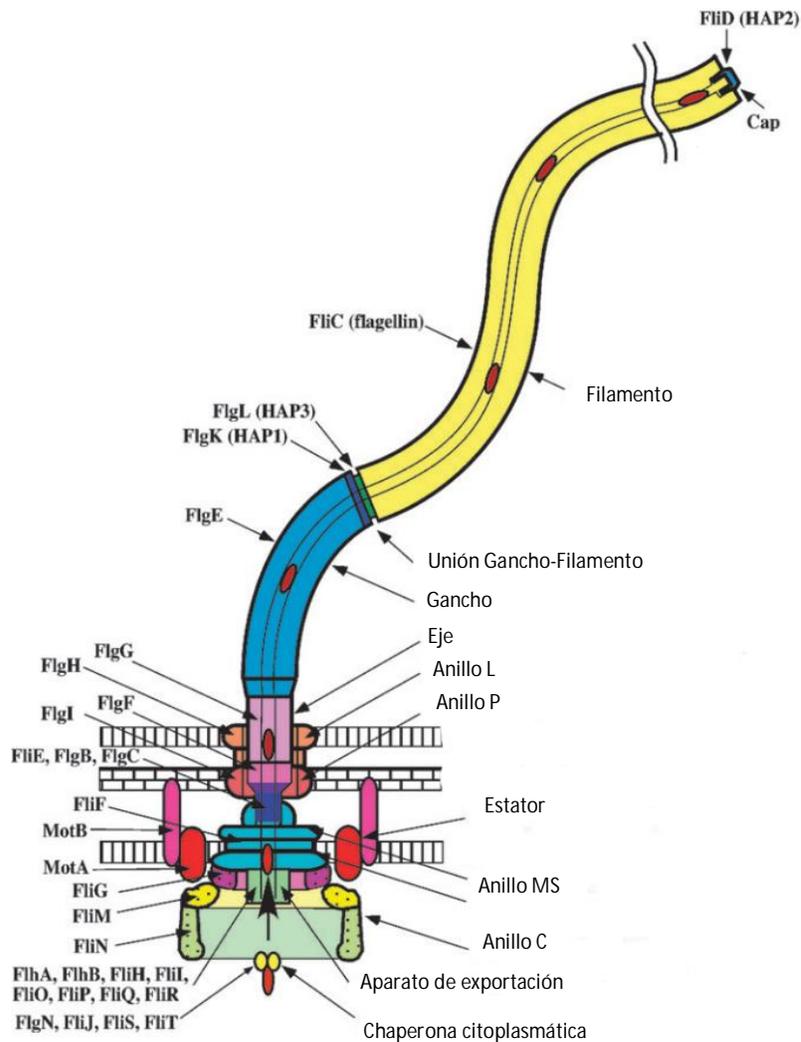


Figura 1. Imagen esquematizada del flagelo bacteriano. Se señalan con diferentes colores los componentes estructurales del flagelo y se indican las proteínas que los forman. Imagen tomada de (Minamino et al, 2008).

Filamento.

El filamento flagelar es una estructura helicoidal que puede llegar a medir varias veces el tamaño del cuerpo de la bacteria, alcanzando hasta 15 μm de longitud (Samatey et al, 2001; Yonekura et al, 2003). Realiza el trabajo mecánico sobre el medio y logra propulsar a la bacteria durante el nado; está formado aproximadamente por 30,000 copias de una sola proteína llamada flagelina o FliC (Beatson et al, 2006) dispuestas en 11 protofilamentos (Samatey et al, 2001).

La flagelina tiene una alta tendencia a la auto polimerización y la formación de filamentos, por ello ha sido imposible obtener el cristal de la proteína completa. La estructura cristalográfica se generó a partir de una versión recombinante a la cual le fueron removidos los extremos amino y carboxilo terminal, generando un producto de 395 residuos de aminoácidos de los 494 que contiene la proteína silvestre de *Salmonella enterica*; la versión mutante comprende de la asparagina 56 a la arginina 450 (Samatey et al, 2001).

El cristal muestra que la flagelina está compuesta por tres dominios que han sido denominados: D1, D2, y D3. El dominio D1 comprende la región del N-terminal que va desde la Asp 54 a la Gln 176 y la región del C-terminal que abarca desde la Thr 402 a la Arg 450 y está formado casi exclusivamente por α -hélices. El dominio D2 también está formado por dos segmentos que van de la Lys 177 a la Gly 189 y de la Ala 248 a la Ala 401 y contrario al dominio D1, este dominio está formado en su mayoría por estructuras β -plegadas. Finalmente el dominio D3 que corresponde a la región central de la proteína, abarca desde el residuo Tyr 190 a Val 283 y también contiene mayoritariamente estructuras β -plegadas (Samatey et al, 2001) (Figura 2).

El modelo atómico del filamento bacteriano obtenido a partir del análisis por criotomografía electrónica reveló la estructura de los extremos amino y carboxilo de la proteína silvestre. Estas regiones forman un cuarto dominio llamado D0 que está compuesto por 2 α -hélices entrelazadas (Yonekura et al, 2003)(Figura 2).

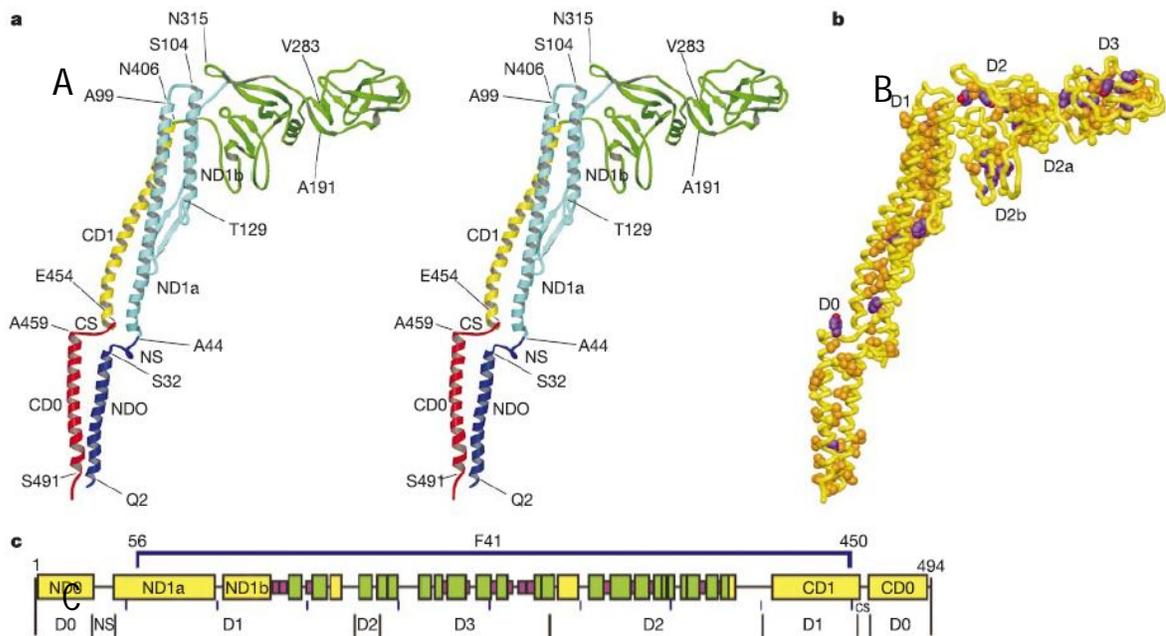


Figura 2. Estructura terciaria de la proteína FliC. A) Diagrama de esqueleto de α de la proteína FliC, el modelo se encuentra coloreado de la siguiente manera: en azul marino el dominio D0 del N-terminal (NDO), residuos 1-44; en azul claro el dominio D1 del N-terminal (ND1), residuos 44-179; en verde los dominios D2 y D3, residuos 179-406; en amarillo el dominio D1 del C-terminal (CD1), residuos 406-454 y en rojo el dominio D0 del C-terminal (CDO), residuos 454-494. B) Distribución de las cadenas hidrofóbicas laterales: Ala y Met, amarillo; Leu, Ile y Val, anaranjado; Phe, Tyr y Pro, morado; oxígeno, rojo. C) Características estructurales de la flagelina. En azul marino la región que abarca la versión F41 a partir de la cual se determinó la estructura cristalográfica, abajo se muestra la distribución de las estructuras secundarias: α -hélice en amarillo, β -plegada en verde y giro- β en morado. Modificado de (Yonekura et al, 2003).

Se sabe que las regiones N-terminal y C-terminal de la proteína FliC de *Salmonella* que forman el dominio D0 son regiones que carecen de una estructura secundaria ordenada en solución; se sabe también que son esenciales para la polimerización y que participan en la estabilización del filamento (Vonderviszt et al, 1991; Vonderviszt et al, 1989), además, la interacción entre ambas regiones es esencial durante las transiciones polimórficas (Mimori-Kiyosue et al, 1996).

En el modelo atómico del filamento, ambas regiones aparecen formando la cara interna de dicha estructura tubular y constituyen el canal por el cual las nuevas subunidades que se van a incorporar al filamento son exportadas (Yonekura et al, 2003) (Figura 3). Una vez incorporadas al filamento, las regiones N- y C-terminal sufren una transición desorden-orden y adquieren una estructura compacta de α -hélice (Aizawa et al, 1990). Cabe resaltar que ambas regiones se

encuentran altamente conservadas, probablemente por su participación en la polimerización y en el mantenimiento de un ambiente homogéneo a lo largo del canal que se extiende desde la base del eje hasta la punta del filamento (Pallen & Matzke, 2006).

Por su parte, el dominio D1 constituye un segundo tubo más externo también densamente empaçado y junto con el dominio D0 forman una estructura concéntrica de doble tubo (Figura 3). Este dominio también tiene un papel importante en la polimerización y está altamente conservado.

La región central de la proteína correspondiente a los dominios D2 y D3 no es esencial para su polimerización, incluso algunas mutantes con deleciones en dicha región aún son capaces de formar filamentos (Kuwajima, 1988). Además, existe una muy alta variabilidad tanto en la composición como en la longitud de ambos dominios entre las flagelinas pertenecientes a distintas especies bacterianas (en *Bacillus cereus* está prácticamente ausente, mientras que en *Desulfotoba psychrophila* tiene casi 1000 residuos) (Beatson et al, 2006). Se sabe que es la región más expuesta en la superficie del filamento (Figura 3 A) y que es la responsable de las propiedades antigénicas de la molécula, probablemente esta sea la razón de la gran variabilidad que presenta (Beatson et al, 2006).

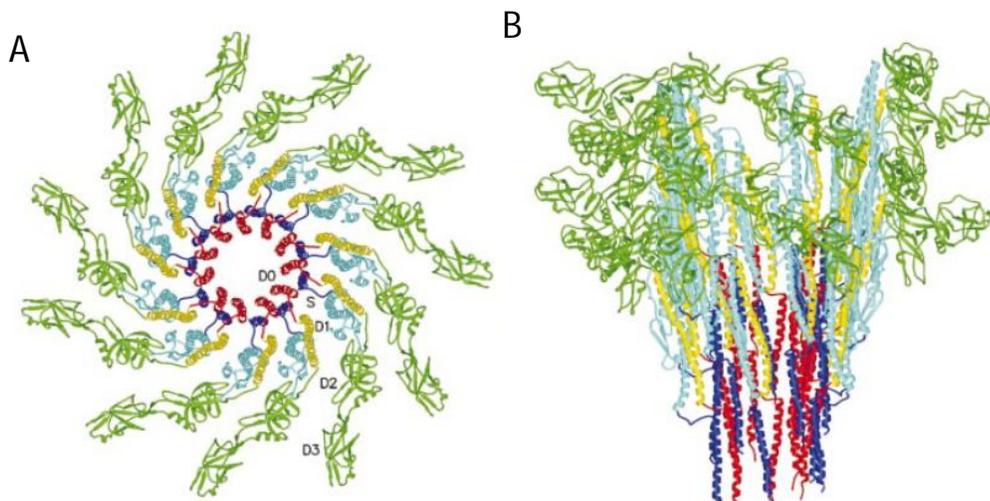


Figura 3. Modelo de listones del esqueleto de $C\alpha$ del modelo atómico del filamento. A) vista superior del extremo distal, se señalan los diferentes dominios de una de las subunidades. B) Vista lateral de la cara externa del filamento, se observa la estructura de doble tubo formada por los dominios D0 y D1 y la región expuesta y más laxa que corresponde a los dominios D2 y D3. Se conserva la misma simbología de colores que en la imagen anterior: en azul marino el dominio NDO; en azul claro el dominio ND1; en verde los dominios D2 y D3; en amarillo el dominio CD1 y en rojo el dominio CD0. Imagen modificada de (Yonekura et al, 2003).

A pesar de que *in vitro* la flagelina es capaz de autopolimerizar y formar filamentos, *in vivo* dicho proceso requiere necesariamente de la participación de una proteína ensambladora llamada FliD o también conocida como la tapa del filamento “filament cap” o HAP2 (por “Hook-associated protein”). Debido a que las subunidades que se van incorporando al filamento tienen que viajar a través del canal interno cuyo diámetro es muy estrecho (30 Å) (Figura 4 panel A y B), éstas lo hacen en un estado no plegado y cuando finalmente llegan a la punta del filamento, adquieren su conformación tridimensional nativa (Yonekura et al, 2000).

Se ha propuesto que el papel de la proteína FliD en el ensamblaje del filamento es evitar que las subunidades que emergen de dicho canal sean liberadas al espacio extracelular y se pierdan sin haberse incorporado (Homma et al, 1984a; Ikeda et al, 1985). También se ha sugerido que FliD sea la responsable de inducir un cambio conformacional en la flagelina para su correcta polimerización (Yonekura et al, 2000).

FliD forma un decámero en solución (Imada et al, 1998), sin embargo, cuando se asocia a la punta del filamento lo hace en forma de pentámero (Figura 4 panel C). Cada subunidad de flagelina que se incorpora obliga al pentámero de FliD a desplazarse siempre hacia el extremo de filamento en una posición energéticamente equivalente. La asimetría que existe entre el filamento y FliD le indican a la flagelina en que sitio incorporarse lo cual ocurre en un mecanismo rotatorio (Yonekura et al, 2000).

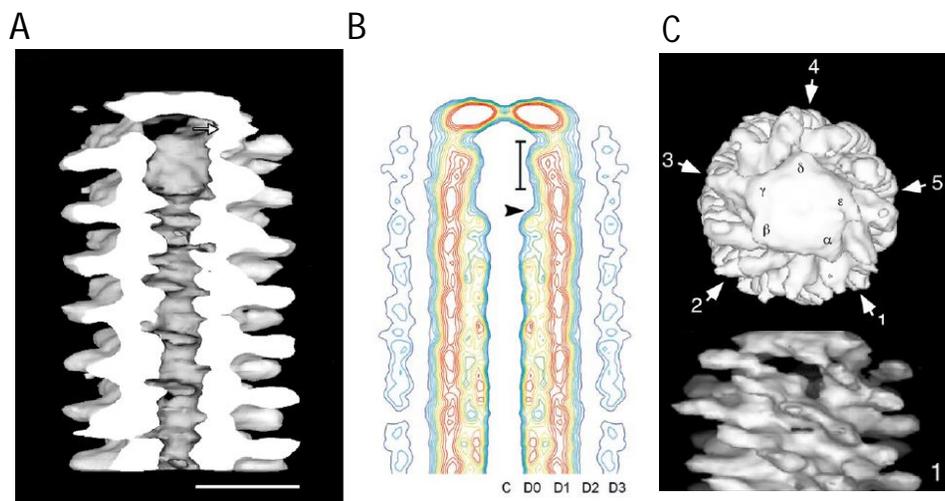


Figura 4. Mapa tridimensional de densidades del complejo filamento-FliD. A y B) Complejo Filamento-FliD, se observa el canal central (C), los diferentes dominios de la flagelina (D0, D1, D2 y D3) y el espacio formado entre el extremo distal del filamento y el pentámero de FliD. C) Vista superior del pentámero de FliD (arriba) y vista lateral (abajo), se aprecia el sitio por el cual se propone que ocurre la incorporación de cada subunidad de flagelina con forma de L invertida. Imagen tomada de (Yonekura et al, 2000).

Gancho.

El gancho es una estructura relativamente corta (55 nm) (Hirano et al, 1994), curva y flexible compuesta aproximadamente por 120 copias de la proteína FlgE dispuestas en un ensamblaje helicoidal (Fujii et al, 2009) (Figuras 5 y 6). Su función es servir como conexión entre el cuerpo basal y el filamento y transmitirle la torca generada por el motor (Samatey et al, 2004b).

Para la obtención del cristal de la proteína FlgE se empleó la misma estrategia utilizada para la flagelina, es decir, se eliminaron las regiones N- y C-terminales, el producto resultante (FlgE31) abarca de los residuos 71 a 369 de los 402 que posee la proteína silvestre de *Salmonella* (Samatey et al, 2004a). El cristal junto con el modelo atómico muestran que la proteína FlgE está compuesta por tres dominios (D0, D1 y D2) (Fujii et al, 2009; Shaikh et al, 2005) (Figura 5 panel B).

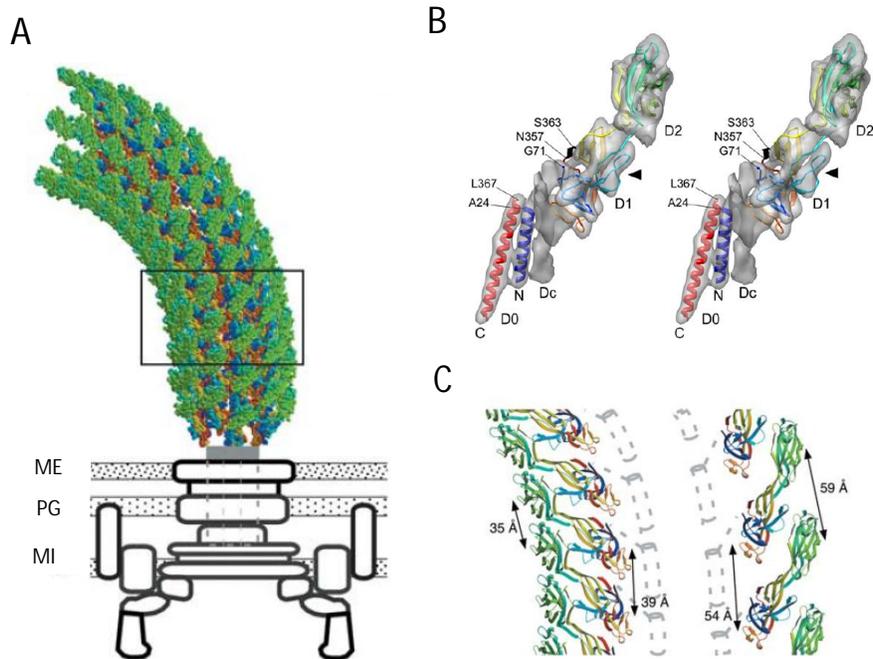


Figura 5. Modelo atómico del gancho y estructura terciaria de la proteína FlgE. A) Modelo atómico del gancho curvo con una representación esquemática del cuerpo basal en la parte inferior: membrana externa (ME), peptidoglicano (PG) y membrana interna (MI). B) Estructura terciaria de la proteína FlgE, se indican los diferentes dominios estructurales que la conforman. C) Imagen magnificada del gancho curvo, se esquematizan los protofilamentos localizados en la curvatura mayor y menor y el canal central formado por los dominios D0 (líneas punteadas grises). Imágenes tomadas de (Samatey et al, 2004b) y de (Fujii et al, 2009).

El dominio D0 de la proteína del gancho comparte muchas características con su homónimo de FliC, ambos son desordenados en solución y adquieren una conformación α -hélice "coiled coil" al polimerizar, son los responsables de la polimerización y se localizan en el centro de la estructura tubular (filamento o gancho) (Fujii et al, 2009). Además, poseen repeticiones de aminoácidos hidrofóbicos a intervalos de 7, al igual que el resto de las proteínas axiales (proteínas asociadas al gancho y proteínas de eje) (Homma et al, 1990; Vonderviszt et al, 1992).

Los dominios D1 y D2 están menos densamente empacados lo cual pudiera explicar la flexibilidad del gancho. Las interacciones intermoleculares que ocurren a nivel de estos dominios sufren una serie de cambios que permiten la extensión y compresión de cada protofilamento en aproximadamente 9 Å, dando como resultado una alta flexibilidad que permite que dicha estructura adquiera una forma curva (Fujii et al, 2009). Estos cambios de extensión y compresión deben ocurrir en cada vuelta que da el flagelo, es decir, aproximadamente 300 veces por segundo (Samatey et al, 2004b).

Los tres dominios mencionados (D0, D1 y D2) y un dominio adicional que pudiera formar uno solo con el dominio D0 pero que la resolución del análisis no permitió modelarlo con claridad (dominio Dc) se disponen en un arreglo radial del centro hacia el exterior de la estructura tubular del gancho (Figura 6).

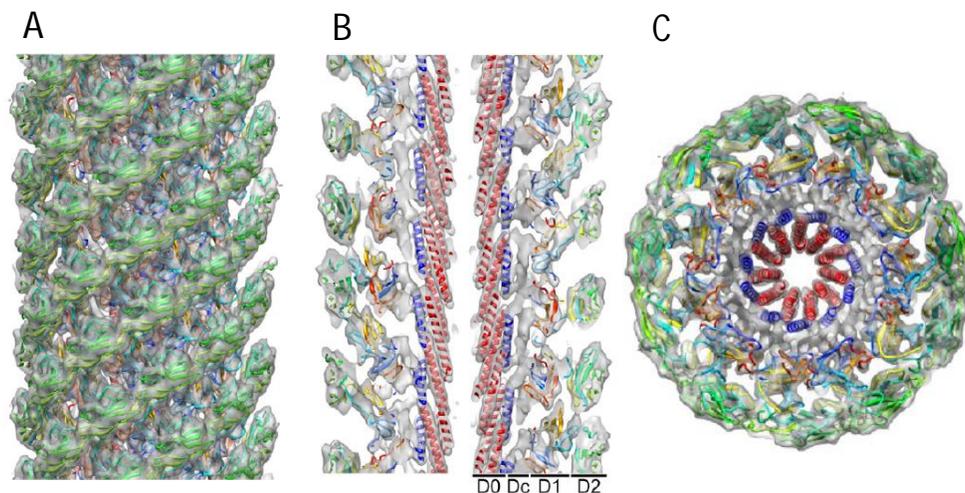


Figura 6. Mapa tridimensional de densidades del gancho. A) Vista lateral de la superficie del gancho B) Corte longitudinal del gancho, se muestra el arreglo radial de los diferentes dominios de FlgE. C) Vista superior, el diámetro del gancho es de 180 Å, el canal interno mide 18 Å. Imagen tomada de (Fujii et al, 2009).

Al igual que FliC requiere de FliD para su correcta polimerización, la proteína del gancho (FlgE) requiere de la proteína FlgD (Ohnishi et al, 1994); se ha sugerido que esta última actúa como una proteína de andamiaje y al mismo tiempo que promueve la polimerización del gancho, impide que las nuevas subunidades de FlgE que son exportadas difundan al medio extracelular (Moriya et al, 2011).

Existen 3 proteínas que se encuentran asociadas al gancho en algún punto de la biogénesis flagelar (proteína asociada al gancho HAP2) o de forma permanente (proteínas asociadas al gancho HAPs 1 y 3). La primera de ellas es la proteína HAP2, también llamada FliD de la cual se habló en la sección previa, las otras dos (HAP1 y HAP3) forman una interfase entre el filamento y el gancho permitiendo que ambas estructuras se acoplen (Homma et al, 1984b; Ikeda et al, 1987).

Cuerpo Basal.

El cuerpo basal es un complejo multiproteico que contiene varios componentes estructurales y funcionales del flagelo como son: el motor, al menos 4 estructuras anulares, el aparato de exportación y una estructura de tipo axial llamada eje (Figura 7). En total son alrededor de 20 proteínas diferentes las que lo constituyen (Minamino et al, 2008).

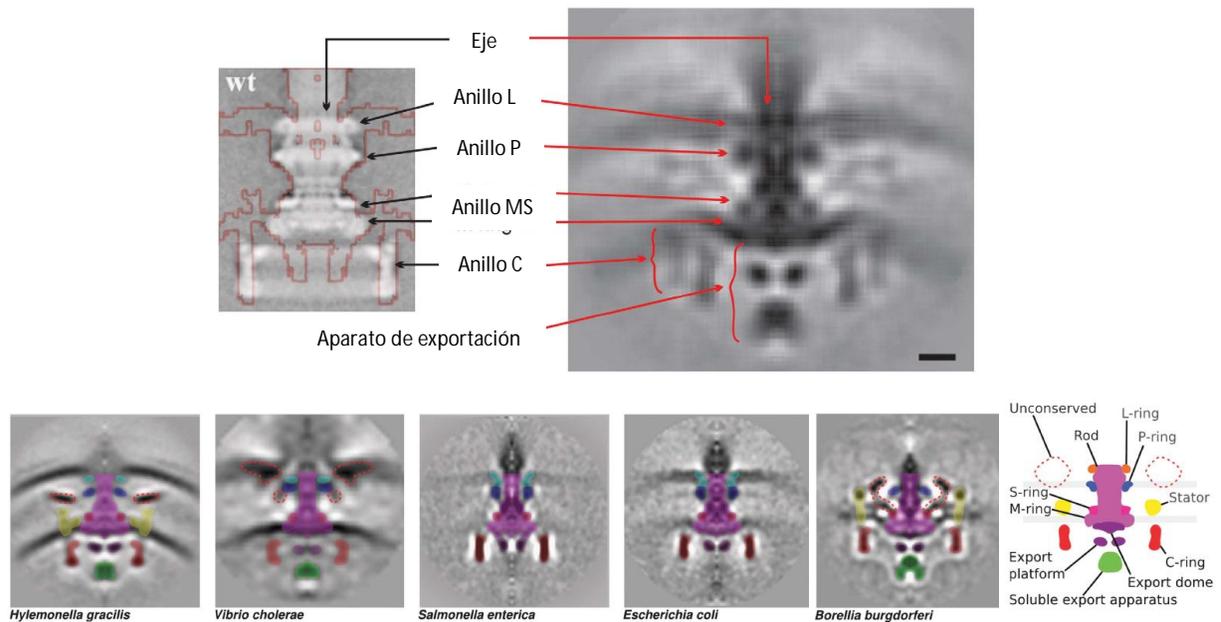


Figura 7. Imágenes de criotomografía electrónica que muestran la composición básica del cuerpo basal (arriba) y las diferencias a nivel estructural que existen entre especies bacterianas de distintos grupos taxonómicos (abajo). En la imagen inferior del extremo derecho se indica la nomenclatura de colores utilizada. Imágenes tomadas de (Chen et al, 2011).

Motor

El motor, encargado de impulsar la rotación del flagelo, es una máquina molecular energizada por el gradiente transmembranal de protones H^+ o iones Na^+ (Figura 8). Está compuesto por dos partes: una rotatoria (rotor) conectada al gancho y al filamento que en su base recibe el nombre de anillo C el cual está formado por múltiples copias de las proteínas FliM, FliN y FliG (Erhardt et al, 2010) y otra no rotatoria (estator) que lleva a cabo el transporte de iones y participa en la conversión de energía electroquímica a mecánica.

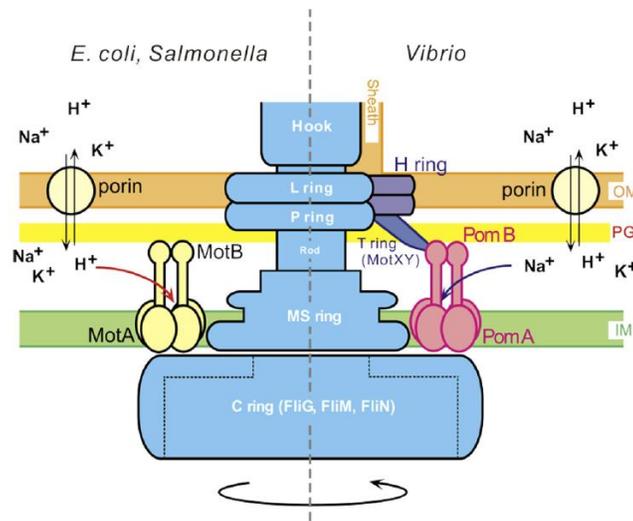


Figura 8. Representación esquemática de los dos tipos de motores: El motor energizado por protones H^+ como los que poseen *Salmonella* y *E. coli* y el motor energizado por iones Na^+ como el que poseen bacterias del género *Vibrio* (Yonekura et al, 2011).

El estator está formado aproximadamente por 11 complejos MotA/MotB que funcionan de manera independiente para conducir protones a través de la membrana citoplasmática y acoplar su flujo a la rotación (Kojima & Blair, 2001). Muchos estudios sugieren que la estequiometría de la unidad del estator flagelar es $(MotA)_4(MotB)_2$ (Yonekura et al, 2011).

En microorganismos marinos como *Vibrio alginolyticus* y alcalófilos como *Bacillus subtilis* se identificaron homólogos de MotA/MotB, llamados PomA/PomB y MotP/MotS respectivamente, que funcionan con iones Na^+ (Asai et al, 1997). Recientemente se reportó que en *B. clausii*, los homólogos de MotA y MotB funcionan con ambos iones (H^+ y Na^+) en función del pH del medio (Terahara et al, 2008). Y en el 2009, se encontró que *Shewanella oneidensis* posee homólogos de MotA/MotB y PomA/PomB y utiliza un complejo u otro en función de la concentración de Na^+ en el medio (Paulick et al, 2009).

La proteína MotB contiene una sola hélice transmembranal y un gran dominio periplásmico que se une a la pared de peptidoglicano permitiendo el anclaje del estator; posee un residuo de aspartato conservado y esencial, el cual se piensa tiene un papel fundamental en el paso de protones (Fujinami et al, 2009). El dominio transmembranal de esta proteína es el responsable de determinar la especificidad del ión (Asai et al, 2003; Terahara et al, 2008).

Se ha sugerido que la estructura de MotB es dinámica y sufre cambios estructurales drásticos necesarios para el anclaje con la pared de peptidoglicano y para activar el canal (Kojima et al, 2009). La estructura central que conforma el dominio de unión a la pared de peptidoglicano de MotB está formada por tres α -hélices, cuatro β -plegadas juntas y asas que conectan estas estructuras. Este dominio muestra similitud con el dominio de unión a la pared de otras proteínas (Yonekura et al, 2011).

MotA contiene cuatro hélices transmembranales (TM 1-4) y un dominio citoplásmico grande localizado entre las TM2 Y TM3 que participa en la generación del torque al interactuar con el C-terminal de la proteína FliG del rotor (Manson et al, 1998).

Anillos

Además del anillo C que se mencionó en la sección anterior, existen al menos otras 3 estructuras anulares en el cuerpo basal: El anillo MS, el anillo P y el anillo L (DePamphilis & Adler, 1971b). El anillo MS es el primer componente estructural del flagelo en ensamblarse (Guttenplan et al, 2013), está formado por aproximadamente 26 subunidades de la proteína FliF (Jones et al, 1990) y se localiza en la membrana citoplasmática; en su interior alberga al aparato de exportación y sirve como una estructura de anclaje al cuerpo celular (DePamphilis & Adler, 1971a) (Figura 7).

Los anillos P y L están formados por 24 copias de la proteína FlgI y 28 de la proteína FlgH respectivamente (Jones et al, 1990); se localizan rodeando al eje flagelar a la altura de la pared de peptidoglicano (anillo P) y de la membrana de lipopolisacárido en bacterias Gram negativas (anillo L) (Figura 9) (DePamphilis & Adler, 1971b). Las mutantes en *flgI* son incapaces de ensamblar ambos anillos, en cambio, mutantes en *flgH* aún pueden ensamblar el anillo P (Jones et al, 1987).

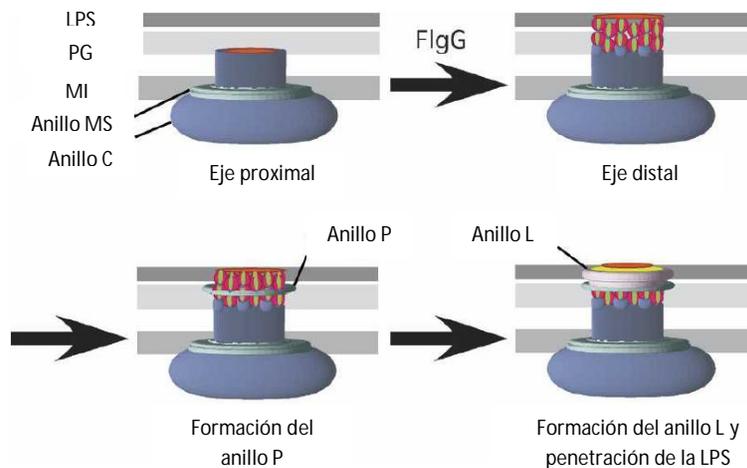


Figura 9. Modelo del ensamblaje del eje flagelar y los anillos L y P. La finalización de la polimerización de FlgG (eje distal) está acoplada con el ensamblaje del anillo P y posteriormente del anillo L; la formación de este último permite la penetración de la membrana externa. LPS, membrana de lipopolisacárido; PG, pared de peptidoglicano; MI, membrana interna. Imagen tomada de (Chevance et al, 2007).

Se propone que el anillo P es un elemento no rotatorio del cuerpo basal y que actúa como un forro o rodamiento en la región distal del eje flagelar formada por la proteína FlgG, a la altura de la pared de peptidoglicano. Se piensa que es necesario para facilitar una rotación suave (Hizukuri et al, 2008), además de ser necesario para la formación del anillo L.

Por su parte el anillo L, se localiza por encima del anillo P a la altura de la membrana externa y se sabe que forma un poro por el cual atraviesa el flagelo permitiéndole extenderse hacia el exterior de la célula. Bacterias que presentan un flagelo periplásmico como las espiroquetas carecen de dicho anillo (Chevance et al, 2007).

Aparato de exportación.

El aparato de exportación está compuesto por 6 proteínas membranales: FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ y FliR y 3 proteínas citoplasmáticas: FliH, FliI y FliJ (Figura 10). Juntas las proteínas membranales forman un poro central embebido en la base del anillo MS; FliI es una ATPasa que transforma la energía de la hidrólisis de ATP probablemente en la energía necesaria para la translocación de las proteínas que se van a exportar; FliH es un regulador de la ATPasa FliI y FliJ

provoca un cambio en la especificidad los sustratos a exportar, el cual cambia de elementos tipo eje (FliE, FlgB, FlgC, FlgF, FlgG y FlgJ) y tipo gancho (FlgD, FlgE y FliK) a elementos tipo filamento (FliC, FlgM, FliD, HAP1 y HAP3) (Fraser et al, 2003) (Figura 11). La delección del gen *fliK* o inserciones en el mismo tienen como resultado la formación de ganchos de mayor longitud, este fenotipo recibe el nombre de poliganchos (Patterson-Delafield et al, 1973; Williams et al, 1996).

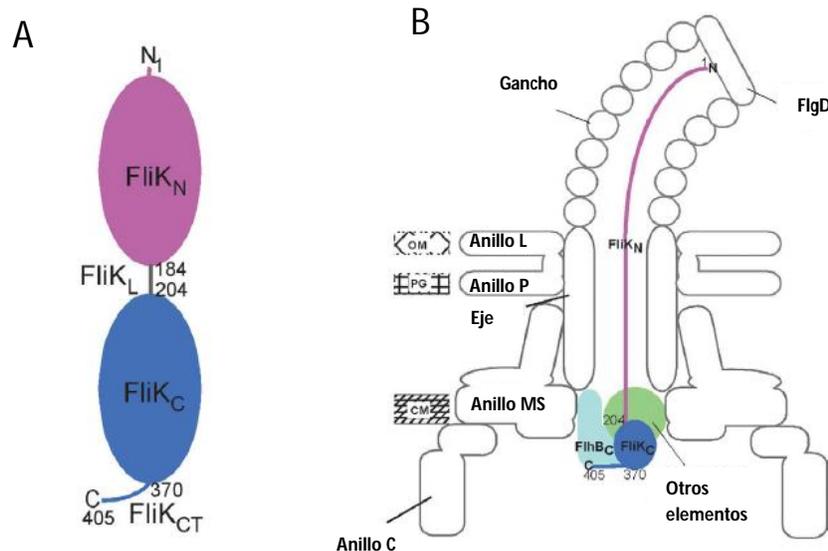


Figura 11. Representación esquematizada del cambio en la especificidad por el sustrato del aparato de exportación. A) Representación de la proteína FliK que muestra sus dominios estructurales N- y C- terminal (FliK_N y FliK_C) así como la región central que los une (FliK_L). B) Representación del modo de acción de FliK en el cuerpo basal-gancho y su interacción con el C-terminal de FlhB (FlhB_C) que tiene como resultado el cambio en la especificidad y permite la culminación de la biogénesis flagelar. OM, membrana externa; PG, peptidoglicano y CM, membrana interna. Imagen tomada de (Minamino et al, 2004).

A pesar de que en las proteínas exportadas o sustratos no se ha identificado una secuencia consenso que sea reconocida por el aparato de exportación, el análisis por delección indica que la señal de secreción se localiza en la región N-terminal estas proteínas; mutantes que carecen de dicha región son incapaces de ser exportadas (Weber-Sparenberg et al, 2006). Algunos autores han sugerido que la señal es de carácter estructural e incluso que el desorden del N-terminal que comparten todas las proteínas axiales podría ser la responsable del reconocimiento por parte del aparato de exportación (Vonderviszt et al, 1992).

Eje

El eje consiste en una porción distal formada por veintiséis subunidades de la proteína FlgG y una porción proximal que se propone está formada por tres proteínas diferentes (FlgB, FlgC y FlgF), con aproximadamente seis subunidades de cada una (Jones et al, 1990). En total el eje tiene una longitud de 25 nm de los cuales 10 corresponden a la región proximal y 15 a la distal (Chevance et al, 2007) (Figura 12). Su función es transmitir la torca generada por el motor hacia el gancho y el filamento.

Existe otra proteína llamada FliE la cual se ha propuesto que constituye una zona de unión o de interfase entre el anillo MS y la región más proximal del eje formada por FlgB. La estequiometría de FliE en el cuerpo basal se ha estimado en nueve subunidades (Minamino et al, 2000). Por último, recientemente se ha sugerido la posibilidad de que FliE participe en la apertura del canal de exportación que atraviesa la región central del anillo MS (Xiaowei Zhao, 2013).

Las proteínas que conforman al eje comparten algunas características con el resto de las proteínas axiales; se sabe que tienen una alta tendencia a la polimerización (Saijo-Hamano et al, 2004), que presentan cierto nivel de desorden en su estado monomérico y que se asocian para formar una estructura con una simetría axial, sin embargo, dicha estructura presenta algunas diferencias notables con el gancho y el filamento; por ejemplo, el eje está compuesto por hasta 5 proteínas diferentes.

El eje flagelar se extiende desde la parte superior del anillo MS hasta la membrana externa abarcando todo el espacio periplásmico. Durante su ensamblaje se ve obligado a atravesar tanto la pared de peptidoglicano como la membrana de lipopolisacárido en bacterias Gram negativas. Como ya se mencionó, la penetración de la membrana externa ocurre gracias a la participación del anillo L, sin embargo, la pared celular representa una barrera mucho más rígida y difícil de atravesar.

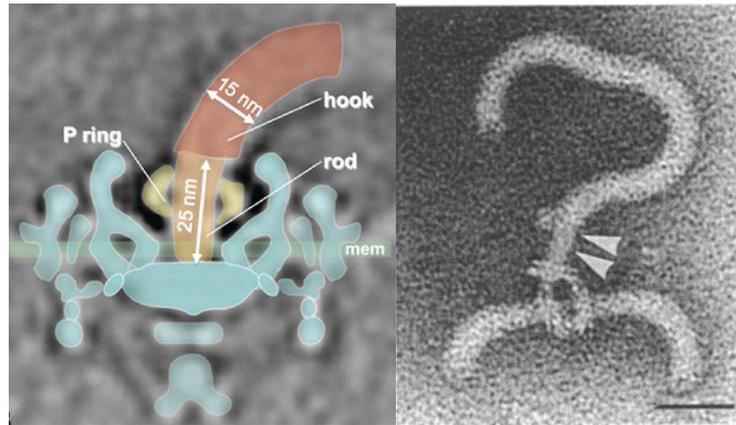


Figura 12. Estructura y localización del eje flagelar. Imagen de criotomografía electrónica del gancho y cuerpo basal de *Borrelia burgdorferi* que muestra al eje en anaranjado, al gancho en marrón, en amarillo el anillo P y en azul el resto de los componentes del cuerpo basal (imagen de la izquierda) (Zhang et al, 2012). Imagen de microscopía electrónica de transmisión de una mutante poliganchos, con flechas se señalan los sitios en los que deberían estar los anillos L y P alrededor del eje (Jones et al, 1987).

En *Salmonella enterica* se encontró que la proteína FlgJ posee en su extremo C-terminal un dominio de glucosaminidasa capaz de degradar la pared celular y permitir el ensamblaje del eje (Nambu et al, 1999). Por otro lado, el extremo N-terminal (~151 residuos) de la misma proteína participa en la polimerización del eje, se propone que realiza una función similar a la de FlgD y FliD en el gancho y filamento respectivamente (Hirano et al, 2001).

Vía de secreción Sec

La mayoría de las proteínas flagelares se exportan al periplasma o al medio extracelular por medio de la vía específica del flagelo o Sistema de Secreción Tipo III (SST3) (Hirano et al, 2003), con excepción de las proteínas de los anillos L (FlgH) y P (FlgI) (Homma et al, 1987a; Homma et al, 1987b) y la chaperona del anillo P (FlgA) (Kutsukake et al, 1994) las cuales son exportadas por la vía Sec.

Aproximadamente una tercera parte de todas las proteínas de una bacteria llevan a cabo sus funciones fuera del citoplasma celular, lugar en el cual son sintetizadas; por lo tanto, necesitan ser translocadas a través de la membrana citoplasmática o incorporarse a esta (Auclair et al, 2012). Las dos vías más comunes de translocación de proteínas en bacterias son: la vía Sec (por **S**ecretion pathway) que transloca proteínas en un estado no plegado y la vía de translocación de las argininas gemelas o vía Tat (por **t**win-**a**rginines **t**ranslocation pathway) que transloca proteínas en su

conformación nativa; ambas vías están conservadas en los 3 dominios de la vida (Bacteria, Arquea y Eucaria) (Natale et al, 2008).

Las proteínas que son secretadas a través de la membrana interna por el sistema Sec contienen un péptido señal en el N-terminal el cual es procesado después de ocurrida la translocación, este péptido señal interacciona con la proteína SecA. El complejo proteína a exportar y SecA se asocia al poro de translocación por el cual la proteína va a ser transportada en un mecanismo dependiente de ATP (Rusch & Kendall, 2007) (Figura 13).

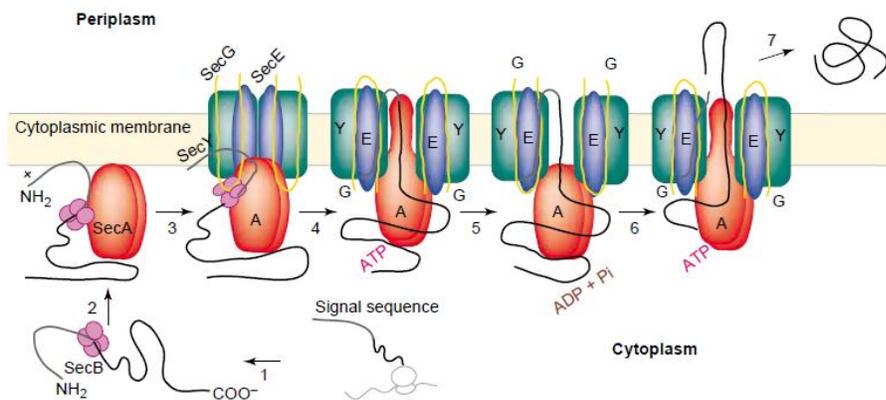


Figura 13. Representación esquemática de la vía de secreción Sec. La secuencia señal de la proteína a exportar es reconocida por la maquinaria Sec, la chaperona SecB mantiene a la proteína en un estado no plegado y la dirige a la proteína SecA. La ATPasa SecA se une al canal formado por el complejo heterotrimérico SecYEG que constituye el canal por el cual será translocada la proteína blanca (pasos 1-4). Comienza la translocación de la proteína potenciada por la hidrólisis de ATP y la fuerza protón motriz, finalmente se libera la proteína y ocurre un corte proteolítico de la secuencia señal, la proteína madura llega a su destino. (pasos 5-7). Imagen tomada de (Mori & Ito, 2001).

La ATPasa SecA funciona como un receptor de las proteínas a secretar y como un motor dependiente de ATP que energiza la translocación de proteínas cuando se asocia con el canal de secreción formado por el complejo heterotrimérico SecYEG a través de la membrana plasmática. SecY es el componente central del canal de translocación, se trata de una proteína que contiene 10 cruces transmembranales e interacciona directamente con las proteínas SecA, SecE, SecG y la proteína exportada (Figura 14) (Rusch & Kendall, 2007).

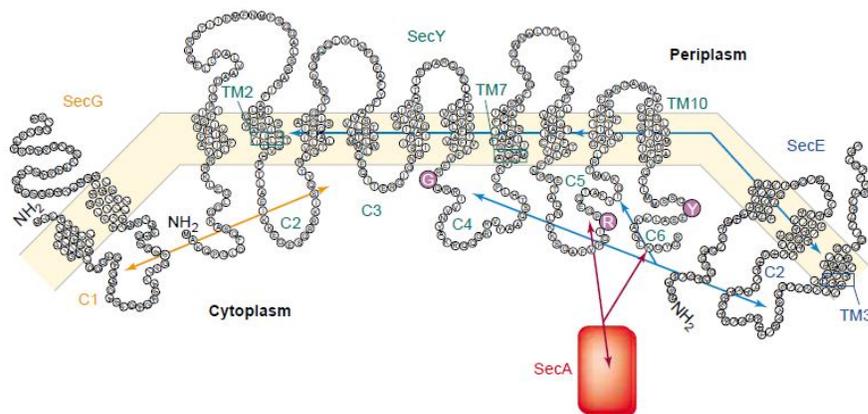


Figura 14. Mapa de las interacciones que ocurren entre los diferentes elementos del translocador de proteínas. SecY, SecE y SecG están representadas por el posible arreglo topológico en la membrana citoplasmática, C y TM indican los dominios citoplasmáticos y transmembranales respectivamente. Las interacciones entre SecA-SecY, SecE-SecT y SecG-SecY se representan con flechas de rojo, azul y anaranjado respectivamente. Imagen tomada de (Mori & Ito, 2001).

Secuencia señal o péptido señal

La secuencia señal es una extensión del N-terminal de la proteína a secretarse y es necesaria para su reconocimiento por parte de la maquinaria de la vía de secreción. Típicamente tiene una longitud de 20 residuos de aminoácidos divididos en 3 regiones: un N-terminal cargado positivamente (región-n), un núcleo o región central hidrofóbica (región-h) y un C-terminal polar (región-c) (Figura 15) (Natale et al, 2008). La función y la estructura de la secuencia señal están muy conservadas a lo largo de los 3 dominios de la vida; muchas de las secuencias reportadas se encuentran depositadas en bases de datos lo cual permite su fácil identificación mediante el análisis con software especializado como el programa de predicción SignalP (Emanuelsson et al, 2007).

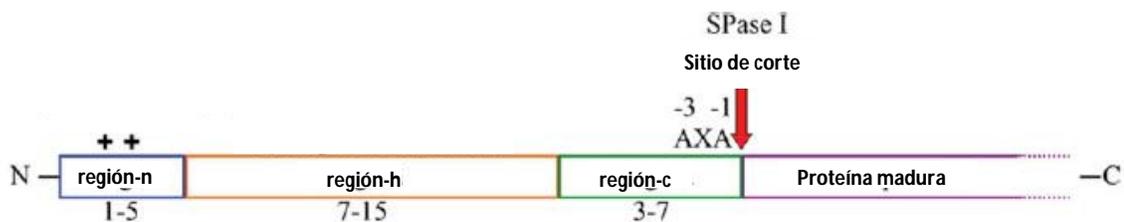


Figura 15. Representación esquemática de la secuencia señal o péptido señal y sus principales características. En azul se señala la región-n que puede abarcar de 1 a 5 residuos cargados positivamente en el N-terminal, en anaranjado se indica la región-h compuesta por 7 a 15 residuos hidrofóbicos, en verde la región-c cuya longitud varía de 3 a 7 residuos y que contiene los aminoácidos reconocidos por la Peptidasa Señal I (SPase I) en las posiciones -1 y -3, finalmente en morado se indica la región que corresponde a la proteína madura. Imagen tomada de (Auclair et al, 2012).

La región-c es necesaria para el reconocimiento por parte de la Peptidasa Señal I (SPasal), esta enzima es la responsable de catalizar el corte de la secuencia señal una vez que ha ocurrido la translocación, permitiendo que la proteína madura se libere de la membrana y adquiera su conformación tridimensional nativa. El sitio de corte está después de la secuencia consenso Ala-X-Ala, también conocida como la regla del -1,-3 dado que en esas posiciones se localiza un residuo de Alanina (Auclair et al, 2012) (Figura 15).

La región-h normalmente está formada por aminoácidos hidrofóbicos con una alta propensión a la formación de α -hélices, mientras que la región-n cargada positivamente participa en las interacciones electrostáticas con los fosfolípidos de la membrana (Natale et al, 2008). Ambas regiones son importantes para el reconocimiento por parte de la proteína motor SacA; la interacción con SecA incrementa conforme aumenta el número de cargas positivas en la región-n (Natale et al, 2008).

Pared celular de peptidoglicano (Mureína).

El peptidoglicano, también llamado mureína (del latín *murus* que significa pared) es un componente esencial y específico de la pared celular de las bacterias (Weidel & Pelzer, 1964). Dicha pared se localiza en el exterior de la membrana citoplasmática de prácticamente todas las especies bacterianas salvo muy pocas excepciones (mycoplasma, planctomycetes y spiroplasma). Su función es preservar la integridad celular, además, contribuye en el mantenimiento de una forma definida y sirve como andamio para el anclaje de otros componentes de la envoltura celular como proteínas y el ácido teicoico (Vollmer et al, 2008a).

La arquitectura y composición química del peptidoglicano se puede definir como largas cadenas lineares de glúcidos interconectadas por péptidos pequeños. En bacterias Gram negativas las cadenas de glúcidos están compuestas por residuos alternados de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y N-acetilmurámico (MurNAc) unidos por enlaces β -1 \rightarrow 4. Cada residuo de MurNAc está unido a un péptido pequeño (Figura 16), estos últimos son los responsables de interconectar las cadenas de glúcidos y de esta manera se forma el sáculo que recubre a la célula bacteriana (Vollmer et al, 2008a).

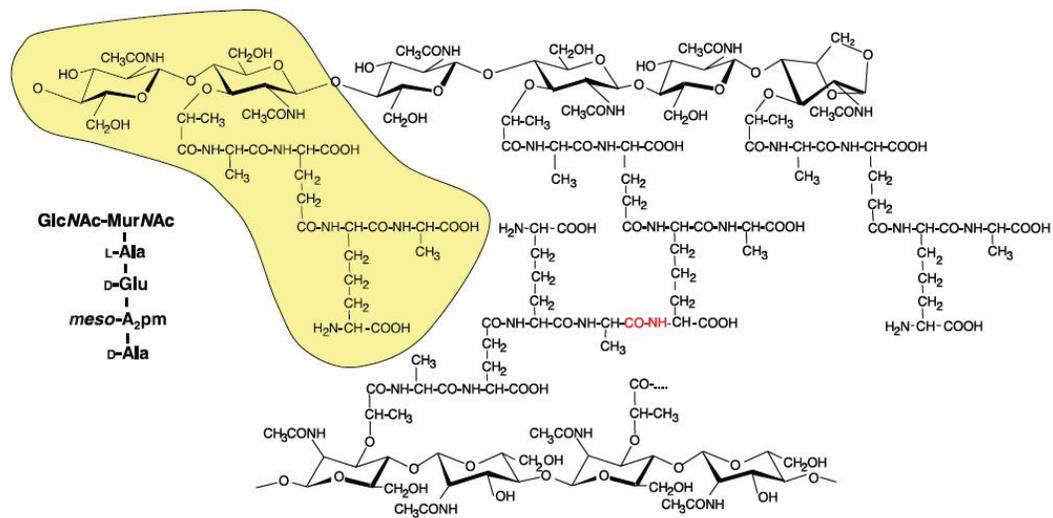


Figura 16. Estructura del peptidoglicano de *E. coli*. Las cadenas de glúcidos consisten en residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y N-acetilmurámico (MurNAc) alternados, unidos por enlaces β -1 \rightarrow 4. La parte sombreada en amarillo corresponde a la unidad estructural del peptidoglicano (monómero), a un costado se indica en una nomenclatura abreviada. En medio se muestran los enlaces entre los péptidos que conectan las cadenas de glúcidos, en rojo se señala en grupo amida que los conecta. Imagen tomada de (Vollmer et al, 2008a).

La pared celular es una estructura rígida y al mismo tiempo dinámica, el crecimiento y división de la bacteria deben estar acompañados por cambios a nivel de la pared celular que involucren la síntesis del peptidoglicano y su incorporación al sáculo existente así como la degradación y reciclamiento de la misma (Typas et al, 2012).

La síntesis del peptidoglicano ocurre en 3 pasos: primero los nucleótidos precursores UPD-N-acetilglucosamina y UPD-N-acetilmuramil son sintetizados en el citoplasma; en el segundo paso dichos precursores forman el monómero disacárido-pentapéptido también llamado (lípidio II), el cual es anclado a la cara interna de la membrana citoplasmática al unirse con el undecaprenil fosfato y finalmente gira y se coloca del otro lado de la membrana, es decir, hacia el espacio periplásmico. El tercer paso involucra la polimerización del lípidio II y la liberación del undecaprenil fosfato, este paso significa la incorporación del monómero al sáculo (Typas et al, 2012) (Figura 17).

Las enzimas que participan en la fase de síntesis son: glicosiltransferasas (GTasas) que polimerizan las cadenas de glúcidos y DD-transpeptidasas (DD-TPasas) que unen a los péptidos, las TPasas también son llamadas PBPs por "penicillin-binding proteins".

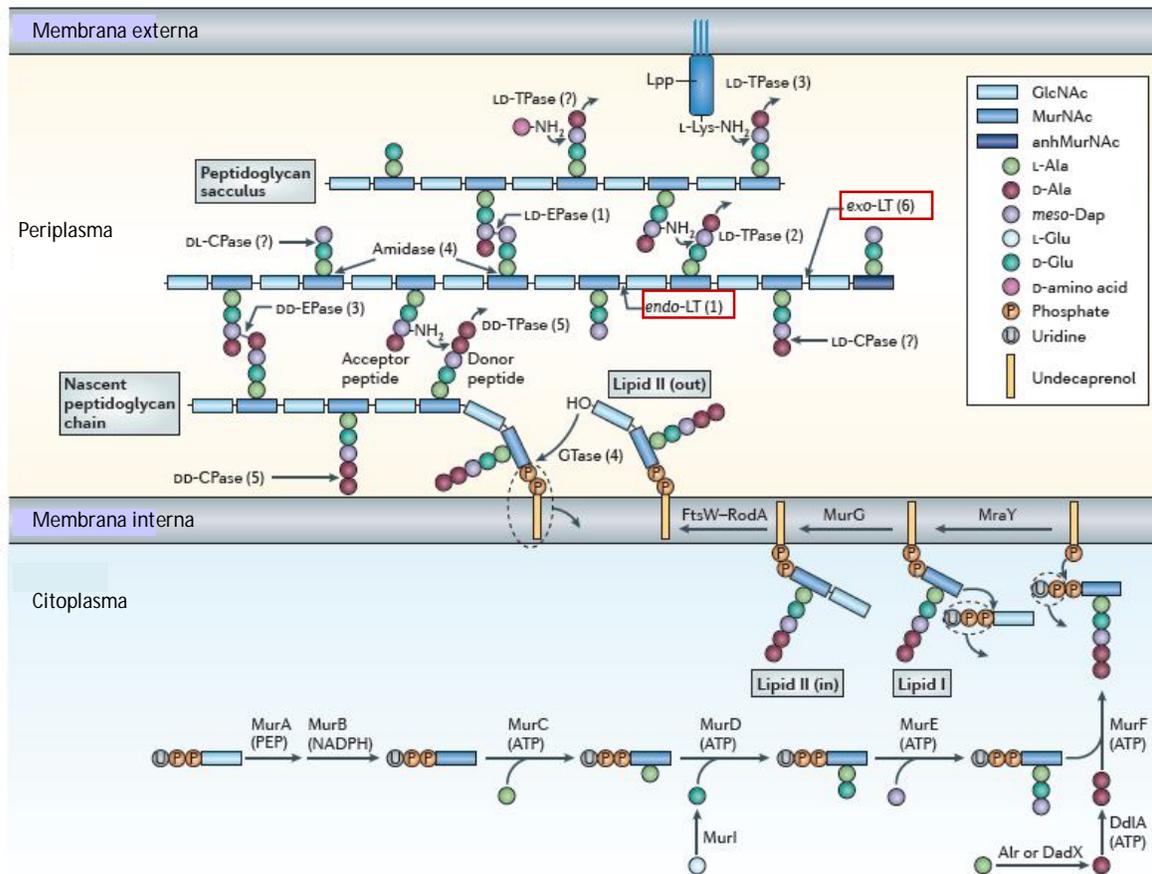


Figura 17. Síntesis y degradación del peptidoglicano. La síntesis e incorporación de nuevas cadenas de peptidoglicano al sáculo existente requiere de una serie de reacciones químicas catalizadas por una batería enzimática. Los precursores son sintetizados en el citoplasma y unidos al lípido transportador undecaprenil fosfato, el cual los voltea al lado periplásmico de la membrana interna por acción de la FtsW-RodA. Una glicosiltransferasa (GTasa) cataliza la polimerización de la cadena de peptidoglicano nascente. La incorporación del nuevo peptidoglicano al sáculo ocurre por acción de una DD-transpeptidasa (DD-TPasa). Las amidasas remueven los péptidos de la cadena de glúcidos y las endo- y exo- transglicosilasas líticas (LTs), encerradas en rojo, rompen el enlace entre el MurNAc y la GicNAc. Imagen tomada de (Typas et al, 2012).

El simple hecho de añadir nuevo material al sáculo por reacciones de transpeptidación solamente provocaría un aumento en el grosor del mismo sin que ocurra la elongación requerida. Para que la pared se extienda, se necesita de la ruptura de enlaces covalentes que permitan la inserción del nuevo material en la misma capa, sin que aumente su grosor. La degradación del peptidoglicano también es importante durante la división celular (Vollmer & Bertsche, 2008).

Existe una batería enzimática encargada de la degradación del peptidoglicano, estas enzimas en su conjunto reciben el nombre de autolisinas las cuales pueden tener actividad enzimática de

muramidasa, glucosaminidasa, amidasa o endopeptidasa (Figura 17). El número de genes que codifican para este tipo de enzimas puede variar entre diferentes organismos, en la figura 17, se indica entre paréntesis el número de enzimas conocidas para cada grupo en *E. coli*, en total son al menos 15 (Typas et al, 2012).

En *E. coli* aproximadamente el 50% de todo el peptidoglicano de la pared celular es removido cada generación por la acción de las autolisinas; las transglicosilasas líticas son los principales contribuidores en dicho proceso (Kraft et al, 1999).

La monocapa del sáculo de peptidoglicano en bacterias Gram negativas permite el libre paso de moléculas pequeñas, sin embargo, el paso de macromoléculas requiere del ensamblaje de complejos proteicos que atraviesen las envolturas celulares (Thanassi & Hultgren, 2000). Por lo tanto se ha propuesto que enzimas especializadas facilitan temporal y espacialmente la penetración de dichos complejos al abrir huecos de manera controlada en la pared celular (Dijkstra & Keck, 1996).

La anterior propuesta se basa en diferentes evidencias encontradas en los sistemas de transporte que atraviesan las envolturas celulares que involucran un rearrreglo específico del peptidoglicano, así como la identificación de homólogos de transglicosilasas líticas asociados a diversos sistemas de transporte (Koonin & Rudd, 1994; Koraimann, 2003).

El flagelo bacteriano es uno de los organelos bacterianos extracelulares más largos y al igual que otros complejos macromoleculares, requiere atravesar las distintas envolturas celulares. El diámetro mínimo necesario del hueco para que el eje flagelar pueda atravesar el peptidoglicano es de 13 nm, sin embargo, para permitir el ensamblaje del anillo P alrededor del eje, se requiere de un hueco aproximadamente de 26 nm (Stallmeyer et al, 1989).

En 1979 Fein (Fein, 1979) fue el primero en sugerir la necesidad de la existencia de una ruptura localizada en la pared de peptidoglicano con la finalidad de permitir al flagelo bacteriano atravesar dicha estructura. En 1992 Joris y colaboradores (Joris et al, 1992) al realizar un estudio comparativo, demostraron que el C-terminal de la proteína FlgJ de *Salmonella* era homólogo al dominio catalítico de otras autolisinas, con esta evidencia, Dijkstra y Keck (Dijkstra & Keck, 1996) sugirieron que FlgJ podría ser la responsable de la penetración de la barrera de peptidoglicano por parte del eje flagelar.

Hasta 1999 se pudo demostrar que en efecto, el C-terminal de FlgJ tiene actividad hidrolítica sobre el peptidoglicano y que dicha actividad es requerida para la formación del flagelo en *S. enterica* (Nambu et al, 1999). El dominio catalítico de FlgJ corresponde a una enzima del tipo glucosaminidasa, sin embargo dicho dominio únicamente se encuentra asociado a la proteína FlgJ en gamma y beta-proteobacterias (Nambu et al, 2006).

Rhodobacter sphaeroides, una bacteria púrpura no sulfurosa que pertenece al grupo de las alfa-proteobacterias posee un homólogo de FlgJ con una longitud de 100 residuos de aminoácidos que únicamente corresponden a la región N-terminal de la FlgJ de *Salmonella* (González-Pedrajo et al, 2002), cuya función ha sido descrita como promotora de la polimerización del eje flagelar (Hirano et al, 2001).

En 2007, el grupo de trabajo del Dr. Georges Dreyfus demostró que una enzima codificada en el contexto genético flagelar de *R. sphaeroides* era la responsable de facilitar la penetración del eje flagelar a través de la pared celular (de la Mora et al, 2007). Esta nueva proteína involucrada en la biogénesis flagelar fue nombrada SlfF dado que el análisis bioinformático la agrupaba con enzimas del tipo transglicosilasas líticas (**S**oluble **L**ytic **T**ransglycosylases) y además se trataba de una enzima específica del flagelo.

Transglicosilasas líticas.

Las transglicosilasas líticas LTs (Lytic transglycosylases) son enzimas capaces de degradar el peptidoglicano (autolisinas) al romper el enlace β -1,4 que une al MurNAc con el GlcNAc (Höltje et al, 1975). A diferencia de la lisozima, el sustrato no es hidrolizado, es decir no participa una molécula de agua en la reacción, y como resultado de la catálisis se forma un enlace 1,6 en el MurNAc (Figura 18) (Koraimann, 2003).

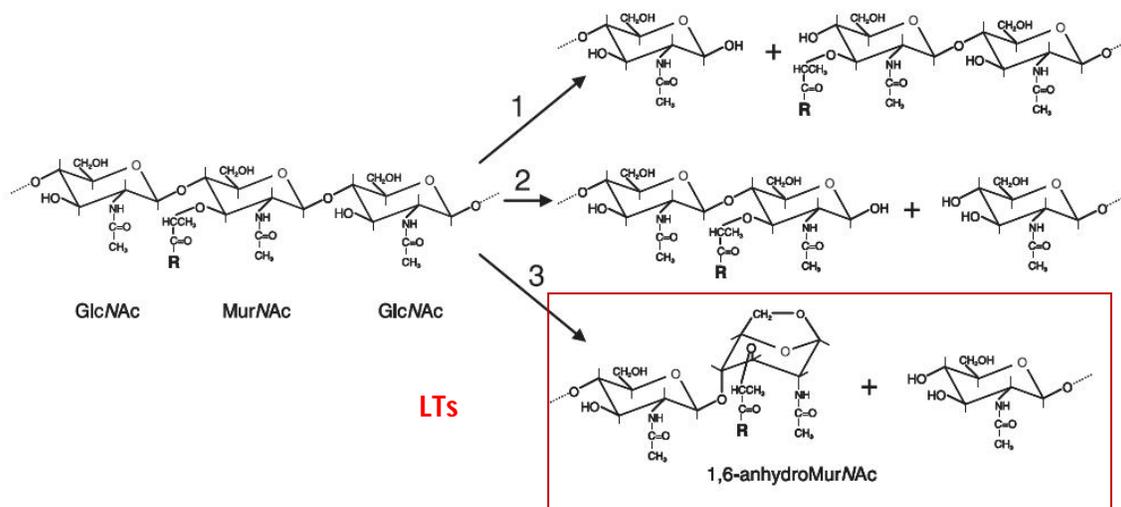


Figura 18. Ruptura del enlace glucosídico por parte de una N-acetilglucosaminidasa (1), lisozima (2) y transglucosilasa lítica (3). En la última reacción enmarcada en rojo, el corte que ocurre entre el MurNAc y la GlcNAc tiene como resultado la formación de un anillo 1,6 anhidro MurNAc debido a una transglucosilación intramolecular. La letra R representa al péptido unido al residuo de MurNAc. Imagen tomada de (Vollmer et al, 2008b).

La LTs son enzimas ubicuas en prácticamente todas las especies bacterianas, existe una variedad de éstas y presentan diferencias a nivel de secuencia y estructura. Con la finalidad de clasificarlas se realizó un análisis comparativo basado en la similitud de la secuencia y la identificación de motivos catalíticos de 127 enzimas caracterizadas e hipotéticas (Blackburn & Clarke, 2001). Como resultado se estableció la existencia de 4 familias (Figura 19), la familia 1 se subdivide a su vez en 5 subfamilias: 1A o Slt, 1B o YfhD, 1C o MltC, 1D o MltD y 1E o EmtA. Esta subfamilia comprende enzimas de una gran variedad de especies bacterianas tanto Gram negativas como Gram positivas e incluso algunos bacteriófagos, los miembros de esta subfamilia poseen 3 motivos catalíticos en el N-terminal y un cuarto motivo hacia el C-terminal.

La familia 2 agrupa enzimas hipotéticas pertenecientes a bacterias Gram negativas y poseen 6 motivos muy conservados. La familia 3 también representa enzimas pertenecientes a bacterias Gram negativas, las cuales contienen 5 motivos. Por último la familia 4 incluye transglucosilasas líticas de bacteriófagos y aparentemente no están relacionadas con las otras familias, estas enzimas presentan 4 motivos a lo largo de su secuencia (Blackburn & Clarke, 2001).

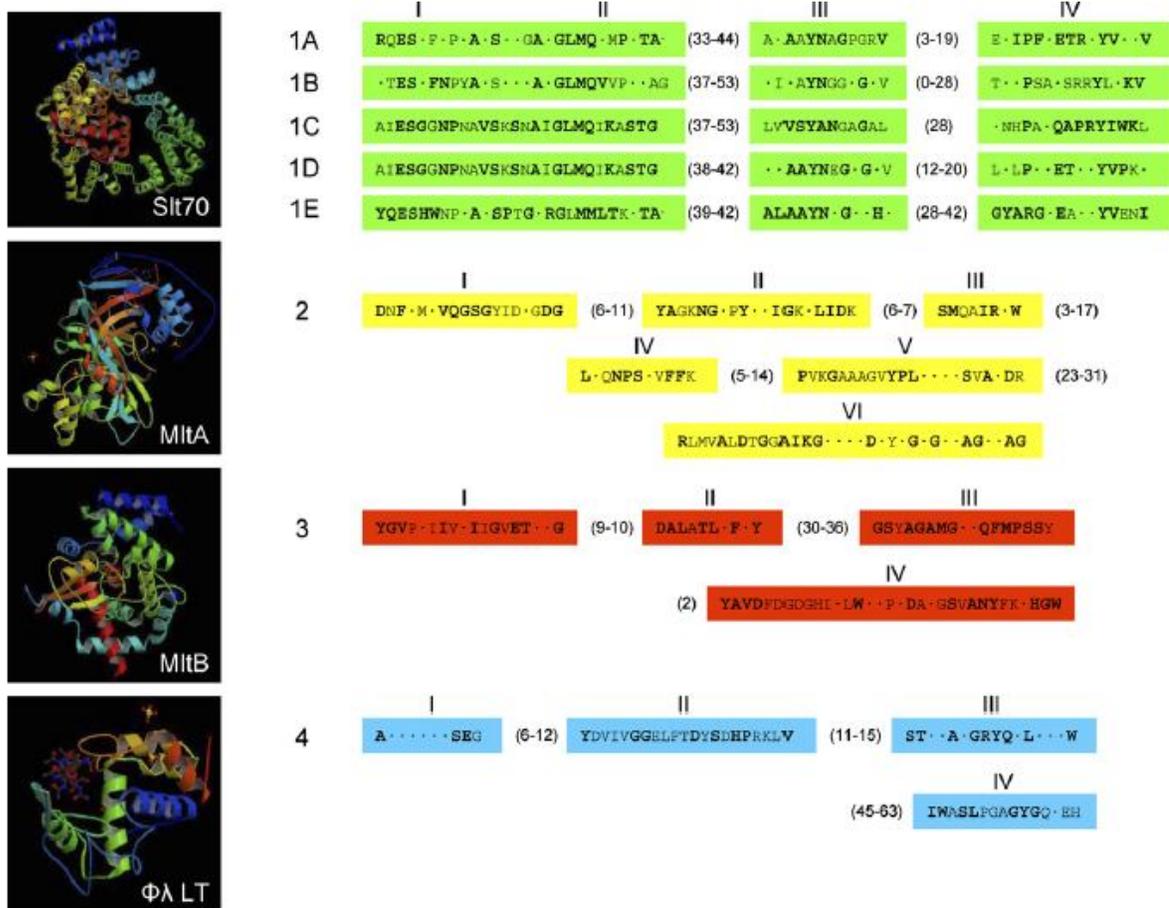


Figura 19. Clasificación de las transglicosilasas líticas. Estructuras tridimensionales de representantes de las 4 familias de LTs identificadas mediante el análisis de su secuencia y la identificación de motivos catalíticos señalados con números romanos. Los residuos que aparecen en negritas corresponden a los más conservados (por arriba del 80%), los números entre paréntesis indican el número de residuos entre cada motivo. Imagen tomada de (Blackburn & Clarke, 2001).

Planteamiento del problema.

La pared celular representa una barrera física que debe ser atravesada por el flagelo durante su formación. El diámetro del eje flagelar (13 nm) es mayor que los espacios que existen en la red formada por el peptidoglicano (4 a 8 nm) (Demchick & Koch, 1996), lo cual plantea la necesidad de la participación de enzimas con la capacidad de degradar dicho polímero (Fein, 1979).

En *Salmonella enterica* se demostró que el C-terminal de FlgJ contiene un dominio de glucosaminidasa cuya actividad catalítica es necesaria para la formación del flagelo (Nambu et al, 1999), sin embargo este modelo solo aplica para bacterias pertenecientes a los grupos γ y β -proteobacteria, en el caso de otros grupos bacterianos que poseen un homólogo de FlgJ, esta proteína únicamente contiene el dominio ensamblador (Nambu et al, 2006).

El grupo de trabajo del Dr. Georges Dreyfus reportó por primera vez la existencia de una FlgJ pequeña o también denominada monodominio en *R. sphaeroides* (González-Pedrajo et al, 2002), desde ese momento surgió la pregunta acerca de cómo el flagelo era capaz de penetrar la pared celular en esta bacteria. Años más tarde, el mismo laboratorio publicó un trabajo en el cual demostró la participación de una enzima con la capacidad de degradar la pared celular durante el ensamblaje flagelar (SlfF). El gen que codifica para esta enzima se localiza en un contexto genético flagelar (operón flgG) y la mutación de éste, tiene como consecuencia la incapacidad de ensamblar el flagelo en la cepa mutante (de la Mora et al, 2007).

En ese mismo trabajo se demostró que dicha enzima es capaz de interactuar *in vitro* con la proteína ensambladora FlgJ y con base en el análisis bioinformático de la secuencia, se sugirió que su exportación al periplasma depende de la vía de secreción Sec. A la luz de estos descubrimientos se propuso un modelo en el cual la interacción de la enzima SlfF con un componente flagelar (FlgJ) era necesaria para la localización específica en el punto de ensamblaje del flagelo (de la Mora et al, 2007).

Para respaldar el modelo propuesto, es necesario generar datos experimentales que demuestren que SlfF efectivamente se localiza en el periplasma celular y que su exportación a dicho compartimiento depende de la vía Sec y no de la vía flagelar como ocurre con la mayoría de las proteínas flagelares.

Como se mencionó en la introducción, existe una variedad de enzimas capaces de degradar el peptidoglicano (Vollmer et al, 2008b), estas se diferencian principalmente en el tipo de enlace que son capaces de romper y en el mecanismo de reacción que ocupan para dicho propósito. Además, dentro de cada grupo existe una clasificación con base en la similitud de su secuencia y en los motivos funcionales que presentan.

El dominio catalítico de la FlgJ de *Salmonella enterica* corresponde a una enzima del tipo glucosaminidasa (Nambu et al, 1999), en cambio la SlfF de *R. sphaeroides* parece pertenecer al grupo de enzimas transglicosilasas líticas. Un análisis más detallado de la secuencia de SlfF y los motivos catalíticos que presenta nos podrían ayudar a clasificarla dentro de alguno de los grupos conocidos y con ello tener un panorama de la diversidad de estrategias evolutivas empleadas por las bacterias en el caso particular del flagelo bacteriano.

Un análisis preliminar de la secuencia de SlfF muestra que 48 residuos del C-terminal no poseen similitud con alguna proteína de función conocida, sin embargo, algunos datos experimentales indican que sin esa región, la proteína SlfF es incapaz de restaurar el nado silvestre en una cepa mutante $\Delta slfF$. Es importante caracterizar la función del C-terminal de SlfF y determinar si participa en la interacción con FlgJ.

Hipótesis.

La región N-terminal de la proteína SlfF contiene una secuencia señal que determina su exportación al periplasma por la vía Sec, mientras que la región del C-terminal (48 residuos) participa en la interacción con la proteína ensambladora FlgJ.

Objetivos.

General

Determinar si la exportación de SlfF al periplasma ocurre mediante la vía Sec y establecer el papel que desempeña la región de C-terminal en la interacción con FlgJ.

Particulares

- Determinar la localización subcelular de la proteína SlfF.
- Demostrar que la exportación de SlfF se lleva a cabo por la vía Sec.
- Analizar el dominio catalítico de SlfF para poder clasificarla dentro de alguna de las subfamilias de transglicosilasas líticas.
- Construir mutantes con deleciones en la región C-terminal, analizar su capacidad de complementar a una cepa carente del gen *slfF* y determinar si son capaces de interactuar con la proteína ensambladora FlgJ *in vitro*.

Materiales y métodos.

Medios y condiciones de cultivo.

Las diferentes cepas de *Rhodobacter sphaeroides* fueron crecidas en medio Sistrom (Sistrom, 1962): KH₂PO₄ 20 mM, (NH₄)₂SO₄ 3.78 mM, ácido succínico 34 mM, ácido L-glutámico 0.67 mM, ácido L-aspartico 0.25 mM, NaCl 8.5 mM, ácido nitrilotriacético 1.04 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 0.23 mM, FeSO₄ 0.007 mM, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 0.16 μM y 0.1 mL de solución de elementos traza (EDTA 4.7 mM, ZnSO₄ 38 mM, FeSO₄ 18 mM, MnSO₄ 9 mM, CuSO₄ 1.5 mM, Co(NO₃)₂ 0.9 mM y H₃BO₃ 1.8 mM) por cada litro. Se ajustó el pH a 7.0 con KOH y se esterilizó en el autoclave, posteriormente se agregó 1 mL de solución de vitaminas (ácido nicotínico 1%, tiamina 0.5% y biotina 0.01%, esta solución fue esterilizada por filtración) por cada litro de medio Sistrom. En el caso de medio sólido se añadió 2% de bacto-agar.

Los cultivos fueron crecidos a 30°C en iluminación constante, cuando fue necesario se adicionaron antibióticos en las siguientes concentraciones: ácido nalidíxico [20 μg/L], espectinomicina [50 μg/mL], tetraciclina [25 μg/L] y kanamicina [25 μg/L].

Escherichia coli se creció en medio LB (Bertani, 1951): triptona 1%, Extracto de levadura 0.5% y NaCl 1% a 37°C en agitación constante (250 rpm), cuando se requirió, se adicionaron los siguientes antibióticos: espectinomicina [50 μg/L], kanamicina [50 μg/L], tetraciclina [25 μg/L] y penicilina [200 μg/L].

Tabla 1. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados

Cepa, plásmido u oligonucleótido	Característica relevante o secuencia	Referencia
Cepa		
<i>E. coli</i>		
JM103	<i>hsdR4</i> Δ(lac-pro) F' <i>traD36 proAB lacI</i> ^q ΔM15	(Ausubel, 1987)
M15 [pREP 4]	<i>Thi lac ara⁺ gal mlt F' recA⁺ uvr⁺ lon⁺</i> : plásmido pREP4; Kan ^r	Qiagen
BL21 (DE3)/pLysS	F' <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)/pLysS	Novagen
S17-1	<i>recA endA thi hsdR</i> RP4-2-Tc::Mu::Tn7; Tp ^r Sm ^r Kan::Tn7	(Simon et al, 1983)

<i>R. sphaeroies</i>		
WS8-N	Cepa silvestre; espontánea ; Nal ^r	(Sockett et al, 1990)
SlfF1	WS8-N <i>sltF::aadA</i> ; Nal ^r Spc ^r	(de la Mora et al, 2007)
RsgJ-np	WS8-N <i>flgJ::aadA</i> ; Nal ^r Spc ^r	(González-Pedrajo et al, 2002)
Plásmidos		
pQE30	Vector de expresión; Amp ^r N-terminal 6xHis	Qiagen
pQE60	Vector de expresión; Amp ^r C-terminal 6xHis	Qiagen
pRSJ	Derivado de pQE60, contiene <i>flgJ^r</i> ; Amp ^r	(de la Mora et al, 2007)
pRS1sltF	Derivado de pQE30, contiene <i>sltF⁺</i> ; Amp ^r	Este trabajo
pRS1sltFΔ4	Derivado de pQE30, contiene <i>sltFΔ(723-795)</i> ; Amp ^r	Este trabajo
pRS1sltFΔ5	Derivado de pQE30, contiene <i>sltFΔ(651-723)</i> ; Amp ^r	Este trabajo
pRS1sltFΔ6	Derivado de pQE30, contiene <i>sltFΔ(651-795)</i> ; Amp ^r	Este trabajo
pRK415	Derivado de pRK404, promotor <i>lac</i> ; <i>lacZ mob⁺</i> ; Tc ^r	(Keen et al, 1988)
pRKsltF	Derivado de pRK415, contiene <i>sltF⁺</i> ; Tc ^r	(de la Mora et al, 2007)
pRKsltFΔ4	Derivado de pRK415, contiene <i>sltFΔ(723-795)</i> ; Tc ^r	Este trabajo
pRKsltFΔ5	Derivado de pRK415, contiene <i>sltFΔ(651-723)</i> ; Tc ^r	Este trabajo
pRKsltFΔ6	Derivado de pRK415, contiene <i>sltFΔ(651-795)</i> ; Tc ^r	Este trabajo
pTZ19R/18R	Derivado de pUC, contiene <i>lacZ⁺</i> ; Amp ^r	Pharmacia
pIND4	Vector de expresión inducible con IPTG; Kan ^r	(Ind et al, 2009)
pINsltF	Derivado de pIND4, contiene <i>sltF</i> ; Kan ^r	Este trabajo
pINsltFΔSP	Derivado de pIND4, contiene <i>sltF</i> sin secuencia señal; Kan ^r	Este trabajo
pINsltFΔ4	Derivado de pIND4, contiene <i>sltFΔ(723-795)</i> ; Kan ^r	Este trabajo
pINsltFΔ5	Derivado de pIND4, contiene <i>sltFΔ(651-723)</i> ; Kan ^r	Este trabajo
pINsltFΔ5	Derivado de pIND4, contiene <i>sltFΔ(651-795)</i> ; Kan ^r	Este trabajo
Oligonucleótidos		
sltFfwsec+	CATGCCATGGCACGGCCCTTGCCCGCG	Este trabajo
sltFfwsec-	CATGCCATGGCGGACGAGGGCTGCGAGACG	Este trabajo
fw1	CTGATCTAGACCCTCCGGCCCCGGCCACGGTG	Este trabajo
sltFrv	GGAAGATCTCGGTTGCATTGCGAGCAGGTC	Este trabajo
orf72fw	CATGGAGCTCGCGGACGAGGGCTGCGAGACG	Este trabajo
orf72rv	CCCGAAGCTTTCACGGTTGCATTGCGAGCAG	Este trabajo
orf72rvΔ24	CCCGAAGCTTTCACGCTCGGCGAGGAGGTCCGG	Este trabajo
orf72rvΔ48	CCCGAAGCTTTCACCGGGCAGCCCTCCCTGCGT	Este trabajo
orf72fwΔ24int	CGCAGGGAGGGCTGCCCGGGACCTCCGCAGCGCCTGCG	Este trabajo
orf72rv_24int	CGCAGGGCTGCGGAAGTCCCGGGCAGCCCTCCCTGCG	Este trabajo
orf72rv	CCCGAAGCTTTCACGGTTGCATTGCGAGCAG	Este trabajo

Amp (ampicilina), Nal (ácido nalidixico), Spc (espectinomina), Kan (kanamicina), Tc (tetraciclina),

Técnicas de biología molecular.

Se utilizaron técnicas estándares de biología molecular para el aislamiento y purificación de DNA cromosomal de *R. sphaeroides* WS8-N (Ausubel, 1987). Los plásmidos y fragmentos de DNA amplificados mediante PCR fueron purificados con los kits QIAprep spin y QIAquick PCR respectivamente (Qiagen), los productos fueron clonados en pTZ19R o pTZ18R según fue necesario. La secuenciación de DNA se realizó en un secuenciador automático ABS-Prism; las reacciones de PCR se llevaron a cabo con la enzima Pfu Turbo (Invitrogen) y los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Aldrich.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Para la separación de fragmentos de DNA, se utilizaron geles de agarosa al 1% en amortiguador TE (acetato de sodio 5 mM, EDTA 1 mM, Tris-base 40 mM y ácido acético 32 mM), se corrieron a un voltaje aproximado de 80 a 100 V durante 1 h. Los geles se incubaron por 10 minutos en una solución de bromuro de etidio y se visualizaron por medio de la exposición a luz ultravioleta.

Transformación de *E. coli* (Cohen et al, 1972).

Se crecieron 10 mL de cultivo de la cepa deseada hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{550nm})=0.5, posteriormente se incubaron en hielo durante cinco minutos y se centrifugaron a 3,500 xg durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y el paquete celular se resuspendió en la mitad del volumen original (5 mL) con una solución a 4°C de CaCl₂ 100 mM; se incubó en hielo durante 10 minutos. Nuevamente se centrifugó en las mismas condiciones, el sobrenadante se decantó y el paquete celular se resuspendió esta vez en una décimo quinta fracción del volumen inicial (666 µL) con la solución de CaCl₂ 100 mM. Las células se incubaron 2 o 24 h a 4°C, pasado ese tiempo se tomaron alícuotas de 200 µL y se añadió el volumen de DNA con el que se desea transformar; se incubó durante 1 h. Las células se sometieron a un choque de calor a 43°C por 2 minutos e inmediatamente se incubaron en hielo por 2 minutos más; se añadió el volumen necesario de LB para completar a 1 mL y se incubó durante 1 h a 37°C. Por último, las células transformadas se sembraron en cajas Petri con medio LB sólido (2% de agar) en presencia del agente selectivo y se incubaron toda la noche a 37°C.

Conjugación (Davis et al, 1988).

Se crecieron cultivos de 2 y 10 mL de *E. coli* y *R. sphaeroides* respectivamente durante toda la noche. Al día siguiente se inocularon 5 mL de medio LB con 50 μ L del cultivo de *E. coli* y se incubó hasta alcanzar una $DO_{550nm}=0.5$. Los cultivos de ambas cepas se incubaron en hielo durante 5 minutos, se tomaron alícuotas de 1.5 mL de cada uno y se colocaron en tubos Eppendorf, se centrifugaron a 3,000 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y los paquetes celulares se resuspendieron en 0.5 mL de LB, se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones; este paso se repitió en dos ocasiones para cada cepa. Los paquetes celulares se resuspendieron en 0.5 mL de LB y se mezclaron, se volvieron a centrifugar a 3,000 xg durante 5 minutos y esta vez se resuspendieron en 50 μ L de LB los cuales se colocaron sobre rectángulos de aproximadamente 1 cm² de nitrocelulosa estériles y se pusieron en cajas Petri con medio LB sólido. Se incubó toda la noche a 30°C, posteriormente se recuperó el rectángulo de nitrocelulosa y se colocó en un tubo Eppendorf, se agregó 1 mL de medio LB, se agitó vigorosamente para desprender las células del papel y se sembraron en medio selectivo.

Ensayos de nado en agar semisólido.

Se inocularon 5 μ L provenientes de un cultivo en fase estacionaria en cajas Petri con medio Siström sin succinato, suplementado con 0.1 mM de propionato de sodio como fuente de carbono y con 0.25% de agar. Las cajas se incubaron a 30°C en condiciones aeróbicas en obscuridad durante 24 o 36 horas.

Electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes SDS-PAGE.

La separación de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli, 1970); se utilizaron geles con distinta concentración de acrilamida según fue necesario: 12.5, 15 o 17.5%, los geles se corrieron aproximadamente a un voltaje de 100 V durante una 1.5 h, posteriormente se tiñeron con solución de Coomassie R250 al 2%, en 50% de metanol y 10% de ácido acético. Se utilizaron marcadores de peso molecular de New England Biolabs.

Inmuno réplica tipo Western.

Después de la electroforesis en geles SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm en una cámara húmeda con amortiguador de transferencia (NaHCO_3 10 mM, Na_2CO_3 3 mM y metanol 20%) a 350 miliamperios por 1.5 h a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se incubó en una solución al 5% de leche (marca comercial *svelty*) en amortiguador TTBS (NaCl 0.5 M, Tris-base 2.4 mM, pH 7.5 y Tween-20 0.05%) durante 1 h y se realizaron tres lavados con 50 mL de amortiguador TTBS de 15, 10 y 5 minutos. Se incubó con el anticuerpo primario en diferentes diluciones según se requirió en un volumen de 10 mL de amortiguador TTBS durante 1 h, se repitieron los tres lavados y en el caso que fue necesario se incubó en las mismas condiciones con el anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa (Amersham), se hicieron nuevamente los lavados y se reveló mediante una reacción quimioluminiscente de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante (Amersham). La quimioluminiscencia se registró en placas radiográficas de la marca Kodak.

Sobrexpresión y purificación de las proteínas recombinantes SitF, FlgJ y las mutantes SitF Δ 4, SitF Δ 5 y SitF Δ 6.

Inducción y purificación de SitF silvestre y mutantes en condiciones nativas.

Se inoculó 1 L de medio LB adicionado con ampicilina [200 $\mu\text{g}/\text{mL}$], con una vigésima fracción de un cultivo en fase estacionaria. Se incubó a 37°C en agitación constante (250 rpm) hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}=0.6$; en este punto se añadió el inductor IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopironósido) a una concentración final de 0.5 mM y se incubó durante 6 h a 25°C. El cultivo se centrifugó a 3,500 xg y el paquete celular se resuspendió en 10 mL de amortiguador de fosfatos (NH_2PO_4 50 mM y NaCl 150 mM, pH 7.6) al cual se le agregó una pastilla que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche). Se sonicó 6 veces durante 1 minuto cada una, haciendo uso de un sonicador Branson modelo 250, las células se mantuvieron en hielo en todo momento para evitar el calentamiento. El extracto celular resultante se centrifugó a 14,500 xg durante 10 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se ajustó el pH a 8.0; se incubó con 300 mL de una resina de agarosa Ni-NTA (Quiagen) durante 2 h.

La resina se lavó con amortiguador de fosfatos adicionado con imidazol en diferentes concentraciones (5, 10, 15, 20, 25 y 30) mM, la proteína se eluyó con 250 mM de imidazol en un volumen de 10 mL. El eluido se dializó en 1 L de amortiguador de fosfatos pH 7.6 a 4°C durante toda

la noche. Finalmente la proteína se concentró en un sistema de ultrafiltración de la marca Millipore (Amicon Ultra 10,000 MWCO) y se determinó la cantidad de proteína como se describe más adelante.

La inducción y purificación de las versiones mutantes de SlfF se realizó con algunas modificaciones del protocolo descrito para la enzima silvestre: 1) El cultivo se indujo a una $DO_{600\text{ nm}} = 0.8$ con 1 mM de IPTG durante 6 h a 30°C, 2) se incubó con 300 μL de una resina de agarosa Ni-NTA (Quiagen) durante 1 h a 4°C en agitación, 3). El eluido se dializó en amortiguador Tris 0.1 mM pH 8.0 y se cargó en una columna de intercambio aniónico DEAE Bio-Gel A (Bio Rad). Para la elución se utilizó un gradiente lineal de 0 a 0.3 M de NaCl, se colectaron las fracciones y se analizaron en geles SDS-PAGE.

Sobreexpresión y purificación de FlgJ en condiciones desnaturalizantes.

Se inoculó medio LB con una vigésima fracción de cultivo en fase estacionaria de la cepa BL21 (DE3) pLysS transformada con el plásmido pRSJ. Se incubó durante 8 h a 37°C en agitación constante (250 rpm); se centrifugó el cultivo a 3,500 xg durante 10 minutos. El paquete celular se resuspendió en 10 mL de amortiguador de fosfatos (NH_2PO_4 50 mM y NaCl 150 mM, pH 7.6) y se sonicó 6 veces, 1 minuto cada una; se centrifugó a 3,500 xg durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 10 mL de amortiguador de fosfatos, 1 M de cloruro de guanidina (GuHCl) y se incubó en agitación a 4°C durante 1 h. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y se descartó el sobrenadante, el precipitado se resuspendió esta vez en amortiguador de fosfatos, GuHCl 6 M; se sonicó durante 20 segundos en dos ocasiones y se incubó en agitación a 4°C durante 1 h. Se centrifugó a 25,000 xg durante 1 h a 4°C y se recuperó el sobrenadante, se ajustó el pH a 8.0 y se incubó con 250 μL de resina de agarosa Ni-NTA (Quiagen) durante 2 h.

La resina se lavó con amortiguador de fosfatos, 6 M GuHCl adicionado con 10 mM de imidazol y se eluyó con 250 mM de imidazol en un volumen de 10 mL. La elución se dializó contra 1 L de amortiguador de fosfatos a 4°C durante toda la noche. Finalmente la proteína se concentró en un sistema de la marca Millipore (Amicon Ultra 5,000 MWCO) y se determinó la cantidad de proteína como se describe más adelante.

Cuantificación de proteína.

Para determinar la cantidad de proteína, se utilizó el método TCA-Lowry (Peterson, 1977); la fracción de proteína a cuantificar se disolvió en 1 mL de agua, se añadieron 100 μ L de deoxicolato de sodio al 0.15% y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 100 μ L de ácido trocloreacético (TCA) al 72% y se agitó vigorosamente. Se centrifugó a 8,500 xg durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 mL de una solución CuSO_4 0.04 mM, citrato de sodio 0.07 mM, Na_2CO_3 190 mM y NaOH 100 mM; se incubó durante 10 minutos y se añadieron 100 μ L de una solución de Folín 1:1. Se incubó durante 30 minutos y se determinó la absorbancia a 750 nm. Para la curva estándar se utilizó albúmina sérica bovina (Sigma) a diferentes concentraciones.

Fraccionamiento celular.

Se inocularon 5 mL de medio SistroM con 166 μ L de un cultivo en fase estacionaria de la cepa de *R. sphaeroides* deseada, se incubó a 30°C en condiciones aeróbicas y agitación constante (250 rpm), hasta una $\text{DO}_{600\text{ nm}} = 0.35$. Se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y se indujo durante tres horas. Se centrifugaron los cultivos a 3,500 xg y el paquete se resuspendió en 5 mL de amortiguador de fosfatos (NH_2PO_4 50 mM y NaCl 150 mM, pH 7.6) y se centrifugó a 8,000 xg durante 10 minutos. El paquete celular se resuspendió en 0.5 mL de amortiguador de fosfatos adicionado con sacarosa 20%, se añadió PMSF y EDTA a una concentración final de 1 y 2 mM respectivamente, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 8,000 xg, se analizó el sobrenadante y el precipitado mediante inmuno réplica tipo Western.

Ensayo de accesibilidad a proteasas.

Cultivos de la cepa SlfF1 complementada con un el plásmido inducible pIND4 que contiene al gen silvestre sltF o a la versión mutante sltF Δ SP (la cual carece de los nucleótidos que codifican para la secuencia señal) se crecieron en medio SistroM a 30°C en condiciones aeróbicas hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{ nm}} = 0.35$. Se añadió el inductor IPTG a una concentración de 1 mM y se dejó incubando durante 1 h. Los cultivos se centrifugaron a 3,500 xg y el paquete celular se resuspendió en 5 mL de amortiguador 10 mM Tris-Cl pH 8.0; este paso se repitió en dos ocasiones para lavar las células. Finalmente el paquete celular se resuspendió en 1 mL del mismo amortiguador y se dividió en dos tubos Eppendorf con 500 μ L cada uno, se centrifugó a 2,500 xg durante 10 minutos a 4°C y el

paquete celular se resuspendió en 150 μL de una solución 100 mM Tris-Cl pH 8 y 20% de sacarosa, se incubó durante 5 minutos a 37°C y se añadió EDTA a una concentración final de 10 mM. Se agregó lisozima a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó durante 5 minutos a 35°C, a los 2 minutos se mezcló la reacción por inversión.

Al tubo experimental se añadió proteinasa K a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó durante 15 minutos a 37°C, se mezcló por inversión cada 3 minutos, pasado ese tiempo se añadieron 1.5 μL de una solución 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y se mezcló por inversión 5 veces. Se añadieron 150 μL de amortiguador de carga 2X, las distintas reacciones se analizaron por inmuno replica tipo Western.

Ensayos de estabilidad.

Se crecieron cultivos de las diferentes cepas de *R. sphaeroides* en medio Sistrom a 30°C hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{ nm}} = 0.35$, se añadió IPTG 1 mM y se indujo por 1 h. Se añadió rifampicina (inhibe la síntesis de RNA) a una concentración final de 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se tomaron muestras de 200 μL a diferentes tiempos (0, 1, 2.5, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos). Las muestras se centrifugaron a 3,500 $\times\text{g}$ y se resuspendieron en amortiguador de carga, se hirvieron durante 10 minutos y se analizaron por inmuno réplica tipo Western.

Se determinó la densidad de la señal obtenida mediante la inmuno detección tipo Western y se graficó como función del tiempo, los datos se ajustaron a una función de decaimiento de primer orden (Ecuación 1) con el propósito de determinar la constante de degradación y las vidas medias de las diferentes versiones de SlfF.

$$1) \quad \frac{dN}{dt} = -kN \quad \longrightarrow \quad \ln \frac{N}{N_0} = -kt \quad N = \frac{1}{2}N_0 \quad t = t_{1/2} \quad t_{1/2} = \frac{0.693}{k}$$

Co-inmuno precipitación.

Esferas de Sefarosa CL-4B acopladas a proteína A (20 μL) (Sigma Chemicals) se incubaron con 8 μg de gamma globulinas anti-SlfF en 1 mL de amortiguador de fosfatos pH 7.6 durante 12 h a 4°C; se centrifugó a 3,500 $\times\text{g}$ durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Se incubó la proteína deseada o la mezcla de proteínas a evaluar en a una concentración de 0.14 μM en 1 mL de amortiguador de fosfatos pH 7.6 durante 1 h a 4°C, esta reacción se utilizó para resuspender el

precipitado de las esferas de Sefarosa previamente incubadas con las gamma globulinas anti-SItF. La mezcla se incubó durante 1 h a 4°C y se centrifugó a 10,000 xg durante 10 minutos; el precipitado se resuspendió en 1 mL del mismo amortiguador, este paso se repitió en 5 ocasiones para lavar la resina. Finalmente el precipitado se resuspendió en 30 µL de amortiguador de carga y se analizó por inmuno réplica tipo Western con His-Probe-HPR (Pierce Chemicals, Rockford, IL.) a una dilución de 1:10,000.

Cromatografía líquida en columna.

Se purificó a la proteína SItF silvestre en las condiciones descritas anteriormente y se cargaron 300 µg en un volumen de 500 mL en una columna Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia) equilibrada con amortiguador de fosfatos (NH_2PO_4 50 mM y NaCl 150 mM, pH 7.6), se utilizó un equipo FPLC (Waters) a un flujo de 0.2 mL/min. Se colectaron fracciones cada 1.5 minutos y se analizaron mediante inmuno réplica tipo Western con anticuerpos policlonales anti-SItF a una dilución de 1:2,500.

Para el cálculo del peso molecular aparente, se generó una curva patrón con las proteínas: albúmina sérica bovina BSA (66kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino (29 kDa) y citocromo c de corazón de caballo (12.4 kDa), (Sigma-Aldrich). Las proteínas estándares se mezclaron en concentración 7 µM cada una en un volumen final de 500 µL y se corrieron en las mismas condiciones que la proteína SItF. Se graficó el volumen de elución contra el logaritmo base 10 del peso molecular.

Resultados.

El análisis de bioinformático de *SlfF* nos permitió identificar la presencia de un péptido señal que sugiere que esta proteína se exporta al periplasma mediante la vía Sec. Con la finalidad de aportar evidencia experimental, diseñamos una versión mutante de *slfF* a la cual le fueron removidos los nucleótidos que codifican para los primeros 27 residuos de aminoácidos que corresponden a dicho péptido señal (*slfF* Δ SP), según la predicción del programa SignalP 4.1 (Emanuelsson et al, 2007) (Figura 20).

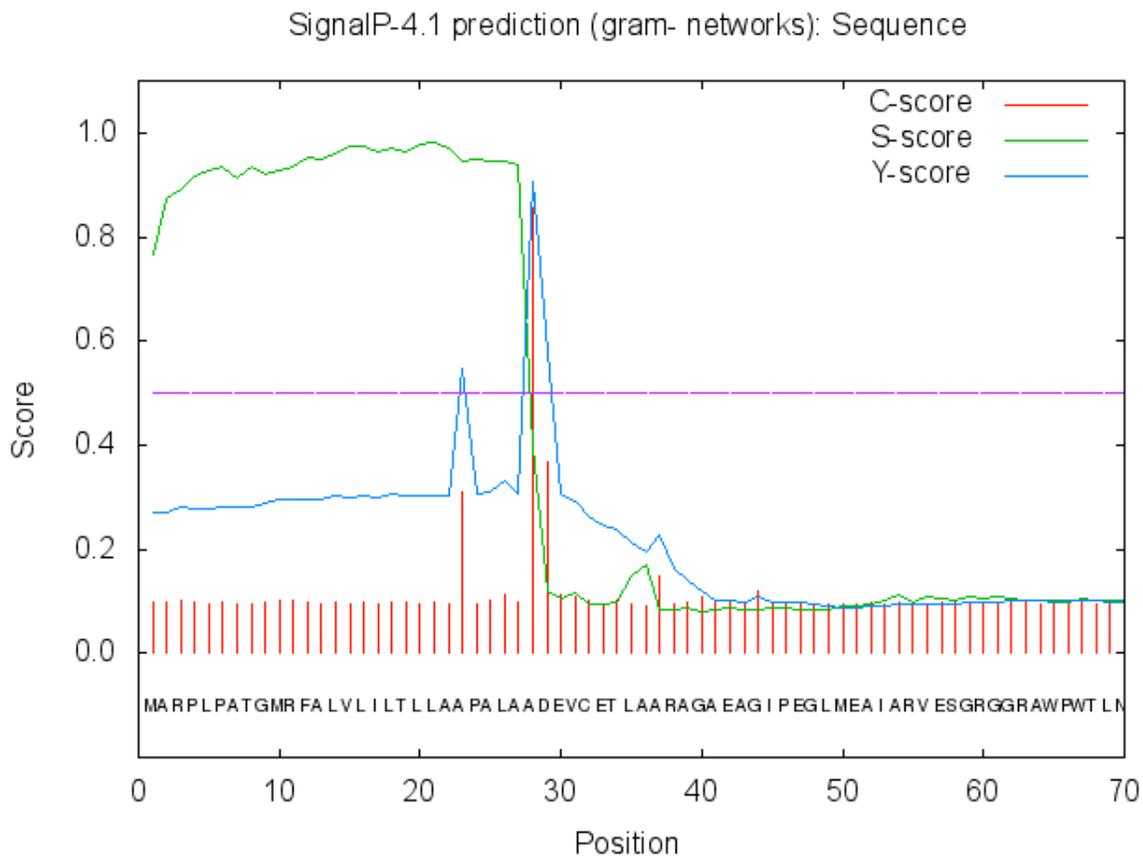


Figura 20. Gráfica generada mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos de *SlfF* con el programa SignalP 4.1. Se predice un corte entre el aminoácido A27 y A28.

Se realizaron ensayos de complementación en *trans* de la cepa *SlfF1*, que contiene una interrupción del gen *slfF* (de la Mora et al, 2007); las complementaciones fueron hechas con el gen silvestre *slfF* y con la versión mutante *slfF* Δ SP. Posteriormente se analizaron los fenotipos mediante

ensayos de nado en agar suave adicionados con 100 μ M de propionato de sodio como fuente de carbono y 1mM de IPTG como inductor; las cepas analizadas fueron: la mutante SltF1, la mutante complementada con el gen silvestre (SltF/sltF), la mutante complementada con la versión sin secuencia señal (SltF1/sltF Δ SP) y la cepa silvestre, (Figura 21 A).

La cepa silvestre WS8 fue transformada con el plásmido pINsItF debido a que los niveles de expresión genómicos son difícilmente detectables mediante ensayos de inmuno réplica tipo Western.

La proteína sin secuencia señal fue incapaz de restablecer el fenotipo de nado silvestre (Figura 21 A). Para descartar la posibilidad de que la falta de complementación se debiera a la ausencia de la proteína, se realizaron ensayos de inmuno réplica tipo Western a partir de extractos totales de las mismas cepas utilizadas en la Figura 21 A. La proteína SltF con y sin secuencia señal fue detectada en cantidades equivalentes (Figura 21 B).

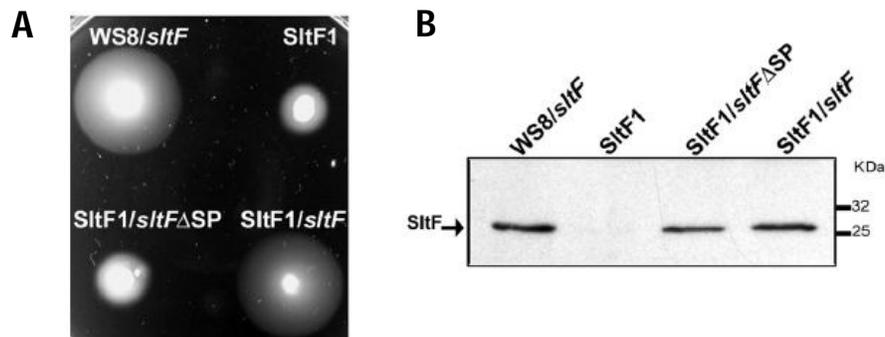


Figura 21. Efecto de la eliminación del péptido señal en la proteína SltF. (A) Ensayo de nado en agar suave (0.25%) de la cepa silvestre WS8 con el gen silvestre *sltF* en *trans*, la cepa mutante SltF1 (Δ *sltF*) complementada con el gen silvestre *sltF* y la misma cepa complementada con una copia del gen *sltF* sin la secuencia señal (*sltF* Δ SP). El medio fue adicionado con 100 μ M de propionato de sodio como fuente de carbono y 1mM de IPTG. (B) Análisis por inmuno réplica tipo Western de las mismas cepas utilizadas en el panel A, se utilizaron gamma globulinas anti-SltF en dilución 1:2,500. Gel SDS-12.5% PAGE.

Se hicieron ensayos de fraccionamiento para determinar la localización subcelular de SltF y SltF Δ SP en un fondo genético silvestre y en una cepa mutante Δ fleQ, la cual es incapaz de sintetizar ningún componente flagelar y por lo tanto carece de la vía de exportación específica del flagelo (SST3). En ambos casos se analizaron las fracciones del paquete celular y periplasma con anticuerpos

policlonales específicos anti-SltF. Se utilizó a la proteína quimiotáctica citoplasmática CheY6 como control.

La proteína SltF se localiza en el periplasma aún en ausencia del Sistema de Secreción Tipo III (SST3), este resultado confirma que su exportación es independiente a esta vía (Figura 22 A), por el contrario, la mutante SltF Δ SP no se exporta en ninguno de los casos (Figura 22). La proteína CheY6 se encuentra exclusivamente en la fracción del paquete celular que contiene a los elementos citoplasmáticos.

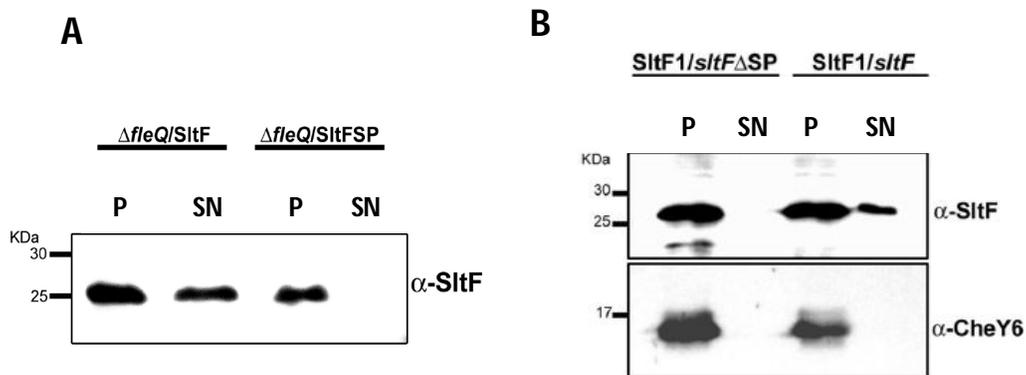


Figura 22. Localización subcelular de SltF con y sin secuencia señal. A) Ensayo de fraccionamiento celular en un fondo genético $\Delta fleQ$. B) Ensayo de fraccionamiento celular en la cepa SltF1, la proteína quimiotáctica CheY6 se utilizó como control citoplasmático. Se analizaron las fracciones del Paquete celular (P) y Periplasma (SN) mediante inmuno réplica tipo Western utilizando gamma globulinas anti-SltF y anti-CheY6 en diluciones 1:2,500 y 1:300,000 respectivamente. Se emplearon geles SDS-12.5% PAGE en los tres casos.

Adicionalmente se realizó un ensayo de accesibilidad a proteasas para confirmar la localización periplásmica de SltF. Mediante choque osmótico y la adición de lisozima, se liberó el contenido periplásmico al medio, posteriormente se añadió proteinasa K. Las proteínas citoplasmáticas permanecen protegidas de la acción proteolítica al interior de los esferoplastos resultantes; por el contrario, las proteínas periplásmicas quedan expuestas a la degradación por parte de la proteinasa K.

El análisis por inmuno réplica tipo Western muestra que la proteína SitF se degrada por completo tanto en la cepa silvestre como en la mutante SitF1, mientras que la señal de la versión sin secuencia señal (SitF Δ SP) permanece en presencia de la proteinasa K (Figura 23).

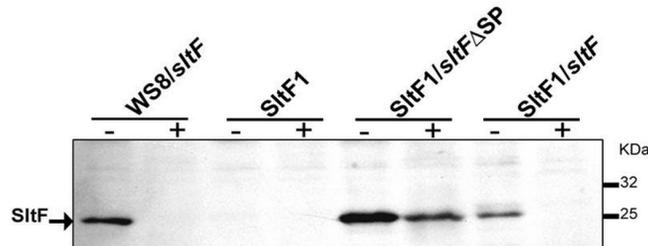


Figura 23. Ensayo de acceso a proteasas para determinar la localización de las proteínas SitF y SitF Δ SP. Las células fueron sometidas a choque osmótico e incubadas con lisozima, posteriormente se añadió proteinasa K en los casos que se indican con el signo (+). Se utilizaron gamma globulinas anti-SitF en dilución 1:2.500 Gel SDS-12.5% PAGE.

Los motivos catalíticos presentes en SitF corresponden a motivos característicos de la Familia 1 de transglicosilasas líticas; con la intención de ubicar a SitF dentro de alguna de las cinco subfamilias que comprende esta familia (Blackburn & Clarke, 2001), se realizó un alineamiento múltiple con el algoritmo MUSCLE utilizando las secuencias de cinco enzimas distintas pertenecientes a cada una de las de las cinco subfamilias y la secuencia de SitF. A partir del alineamiento se construyó un árbol filogenético con el algoritmo Neighbor joining (Figura 24), SitF se agrupó más cercanamente con las enzimas de la subfamilia 1D (MItD).

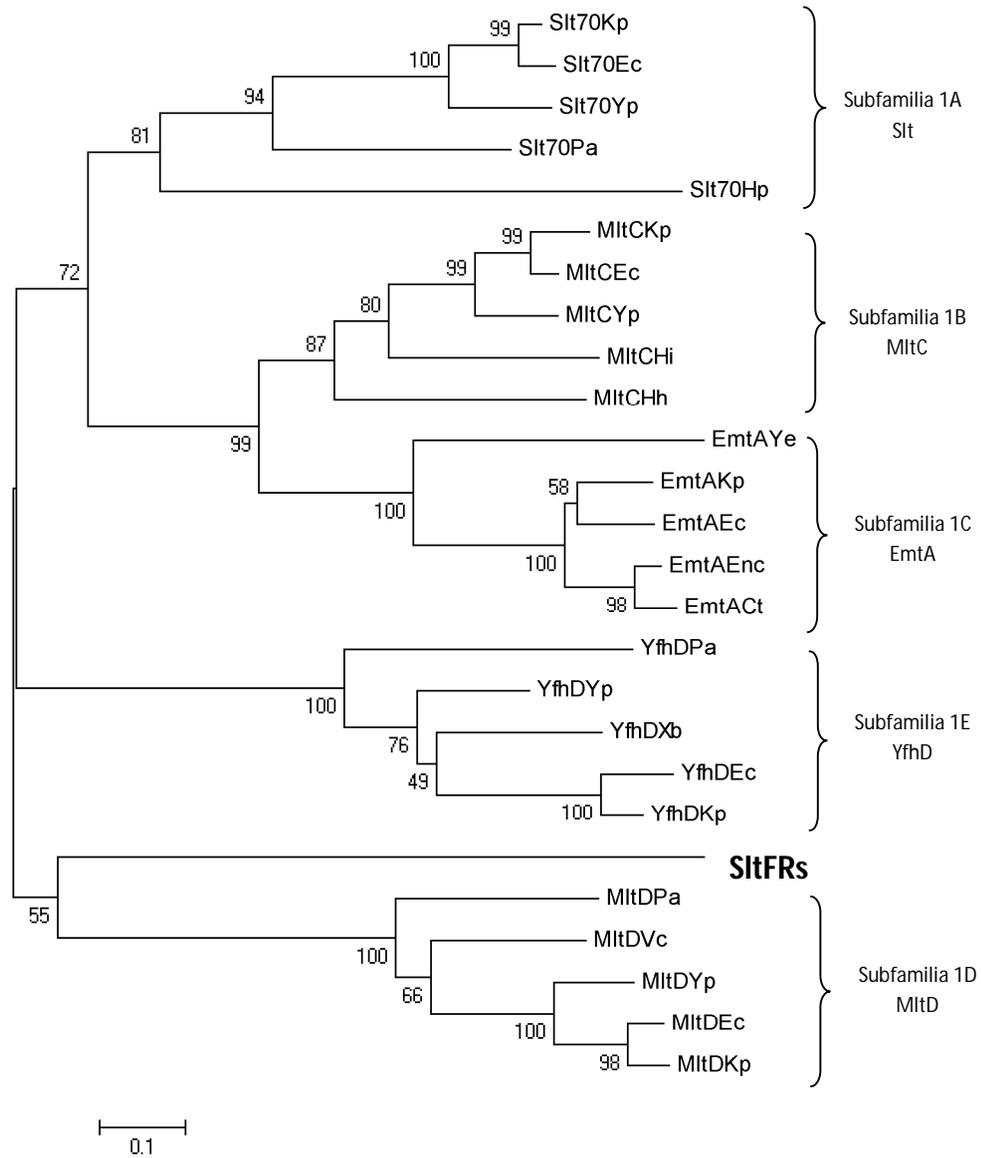


Figura 24. Árbol filogenético de distintas transglucosilasas líticas pertenecientes a las cinco subfamilias que conforman la familia 1. Slf se agrupa junto con enzimas de la familia 1D. Para el alineamiento se utilizó el algoritmo de MUSCLE y para la filogenia el algoritmo de Neighbor joining. Con número se muestran los valores de Bootstrap obtenidos a partir de 500 iteraciones.

Al realizar un alineamiento múltiple de Slf únicamente con las secuencias de las transglucosilasas líticas pertenecientes a la subfamilia 1D también llamadas MitD (Blackburn & Clarke, 2001) pudimos identificar varios aminoácidos conservados y las firmas más características de este

grupo de enzimas (Figura 25). Adicionalmente, este análisis nos permitió delimitar el dominio catalítico de SltF el cual abarca desde el residuo 47 hasta el 217 e identificar una región que comprende los últimos 48 residuos del C-terminal la cual no forma parte del dominio catalítico y no es homóloga a alguna secuencia cuya función esté caracterizada.

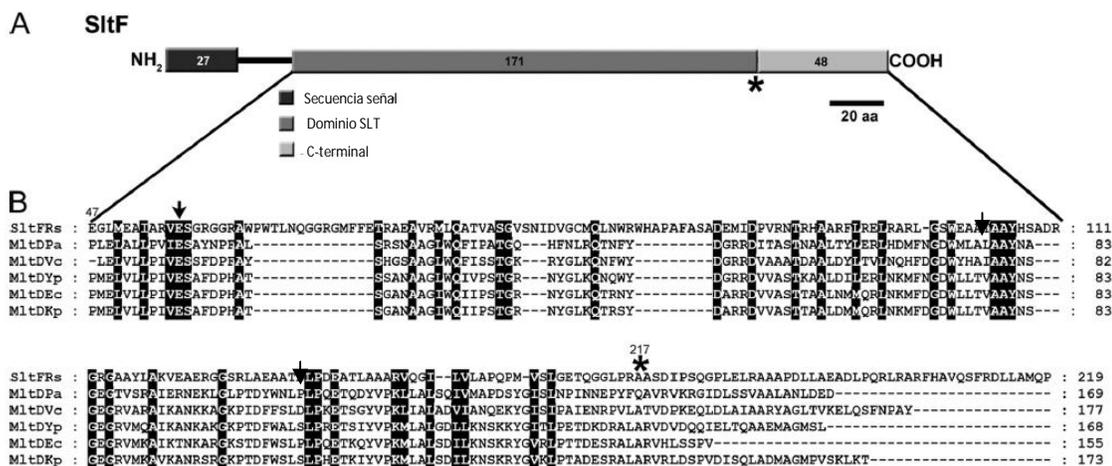


Figura 25. A) Representación esquemática de los diferentes dominios funcionales propuestos en este estudio para SltF. B) Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de varias enzimas pertenecientes a la subfamilia 1D de transglicosilasas líticas. El lineamiento fue realizado usando el programa MUSCLE, las secuencias de transglicosilasas utilizadas pertenecen a los siguientes organismos: *R. sphaeroides* (Rs), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Vibrio cholerae* (Vc), *Yersinia pestis* (Yp), *Escherichia coli* (Ec) y *Klebsiella pneumoniae* (Kp). Las flechas indican las firmas características de este tipo de enzimas y el asterisco el final del dominio catalítico.

Con la finalidad de obtener información que nos permitiera conocer la función de la región del C-terminal de SltF, se construyeron tres diferentes mutantes que carecen de los nucleótidos que codifican para los últimos 24 (*sltFΔ4*), los penúltimos 24 (*sltFΔ5*) y el total de los 48 residuos de aminoácidos que corresponden a dicha región (*sltFΔ6*) como se indica en la Figura 26 A.

Se evaluó la capacidad de complementar el fenotipo de nado silvestre por parte de las mutantes del C-terminal mediante ensayos de nado en agar suave. Los genes de las proteínas con deleciones en el extremo C-terminal se introdujeron en el plásmido pRK415 a la cepa SltF1 (SltF1/*sltFΔ4*, SltF1/*sltFΔ5* y SltF1/*sltFΔ6*) y se comparó el halo de nado con la cepa silvestre (WS8), con la mutante interrumpida de *sltF* (SltF1) y con la mutante complementada con el gen silvestre

(SlfF1/*sltF*). Ninguna de las tres mutantes del C-terminal fue capaz de restaurar el nado en la mutante SlfF1 (Figura 26 B).

Se corroboró la presencia de las distintas versiones de SlfF en las cepas utilizadas en el panel B de la Figura 25 mediante ensayos de inmuno réplica tipo Western. No se detectó señal en el carril correspondiente a la mutante SlfF Δ 4, por el contrario, en los carriles de las mutantes SlfF Δ 5 y SlfF Δ 6, se detectó una señal muy intensa en comparación con la cepa silvestre WS8 y con la mutante SlfF1 complementada con el gen silvestre.

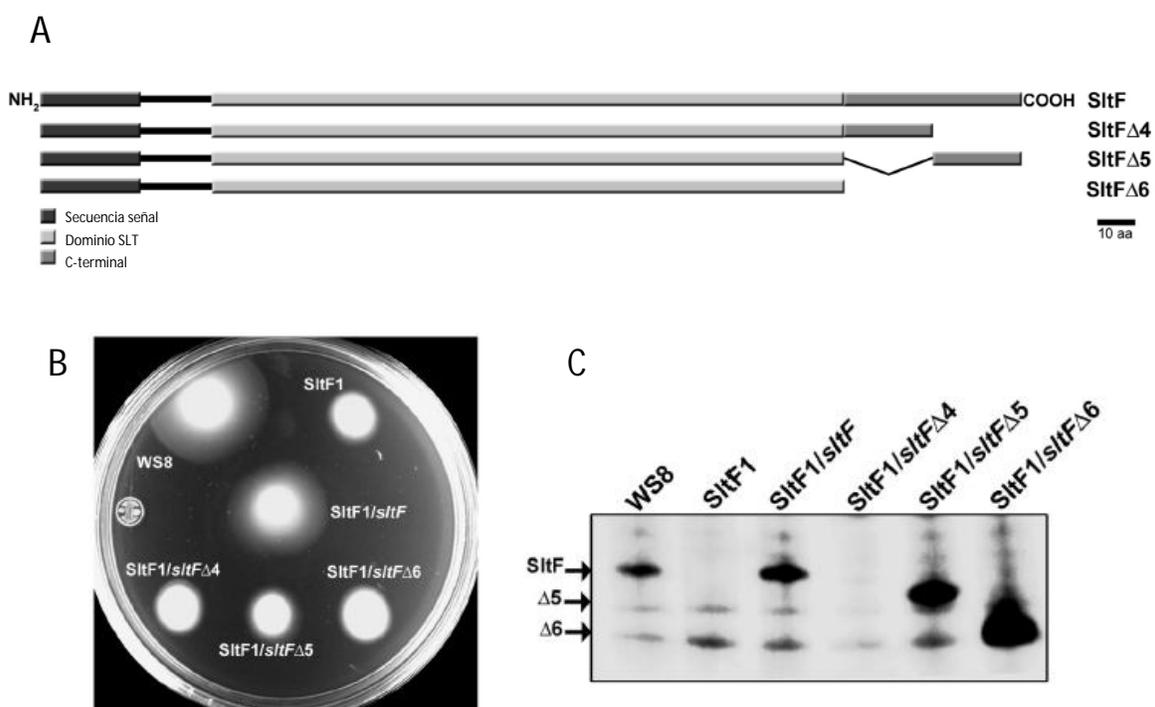


Figura 26. Análisis funcional del C-terminal de SlfF. A) Representación esquemática de la proteína SlfF silvestre y las tres mutantes con deleciones en el extremo C-terminal. Se señalan la secuencia señal, la región correspondiente al dominio catalítico y la región del C-terminal. B) Ensayo de nado en agar suave que evaluó la capacidad de las mutantes del C-terminal para complementar el nado en la mutante SlfF1. C) Inmuno réplica tipo Western de las cepas utilizadas en el ensayo de complementación (panel B). Se utilizaron gamma globulinas anti-SlfF en diluciones 1:2,500. Gel SDS-12.5% PAGE.

Dadas las diferencias que se encontraron en las cantidades de proteína en el ensayo de inmuno réplica tipo Western que se muestra en la Figura 26 C, decidimos evaluar la estabilidad de

SlfF y de las mutantes resultantes del análisis por deleción. Se hizo un seguimiento por inmuno réplica tipo Western de las distintas versiones de SlfF después de la adición de rifampicina a una concentración de 800µg/mL. La rifampicina inhibe a la RNA polimerasa y como resultado final detiene la síntesis *de novo* de proteína.

Se tomaron muestras a distintos tiempos (0, 1, 2.5, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos) y se analizaron por inmuno réplica tipo Western con gamma globulinas anti-SlfF (Figura 27 A). La densidad de las señales obtenidas se procesó con un software especializado y se graficó como función del tiempo, el análisis matemático se realizó como se indica en (Belle et al, 2006). Los resultados se resumen en la Tabla 2.

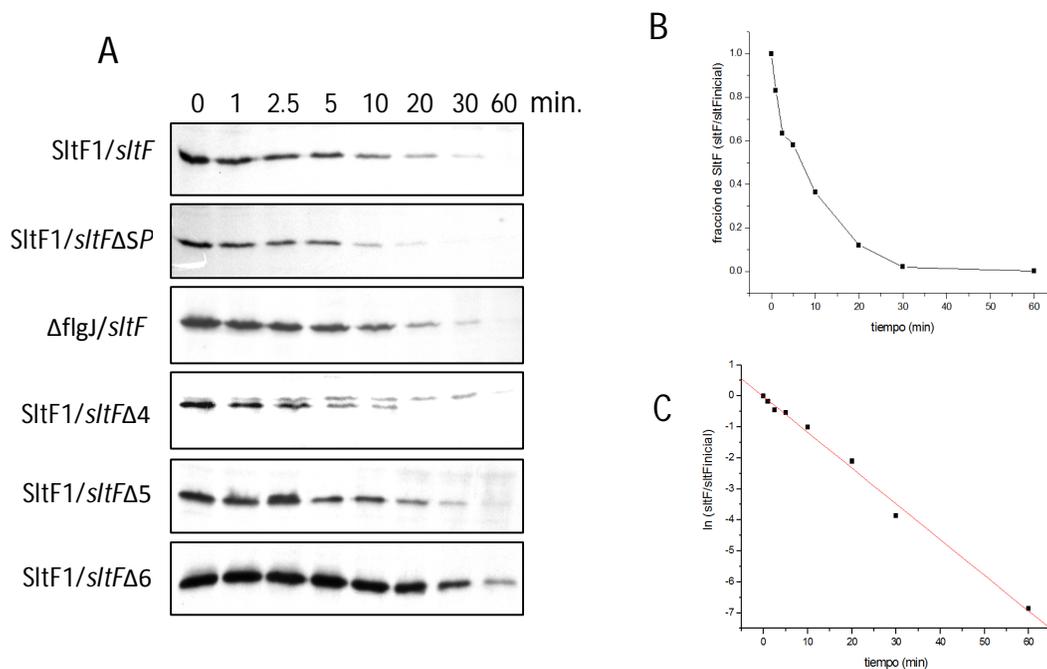


Figura 27. Determinación de la vida media de las distintas versiones de SlfF. A) Imagen representativa de las señales obtenidas de cada proteína mediante el análisis por Inmuno réplica tipo Western. B y C) Gráficas que muestran el ajuste de los datos de densitometría de las señales mostradas en el panel A, al modelo de decaimiento exponencial.

Tabla 2. Vida media de las diferentes versiones de SltF.

Versión de SltF	Valor de vida media (min.) $\pm \sigma$ (n=3)
SltF	4.62 \pm 0.34
SltFΔSP	6.42 \pm 0.21
SltF (ΔflgJ)	7.32 \pm 0.69
SltFΔ4	3.45 \pm 0.24
SltFΔ5	11.03 \pm 0.87
SltFΔ6	15.80 \pm 0.37

Todas las proteínas mutantes mostraron valores de vida media distintos a la proteína silvestre (Tabla 2). En el caso de las mutantes SltF Δ 5 y SltF Δ 6, estos valores aumentan casi tres y cuatro veces respectivamente, dicho aumento es congruente con la mayor señal detectada en la Figura 26 C. Por el contrario, la delección de los últimos 24 residuos de aminoácidos genera una proteína inestable y muy probablemente por esa razón sea indetectable en el ensayo de la Figura 26 C.

La mutante que carece de la secuencia señal SltF Δ SP y que por lo tanto se localiza exclusivamente en el citoplasma de la célula (Figura 22 A) tiene un valor de media mayor que la proteína silvestre que es exportada al periplasma. También se evaluó la estabilidad de SltF en ausencia de FlgJ, en este caso su valor de vida media aumenta aproximadamente un 50% (Tabla 2).

Experimentos adicionales realizados en el laboratorio, muestran que ninguna de las proteínas mutantes pierde su actividad catalítica (de la Mora et al, 2012), por esta razón decidimos evaluar si la

falta de complementación se debía a que dichas mutaciones alteraban su capacidad de interactuar con FlgJ; para ello, se purificaron las proteínas SlfF, FlgJ y las tres versiones mutantes de SlfF y se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación (Figura 28).

Se incubaron esferas de Sefarosa acopladas a proteína A con gamma globulinas anti-SlfF y posteriormente se añadió una de las versiones de SlfF con o sin FlgJ y se incubó durante una hora a 4°C en agitación. Como control negativo únicamente se añadió a FlgJ (carril 5, Figura 28), las distintas reacciones fueron analizadas mediante inmuno réplica tipo Western con anticuerpos anti-His.

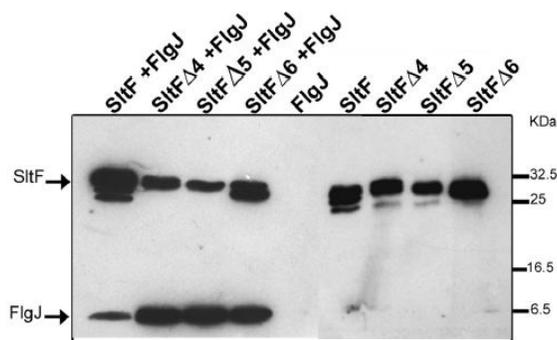


Figura 28. Ensayo de coimmunoprecipitación de SlfF silvestre y las tres versiones con mutaciones en el C-terminal en presencia o ausencia de FlgJ. Análisis por Inmuno réplica tipo Western, se utilizaron anticuerpos anti-His en dilución 1:10,000. Gel SDS-12.5% PAGE.

Ninguna de las mutantes del carboxilo pierde la capacidad de interactuar con SlfF, por el contrario, la señal de la coimmunoprecipitación de FlgJ se ve aumentada en los tres casos. En el carril cinco en el cuál únicamente se añadió a FlgJ, no se detectó ninguna señal, es decir no existe interacción inespecífica con la resina o con la proteína A. Los últimos cuatro carriles de la Figura 28 únicamente muestran a las distintas versiones de SlfF que se añadieron en las mismas concentraciones.

Ensayos de interacción de doble híbrido en levadura confirman los resultados obtenidos mediante las coimmunoprecipitaciones, adicionalmente muestran que SlfF tiene la capacidad de interactuar consigo misma y que las mutantes del carboxilo pierden dicha capacidad (de la Mora et al, 2012).

Para explorar la posibilidad de que la interacción SlfF-SlfF pudiera significar la existencia de formas multiméricas de esta proteína, realizamos ensayos de cromatografía líquida en columna de exclusión molecular que nos permitieron determinar el estado oligomérico de SlfF. Se purificó a SlfF y se corrieron 300 µg en un volumen de 500µL en amortiguador 50mM NaH₂PO₄, 150mM NaCl, pH7.6 a un flujo de 0.2mL/min (Figura 29, panel A y C). Se colectaron fracciones cada 1.5 minutos y se analizaron por inmuno réplica tipo Western con gamma globulinas anti-SlfF a una dilución de 1:2,500.

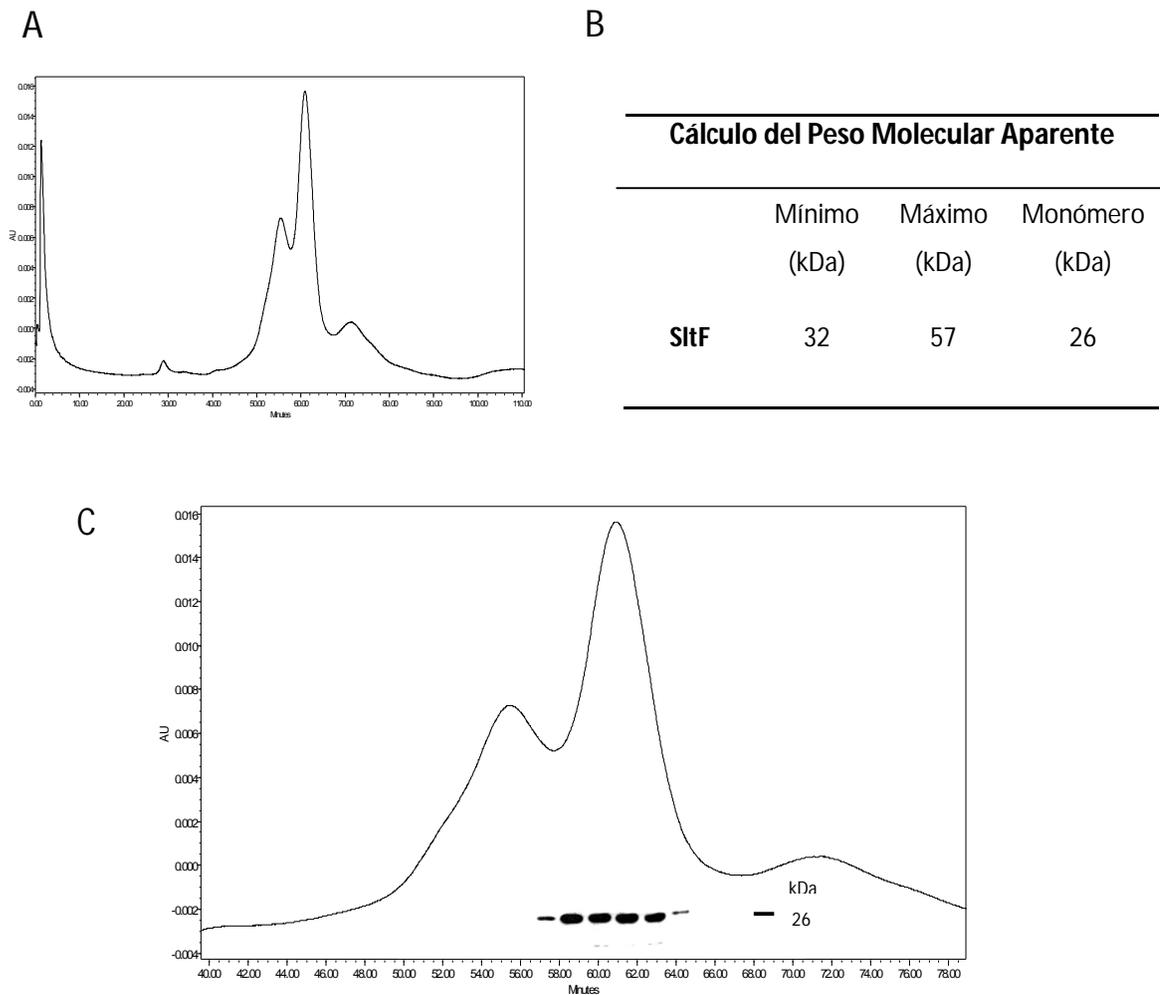


Figura 29. Ensayos de cromatografía líquida en columna de exclusión molecular. A) Cromatograma de SlfF, se cargaron 300 µg de proteína purificada en un volumen de 500 µL. Se utilizó una columna Superdex 75 (10/300) en un sistema FPLC Waters, las muestras fueron corridas en amortiguador 50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl pH 7.6, a un flujo de 0.2mL/min. B) Tabla de los pesos moleculares aparentes máximo y mínimo calculados para SlfF a partir del ensayo de cromatografía, se indica el peso predicho para el monómero. C) Acercamiento de los picos obtenidos en el cromatograma del panel A, se señalan las fracciones colectadas y analizadas por inmuno réplica tipo Western, la señal de SlfF va del minuto 57 al minuto 64.5. Se utilizaron gamma globulinas anti-SlfF en dilución 1:2,500.

Se detectó la señal de Stf en las fracciones de la 38 a la 42 cuyos pesos moleculares aparentes mínimo y máximo calculados a partir de una curva patrón son 32 y 57 kDa respectivamente (Figura 29 panel C), este intervalo abarca los pesos predichos para el monómero y el dímero.

Discusión.

En este trabajo se demostró que la proteína SlfF se exporta al periplasma por la vía Sec y no por la vía flagelar o vía de secreción tipo III como ocurre con la mayoría de las proteínas flagelares (Macnab, 2004; Minamino et al, 2008). Las excepciones reportadas son las proteínas de los anillos L y P y la chaperona del anillo P, la proteína FlgA; estas 3 proteínas también son exportadas al periplasma por la vía Sec (Homma et al, 1987a; Nambu & Kutsukake, 2000).

Cabe resaltar que en el caso de la proteína FlgJ de *Salmonella*, el dominio ensamblador se encuentra en la región N-terminal y el dominio de glucosaminidasa en la región C-terminal (Hirano et al, 2001). Varios análisis sugieren que la secuencia que reconoce el aparato de exportación flagelar se localiza en el N-terminal, este hecho permite que en esta bacteria, ambos dominios (los cuales forman parte de la misma proteína) sean exportados por la vía flagelar.

En otras α -proteobacterias como *Silicibacter pomeroyi* y *Bradyrhizobium japonicum*, también se encuentra genes que codifican para transglicosilasas líticas dentro de contextos genéticos flagelares, curiosamente para los productos de estos genes de igual modo se predice su exportación al periplasma por la vía Sec (de la Mora et al, 2007). En *Caulobacter crescentus* se reportó la participación de una transglicosilasa lítica en la formación del flagelo y del pili la cual fue nombrada PleA. En este caso se propone que su exportación al periplasma puede ocurrir por la vía de secreción tipo I o vía ABC, debido a que dicha proteína carece de una secuencia señal en el N-terminal y en cambio posee un C-terminal rico en glicinas, característica distintiva de las proteínas que se exportan por esta vía (Viollier & Shapiro, 2003).

Dado que la presencia de una FlgJ monodominio es una condición presente en la mayoría de los grupos bacterianos (Nambu et al, 2006), es posible que el modelo que involucra la participación de una proteína independiente con capacidad de degradar el peptidoglicano y que permita de manera específica la penetración del flagelo como es el caso de SlfF, se aplique también en otras bacterias.

No solamente el flagelo requiere atravesar la pared celular, otros complejos macromoleculares deben llevar a cabo dicho proceso, incluidos muchos de los sistemas de secreción. Recientemente se reportó que la transglicosilasa lítica EtgA participa en el ensamblaje del

inyectisoma de *E. coli* enteropatógena (EPEC), curiosamente esta proteína también es exportada por la vía Sec (García-Gómez et al, 2011).

Los estudios estructurales y de biogénesis del flagelo bacteriano han sido realizados principalmente en *E. coli* y *S. enterica*. A pesar de que existe una estructura básica y un núcleo de componentes muy conservados entre las distintas especies bacterianas (Liu & Ochman, 2007), en los últimos años, el estudio de bacterias pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos nos han permitido darnos una idea de la gran variabilidad que existe entre los sistemas flagelares (Chen et al, 2011; Snyder et al, 2009).

Muy probablemente el asunto de la penetración del peptidoglicano sea un ejemplo más de esa gran variabilidad. Además de los casos ya mencionados de *S. enterica* y *E. coli* en donde el dominio de glucosaminidasa se encuentra fusionado a la proteína FlgJ, en 2006 se publicó la existencia de una FlgJ fusionada a un dominio de peptidasa en el género *Desulfovibrio* (Nambu et al, 2006), este dominio es capaz de degradar el peptidoglicano pero lo hace al romper los enlaces entre los péptidos pequeños que se encuentran unidos al MurNAc.

Finalmente, nuestra búsqueda en la base de datos del Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) nos permitió encontrar 6 fusiones entre FlgJ y un dominio de transglicosilasa lítica en algunas especies de los géneros *Pseudomonas* e *Hippea*. Todas estas proteínas quiméricas pudieron haber sido el resultado de la fusión genética entre *flgJ* y un gen que codificaba para alguna enzima de este tipo (Nambu et al, 2006).

Evidentemente en el caso de las fusiones resulta más fácil tener un panorama de la diversidad de estrategias evolutivas que se han seleccionado, sin embargo, el caso de las proteínas FlgJ monodominio es menos estudiado y paradójicamente es el más común. Es posible que exista un nivel similar de variabilidad en los mecanismos que involucran a una FlgJ monodominio en el que participen enzimas con actividades catalíticas distintas a las transglicosilasas líticas pero cuyo resultado final sea la formación de huecos en el peptidoglicano.

Con la finalidad de entender la diversidad existente a este nivel, se vuelve imprescindible la elaboración de un análisis detallado el cual permita clasificar a las enzimas que resulten involucradas en la penetración del peptidoglicano en distintos sistemas flagelares. Nuestro análisis agrupa a la

proteína SlfF dentro de la Familia 1 de transglicosilasas líticas, con características más cercanas a la subfamilia 1D o MltD.

En nuestro modelo, la interacción de SlfF con la proteína flagelar FlgJ resulta crucial para la localización específica de la enzima en el sitio de ensamblaje del flagelo, sobre todo si se tiene en cuenta que SlfF es exportada por un vía distinta. En el caso ya mencionado de EtgA, se demostró que ésta interacciona con la proteína Escl, componente estructural del inyectisoma (García-Gómez et al, 2011). Otro ejemplo es VirB1, una transglicosilasa lítica que participa en el ensamblaje del sistema de secreción tipo IV la cual interacciona con algunos de sus componentes estructurales (VirB8, VirB9 y VirB11) (Höppner et al, 2005).

Los experimentos realizados confirman que el C-terminal de SlfF participa en la interacción de esta proteína con FlgJ, sin embargo, lo hace regulando de manera negativa dicha interacción. Las tres mutantes con deleciones en el C-terminal interaccionan con mayor fuerza con FlgJ, por lo tanto proponemos que dicha región ejerce un efecto negativo lo cual permite que el ensamblaje se lleve a cabo de manera eficiente.

Paradójicamente esta misma región favorece la interacción de SlfF consigo misma. Los ensayos de cromatografía líquida en columna de exclusión molecular confirman dicha interacción y sugieren que podría significar la existencia de una forma dimérica de la proteína. Es prudente señalar que las mutantes SlfF Δ 4, SlfF Δ 5 y SlfF Δ 6 las cuales son incapaces de restaurar el nado en una cepa carente del gen *sltF*, pierden la capacidad de interaccionar consigo mismas, lo cual podría significar que dicha capacidad es importante para su función en el ensamblaje flagelar.

Otro hecho interesante que encontramos fue el efecto de las deleciones del C-terminal sobre la estabilidad de SlfF. Deleciones en el C-terminal de la proteína PomB del motor flagelar de *Vibrio alginolyticus* vuelven inestable a la proteína (Yakushi et al, 2005). En el caso de SlfF, la mutación de los últimos 24 residuos (SlfF Δ 4) tiene un efecto similar, sin embargo, la mutación de los 24 residuos siguientes (SlfF Δ 5) tiene un efecto contrario aumentando casi 3 veces el valor de vida media con respecto a la proteína silvestre. Más sorprendente aún, la deleción de la región completa de 48 residuos aumenta la vida media casi 4 veces (Tabla 2).

Es probable que las diferencias de las vidas medias de las mutantes sea efecto simple de la deleción, pero no descartamos la existencia de un mecanismo específico de degradación de la proteína que reconozca secuencias consenso probablemente localizadas en el C-terminal.

Conclusiones

- SttF se localiza en el periplasma y su exportación a dicho compartimento ocurre mediante la vía de secreción Sec.
- SttF es una transglicosilasa lítica que pertenece a la Familia 1 y se agrupa más cercanamente con los miembros de la subfamilia 1D o MltD.
- La región C-terminal de esta proteína es esencial para su función. Mutaciones en dicha región tienen efecto sobre la estabilidad de la enzima.
- La región C-terminal de SttF modula la interacción con la proteína ensambladora FlgJ.
- SttF interactúa consigo misma y es capaz de formar dímeros *in vivo*. Deleciones en el C-terminal de la proteína provocan que dicha interacción se pierda.

Perspectivas.

- Dado que las mutantes del C-terminal son incapaces de complementar el fenotipo de nado silvestre en una mutante carente del gen *sltF* y adicionalmente pierden la capacidad de interaccionar consigo mismas; es prudente realizar ensayos de cromatografía líquida con la finalidad de ver si en estas mutantes se pierde la forma dimérica detectada en la proteína silvestre. Estos datos nos permitirían asignarle una relevancia fisiológica a la dimerización de *SlfF*.
- Si bien los ensayos cualitativos de actividad muestran que las mutantes retienen la capacidad de degradar el peptidoglicano (de la Mora et al, 2012), es probable que su incapacidad para restaurar el nado esté asociada a diferencias sutiles en su velocidad de reacción. Ensayos semicuantitativos de la actividad catalítica de las mutantes en comparación con la proteína silvestre podrían ayudarnos a determinar si a este nivel existen diferencias que expliquen dicha incapacidad.
- Aparentemente una fuerte interacción entre *SlfF* y *FlgJ* tiene un efecto perjudicial durante la biogénesis flagelar. Se podrían realizar ensayos de actividad de las distintas versiones de *SlfF* en presencia de *FlgJ* y de esta manera poder explorar la posibilidad de que esta fuerte interacción tuviera algún efecto sobre la actividad enzimática de *SlfF*.
- Es un hecho que *SlfF* interacciona con la proteína de ensamblaje *FlgJ*, así lo demuestran los distintos ensayos realizados en este y otros trabajos del laboratorio, sin embargo, no sabemos si esta interacción se puede traducir en la formación de un complejo entre ambas proteínas. Experimentos de cromatografía líquida en columna de exclusión molecular o de centrifugación analítica podrían ayudarnos a esclarecer dicha cuestión.
- Con respecto a la estabilidad de la proteína, es curioso que los valores de vida media entre la proteína capaz de ser exportada al periplasma y la mutante *SlfF Δ SP* sean distintos. Además también existen variaciones con las mutantes del C-terminal. Con el objetivo de saber si existe un mecanismo específico involucrado en la degradación del *SlfF*, sería conveniente realizar una búsqueda exhaustiva de secuencias de reconocimiento de proteasas, particularmente en el C-terminal. Adicionalmente se pudieran realizar ensayos de estabilidad de las mutantes sin la secuencia señal ya que el mecanismo de degradación pudiera ser de localización periplásmica o bien que las diferencias entre el ambiente citoplasmático y periplásmico sean las únicas responsables de dicho fenómeno.

- Nuestros experimentos claramente sugieren que el C-terminal de SlfF participa en la interacción de esta proteína con FlgJ, sin embargo, su papel es modularla ya que las mutantes continúan interaccionando e incluso aparentemente con mayor afinidad. Existen dos regiones en SlfF que se presentan como fuertes candidatos para mediar de manera positiva la interacción entre ambas proteínas: la primera se localiza entre el sitio de corte predicho de la secuencia señal (residuos A28 y A28) y el inicio del dominio catalítico (aminoácido E 47), la segunda es la región inmediata antes de los 48 residuos que se mutagenizaron en este estudio. Es probable que un nuevo análisis de delección en estas regiones pudieran confirmar que el sitio de interacción SlfF-FlgJ corresponde a alguna de ellas.
- La plasticidad de FlgJ para asociarse a diferentes dominios catalíticos que degradan el peptidoglicano es un hecho ya reportado, que ha ocurrido en diferentes grupos taxonómicos. Una estrategia que pudiera respaldar nuestra propuesta de que la coexistencia de SlfF y FlgJ durante el ensamblaje flagelar es indispensable para que este ocurra de manera satisfactoria es la construcción de una proteína quimérica resultado de la fusión entre ambas proteínas.

Referencias

- Aizawa SI, Vonderviszt F, Ishima R, Akasaka K (1990) Termini of Salmonella flagellin are disordered and become organized upon polymerization into flagellar filament. *J Mol Biol* **211**: 673-677
- Asai Y, Kojima S, Kato H, Nishioka N, Kawagishi I, Homma M (1997) Putative channel components for the fast-rotating sodium-driven flagellar motor of a marine bacterium. *J Bacteriol* **179**: 5104-5110
- Asai Y, Yakushi T, Kawagishi I, Homma M (2003) Ion-coupling determinants of Na⁺-driven and H⁺-driven flagellar motors. *J Mol Biol* **327**: 453-463
- Auclair SM, Bhanu MK, Kendall DA (2012) Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins. *Protein Sci* **21**: 13-25
- Ausubel FM. (1987) Current protocols in molecular biology. In Brent R (ed.). Wil.
- Beatson SA, Minamino T, Pallen MJ (2006) Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure. *Trends Microbiol* **14**: 151-155
- Belle A, Tanay A, Bitincka L, Shamir R, O'Shea EK (2006) Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 13004-13009
- Bertani G (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. *J Bacteriol* **62**: 293-300
- Blackburn NT, Clarke AJ (2001) Identification of four families of peptidoglycan lytic transglycosylases. *J Mol Evol* **52**: 78-84
- Chen S, Beeby M, Murphy GE, Leadbetter JR, Hendrixson DR, Briegel A, Li Z, Shi J, Tocheva EI, Müller A, Dobro MJ, Jensen GJ (2011) Structural diversity of bacterial flagellar motors. *EMBO J* **30**: 2972-2981
- Chevance FF, Takahashi N, Karlinsey JE, Gnerer J, Hirano T, Samudrala R, Aizawa S, Hughes KT (2007) The mechanism of outer membrane penetration by the eubacterial flagellum and implications for spirochete evolution. *Genes Dev* **21**: 2326-2335
- Cohen SN, Chang AC, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 2110-2114
- Davis J, Donohue TJ, Kaplan S (1988) Construction, characterization, and complementation of a Puf⁻ mutant of Rhodospirillum rubrum. *J Bacteriol* **170**: 320-329
- de la Mora J, Ballado T, González-Pedrajo B, Camarena L, Dreyfus G (2007) The flagellar muramidase from the photosynthetic bacterium Rhodospirillum rubrum. *J Bacteriol* **189**: 7998-8004

de la Mora J, Osorio-Valeriano M, González-Pedrajo B, Ballado T, Camarena L, Dreyfus G (2012) The C terminus of the flagellar muramidase SlfF modulates the interaction with FlgJ in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **194**: 4513-4520

De Marais DJ (2000) Evolution. When did photosynthesis emerge on Earth? *Science* **289**: 1703-1705

Demchick P, Koch AL (1996) The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**: 768-773

DePamphilis ML, Adler J (1971a) Attachment of flagellar basal bodies to the cell envelope: specific attachment to the outer, lipopolysaccharide membrane and the cytoplasmic membrane. *J Bacteriol* **105**: 396-407

DePamphilis ML, Adler J (1971b) Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **105**: 384-395

Dijkstra AJ, Keck W (1996) Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. *J Bacteriol* **178**: 5555-5562

Dismukes GC, Klimov VV, Baranov SV, Kozlov YN, DasGupta J, Tyryshkin A (2001) The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2170-2175

Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* **2**: 953-971

Erhardt M, Namba K, Hughes KT (2010) Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a000299

Fein JE (1979) Possible involvement of bacterial autolytic enzymes in flagellar morphogenesis. *J Bacteriol* **137**: 933-946

Fraser GM, Hirano T, Ferris HU, Devgan LL, Kihara M, Macnab RM (2003) Substrate specificity of type III flagellar protein export in *Salmonella* is controlled by subdomain interactions in FlhB. *Mol Microbiol* **48**: 1043-1057

Fujii T, Kato T, Namba K (2009) Specific arrangement of alpha-helical coiled coils in the core domain of the bacterial flagellar hook for the universal joint function. *Structure* **17**: 1485-1493

Fujinami S, Terahara N, Krulwich TA, Ito M (2009) Motility and chemotaxis in alkaliphilic *Bacillus* species. *Future Microbiol* **4**: 1137-1149

García-Gómez E, Espinosa N, de la Mora J, Dreyfus G, González-Pedrajo B (2011) The muramidase EtgA from enteropathogenic *Escherichia coli* is required for efficient type III secretion. *Microbiology* **157**: 1145-1160

- Golovlev EL (2001) [Ecological strategy of bacteria: specific nature of the problem]. *Mikrobiologija* **70**: 437-443
- González-Pedrajo B, de la Mora J, Ballado T, Camarena L, Dreyfus G (2002) Characterization of the flgG operon of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 and its role in flagellum biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1579**: 55-63
- Guttenplan SB, Shaw S, Kearns DB (2013) The cell biology of peritrichous flagella in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **87**: 211-229
- Hirano T, Minamino T, Macnab RM (2001) The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase. *J Mol Biol* **312**: 359-369
- Hirano T, Minamino T, Namba K, Macnab RM (2003) Substrate specificity classes and the recognition signal for *Salmonella* type III flagellar export. *J Bacteriol* **185**: 2485-2492
- Hirano T, Yamaguchi S, Oosawa K, Aizawa S (1994) Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 5439-5449
- Hizukuri Y, Kojima S, Yakushi T, Kawagishi I, Homma M (2008) Systematic Cys mutagenesis of FlgI, the flagellar P-ring component of *Escherichia coli*. *Microbiology* **154**: 810-817
- Homma M, DeRosier DJ, Macnab RM (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
- Homma M, Fujita H, Yamaguchi S, Iino T (1984a) Excretion of unassembled flagellin by *Salmonella typhimurium* mutants deficient in hook-associated proteins. *J Bacteriol* **159**: 1056-1059
- Homma M, Komeda Y, Iino T, Macnab RM (1987a) The flaFIX gene product of *Salmonella typhimurium* is a flagellar basal body component with a signal peptide for export. *J Bacteriol* **169**: 1493-1498
- Homma M, Kutsukake K, Iino T, Yamaguchi S (1984b) Hook-associated proteins essential for flagellar filament formation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **157**: 100-108
- Homma M, Ohnishi K, Iino T, Macnab RM (1987b) Identification of flagellar hook and basal body gene products (FlaFV, FlaFVI, FlaFVII and FlaFVIII) in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **169**: 3617-3624
- Hughes KT, Gillen KL, Semon MJ, Karlinsey JE (1993) Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* **262**: 1277-1280
- Höltje JV, Mirelman D, Sharon N, Schwarz U (1975) Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **124**: 1067-1076

- Höppner C, Carle A, Sivanesan D, Hoepfner S, Baron C (2005) The putative lytic transglycosylase VirB1 from *Brucella suis* interacts with the type IV secretion system core components VirB8, VirB9 and VirB11. *Microbiology* **151**: 3469-3482
- Ikeda T, Asakura S, Kamiya R (1985) "Cap" on the tip of *Salmonella* flagella. *J Mol Biol* **184**: 735-737
- Ikeda T, Homma M, Iino T, Asakura S, Kamiya R (1987) Localization and stoichiometry of hook-associated proteins within *Salmonella typhimurium* flagella. *J Bacteriol* **169**: 1168-1173
- Imada K, Vonderviszt F, Furukawa Y, Oosawa K, Namba K (1998) Assembly characteristics of flagellar cap protein HAP2 of *Salmonella*: decamer and pentamer in the pH-sensitive equilibrium. *J Mol Biol* **277**: 883-891
- Ind AC, Porter SL, Brown MT, Byles ED, de Beyer JA, Godfrey SA, Armitage JP (2009) Inducible-expression plasmid for *Rhodobacter sphaeroides* and *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol* **75**: 6613-6615
- Jones CJ, Homma M, Macnab RM (1987) Identification of proteins of the outer (L and P) rings of the flagellar basal body of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**: 1489-1492
- Jones CJ, Macnab RM, Okino H, Aizawa S (1990) Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **212**: 377-387
- Joris B, Englebert S, Chu CP, Kariyama R, Daneo-Moore L, Shockman GD, Ghuyssen JM (1992) Modular design of the *Enterococcus hirae* muramidase-2 and *Streptococcus faecalis* autolysin. *FEMS Microbiol Lett* **70**: 257-264
- Kaiser D (2000) Bacterial motility: how do pili pull? *Curr Biol* **10**: R777-780
- Kearns DB (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* **8**: 634-644
- Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Trollinger D (1988) Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* **70**: 191-197
- Kojima S, Blair DF (2001) Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor. *Biochemistry* **40**: 13041-13050
- Kojima S, Imada K, Sakuma M, Sudo Y, Kojima C, Minamino T, Homma M, Namba K (2009) Stator assembly and activation mechanism of the flagellar motor by the periplasmic region of MotB. *Mol Microbiol* **73**: 710-718
- Koonin EV, Rudd KE (1994) A conserved domain in putative bacterial and bacteriophage transglycosylases. *Trends Biochem Sci* **19**: 106-107
- Koraimann G (2003) Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell Mol Life Sci* **60**: 2371-2388

- Kraft AR, Prabhu J, Ursinus A, Höltje JV (1999) Interference with murein turnover has no effect on growth but reduces beta-lactamase induction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 7192-7198
- Krell T, Lacal J, Muñoz-Martínez F, Reyes-Darías JA, Cadirci BH, García-Fontana C, Ramos JL (2011) Diversity at its best: bacterial taxis. *Environ Microbiol* **13**: 1115-1124
- Kutsukake K, Iino T (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, Okada T, Yokoseki T, Iino T (1994) Sequence analysis of the flgA gene and its adjacent region in *Salmonella typhimurium*, and identification of another flagellar gene, flgN. *Gene* **143**: 49-54
- Kuwajima G (1988) Construction of a minimum-size functional flagellin of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**: 3305-3309
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Liu R, Ochman H (2007) Stepwise formation of the bacterial flagellar system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7116-7121
- Macnab RM (2003) How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* **57**: 77-100
- Macnab RM (2004) Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 207-217
- Manson MD, Armitage JP, Hoch JA, Macnab RM (1998) Bacterial locomotion and signal transduction. *J Bacteriol* **180**: 1009-1022
- Mimori-Kiyosue Y, Vonderviszt F, Yamashita I, Fujiyoshi Y, Namba K (1996) Direct interaction of flagellin termini essential for polymorphic ability of flagellar filament. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 15108-15113
- Minamino T, Imada K, Namba K (2008) Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly. *Mol Biosyst* **4**: 1105-1115
- Minamino T, Saijo-Hamano Y, Furukawa Y, González-Pedrajo B, Macnab RM, Namba K (2004) Domain organization and function of *Salmonella* FliK, a flagellar hook-length control protein. *J Mol Biol* **341**: 491-502
- Minamino T, Yamaguchi S, Macnab RM (2000) Interaction between FliE and FlgB, a proximal rod component of the flagellar basal body of *Salmonella*. *J Bacteriol* **182**: 3029-3036
- Mori H, Ito K (2001) The Sec protein-translocation pathway. *Trends Microbiol* **9**: 494-500

- Moriya N, Minamino T, Imada K, Namba K (2011) Genetic analysis of the bacterial hook-capping protein FlgD responsible for hook assembly. *Microbiology* **157**: 1354-1362
- Nambu T, Inagaki Y, Kutsukake K (2006) Plasticity of the domain structure in FlgJ, a bacterial protein involved in flagellar rod formation. *Genes Genet Syst* **81**: 381-389
- Nambu T, Kutsukake K (2000) The Salmonella FlgA protein, a putative periplasmic chaperone essential for flagellar P ring formation. *Microbiology* **146 (Pt 5)**: 1171-1178
- Nambu T, Minamino T, Macnab RM, Kutsukake K (1999) Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in Salmonella typhimurium. *J Bacteriol* **181**: 1555-1561
- Nan B, Zusman DR (2011) Uncovering the mystery of gliding motility in the myxobacteria. *Annu Rev Genet* **45**: 21-39
- Natale P, Brüser T, Driessen AJ (2008) Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 1735-1756
- Ohnishi K, Ohto Y, Aizawa S, Macnab RM, Iino T (1994) FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in Salmonella typhimurium. *J Bacteriol* **176**: 2272-2281
- Pallen MJ, Matzke NJ (2006) From The Origin of Species to the origin of bacterial flagella. *Nat Rev Microbiol* **4**: 784-790
- Patterson-Delafield J, Martinez RJ, Stocker BA, Yamaguchi S (1973) A new fla gene in Salmonella typhimurium--flaR--and its mutant phenotype--superhooks. *Arch Mikrobiol* **90**: 107-120
- Paulick A, Koerdt A, Lassak J, Huntley S, Wilms I, Narberhaus F, Thormann KM (2009) Two different stator systems drive a single polar flagellum in Shewanella oneidensis MR-1. *Mol Microbiol* **71**: 836-850
- Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**: 346-356
- Porter SL, Wadhams GH, Armitage JP (2011) Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nat Rev Microbiol* **9**: 153-165
- Rusch SL, Kendall DA (2007) Interactions that drive Sec-dependent bacterial protein transport. *Biochemistry* **46**: 9665-9673
- Saijo-Hamano Y, Uchida N, Namba K, Oosawa K (2004) In vitro characterization of FlgB, FlgC, FlgF, FlgG, and FlIE, flagellar basal body proteins of Salmonella. *J Mol Biol* **339**: 423-435

Samatey FA, Imada K, Nagashima S, Vonderviszt F, Kumasaka T, Yamamoto M, Namba K (2001) Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature* **410**: 331-337

Samatey FA, Matsunami H, Imada K, Nagashima S, Namba K (2004a) Crystallization of a core fragment of the flagellar hook protein FlgE. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 2078-2080

Samatey FA, Matsunami H, Imada K, Nagashima S, Shaikh TR, Thomas DR, Chen JZ, Derosier DJ, Kitao A, Namba K (2004b) Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. *Nature* **431**: 1062-1068

Shaikh TR, Thomas DR, Chen JZ, Samatey FA, Matsunami H, Imada K, Namba K, Derosier DJ (2005) A partial atomic structure for the flagellar hook of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1023-1028

Simon R, Priefer U, Pühler A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* mutagenesis genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Nature Biotechnology*, Vol. 1, pp. 784-791.

Sistrom WR (1962) The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas spheroides*. *J Gen Microbiol* **28**: 607-616

Snyder LA, Loman NJ, Fütterer K, Pallen MJ (2009) Bacterial flagellar diversity and evolution: seek simplicity and distrust it? *Trends Microbiol* **17**: 1-5

Sockett RE, Foster JCA, Armitage JP. (1990) Molecular biology of *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. FEMS Symp., Vol. 53.

Stallmeyer MJ, Aizawa S, Macnab RM, DeRosier DJ (1989) Image reconstruction of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **205**: 519-528

Terahara N, Krulwich TA, Ito M (2008) Mutations alter the sodium versus proton use of a *Bacillus clausii* flagellar motor and confer dual ion use on *Bacillus subtilis* motors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 14359-14364

Thanassi DG, Hultgren SJ (2000) Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 420-430

Typas A, Banzhaf M, Gross CA, Vollmer W (2012) From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol* **10**: 123-136

Viollier PH, Shapiro L (2003) A lytic transglycosylase homologue, PleA, is required for the assembly of pili and the flagellum at the *Caulobacter crescentus* cell pole. *Mol Microbiol* **49**: 331-345

Vollmer W, Bertsche U (2008) Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 1714-1734

Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA (2008a) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 149-167

Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S (2008b) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 259-286

Vonderviszt F, Aizawa S, Namba K (1991) Role of the disordered terminal regions of flagellin in filament formation and stability. *J Mol Biol* **221**: 1461-1474

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

Vonderviszt F, Kanto S, Aizawa S, Namba K (1989) Terminal regions of flagellin are disordered in solution. *J Mol Biol* **209**: 127-133

Weber-Sparenberg C, Pöplau P, Brookman H, Rochón M, Möckel C, Nietschke M, Jung H (2006) Characterization of the type III export signal of the flagellar hook scaffolding protein FlgD of *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* **186**: 307-316

Weidel W, Pelzer H (1964) Bagshaped Macromolecules a New Ourlook On Bacterial Cell Walls. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **26**: 193-232

Williams AW, Yamaguchi S, Togashi F, Aizawa SI, Kawagishi I, Macnab RM (1996) Mutations in fliK and flhB affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **178**: 2960-2970

Xiaowei Zhao KZ, Tristan Boquoi, Bo Hu, Chunhao Li, Md A. Motaleb, Kelly A. Miller, Milinda E. James, Nyles W. Charon, Steven J. Norris Jun Liu. (2013) 3-D Visualization of bacterial flagellar assembly in *Borrelia burgdorferi*. . Bacterial locomotion and signal transduction XII, Tucson, Arizona., p. 9.

Yakushi T, Hattori N, Homma M (2005) Deletion analysis of the carboxyl-terminal region of the PomB component of the vibrio alginolyticus polar flagellar motor. *J Bacteriol* **187**: 778-784

Yonekura K, Maki S, Morgan DG, DeRosier DJ, Vonderviszt F, Imada K, Namba K (2000) The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science* **290**: 2148-2152

Yonekura K, Maki-Yonekura S, Homma M (2011) Structure of the flagellar motor protein complex PomAB: implications for the torque-generating conformation. *J Bacteriol* **193**: 3863-3870

Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K (2003) Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* **424**: 643-650

Zhang K, Tong BA, Liu J, Li C (2012) A single-domain FlgJ contributes to flagellar hook and filament formation in the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* **194**: 866-874

Anexos

The C Terminus of the Flagellar Muramidase SltF Modulates the Interaction with FlgJ in *Rhodobacter sphaeroides*

Javier de la Mora, Manuel Osorio-Valeriano, Bertha González-Pedrajo, Teresa Ballado, Laura Camarena and Georges Dreyfus
J. Bacteriol. 2012, 194(17):4513. DOI: 10.1128/JB.00460-12.
Published Ahead of Print 15 June 2012.

Updated information and services can be found at:
<http://jb.asm.org/content/194/17/4513>

SUPPLEMENTAL MATERIAL

These include:

[Supplemental material](#)

REFERENCES

This article cites 39 articles, 19 of which can be accessed free at: <http://jb.asm.org/content/194/17/4513#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

The C Terminus of the Flagellar Muramidase SltF Modulates the Interaction with FlgJ in *Rhodobacter sphaeroides*

Javier de la Mora,^a Manuel Osorio-Valeriano,^a Bertha González-Pedrajo,^a Teresa Ballado,^a Laura Camarena,^b and Georges Dreyfus^a

Instituto de Fisiología Celular^a and Instituto de Investigaciones Biomédicas,^b Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Macromolecular structures such as the bacterial flagellum in Gram-negative bacteria must traverse the cell wall. Lytic transglycosylases are capable of enlarging gaps in the peptidoglycan meshwork to allow the efficient assembly of supramolecular complexes. We have previously shown that in *Rhodobacter sphaeroides* SltF, the flagellar muramidase, and FlgJ, a flagellar scaffold protein, are separate entities that interact in the periplasm. In this study we show that the export of SltF to the periplasm is dependent on the SecA pathway. A deletion analysis of the C-terminal portion of SltF shows that this region is required for SltF-SltF interaction. These C terminus-truncated mutants lose the capacity to interact with themselves and also bind FlgJ with higher affinity than does the wild-type protein. We propose that this region modulates the interaction with the scaffold protein FlgJ during the assembly process.

Motility has given bacteria an evolutionary advantage and is therefore widespread in nature. The assembly of the cell-spanning flagellum is costly for the bacterial cell and is tightly regulated (2, 5). The bacterial flagellum can be divided into three substructures: a basal body that acts as a motor, a filament that acts as a propeller, and a universal joint also known as the hook, which links the basal body and the filament. The electrochemical gradient drives rotation of the motor that generates the thrust needed to propel the bacterial cell. Biogenesis of the bacterial flagellum requires the hierarchical expression of more than 50 genes, and the assembly of this structure proceeds outwardly from the proximal to the distal end (6, 22, 34). The basal body is composed in Gram-negative bacteria of an axial rod and three ring-like structures named the MS, P, and L rings. The MS ring is embedded in the cytoplasmic membrane and interacts with the C ring that houses the export apparatus, which acts as a switch and interacts with the stator proteins (28, 40). The rod is a heterogeneous filamentous structure composed by four proteins: FlgB, FlgC, FlgF, and FlgG (14). The P and L rings are attached to the peptidoglycan (PG) layer and outer membrane, respectively, and also surround the axial rod. At a certain point in the assembly process, the PG layer, a mesh-like structure of glycan chains of alternating *N*-acetyl muramic acid and *N*-acetylglucosamine cross-linked by interpeptide bonds (36) that has an average mesh diameter of ca. 4 nm (23), must be penetrated by the rod, which has a diameter of ca. 11 nm (33). FlgJ, which is required for rod assembly (19) in beta- and gammaproteobacteria, has a dual function: acting as a scaffold for rod assembly and also acting as a muramidase degrading the PG layer to facilitate rod penetration (13, 27). Although the muramidase activity of FlgJ is important for flagellum biogenesis, it is not absolutely required for the assembly process, given that mutants that lack this activity show a leaky phenotype (13). This was explained based on the idea that, occasionally, the nascent structure finds a gap in the peptidoglycan layer; when this happens, a complete flagellum is assembled.

It has been reported that only beta- and gammaproteobacteria possess FlgJ homologues that contain a muramidase domain at the C terminus (25). We have previously reported that FlgJ from *Rhodobacter sphaeroides* lacks the muramidase domain (11). At least three studies have been performed that analyzed FlgJ homo-

logues from various bacteria, and it was noticed that various alphaproteobacteria, including *R. sphaeroides*, possess FlgJ homologues that lack the C-terminal muramidase domain (8, 25, 39). In *R. sphaeroides*, FlgJ is similar to the N-terminal part of FlgJ from *Salmonella enterica*, suggesting that this polypeptide of 100 residues accomplishes the same function as the N-terminal domain of FlgJ from *S. enterica*, which acts as a scaffolding rod-capping protein (11, 13). In accordance with this, an *flgJ* mutant in *R. sphaeroides* has a Fla⁻ phenotype (13), indicating that the canonical domains of *S. enterica* FlgJ can act separately in other species. We have previously demonstrated the presence of a flagellum-specific muramidase in *R. sphaeroides*, SltF, that is encoded within the *flgG* operon (8). It is possible that this protein is exported to the periplasm via the SecA pathway, where it would interact with FlgJ and would open a gap in the PG layer. In the present study, we investigated whether the C-terminal region of SltF is involved in the interaction with FlgJ.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids, and oligonucleotides. The bacterial strains, plasmids, and oligonucleotides used in the present study are listed in Table 1.

Media and growth conditions. Sistrom's culture medium (31) was used to grow *R. sphaeroides* at 30°C under constant illumination in completely filled screw-cap tubes. When required, the following antibiotics were added at the indicated concentrations: nalidixic acid, 20 µg/ml; spectinomycin, 50 µg/ml; tetracycline, 1 µg/ml; and kanamycin, 25 µg/ml. Strains of *Escherichia coli* were grown in Luria-Bertani medium (1). When needed, antibiotics were added at the following concentrations: spectinomycin, 50 µg/ml; kanamycin, 50 µg/ml; tetracycline, 25 µg/ml; and ampicillin, 200 µg/ml. *Saccharomyces cerevisiae* was grown in YPDA medium (1) at 30°C or in minimal synthetic defined (SD) medium (Clontech, Mountain View, CA). Standard molecular biology techniques were used

Received 23 March 2012 Accepted 11 June 2012

Published ahead of print 15 June 2012

Address correspondence to Georges Dreyfus, gdreyfus@ifc.unam.mx.

Supplemental material for this article may be found at <http://jb.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JB.00460-12

TABLE 1 Bacterial strains, plasmids, and oligonucleotides

Strain, plasmid, or oligonucleotide	Relevant characteristics or sequence (5'–3') ^a	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
JM103	<i>hsdR4</i> Δ(<i>lac-pro</i>) F' <i>traD36 proAB lacZ</i> ΔM15	1
M15[pREP4]	<i>thi lac ara</i> ⁺ <i>gal mtl F' recA</i> ⁺ <i>uvr</i> ⁺ <i>lon</i> ⁺ ; pREP4 plasmid; Kan ^r	Qiagen
BL21(DE3)/pLysS	F' <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)/pLysS	Novagen
DH5α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	12
S17-1	<i>recA endA thi hsdR</i> RP4-2-Tc::Mu::Tn7; T _p ^r Sm ^r Kan::Tn7	30
<i>R. sphaeroides</i>		
WS8-N	Wild type; spontaneous; Nal ^r	32
SltF1	WS8-N derivative Δ <i>sltF</i> (1–336):: <i>aadA</i> Fla ⁻ ; Spc ^r Nal ^r	8
RsgJ-np	WS8-N derivative <i>flgJ</i> :: <i>aadA</i> Fla ⁻ ; Spc ^r Nal ^r	11
<i>S. cerevisiae</i> AH109	Yeast reporter strain, for <i>HIS3</i> , <i>ADE2</i> , and <i>lacZ</i>	Clontech
Plasmids		
pQE30	Expression vector; Amp ^r N-terminal His ₆ tag	Qiagen
pQE60	Expression vector; Amp ^r C-terminal His ₆ tag	Qiagen
pRSJ	<i>flgJ</i> cloned into the NcoI/BglII sites of pQE60	8
pRS1sltF	<i>sltF</i> cloned into the SacI/HindIII sites of pQE30	This study
pRsltFΔ4	pQE30 derivative carrying, <i>sltF</i> Δ(723–795)	This study
pRsltFΔ5	pQE30 derivative, carrying <i>sltF</i> Δ(651–723)	This study
pRsltFΔ6	pQE30 derivative, carrying, <i>sltF</i> Δ(651–795)	This study
pRKsltF	1.4-kb PstI/PstI fragment carrying <i>sltF</i> cloned into the EcoRI/HindIII sites of pRK415	8
pRKsltFE57A	<i>sltF2</i> (E57A) cloned into the EcoRI/HindIII sites of pRK415	This study
pRKsltFΔ4	<i>sltF</i> Δ(723–795) cloned into the EcoRI/HindIII sites of pRK415	This study
pRKsltFΔ5	<i>sltF</i> Δ(651–723) cloned into the EcoRI/HindIII sites of pRK415	This study
pRKsltFΔ6	<i>sltF</i> Δ(651–795) cloned into the EcoRI/HindIII sites of pRK415	This study
pTZ19R/18R	pUC derivative multifunctional plasmid carrying <i>lacZ</i> gene for screening; Amp ^r	Pharmacia
pRK415	pRK404 derivative; used for expression on <i>R. sphaeroides</i> under the <i>lac</i> promoter; <i>lacZ mob</i> ⁺ ; Tc ^r	18
pIND4	IPTG-inducible expression vector for <i>R. sphaeroides</i> ; Kan ^r	16
pINSltF	<i>sltF</i> wild type cloned into the NcoI/BglII sites of pIND4	This study
pINSltFΔSP	<i>sltF</i> wild type without SEC signal cloned into the NcoI/BglII sites of pIND4	This study
pINSltFΔ4	<i>sltF</i> Δ(723–795) cloned into the NcoI/HindIII sites of pIND4	This study
pINSltFΔ5	<i>sltF</i> Δ(651–723) cloned into the NcoI/HindIII sites of pIND4	This study
pINSltFΔ6	<i>sltF</i> Δ(651–795) cloned into the NcoI/HindIII sites of pIND4	This study
psltFΔ5	1.4-kb PstI fragment carrying <i>sltF</i> Δ(651–723) cloned into pTZ19R; Amp ^r	This study
pGT001	1.4-kb PstI fragment from pBG313 subcloned into pTZ19R; Amp ^r	11
pGADT7	GAL4 activation domain, LEU2	Clontech
pGBKT7	GAL4 DNA binding domain TRP1	Clontech
pGAD-SltF	pGADT7 derivative expressing GAL4 AD- <i>sltF</i>	This study
pGAD-SltFΔ4	pGADT7 derivative expressing GAL4 AD- <i>sltF</i> Δ(723–795)	This study
pGAD-SltFΔ5	pGADT7 derivative expressing GAL4 AD- <i>sltF</i> Δ(651–723)	This study
pGAD-SltFΔ6	pGADT7 derivative expressing GAL4 AD- <i>sltF</i> Δ(651–795)	This study
pGBD-SltF	pGBKT7 derivative expressing GAL4 BD- <i>sltF</i>	This study
pGBD-SltFΔ4	pGBKT7 derivative expressing GAL4 BD- <i>sltF</i> Δ(723–795)	This study
pGBD-SltFΔ5	pGBKT7 derivative expressing GAL4 BD- <i>sltF</i> Δ(651–723)	This study
pGBD-SltFΔ6	pGBKT7 derivative expressing GAL4 BD- <i>sltF</i> Δ(651–795)	This study
pGADT7-FlgJ	pGADT7 derivative expressing GAL4 AD- <i>flgJ</i>	This study
pGBKT7-FlgJ	pGBKT7 derivative expressing GAL4 BD- <i>flgJ</i>	This study
Oligonucleotides		
sltFfwsec+	CATGCCATGGCACGCGCCCTTGCCCGCG	This study
sltFfwsec-	CATGCCATGGCGGACGAGGGCTGCGAGACG	This study
fw1	CTGATCTAGACCCTCCGGCCCCGGCCACGGTG	This study
sltFrv	GGAAGATCTCGGTTGCATTGCGAGCAGGTC	This study
orf72fw	CATGGAGCTCGCGGACGAGGGCTGCGAGACG	This study
orf72rv	CCCCAAGCTTTACCGTTGCATTGCGAGCAG	This study
orf72rvΔ24	CCCCAAGCTTTACCGCTCGGCGAGGAGGTCGG	This study
orf72rvΔ48	CCCCAAGCTTTACCGGGGACGCCCTCCCTGCGT	This study
orf72fwΔ24int	CGCAGGGAGGGCTGCCCGGGACCTTCCGACGCGCCTGCG	This study
orf72rvΔ24int	CGCAGGGCTGCGGAAGGTCCCGGGGACGCCCTCCCTGCG	This study
orf72rv	CCCCAAGCTTTACCGGTTGCATTGCGAGCAG	This study
orf72fw57A	GGCGATTGCCCGCTGGCGTCGGGCCGGGGCGGGC	This study

(Continued on following page)

TABLE 1 (Continued)

Strain, plasmid, or oligonucleotide	Relevant characteristics or sequence (5'-3') ^a	Source or reference
orf72rv57A	GCCCGCCCCGGCCCCACGCCACGCGGGCAATCGCC	This study
ADBDSltFfw	CCTGCATATGGCGGACGAGGGCTGCGAG	This study
ADDBsltFrv	CCTGGGATCCTCACGGTTGCATTGCGAG	This study
ADBDFlgJfw	CCTGCATATGGAAGCTGAAGCTTCAGGCC	This study
ADBDFlgJrv	CCTGGGATCCTCACGACTTGCCGTCCT	This study
ADBDSltF24rv	CCTGGGATCCTCACGCTCGGCGAGGAG	This study
ADBDSltF48rv	CCTGGGATCCTCACCGGGGAGCCCTCC	This study

^a Sm^r, streptomycin resistance; Nal^r, nalidixic acid resistance; Tp^r, trimethoprim resistance; Tc^r, tetracycline resistance; Amp^r, ampicillin resistance; Spc^r, spectinomycin resistance; Kan^r, kanamycin resistance.

for the isolation and purification of chromosomal DNA from *R. sphaeroides* WS8-N (1). Plasmid DNA and PCR fragments were purified with QIAprep spin and QIAquick PCR kits, respectively (Qiagen, GmbH). The products were cloned either in pTZ19R or pTZ18R as required. DNA sequence was carried out in an ABS-Prism automatic sequencer. PCRs were carried out with PfuTurbo (Invitrogen, Carlsbad, CA), and the oligonucleotides were synthesized by Sigma-Aldrich.

Motility assays. A 5- μ l sample of a stationary-phase culture was placed on the surface of swarm plates (1), followed by aerobic incubation in the dark at 30°C. Swarming ability was recorded as the ability of bacteria to move away from the inoculation point after 24 to 36 h of incubation. Soft agar (0.25%) swimming plates were prepared with Sistrom's minimal medium devoid of succinic acid, to which 100 μ M sodium propionate and 1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) were added when indicated.

Overexpression and purification of SltF, SltF Δ 4, SltF Δ 5, SltF Δ 6, and FlgJ. For the wild-type *sltF* and *flgJ* genes, we used previously described plasmids (8). To obtain the mutants SltF Δ 4 and SltF Δ 6, the following oligonucleotides were used: orf72fw, orf72rv Δ 24, and orf72rv Δ 48. *sltF Δ 5* mutagenesis was carried out using the QuikChange method (Stratagene) with plasmid pGT001 as a template and the oligonucleotides orf72fw Δ 24int and orf72rv Δ 24int, followed by a second PCR with orf72fw and orf72rv. All of the PCR products were cloned in the overexpression vector pQE30. Overexpression and purification was carried out as described previously (8). Protein quantification was carried out by the method described by Lowry (21). Specific polyclonal gamma globulins for SltF and FliC, respectively, were produced as described previously (8, 11).

Site-directed mutagenesis and complementation assays. The SltF point mutant (E57) was obtained using the QuikChange method (Stratagene). Glutamic acid was replaced by alanine using orf72fw57A and orf72rv57A oligonucleotides and plasmid pGT001 as a template. The resulting product was subcloned into pRK415 (18). Mutants SltF Δ 4 and SltF Δ 6 were obtained by PCR using the oligonucleotides fw1 or sltFfwsec⁺ and the oligonucleotides orf72rv Δ 24 or orf72rv Δ 48, respectively. SltF Δ 5 was obtained by PCR from plasmid psltF Δ 5. All of the products were cloned in pTZ19R and further subcloned in pRK415 and pIND4. The plasmids were introduced into a Δ *sltF* strain by diparental conjugation using *E. coli* strain S17-1 as described previously (30). The presence of SltF was verified by Western blot analysis.

Protein export analysis. Two versions of the wild-type *sltF* gene were amplified by PCR; one contained the export signal sequence, and the other lacked it. For this purpose, the oligonucleotide sltFfwsec⁺ or sltFfwsec⁻ was used, with sltFrv as a reverse oligonucleotide. Both products were cloned in the pIND4 plasmid and introduced into a Δ *sltF* mutant. Proteolysis of the exported protein was carried out as follows. Cell cultures (15 ml) were grown aerobically at 30°C to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.35. At this point, 1 mM IPTG was added, and growth continued for 3 h. Harvested cells were washed two times with 5 ml of a buffer containing 10 mM Tris-Cl (pH 8.0) and suspended in 0.3 ml of a buffer containing 100 mM Tris-Cl (pH 8.0) and 20% sucrose. The cells were divided into two aliquots; both were treated with lysozyme (100 μ g/ml) and EDTA (10 mM) for 5 min at 37°C. To one of the vials, 1.5 μ l of a stock

solution of proteinase K (10 mg/ml) was added. The tubes were incubated for 15 min at 37°C, and the reactions were arrested by the addition of 1.5 μ l of a 1 mM solution of phenylmethylsulfonyl fluoride. The samples were analyzed by Western blotting as described previously (20).

SltF stability assays. Wild-type and mutant strains expressing the truncated versions of SltF were grown at 30°C to an OD₆₀₀ of 0.35. At this point, 1 mM IPTG was added, and growth continued for 1 h. RNA synthesis was arrested by the addition of rifampin from a stock solution (50 mg/ml) to a final concentration of 800 μ g/ml. Growth was continued, and samples were drawn at different times and analyzed by Western blotting. The density of the corresponding bands was determined and plotted as a function of time. The data were adjusted to fit a first-order decay function in order to establish the degradation constant and the half-lives of the various versions of SltF (3).

FliC secretion. Cells were grown photoheterotrophically for 16 h until reaching an OD₆₀₀ of 2.0 and then centrifuged for 15 min at 16,000 \times g. The supernatant was centrifuged again, and the filtered through a Millipore membrane (pore size, 22 μ m). Soluble proteins in the supernatant were precipitated with chloroform-methanol, centrifuged, and suspended in sample buffer as described earlier (38). The pellet fraction was suspended in 200 μ l of sample buffer. The protein concentration was determined by the method of Lowry (21), and the samples were analyzed by Western blotting.

Muramidase activity assays. A technique known as zimodot or lisoplates was used to determine muramidase activity. Petri dishes filled with soft 1% agarose containing a cell lysate from *Micrococcus lysodeikticus* to be used as a substrate at a concentration of 50 mg/ml in phosphate buffer (50 mM NaH₂PO₄ [pH 6.5]) as described previously (2a). The lisoplates were inoculated with 20 μ g of protein and incubated for 12 h at 30°C.

Immunoprecipitation. Sepharose CL-4B coupled to protein-A (20 μ l) (Sigma Chemicals) was incubated with 8 μ g of anti-SltF gamma globulin in 1 ml of phosphate buffer (50 mM; pH 7.5) for 12 h at 4°C; the tube was then centrifuged, and the supernatant was discarded. To evaluate the interaction of SltF, SltF Δ 57A, SltF Δ 4, SltF Δ 5, and SltF Δ 6 with FlgJ, 0.07 or 0.14 μ M concentrations of each protein were incubated for 1 h at 4°C before the addition of the specific anti-SltF gamma globulins attached to protein A-Sepharose. The mixture was then incubated for 60 min at 4°C and washed five times with 1 ml of phosphate buffer. The resulting pellet was suspended in 30 μ l of sample buffer and boiled for 10 min. The samples were then subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes treated as described above and developed using His-Probe-HRP at a 1:10,000 dilution (Pierce Chemicals, Rockford, IL).

Yeast two-hybrid assays. The Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 (Clontech) was used to test the interaction between SltF with FlgJ and the various versions of truncated mutants. The genes were amplified using oligonucleotides ADBDSltFfw, ADBDSltFrv, ADBDSltF24rv, ADBDSltF48rv, ADBDFlgJfw, and ADBDFlgJrv. For the *sltF Δ 5* cells, mutant plasmid psltF Δ 5 was obtained by using oligonucleotides ADBDSltFfw and ADBDSltFrv. The products were cloned into pGADT7 (encoding the DNA activation domain [AD] of GAL4 and LEU2 as a selection marker) and pGBKT7 (encoding the DNA binding domain [BD] of GAL4 and TRP1 as selection marker). Different combinations of plasmids

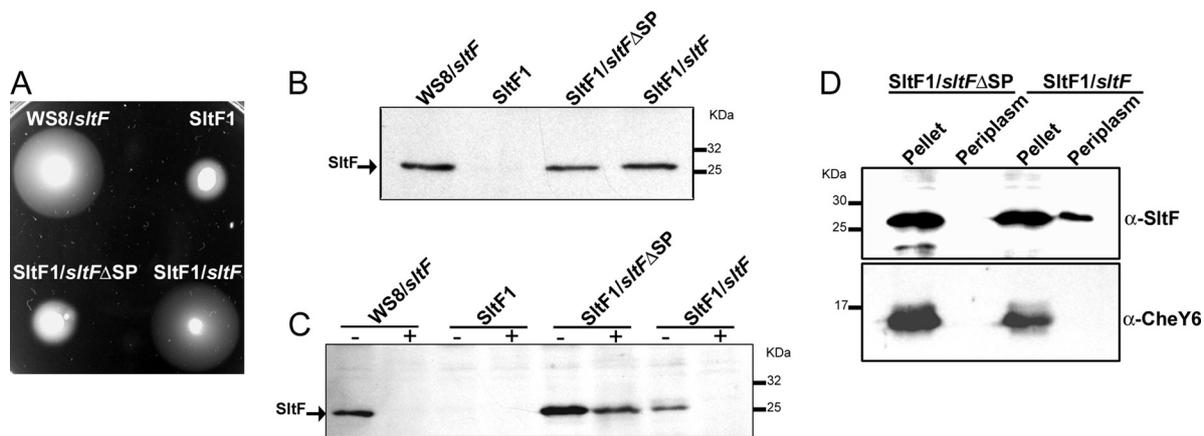


FIG 1 (A) Phenotypic analysis of various strains of *R. sphaeroides*: WS8 (wild-type), SltF1 (Δ sltF), SltF1/sltF Δ SP, and SltF1/sltF. The *sltF* alleles were cloned in vector pIND4 (for details, see Materials and Methods). Swimming assays on soft agar plates were carried out in 0.25% agar supplemented with 100 μ M sodium propionate and 1 mM IPTG. The cells were grown under aerobic conditions at 30°C for 48 h. (B) Western blot analysis of the same strains shown in panel A, using anti-SltF gamma globulins. (C) Sensitivity to proteinase K of SltF with or without signal peptide analyzed by Western blotting with anti-SltF gamma globulins. Proteinase K was added where indicated (+). (D) Cell fractionation and osmotic shock were performed as described previously (10). Pellet and periplasmic fractions were analyzed by Western blotting with specific anti-SltF and CheY6 gamma globulins at dilutions of 1:2,500 and 1:300,000, respectively. SDS-12.5% PAGE was used in all cases.

(AD+BD) were cotransformed into yeast strain AH109. Double transformants were selected as tryptophan and leucine prototrophs. After the initial selection, the different transformant strains were grown overnight in 3 ml of SD minimal medium lacking tryptophan and leucine and supplemented with histidine. Aliquots of the cultures were washed once with SD minimal medium lacking Trp, Leu, and His and then normalized to an OD₆₀₀ of 0.5. Next, 10-fold serial dilutions were made in the same medium. Aliquots (10 μ l) drawn from these dilutions were seeded onto selection plates lacking Trp, Leu, and His. A control plate lacking Trp and Leu was also included. The yeast strain AH109 was transformed with plasmids provided with the kit that represent positive and negative interactions. These plasmids encode the DNA BD or the AD of GAL4 fused either to p53 (murine) or to the simian virus 40 large T antigen. These plasmids were used as a control for positive interaction. As a negative control, the plasmids encoding the fusion AD-T antigen and the plasmid BD-lamin C (human) were cotransformed into strain AH109.

RESULTS

In silico analysis suggests that SltF is secreted into the periplasm via the SecA pathway (8). To obtain experimental evidence to support this prediction, we deleted the nucleotide sequence on the wild-type *sltF* gene that codes for the Sec export signal peptide. The protein lacking the signal peptide expressed from plasmid pINSltF Δ SP was unable to complement an SltF1 mutant. On the other hand, swimming was recovered when the SltF1 mutant was complemented with the wild-type *sltF* allele (Fig. 1A). We carried out Western blot analyses in order to rule out the possibility that the lack of motility in the SltF1 mutant expressing the SltF Sec⁻ protein was due to a difference in protein concentration. We found that SltF, with or without the Sec export sequence, is present in equivalent amounts in the cell (Fig. 1B). We also determined the location of the two versions of SltF by testing the accessibility of proteinase K to SltF in cells that were preincubated with lysozyme. We found that the mutant version (SltF Δ SP) is preserved intact after the addition of the protease, whereas the wild-type form (SltF), which is exported to the periplasm, is completely degraded (Fig. 1C). We also carried out cell fractionation experiments that confirmed that SltF is exported to the periplasm,

whereas SltF Δ SP was not (Fig. 1D). For this experiment, we also verified that both protein versions were soluble in the cytoplasm and hence competent to be exported (see Fig. S1 in the supplemental material). In addition, we determined that CCCP and NaN₃ inhibited the export of SltF, as expected for a protein dependent on SecA activity (see Fig. S2 in the supplemental material).

The amino acid sequence alignment of various membranelytic transglycosylases that belong to family 1D (4) shows a conserved domain of 171 amino acids. This conserved putative transglycosylase domain spans residues 47 to 217 of SltF from *R. sphaeroides* (Fig. 2). The rest of the sequence does not share homology with any known protein. This led us to carry out an analysis of the remaining 48 residues of the C terminus of SltF (Fig. 2B). Furthermore, secondary structure analysis of SltF does not show with certainty the presence of coil-coiled structures within this domain that could account for protein-protein interactions. We therefore dissected the C-terminal region of SltF by deletion of either the first 24 residues (SltF Δ 4), the last 24 residues (SltF Δ 5), or the complete removal of the 48 nonconserved residues of the C terminus domain (SltF Δ 6) (Fig. 3A). Analysis of this region was performed by complementation of SltF1 mutants with each of the three C-terminal truncated mutant alleles. The three C-terminal deletions were unable to restore swimming in soft agar plates (Fig. 3B). We therefore determined whether the three overexpressed and purified C terminus mutants were catalytically active on lysoplasts containing a cell lysate from *M. lysodeikticus*. It was found that the three isolated mutant proteins (SltF Δ 4, SltF Δ 5, and SltF Δ 6) showed a transglycosylase activity similar to that of the wild-type protein (Fig. 3C). In addition, we observed that these mutant versions of SltF did not exert a negative dominance effect on the swimming behavior of the wild-type strain (data not shown).

We also analyzed whether the C-terminal deletions affected the stability of the protein in *R. sphaeroides*. For this, the presence of the modified proteins in cell extracts was determined by means of Western blot analyses with specific anti-SltF polyclonal antibodies.

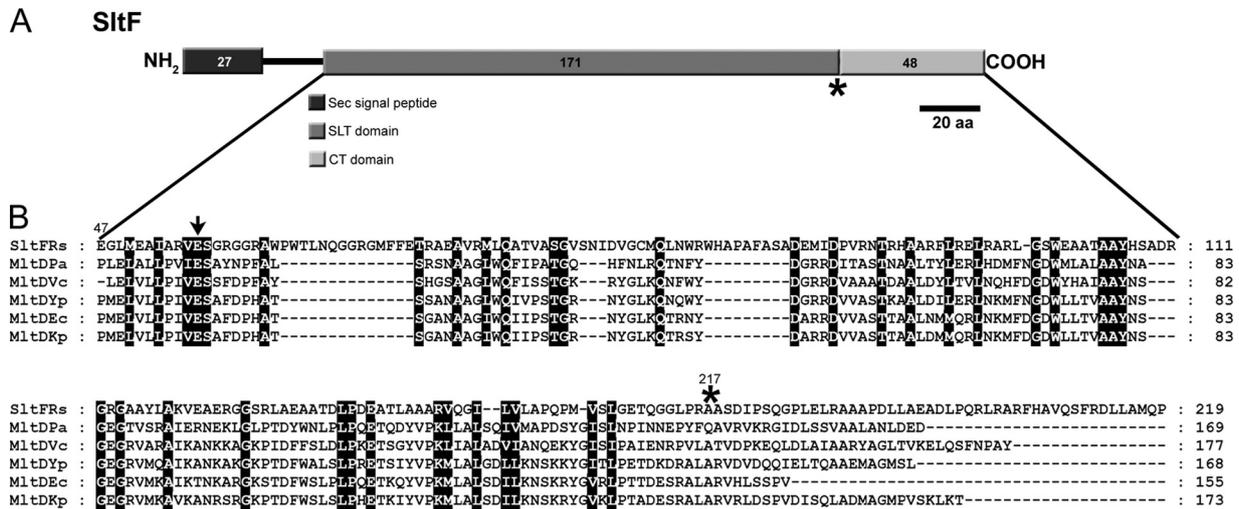


FIG 2 (A) Schematic representation of the different functional domains proposed for SltF. (B) Amino acid alignment of various family 1D membrane lytic transglycosylases. The alignment was carried out using the program MUSCLE (9) and the following sequences: SltF *R. sphaeroides* (Rs), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Vibrio cholerae* (Vc), *Yersinia pestis* (Yp), *Escherichia coli* (Ec), and *Klebsiella pneumoniae* (Kp). Arrow indicates the conserved catalytic glutamic residue among these lytic transglycosylases. An asterisk indicates the start of the nonconserved C terminus of SltF analyzed here.

ies. As shown in Fig. 3D, the presence of either wild-type or mutant SltF was confirmed in strains WS8, SltF1/*sltF*, SltF1/*sltFΔ5*, and SltF1/*sltFΔ6*. It should be noted that two of the mutant proteins (SltF1/*sltFΔ5* and SltF1/*sltFΔ6*) are very abundant, as revealed by Western blot analysis. In contrast, the deletion of the last 24 residues (SltF1/*sltFΔ4*) renders the protein unstable and was

therefore undetectable (Fig. 3D). This finding led us to determine the half-life of the various forms of SltF, i.e., with or without the Sec export sequence, as well as the three C terminus mutants. The half-life of wild-type SltF was evaluated in a strain devoid of the scaffold protein FlgJ. The different versions of SltF were tested in assays wherein the expression of *sltF* was induced with IPTG

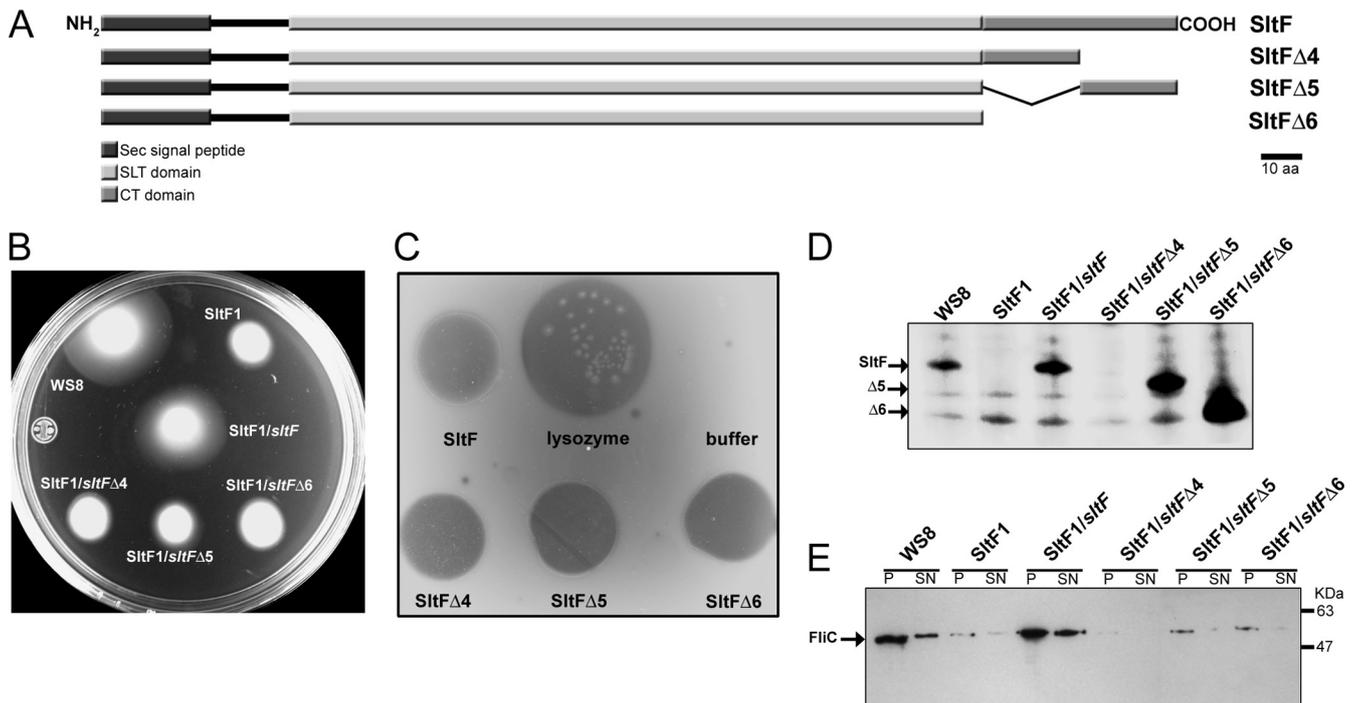


FIG 3 (A) Schematic representation of SltF showing the Sec signal domain, the transglycosylase (SLT) domain, the C terminus domain (CT), and the three C-terminus deletions. (B) Swimming assays on soft agar plates were carried out in 0.25% agar supplemented with 100 μ M sodium propionate. The strains analyzed included WS8 (wild-type), SltF1 (Δ *sltF*), SltF1/*sltF*, SltF1/*sltFΔ4*, SltF1/*sltFΔ5*, and SltF1/*sltFΔ6*. The various alleles of *sltF* were cloned in pRK415 (for details, see Materials and Methods). (C) Zimodot analysis of wild-type SltF and the three C-terminal mutant proteins. Lysozyme activity was included as a control. (D) Western blot analysis with anti-SltF gamma globulins (1:2,500 dilution) of the same strains shown in panel B. (E) Western blot analysis of the same strains with anti-flagellin gamma globulin (1:10,000 dilution). SDS–12.5% PAGE was used in all cases.

TABLE 2 Half-lives of different versions of SltF

SltF version	Mean half-life (min) \pm SD (n = 3)
SltF	4.62 \pm 0.34
SltF (Δ_{sec})	6.42 \pm 0.21
SltF (Δ_{flgJ})	7.32 \pm 0.69
SltF Δ 4	3.45 \pm 0.242
SltF Δ 5	11.03 \pm 0.87
SltF Δ 6	15.80 \pm 0.37

and subsequently arrested by the addition of rifampin. Table 2 shows that the native SltF protein has an average half-life of 4.62 min, whereas SltF expressed in an *flgJ* genetic background displayed an average half-life of 7.32 min. On the other hand, the Sec⁻ version of SltF showed an average half-life of 6.42 min, which is longer than that of the wild-type protein. The three C-terminal mutants displayed different half-life values; these ranged from 3.45 min for SltF Δ 4 to 11.03 min for SltF Δ 5 and 15.8 min for SltF Δ 6. It should be noted that the increased stability of SltF Δ 5 and SltF Δ 6 is consistent with the increased abundance of protein observed for these two mutants in Fig. 3D. It was also determined that these C-terminal mutants of SltF were competent for export to the periplasm (data not shown).

The lack of complementation observed in swimming assays (Fig. 3B) was correlated with the absence of flagellin (FliC) in exconjugant cells. FliC was present in either pellet or supernatant fractions of wild-type WS8 and SltF1/*sltF* cells, whereas it was barely detectable in the pellets of SltF1/*sltF* Δ 5 and SltF1/*sltF* Δ 6 cells and absent in SltF1/*sltF* Δ 4 (Fig. 3E).

It was important to determine whether the three SltF C-terminal mutants retained the ability to interact with FlgJ. Therefore, we carried out pulldown and yeast double-hybrid assays. Figure 4A shows that both SltF and the three C-terminal mutants (SltF Δ 4, SltF Δ 5, and SltF Δ 6) bound to FlgJ. It should be noted that the signal obtained for the three mutants is stronger than the signal observed for the wild-type protein. The interaction of the various mutant proteins was further confirmed in a yeast double-hybrid assay. For this assay, the activation domain or the DNA BD of GAL4 was fused to SltF or FlgJ or to the C-terminal mutants of SltF. A positive interaction was detected as prototrophy for histidine compared to the growth of yeast expressing pairs of proteins that interact or not (see Material and Methods for details). Figure 4B shows that two of the C-terminal mutants (SltF Δ 5 and SltF Δ 6) interacted with FlgJ with a higher affinity than the interaction displayed by wild-type SltF with FlgJ. This assay also showed that SltF readily interacts with itself. This finding is in contrast to the lack of interaction between these mutants. We analyzed by size-exclusion chromatography whether SltF was able to form multimeric complexes. The results showed under our experimental conditions that SltF exists in solution mainly as a dimer (data not shown).

We had previously found that a single point mutation of a glutamic acid (E57A) in SltF inhibits transglycosylase enzymatic activity in an *in vitro* assay (8). We carried out *in vivo* analyses of this point mutant (SltFE57A) by complementation of the SltF1 mutant. Figure 5A shows that SltFE57A is unable to restore motility in a *sltF* mutant. We also determined the presence of flagellin (FliC) in the pellets and supernatants of strains expressing SltFE57A by Western blot analysis (Fig. 5B). It should be noted

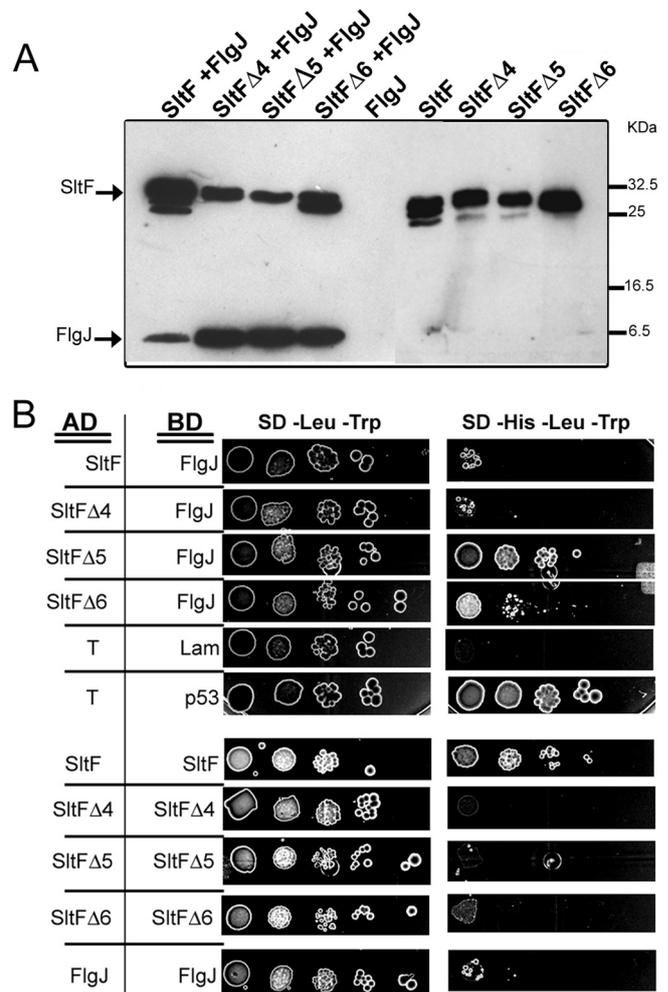


FIG 4 Interaction of various SltF versions with FlgJ. (A) Coimmunoprecipitation of wild-type SltF and three C-terminal mutants in the presence or absence of FlgJ. Anti-SltF gamma globulins were coupled to Protein A-Sepharose beads and tested for binding with the proteins that are indicated. The SDS-PAGE gel used for this analysis was 17.5%. Proteins were detected using His-Probe-HRP at a 1:10,000 dilution (for details, see Materials and Methods). (B) Yeast double-hybrid assays. Different versions of SltF and FlgJ were cloned in plasmids pGADT7 and pGBKT7. pGADT7-T and pGBKT7-Lam were used as negative controls, and PGADT7-T and pGBKT7-p53 were used as positive controls. Serial dilutions of cells were inoculated on culture dishes containing media lacking leucine and tryptophan (-Leu -Trp), and lacking tryptophan, leucine, and histidine. The plates were incubated for 14 days at 30°C.

that the mutant strain SltFE57A, which was unable to complement swimming, shows a reduced amount of FliC in the pellet and supernatant compared to the wild-type or complemented strains. Given that the phenotype of this point mutant is Fla⁻, it was important to test the ability of SltFE57A to interact with FlgJ. Figure 5C shows that the interaction of either the wild-type or the mutant SltF (SltFE57A) with FlgJ is equivalent for the two SltF proteins.

DISCUSSION

In this study we show that SltF from *R. sphaeroides* is exported to the periplasm by the SecA pathway. In *E. coli* and *Salmonella*, the majority of flagellar proteins are exported by the type III flagellar specific export system (fT3SS) (24). The exceptions are the P-ring

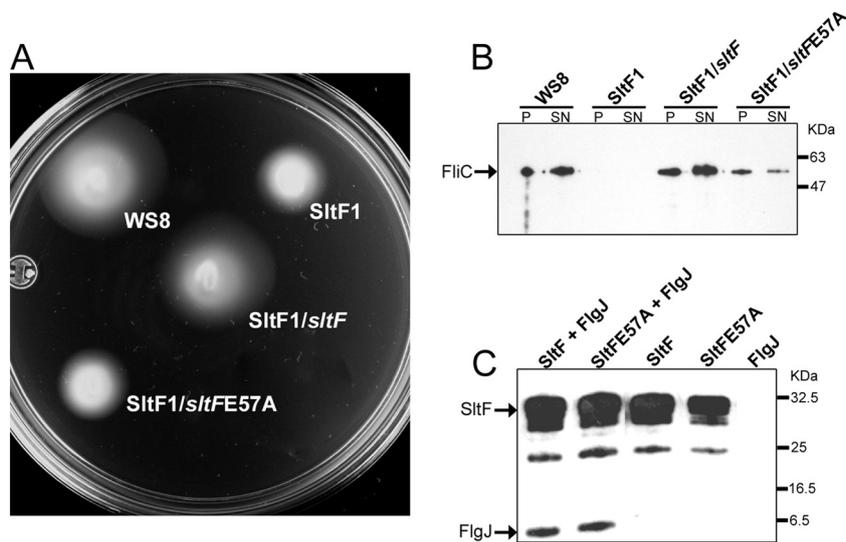


FIG 5 Characterization of a point mutation of SltF. (A) Swimming assay on 0.25% soft agar plates supplemented with 100 μ M sodium propionate. Portions (3 μ l) of the strains WS8, SltF1, SltF1/*sltF*, SltF1/*sltFE57A* were inoculated onto soft agar plates, followed by incubation as described in Materials and Methods. The various versions of *sltF* were cloned in pRK415 (for details, see Materials and Methods). (B) Flagellin (FliC) secretion analyzed by Western blot analysis. The same strains were grown and fractionated in either pellet (P) or supernatant (SN) and then probed with specific gamma globulins at a 1:10,000 dilution. (C) Coimmunoprecipitation assay. Anti-SltF gamma globulins were coupled to protein A-Sepharose beads, followed by incubation with the indicated proteins. These were detected using HisProbe-HRP at a 1:10,000 dilution as indicated in Materials and Methods.

scaffolding protein, FlgA, as well as FlgI and FlgH, which are proteins that conform the P and L rings, respectively. These proteins are also exported to the periplasm through the SecA pathway (17, 26). It should also be noted that in these bacteria, FlgJ contains the rod-scaffolding domain at the N-terminal region and a muramidase domain at the C terminus; this arrangement allows its exportation by the σ^{70} SS. Analysis of the genome sequence of other bacteria, such as *Silicibacter pomeyori* and *Bradyrhizobium japonicum*, has shown that similar, to our observations in *R. sphaeroides*, *flgJ* encodes a single domain scaffolding protein (8, 25). In addition, in these species, a gene encoding a putative lytic muramidase is located in a flagellar context (8). These putative muramidases also show a predictable signal peptide, suggesting that they could be exported to the periplasm using the SecA pathway. However, not all of the genes encoding potential flagellar single domain muramidases contain a coding sequence for a signal peptide, indicating that they are exported either by the σ^{70} SS or through a different export pathway. For example, it has been reported that PleA, the flagellar muramidase of *Caulobacter crescentus*, is translocated by the ABC pathway (35).

The presence of specific muramidases is not restricted to the flagellar system. These enzymes are also required for pilus formation and for many of the various secretion systems reported in different bacteria (29). Recently, it was shown that EtgA, the specific muramidase of the type III secretion system of enteropathogenic *E. coli* is secreted to the periplasm via the Sec pathway (10). It should be noted that EtgA interacts with EscI (rOrf8), which constitutes part of the inner rod of the injectisome (7). In this respect, muramidases or lytic transglycosylases usually interact with other proteins that could exert a physical constrain to control enzymatic activity, such as occurs with VirB1 in the type IV secretion system, which interacts with VirB8, VirB9, and VirB11, core components of this secretion system (15).

In a previous study, we reported that the purified mutant ver-

sion of SltF (SltF E57A) did not show enzymatic activity when tested *in vitro* (lisoplates) (8). On the other hand, we show here that SltF E57A cannot complement the Δ *sltF* mutant strain. However, it was still possible to detect a low amount of flagellin in the culture medium, indicating that this mutant protein still retains a low level of activity. In addition, we also show that SltF E57A is still able to interact with FlgJ, as wild-type SltF does, indicating that this interaction is not affected by the change in the catalytic domain of SltF.

Likewise, we have previously shown that SltF interacts with FlgJ in pulldown assays (8). In the present study, we specifically tested whether the C-terminal region of SltF is involved in this interaction. Using two different assays, we found that the deletion of the C-terminal region of SltF improved SltF-FlgJ interaction. Therefore, these results indicate that the C-terminal domain of SltF exerts a negative effect on SltF-FlgJ interaction. Nonetheless, this same region favors SltF-SltF interaction. This apparent contradiction could be explained if the C-terminal region of SltF in *R. sphaeroides* prevents a strong interaction with FlgJ, thus making this interaction transitory for a successful flagellar assembly to take place. On the other hand, the lack of either one of the C-terminal sections results in a defective export of flagellin; this suggests that SltF Δ 5 and SltF Δ 6 do not support an efficient flagellar assembly. Given that these versions of SltF have an intact muramidase domain, as shown in the activity assay, we propose that the C-terminal region of SltF modulates the activity of this protein, perhaps through its interaction with FlgJ.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Aurora Osorio for helpful technical assistance and the IFC Molecular Biology Unit for sequencing facilities.

This study was supported by grants from CONACyT (grant 106081) and DGAPA/UNAM (IN206811-3).

REFERENCES

1. Ausubel FM, et al. 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc, New York, NY.
2. Bardy SL, Ng SY, Jarrell KF. 2003. Prokaryotic motility structures. Microbiology 149:295–304.
- 2a. Becktel WJ, Basse WA. 1985. A lysoplate assay for *Escherichia coli* cell wall-active enzymes. Anal. Biochem. 150:258–263.
3. Belle A, Tanay A, Bitincka L, Shamir R, O'Shea EK. 2006. Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103:13004–13009.
4. Blackburn NT, Clarke AJ. 2001. Identification of four families of peptidoglycan lytic transglycosylases. J. Mol. Evol. 52:78–84.
5. Chevance FF, Hughes KT. 2008. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. Nat. Rev. Microbiol. 6:455–465.
6. Chilcott GS, Hughes KT. 2000. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64:694–708.
7. Creasey EA, Delahay RM, Daniell SJ, Frankel G. 2003. Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. Microbiology 149:2093–2106.
8. de la Mora J, Ballado T, González-Pedrajo B, Camarena L, Dreyfus G. 2007. The flagellar muramidase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. 189:7998–8004.
9. Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 32:1792–1797.
10. García-Gómez E, Espinosa N, de la Mora J, Dreyfus G, González-Pedrajo B. 2011. The muramidase EtagA from enteropathogenic *Escherichia coli* is required for efficient type III secretion. Microbiology 157:145–160.
11. González-Pedrajo B, de la Mora J, Ballado T, Camarena L, Dreyfus G. 2002. Characterization of the *flgG* operon of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 and its role in flagellum biosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 1579:55–63.
12. Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166:557–580.
13. Hirano T, Minamino T, Macnab RM. 2001. The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase. J. Mol. Biol. 312:359–369.
14. Homma M, Kutsukake K, Hasebe M, Iino T, Macnab RM. 1990. FlgB, FlgC, FlgF, and FlgG: a family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. J. Mol. Biol. 211:465–477.
15. Hoppner C, Carle A, Sivanesan D, Hoepfner S, Baron C. 2005. The putative lytic transglycosylase VirB1 from *Brucella suis* interacts with the type IV secretion system core components VirB8, VirB9, and VirB11. Microbiology 151:3469–3482.
16. Ind AC, et al. 2009. Inducible-expression plasmid for *Rhodobacter sphaeroides* and *Paracoccus denitrificans*. Appl. Environ. Microbiol. 75:6613–6615.
17. Jones CJ, Homma M, Macnab RM. 1989. L-, P-, and M-ring proteins of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*: gene sequences and deduced protein sequences. J. Bacteriol. 171:3890–3900.
18. Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Trollinger D. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. Gene 70:191–197.
19. Kubori T, Shimamoto N, Yamaguchi S, Namba K, Aizawa S. 1992. Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. J. Mol. Biol. 226:433–446.
20. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685.
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265–275.
22. Macnab RM. 2003. How bacteria assemble flagella. Annu. Rev. Microbiol. 57:77–100.
23. Meroueh SO, et al. 2006. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103:4404–4409.
24. Minamino T, Macnab RM. 1999. Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. J. Bacteriol. 181:1388–1394.
25. Nambu T, Inagaki Y, Kutsukake K. 2006. Plasticity of the domain structure in FlgJ, a bacterial protein involved in flagellar rod formation. Genes Genet. Syst. 81:381–389.
26. Nambu T, Kutsukake K. 2000. The *Salmonella* FlgA protein, a putative periplasmic chaperone essential for flagellar P ring formation. Microbiology 146(Pt 5):1171–1178.
27. Nambu T, Minamino T, Macnab RM, Kutsukake K. 1999. Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 181:1555–1561.
28. Oosawa K, Ueno T, Aizawa S. 1994. Overproduction of the bacterial flagellar switch proteins and their interactions with the MS ring complex *in vitro*. J. Bacteriol. 176:3683–3691.
29. Scheurwater EM, Burrows LL. 2011. Maintaining network security: how macromolecular structures cross the peptidoglycan layer. FEMS Microbiol. Lett. 318:1–9.
30. Simon R, Priefer U, Puhler A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. Biotechnology 1:37–45.
31. Sistrom WR. 1962. The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. J. Gen. Microbiol. 28:607–616.
32. Sockett RE, Foster JCA, Armitage JP. 1990. Molecular biology of *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. FEMS Symp. 53:473–479.
33. Sosinsky GE, Francis NR, Stallmeyer MJ, DeRosier DJ. 1992. Substructure of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. J. Mol. Biol. 223:171–184.
34. Thormann KM, Paulick A. 2010. Tuning the flagellar motor. Microbiology 156:1275–1283.
35. Viollier PH, Shapiro L. 2003. A lytic transglycosylase homologue, PleA, is required for the assembly of pili and the flagellum at the *Caulobacter crescentus* cell pole. Mol. Microbiol. 49:331–345.
36. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. 2008. Peptidoglycan structure and architecture. FEMS Microbiol. Rev. 32:149–167.
37. Reference deleted.
38. Wessel D, Flugge UI. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. Anal. Biochem. 138:141–143.
39. Zhang K, Tong BA, Liu J, Li C. 2012. A single-domain FlgJ contributes to flagellar hook and filament formation in the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. J. Bacteriol. 194:866–874.
40. Zhou J, Lloyd SA, Blair DF. 1998. Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95:6436–6441.