



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio de la interacción SlfF y FlgJ, proteínas
involucradas en la biogénesis del flagelo 1 de Rhodobacter
sphaeroides.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MARIELA GARCÍA RAMOS



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. GEORGES DREYFUS CORTÉS**

2015

Ciudad Universitaria, D. F.



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.

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno

García

Ramos

Mariela

5526895505

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

307014434

2. Datos del tutor

Dr.

Georges

Dreyfus

Cortés

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Luis

Servín

González

4. Datos del sinodal 2

Dr.

José Eduardo

Rodríguez

Bustamante

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Saúl

Gómez

Manzo

6. Datos del sinodal 4

Dra.

Irma

Romero

Alvarez

7. Datos del trabajo escrito

Estudio de la interacción SltF y FlgJ, proteínas involucradas en la biogénesis del flagelo 1 de Rhodobacter sphaeroides.

80 p.

2015

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Georges Dreyfus Cortés por haber dirigido este trabajo, el cual se realizó 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 e invaluable apoyo técnico durante la entera realización de este proyecto.

A la Q.F.B. Teresa Ballado por sus innumerables asesorías técnicas durante la realización de esta tesis.

A la Biol. Ana Karen Guevara González por su importante apoyo técnico.

Agradezco a los miembros del jurado por la revisión de esta tesis, a los doctores: Luis Servín González, José Eduardo Rodríguez Bustamante, Saúl Gómez Manzo, Irma Romero Alvarez y Georges Dreyfus Cortes.

A los miembros de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

A la biblioteca 'Armando Gómez Puyou' del Instituto de Fisiología Celular

Finalmente, agradezco los donativos de CONACyT (106081) y PAPIIT (IN204614) los cuales permitieron la elaboración de este proyecto.

Dedicatorias

Sin duda es grato reconocer a mis padres por todo el incondicional esfuerzo que han puesto y aún ponen en mi formación y educación, por lo que no me bastan estas breves líneas para mostrar mi cariño y gratitud.

A mis hermanos Jorge y Mauricio quienes me han acompañado en básicamente todas las variables de la vida.

A mis tíos Gloria y Manuel por todo su cariño y apoyo. Gracias por ser personas excelentes e inspirarme a más todos los días.

Al jefe por haberme dado la oportunidad de incorporarme a la vida del laboratorio.

A Javier, Tere y Ana KDa por haberme aguantado durante todos mis experimentos, seminarios y trámites.

A los miembros pasados y presentes del laboratorio Ana Elisa, Manuel y Arely.

A todos los amigos que han formado parte de este camino acompañándome y haciéndome sonreír siempre. Especialmente a Erika y Mariana quienes todos los días me enseñan a ser mejor persona y amiga.

A mis buenos amigos Karen (Itzel), Rodrigo, Marianis, Miguel, Jorge Rivera, Jorge Pulido, Arturo, Abel, Omar, Jennifer, Víctor, Mariana, Tania, Beto y a mi súper bestie MariCarmen Pastor.

A mis amigos de la facultad Lalo (Dado), Dana, Gabita, Lety, David, Gabo, Roberto, Albita, Fer, Vero y Anita. Con una mención especial para Martín porque pasar tiempo con él me hizo mejor estudiante y mejor persona.

Finalmente, agradezco a la evolución por hacer todo esto posible.

*And everyday I wake, I tell myself a little harmless lie,
The whole wide world is mine.*

-Tom DeLonge

Índice

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
El flagelo bacteriano	4
Cuerpo basal	6
Aparato de exportación.....	7
Motor.....	9
Gancho	10
Proteínas asociadas al gancho.....	12
Filamento	12
Regulación flagelar	15
Biogénesis del flagelo	16
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	18
Pared de peptidoglicano	20
Enzimas líticas	22
Transglicosilasas líticas.....	23
ANTECEDENTES PARTICULARES	25
FlgJ en <i>R. sphaeroides</i>	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
RESULTADOS	42
DISCUSIÓN	58

CONCLUSIONES.....	62
PERSPECTIVAS.....	63
REFERENCIAS.....	65

Resumen

El más importante organelo de motilidad en bacterias es el flagelo, se trata de un sistema de locomoción que le permite desplazarse en ambientes líquidos, viscosos o sobre superficies sólidas. Su actividad es regulada por la maquinaria quimiotáctica, la cual es capaz de censar el medio y dirigir la migración celular permitiéndole alejarse de condiciones desfavorables y acercarse a condiciones benéficas. El ensamblaje del flagelo es un proceso altamente regulado en el que participan cerca de 50 genes expresados jerárquicamente. La estructura del flagelo se divide en tres partes: **El cuerpo basal**, que se encuentra embebido en la superficie celular, alberga al motor y al aparato de exportación, **el gancho** que acopla la rotación y **el filamento** que recibe el torque e impulsa a la bacteria.

Mientras el flagelo se ensambla la pared de peptidoglicano debe ser degradada para permitir el paso del eje: En el organismo modelo *Salmonella enterica* la proteína FlgJ es bifuncional: posee un dominio de ensamblaje en la región N-terminal cuya función es la de permitir la asociación de los componentes del eje y en la región C-terminal un dominio de β -N-acetilglucosaminidasa, el cual degrada la pared de peptidoglicano.

En la α -proteobacteria *Rhodobacter sphaeroides* la proteína FlgJ es monodominio, es decir, carece de la capacidad para hidrolizar a la capa de peptidoglicano y únicamente contiene el dominio de ensamblaje. La proteína SltF es una transglicosilasa lítica y es la responsable de degradar la pared en el sitio de formación del eje flagelar al interactuar con FlgJ. SltF es exportada a su sitio de acción, el periplasma, a través de la vía general de secreción Sec y no de la vía específica para componentes del flagelo.

Análisis bioinformáticos previos agrupan a SltF dentro de la familia 1 de las transglicosilasas líticas en la subfamilia 1 o MltD. Adicionalmente se identificó en el C-terminal una región de 48 residuos que no forman parte del dominio catalítico conservado, pero que, sin embargo, son fundamentales para su función dentro de la biogénesis del flagelo. Al caracterizar dicha región se determinó que su ausencia afecta la interacción con FlgJ aumentando su afinidad por dicha proteína, posiblemente para regular su actividad de enzima lítica.

Los detalles de la interacción que permiten a SltF interactuar con FlgJ se exploraron a través de la construcción de mutantes. Se observó el efecto negativo de cada una de las mutantes de SltF en la motilidad de *R. sphaeroides*, adicionalmente se observó el efecto del cambio al interactuar con FlgJ *in vitro*. Lo anterior permitió concluir que dentro de la secuencia de SltF existe una región determinante para llevar a cabo la interacción con FlgJ.

Con la finalidad de identificar transglicosilasas líticas flagelares, se analizó el genoma de algunas especies bacterianas que poseen una FlgJ monodominio reportada, y se buscó transglicosilasas líticas en contextos flagelares. Se realizaron análisis de las secuencias de transglicosilasas líticas encontradas en contextos flagelares con transglicosilasas líticas (no

flagelares) miembros de las familias establecidas. Las transglicosilasas líticas flagelares se agrupan filogenéticamente como lo que se propone que sea una nueva subfamilia de enzimas específicas para el flagelo.

Los resultados presentados en este trabajo contribuyen al modelo de biogénesis flagelar en *Rhodobacter sphaeroides* y brindan un panorama para el estudio de FlgJ monodominio en otras especies bacterianas.

Introducción

La motilidad bacteriana fue la característica que le permitió al científico Antonie van Leeuwenhoek en el Siglo XVII determinar que las “pequeñas partículas” que observaba en una suspensión eran en realidad organismos vivos y especular que aquello que les permitía desplazarse eran “piernas muy pequeñas”. En 1840, Christian Gottfried Ehrenberg describió por primera vez a los flagelos “ondulados” que observaba como los elementos responsables del movimiento en bacterias; Sin embargo, fue hasta 1881 cuando el profesor Thomas Engelmann realizó el primer estudio descriptivo sobre comportamiento y motilidad observando la tendencia que seguían las células bacterianas para avanzar y acumularse en regiones con alta concentración de nutrientes [1].

La gran variedad de capacidades metabólicas presentes en bacterias han sido optimizadas por procesos evolutivos como respuesta a las presiones del nicho ecológico de cada especie, lo cual, hace sin duda al dominio Bacteria el colonizador más exitoso. Así mismo, las bacterias han desarrollado adaptaciones estructurales únicas que les permiten migrar dentro de su propio nicho, la capacidad para desplazarse es una de las más importantes, pues les permite alejarse de ambientes desfavorables y explorar el medio en busca de nutrientes [2].

La motilidad dependiente de flagelo es un rasgo evolutivamente antiguo y ampliamente distribuido dentro del dominio Bacteria. La gran variabilidad que existe en el número, localización y configuración de los flagelos se refleja en adaptaciones únicas que les permiten explorar el medio que las rodea [3] (**Figura 1**).

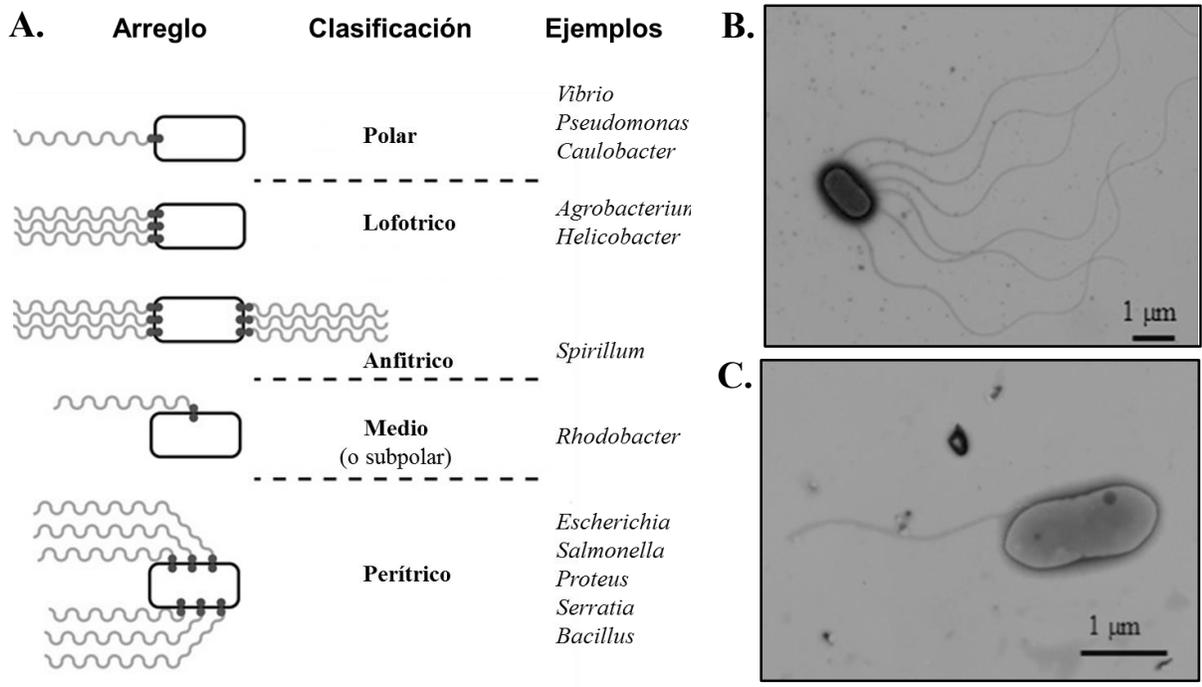


Figura 1. A. Arreglo espacial del flagelo bacteriano. **Polar:** un flagelo en uno o ambos polos. **Lofotrico:** múltiples flagelos en uno o ambos polos. **Anfitrico:** múltiples flagelos en ambos polos. **Medio:** un flagelo a lo largo del cuerpo celular. **Peritrico:** múltiples flagelos en el cuerpo celular (Modificado de Guttenplan, 2012) [4]. **B.** Microscopia electrónica de transmisión de una célula de *Salmonella typhimurium*, se observan flagelos peritricos. **C.** Microscopia electrónica de una célula de *R. sphaeroides*, se observa un flagelo subpolar [5].

El Flagelo bacteriano

El flagelo bacteriano es un complejo macromolecular formado por al menos 40 proteínas, por lo que históricamente y para facilitar su estudio, se ha dividido al flagelo en tres componentes principales: cuerpo basal, gancho y filamento (**Figura 2**). El cuerpo basal se encuentra embebido en la superficie celular, mientras que el gancho y el filamento se localizan fuera de la célula.

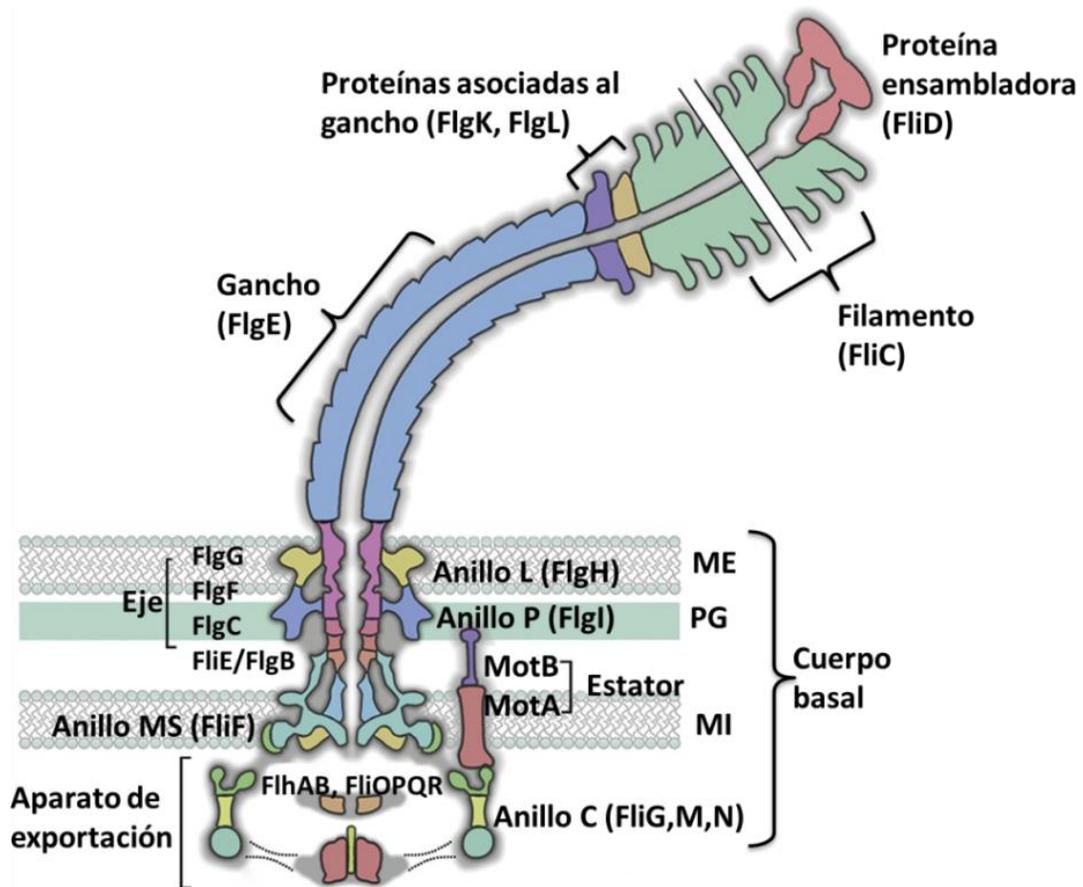


Figura 2. El flagelo bacteriano. Esquema representativo del flagelo bacteriano. Se indican los componentes estructurales con las proteínas que lo conforman. ME, membrana externa. PG, peptidoglicano. MI, membrana interna o citoplásmica [6].

Cuerpo basal

El cuerpo basal es el componente del flagelo que está embebido en la envoltura celular. Es un complejo multiprotéico compuesto por 4 estructuras en forma de anillo, el motor flagelar, una estructura tipo axial denominada eje y el aparato de exportación (**Figura 3**).

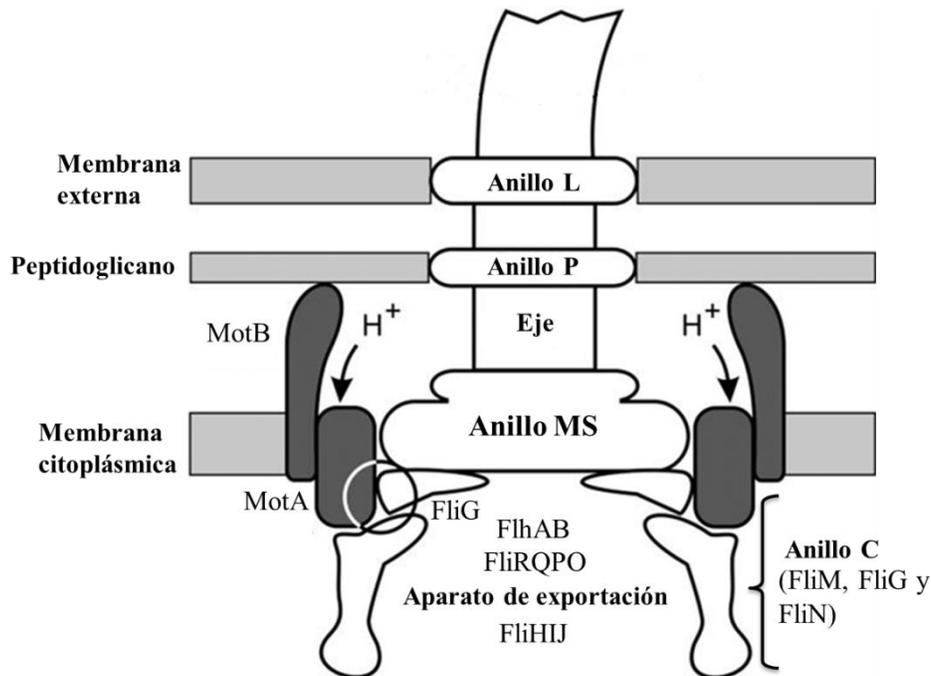


Figura 3. Componentes del cuerpo basal. Esquema representativo de sus principales componentes. Se observa tanto el eje como las estructuras anulares: anillo C, MS, P y L; además de los componentes del motor y el aparato de exportación. Se indica con un círculo la zona de interacción entre los componentes del motor MotA y FliG (Modificado de Schmitt, 2003) [7].

En la base del flagelo hacia la cara citoplásmica de la membrana interna se encuentra el primero de los cuatro anillos: el **anillo C**, el cual es una estructura formada por tres proteínas: FliG, FliM y FliN, las cuales son fundamentales para la rotación y direccionalidad del flagelo.

En la parte inferior del anillo C en una estequiometría 1:4, se forman complejos FliM:FliN, los cuales funcionan como componentes fundamentales para el sentido de rotación del flagelo; la parte superior del anillo está formada por la proteína FliG, la cual es indispensable para lograr la rotación flagelar y para permitir la incorporación de las proteínas FliM y FliN al anillo C [8]. El número de copias estimadas para FliG es de 26, para FliM es de 34 y para FliN de 136 subunidades [9].

Inmerso en la membrana citoplásmica se localiza el **anillo MS** (*Membrane Supramembrane*). Este anillo está compuesto por múltiples copias de una única proteína denominada FliF [10], la cual es capaz de interactuar con la proteína FliG del anillo C [11].

Dispuesto sobre el anillo MS se encuentra el **eje flagelar**, se trata de una estructura tubular compuesta por cinco proteínas distintas: FliE, FlgB, FlgC, FlgF y FlgG en una estequiometría de 9,6, 6, 6 y 26 subunidades, respectivamente. El eje es un transmisor de la torca generada por la rotación del motor flagelar que conecta el anillo MS con el gancho y el filamento [12].

A la altura de la capa de peptidoglicano se ensambla una estructura denominada **anillo P (Figura 3)**. Dicha estructura está formada por 26 monómeros de la proteína FlgI, los cuales requieren de la asistencia de la chaperona FlgA para poder llevar a cabo su proceso de polimerización [13]. Finalmente, ubicado en la membrana externa y formado por 28 subunidades de la lipoproteína FlgH, se encuentra el **anillo L** [14]. El anillo L forma un poro que le permite al flagelo extenderse hacia el exterior celular [15].

Aparato de exportación

La mayoría de los componentes flagelares se ubican fuera de la membrana citoplásmica (**Figura 2**). El ensamblaje de cada una de las estructuras flagelares se lleva a cabo de forma ordenada y sucesiva, comenzando con las estructuras más proximales y posteriormente las más distales: primero se establece el cuerpo basal, seguido del gancho y detrás el filamento. Los componentes flagelares se sintetizan en el citoplasma y es necesario transportarlos al espacio periplásmico, la membrana externa y/o al espacio extracelular para ser ensamblados. La mayoría de los componentes flagelares externos son translocados al extremo distal del flagelo naciente por el aparato de exportación flagelar, se trata de un sistema de secreción tipo III específico para los componentes del flagelo.

El aparato de exportación está compuesto por 6 proteínas integrales de membrana: FliO, FliP, FliQ, FlhA, FlhB y FliR, y tres componentes citoplásmicos solubles: FliI, FliH y FliJ. Adicionalmente existen las proteínas citoplásmicas FlgN, FliA, FliS y FliT las cuales actúan como chaperonas específicas que facilitan la exportación de algunos sustratos [31] (**Figura 4**).

El aparato de exportación se encuentra en el poro central del anillo MS con una proyección hacia el espacio periplásmico (**Figura 4**).

Las proteínas integrales de membrana FlhA y FlhB tienen dominios citoplásmicos, los cuales funcionan como sitios de acoplamiento para las proteínas FliI, FliH y FliJ. FlhA provee sitios de unión para las diferentes chaperonas. FlhB actúa como un interruptor que controla el proceso de exportación según la etapa de ensamblaje del flagelo. Un cambio en la conformación del dominio citoplásmico de FlhB resulta en un cambio en la especificidad de sustratos a exportar: de gancho a filamento [32]. El cambio en la conformación de FlhB es ocasionado por la proteína de control de la longitud del gancho: FliK [20].

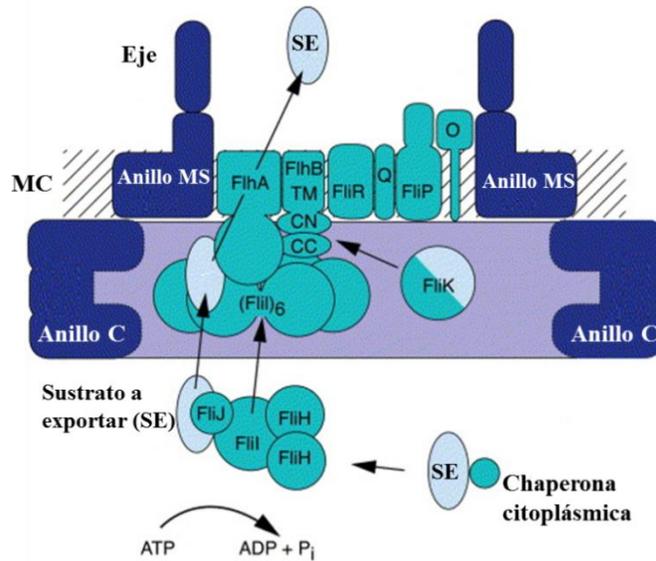


Figura 4. Aparato de exportación flagelar. El esquema indica las proteínas asociadas a membrana (FliO, FliP, FliQ, FliA, FliB, FliR) y los componentes citoplásmicos (FliI, FliH y la chaperona citoplásmica FliJ). Se esquematiza la exportación de un sustrato (SE). MC, membrana citoplásmica (o interna) [31].

La proteína FliI es una ATPasa que existe en un complejo estable con FliH formando un heterotrímero: FliH₂FliI. La proteína FliH es un regulador negativo de la actividad enzimática de FliI. La región amino terminal de FliI y la carboxilo terminal de FliH son las responsables de la formación del complejo [33]. La proteína FliJ interacciona con las proteínas FliH, FliI y los dominios citoplásmicos de las proteínas FliA y FliB, FliJ funciona como una chaperona general, cuyo papel es el de prevenir la agregación citoplásmica de los sustratos a exportar [35,36].

El proceso de exportación de los componentes flagelares requiere de energía para poder llevarse a cabo. La proteína FliI tiene actividad ATPasa y mutantes en su sitio catalítico resultan en una célula incapaz de ensamblar flagelo, se sugiere que la energía necesaria para el transporte de proteínas proviene de la hidrólisis de ATP, sin embargo, se ha determinado que aunque FliI es relevante para el proceso, no es indispensable. Se propone que el gradiente electroquímico es el responsable de proveer la energía necesaria para poder conducir la exportación de las proteínas flagelares a través del sistema de exportación [37].

Motor

El motor del flagelo rota como resultado de la energía generada por el gradiente transmembranal de protones o iones sodio en algunas especies. El motor flagelar convierte la energía proveniente del gradiente electroquímico en trabajo mecánico (**Figura 5**).

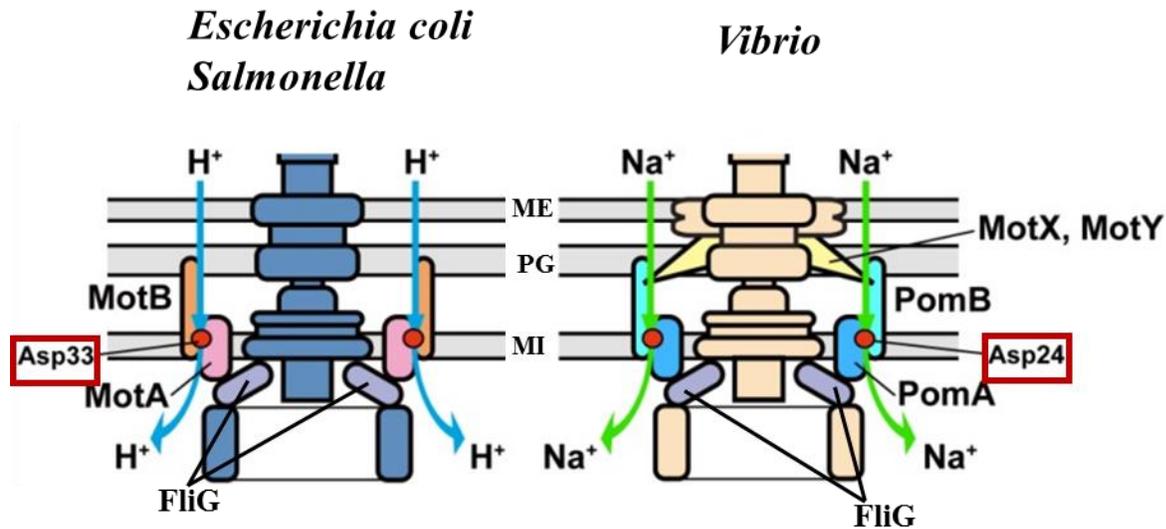


Figura 5. Diagrama representativo de los dos tipos de motores flagelares. Modelo para el motor de protones funcional en *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* (izquierda) y el modelo para el funcionamiento del motor de iones sodio en *Vibrio* (derecha). Se muestra para ambos modelos en un cuadrado el residuo crítico para la rotación del flagelo (El aspártico 33 y el 24 respectivamente). ME, membrana externa. PG, pared de peptidoglicano. MI, membrana interna (Modificado de Morimoto, 2014) [16].

El mecanismo molecular que permite la generación de la torca involucra a las proteínas MotA y MotB (o PomA y PomB para motores de ion sodio, como es el caso de *Vibrio*) y a FliG: Las proteínas integrales de membrana MotA y MotB componen al estator formando un heterohexámero constituido por 4 copias de MotA y 2 copias de MotB [17]. El complejo se encuentra inmerso en la membrana interna y forma dos canales para el transporte de protones; la proteína FliG (del anillo C) se localiza en el lado citoplásmico de la membrana interna y es el componente que forma el rotor [18].

La proteína MotB tiene un residuo crítico para la rotación del flagelo (**Figura 5**): dicho residuo interacciona con los protones transportados y ocasiona un cambio conformacional en la proteína MotA. La consecuencia del cambio en MotA es una modificación en la interacción entre los residuos cargados en su dominio citoplásmico y los residuos cargados en el carboxilo terminal de FliG [16]. La interacción entre los residuos genera un trabajo sobre los **anillos MS** y **C**, haciéndolos rotar [19].

El gancho

El gancho es una estructura tubular flexible cuya función es transmitir la torca del motor flagelar al resto de la estructura, permitiendo así la rotación del filamento (**Figura 6**) [20]. El gancho flagelar se dispone de forma cilíndrica y está compuesto por 120 copias de la proteína FlgE. Cada una de las subunidades se organiza helicoidalmente formando una estructura de hasta 55 nm de longitud (con variaciones según la especie). Cambios en la longitud del gancho originados por mutaciones en la proteína FliK resultan en flagelos incompletos. Por lo anterior se sugiere que FliK juega un papel importante, sin embargo, el mecanismo de funcionamiento está aún por describirse [21].

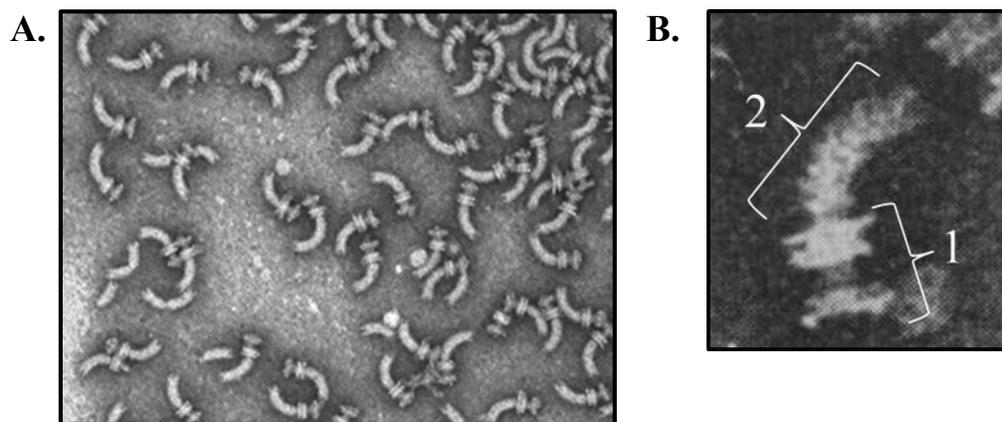


Figura 6. Gancho flagelar. **A.** Microscopía electrónica de complejos gancho-cuerpo basal de *Salmonella typhimurium*. Se observa en la base de cada estructura los anillos del cuerpo basal y el gancho helicoidal [5]. **B.** Característica morfológica de un solo complejo gancho-cuerpo basal. Se indica el cuerpo basal (número 1) y el gancho (número 2) [23].

Estudios de microscopía electrónica resolvieron la arquitectura básica del gancho como una hélice simétrica de 11 subunidades por cada dos vueltas (**Figura 7**) [22].

La estructura cristalográfica disponible para la proteína del gancho FlgE se logró obtener como resultado de eliminar las regiones N- y C-terminales, la proteína resultante abarca de los residuos 71 a 369 de los 402 presentes en la versión silvestre de *Salmonella typhimurium*. Se estableció que la proteína FlgE está compuesta por tres dominios: D0, D1 y D2.

El dominio D0 es desordenado en solución pero adquiere una conformación tipo α -hélice al polimerizar. Se localiza en el centro de la estructura tubular. Los dominios D1 y D2 están poco empacados, lo cual pudiera explicar la flexibilidad del gancho, pues las interacciones intermoleculares que ocurren entre ambos dominios tienen como resultado cambios conformacionales que le otorgan a cada protofilamento una capacidad de extensión y compresión de aproximadamente 9 Å, el resultado es un alto nivel de flexibilidad que le permite a la estructura adquirir una conformación curva. Estos cambios de extensión y compresión deben ocurrir en cada vuelta que da el flagelo al rotar, es decir, aproximadamente 300 veces por segundo.

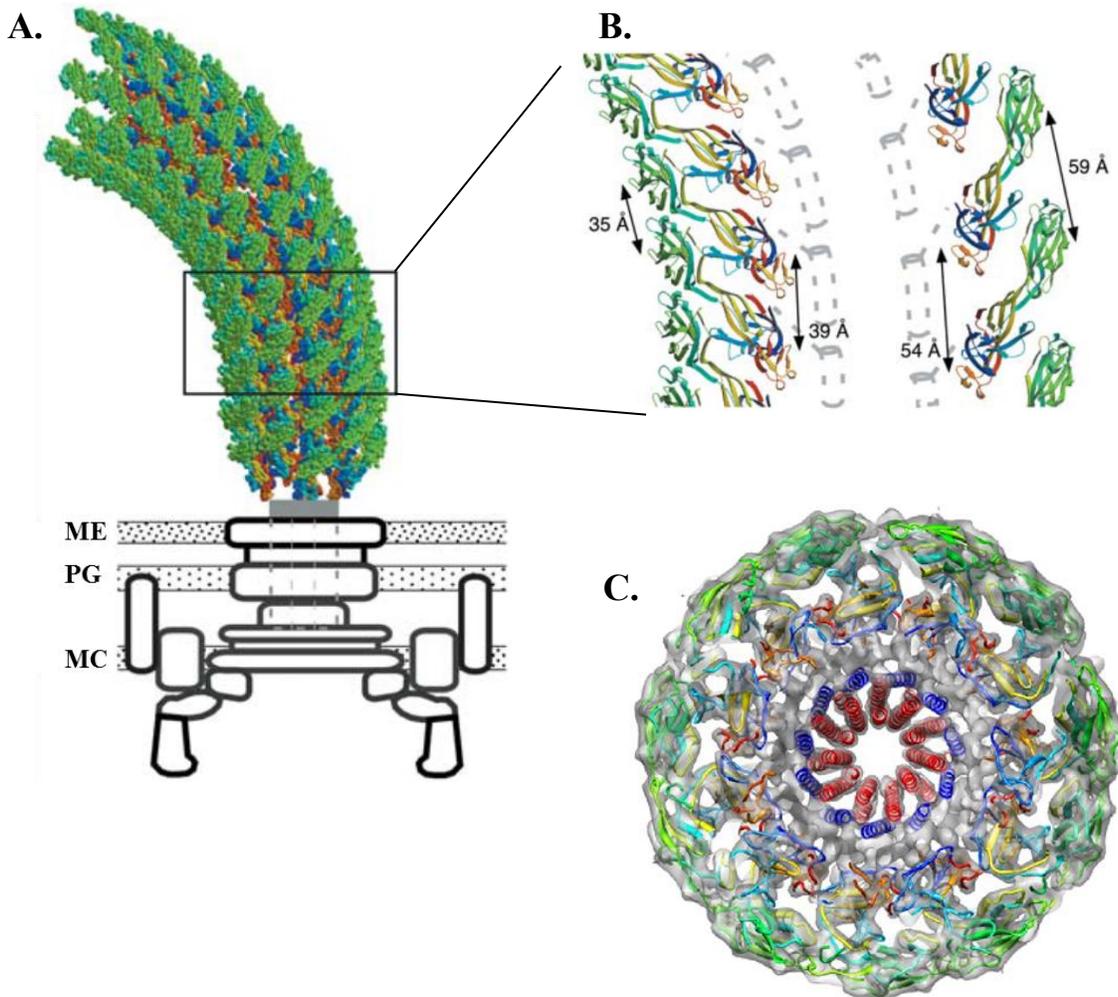


Figura 7. Arquitectura del gancho flagelar. **A.** Modelo del gancho con un diagrama esquemático del cuerpo basal abarcando desde la membrana citoplásmica MC, el peptidoglicano PG y la membrana externa ME. **B.** Acercamiento a la curvatura del gancho. Se aprecia la extensión y compresión de los protofilamentos y el canal central formado por el dominio D0 en líneas grises punteadas [21]. **C.** Vista superior de un mapa de la densidad tridimensional del gancho ajustado al modelo atómico. El diámetro del gancho es de 180 Å y el canal interno mide 18 Å [83].

La proteína del gancho (FlgE) requiere de la asistencia de la proteína FlgD para poder ensamblarse correctamente. Se sugiere que el papel que juega FlgD es el de una proteína de andamiaje que promueve la polimerización de las subunidades del gancho evitando que difundan en el medio extracelular al ser exportadas [24].

Proteínas asociadas al gancho (*Hook Associated Proteins*)

Debido a las diferencias a nivel de estructura entre el gancho y el filamento se requiere una interfase de unión. Para esto es necesaria la presencia de dos proteínas accesorias: estas se denominan proteínas asociadas al gancho 1 y 3, o por sus siglas en inglés HAP1 (FlgK) y HAP3 (FlgL). Ambas proteínas se ensamblan en el extremo distal del gancho [25] y la estequiometría reportada es de 11 unidades para cada una [9]. La proteína HAP1 (FlgK) se une directamente al gancho, y la proteína HAP3 (FlgL) se une a HAP1 y al filamento. Existe otra proteína asociada al gancho: HAP2 (FliD), la cual se ubica después de HAP1 y 3 antes de la elongación del filamento. La proteína FliD permite que las subunidades de flagelina (FliC) polimericen, por lo que en su ausencia el filamento no se ensambla [26].

La ausencia de cualquiera de las proteínas asociadas al gancho ocasiona un flagelo incompleto.

Filamento

El filamento es el componente mayoritario del flagelo bacteriano. Es el encargado de realizar el trabajo mecánico sobre el medio para poder propulsar a la bacteria durante el nado. Con un diámetro de 20 nm y una longitud de hasta 15 μm son necesarias aproximadamente 30, 000 unidades de la proteína FliC (también denominada flagelina) para ensamblarlo. Las unidades de flagelina se disponen una sobre otra hasta formar una hélice; cada vuelta está compuesta por 5.5 unidades de FliC [14]. Los monómeros de flagelina forman 11 hélices (o protofilamentos) los cuales se acomodan sobre la superficie cilíndrica del filamento [27].

La naturaleza fisicoquímica de la flagelina ha dificultado su estudio debido a su tendencia para auto polimerizar y formar filamentos, por lo que actualmente no se conoce la estructura cristalográfica de la proteína completa, pero sí de la mayor parte. La estructura cristalográfica existente pertenece a la flagelina de *S. enterica* y es el resultado de una versión recombinante que carece de los extremos amino y carboxilo terminales, por lo que se trata de un péptido con menor número de aminoácidos: 396 de los 494 [28].

El cristal de la proteína muestra la existencia de tres dominios que componen a la flagelina: D1, D2 y D3. El **dominio D1** se encuentra en el N-terminal, incluye de la asparagina 54 a la glicina 176, también incluye el C-terminal desde la treonina 402 a la arginina 450. Está compuesto principalmente por α -hélices.

Al **dominio D2** está compuesto de igual forma por dos fragmentos que incluyen desde la lisina 177 a la glicina 189 y de la alanina 248 a la alanina 401, siendo la estructura proteica predominante la de hojas β -plegadas.

El **dominio D3** está conformado por la región central de la secuencia proteica y abarca desde la tirosina 190 hasta la valina 283, la estructura secundaria predominante es del tipo hojas β -plegadas (**Figura 8**).

Posteriormente, el modelo del filamento se resolvió por criotomografía electrónica revelando la estructura de los extremos amino y carboxilo de la proteína silvestre. Dichas regiones forman un cuarto dominio: D0, el cual está compuesto por dos α -hélices entrelazadas.

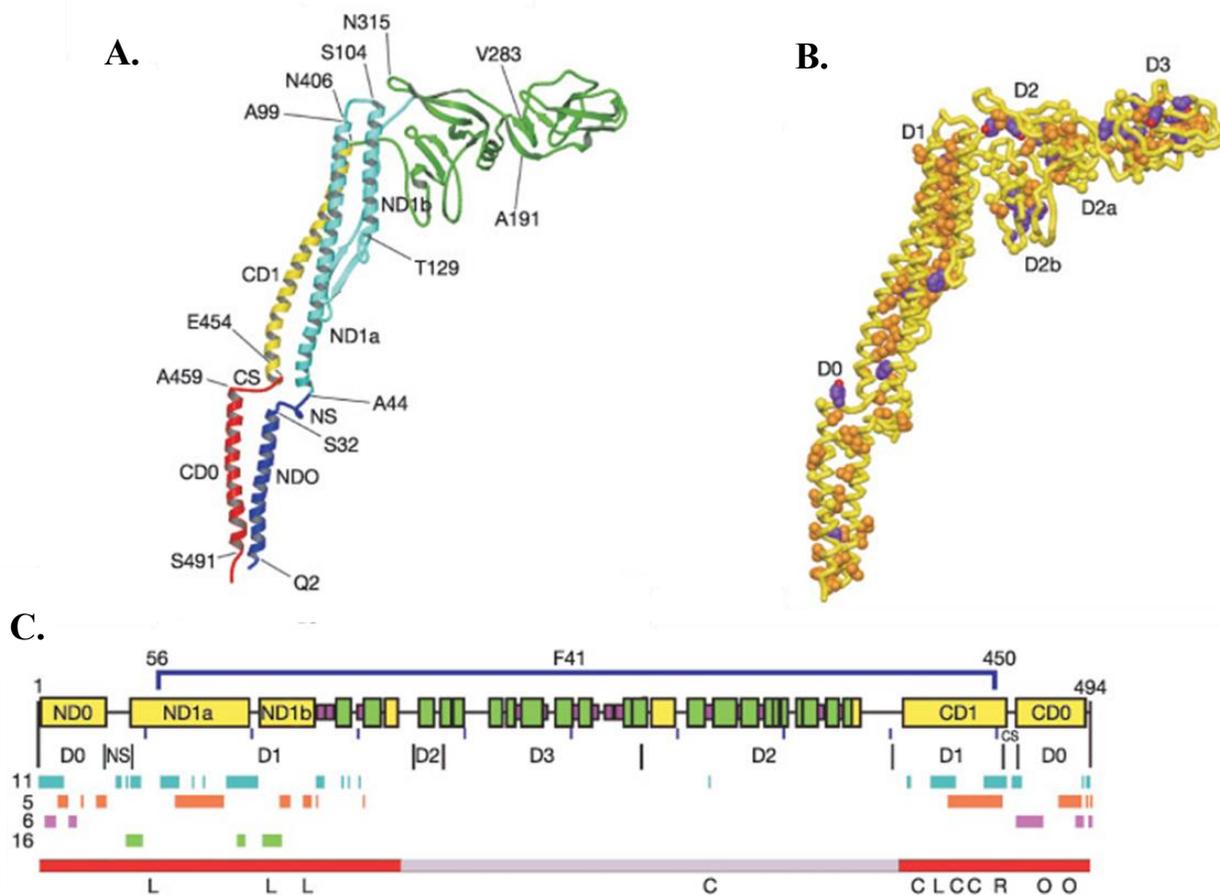


Figura 8. Estructura tridimensional de la flagelina o FliC. **A.** La cadena está coloreada de la siguiente manera: residuos 1 al 44 en color azul, residuos 44 al 179 en celeste, residuos 179 al 406 en verde, 406-454 en amarillo y del 454 al 494 en rojo. **B.** Distribución de las cadenas hidrofóbicas laterales mostrando las regiones que definen a los dominios D0, D1, D2 y D3, los componentes de la cadena lateral están coloreados de la siguiente manera: Alanina y metionina en amarillo. Leucina, isoleucina y valina en naranja. Fenilalanina, tirosina y prolina, morado y rojo: carbono y oxígeno, respectivamente. **C.** Posiciones y regiones de las características estructurales de la secuencia de aminoácidos de la flagelina [28].

Las regiones N-terminal y C-terminal forman el dominio D0, y son regiones que carecen de estructura secundaria ordenada en solución, sin embargo, se sabe que además de ser esenciales para la polimerización y estabilizar el filamento su interacción es esencial durante las transiciones polimórficas, en el modelo 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 son exportadas. Una vez incorporadas en la estructura, las regiones N- y C-terminal sufren una transición que les permite adquirir una conformación α -hélice, ambas regiones están

altamente conservadas y es probable que esto se deba a su papel durante la polimerización del filamento.

El dominio D1 forma una estructura concéntrica de doble tubo y al igual que el dominio D0 tiene un papel importante durante la polimerización y está muy conservado [28].

Los dominios D2 y D3 corresponden a la región central de la proteína, la cual no es esencial para la polimerización, pues mutantes en dicha región conservan la capacidad para formar filamento. Adicionalmente, se sabe que existe una gran variabilidad en la composición y longitud de ambos dominios entre las flagelinas de diferentes especies bacterianas. En la bacteria *Desulfotsea psychrophila* la región consta de aproximadamente 1000 residuos mientras que en *Bacillus cereus* en términos prácticos está ausente. Es la región más expuesta en la superficie del filamento y la responsable de las propiedades antigénicas de la molécula, por lo que quizá esa sea la razón para la gran variabilidad que presenta [29].

Como se mencionó anteriormente, durante el ensamblaje del filamento, la flagelina requiere de la participación de la proteína ensambladora FliD o HAP2, la cual según se propone, es la encargada de evitar que las subunidades de flagelina se disocien en el espacio extracelular al ser exportadas [26]. También se propone que actúa como una chaperona que le permite a la flagelina polimerizar. Al momento del ensamblaje de la estructura cada subunidad de flagelina que se incorpora obliga al pentámero de FliD a desplazarse hacia el extremo del filamento en una posición equivalente. La asimetría que existe entre el filamento y FliD le indican a la flagelina en que sitio incorporarse, lo anterior ocurre en un mecanismo rotatorio [30].

Regulación flagelar

Para formar un flagelo funcional es necesaria la expresión del **regulón flagelar**, el cual involucra a más de 50 genes en al menos 17 operones. La expresión de los genes involucrados en la biogénesis flagelar se regula como una respuesta a los estímulos ambientales y al mismo desarrollo de la estructura [38]. Los genes flagelares se expresan temporalmente dentro de una jerarquía transcripcional según son necesarios para el proceso de ensamblaje. Los sistemas mejor caracterizados pertenecen a las bacterias entéricas *S. typhimurium* y *E. coli*, sin embargo, el orden de la expresión y ensamblaje son procesos sumamente conservados por lo que se utilizan sus modelos como referencia en el estudio de flagelo en otras especies bacterianas (**Figura 9**).

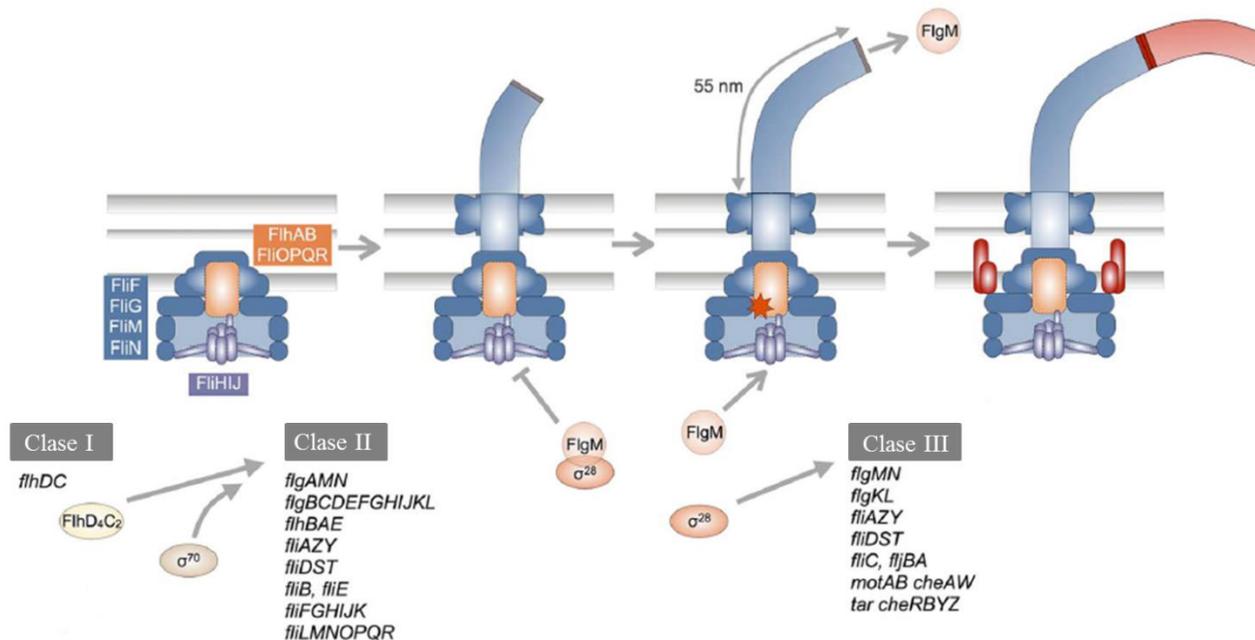


Figura 9. Representación esquemática de la regulación genética acoplada al ensamblaje del flagelo en *S. typhimurium*. En *S. typhimurium* la transcripción de los genes clase II es dependiente de σ^{70} y es activado por el regulador maestro FlhDC. La formación de complejo gancho-cuerpo basal secreta el factor FlgM liberando así la expresión de los genes de clase III (Modificado de Erhardt, 2014) [39].

Los primeros genes en expresarse, son los denominados genes de clase I. Estos codifican para el regulador maestro FlhDC, este activa la transcripción de los genes de clase II una vez presente el factor sigma 70 (σ^{70}). Los genes de clase II codifican para los componentes del cuerpo basal, del gancho, el factor sigma FliA (σ^{28}) y el factor anti-sigma FlgM (anti σ^{28}). Los genes de clase III codifican para la flagelina y otras proteínas necesarias en la biogénesis tardía y que requirieren de σ^{28} para transcribirse, FlgM se une a σ^{28} previniendo la expresión de los genes de clase III. Una vez ensamblado el complejo gancho-cuerpo basal, FlgM es secretado permitiendo así la expresión de los genes de clase III. El flagelo tiene un importante papel en la regulación de su propia

biosíntesis, siendo la formación del complejo gancho-cuerpo basal el punto clave para controlar la expresión de los genes flagelares tardíos [40].

Biogénesis del flagelo

El orden de adición de los componentes flagelares es un proceso lineal y secuencial, procede de las estructuras proximales a las más distales: comienza con los componentes integrales y periféricos de membrana, posteriormente los componentes periplásmicos, los de membrana externa y finalmente los componentes que residen en el exterior de la célula (**Figura 10**).

El evento primario es la formación del anillo MS. Cada subunidad de la proteína FliF se inserta en la membrana interna para formar dicha estructura [14]. Aunque el anillo MS es el primer componente en establecerse para formar la estructura, se ha sugerido que algunas bacterias requieren de las proteínas FlhG y FlhF para poder controlar la localización al anillo MS [86].

Existen componentes del aparato de exportación que son capaces de interactuar con la proteína FliF por lo que se sugiere que la estructura que se ensambla inmediatamente después es el aparato de secreción. Posteriormente se arman los componentes del anillo C. Las proteínas MotA y MotB son capaces de interactuar con FliG por lo que el ensamblaje del motor es posterior a la incorporación del anillo C.

Una vez que se completó el sistema de secreción flagelar comienza la formación del eje. Se propone que la primera de las proteínas en añadirse es FliE. Estudios de interacción sugieren un modelo para el orden de armado del eje flagelar [84]; FlgB interactúa fuertemente con FliE, lo que sugiere que FlgB es la segunda en ensamblarse, FlgC y FlgF le siguen pero el orden en el que lo hacen todavía no está resuelto. Finalmente la proteína FlgG es la más distal ya que se le ha identificado como la más próxima al gancho [14]. Para formar un eje flagelar completo es necesaria la presencia de la proteína FlgJ, la cual actúa de forma bifuncional en primer lugar participando como una proteína ensambladora del eje, con un papel similar al descrito para FlgD en el gancho y FliD en el filamento y en segundo lugar degradando localmente la pared de peptidoglicano permitiendo el paso de la estructura [41].

Para penetrar la membrana externa se requiere de los anillos P (FlgI) y L (FlgH); la formación de ambos anillos es dependiente a la presencia del eje. El complejo que forman los anillos L y P funciona como un forro o rodamiento que no rota pero que es fundamental para mantener la integridad estructural del eje durante la rotación.

Posteriormente, comienza la formación del gancho, cada una de las subunidades de la proteína FlgE es exportada por la vía específica del flagelo. Como ya se mencionó anteriormente el gancho requiere de la proteína FliK para la regulación estricta del control de su longitud. Así mismo, se

requiere de la proteína FlgD ya que le permite incorporar correctamente cada una de las subunidades que forman el gancho.

Una vez que el gancho alcanzó la longitud necesaria ocurre un cambio de especificidad en el aparato de exportación por sustratos de filamento, esto le permite al sistema exportar a FlgK, FlgL (HAP1 y HAP3), FliD (HAP2) y FliC (flagelina). Una vez que ocurre el cambio de especificidad FlgD es sustituida por las recién exportadas FlgK y FlgL (HAP 1 y 3), posteriormente sobre ellas se inserta FliD (HAP2) la cual le permite al filamento polimerizar.

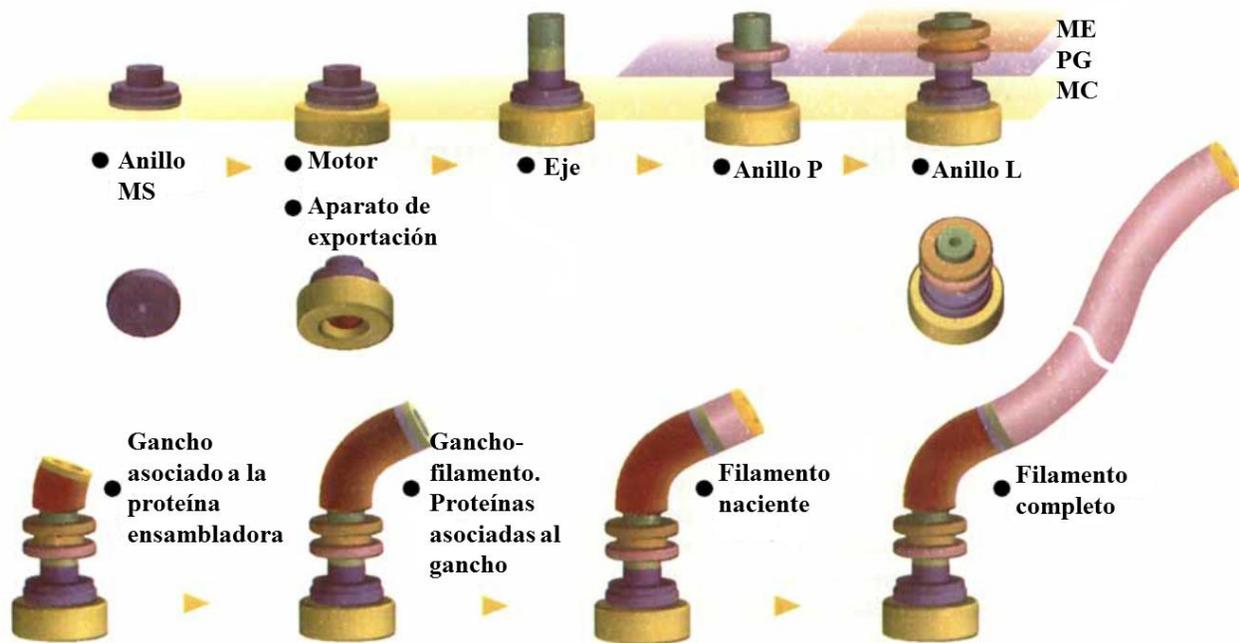


Figura 10. Esquema de la vía morfogénica flagelar. La vía inicia con la formación del anillo MS, el resto de las estructuras se añaden subsecuentemente en el extremo distal de la estructura naciente. El gancho y el filamento necesitan de sus respectivas proteínas chaperonas para polimerizar. (Modificado de Aizawa, 1996) [41]. ME, membrana externa. PG, capa de peptidoglicano. MC, membrana citoplásmica.

Rhodobacter sphaeroides

R. sphaeroides es una bacteria púrpura fotosintética no sulfurosa de vida libre (**Figura 11**) con un extenso repertorio metabólico que pertenece al grupo α -3 de las proteobacterias. Su versatilidad metabólica la ha convertido en un importante modelo experimental en bioenergética. *R. sphaeroides* es capaz de crecer como fotoheterótrofa utilizando una gran variedad de compuestos orgánicos como fuente de carbono y de poder reductor, como fotoautótrofa, en ausencia de oxígeno, utilizando el CO₂ como fuente de carbono y el hidrogeno como poder reductor, como quimioautótrofa en la oscuridad en presencia de oxígeno con CO₂ e hidrógeno como fuentes de carbono y poder reductor, respectivamente. Además, es capaz de tener crecimiento fermentativo, el cual ocurre en ausencia de oxígeno pero en presencia de luz [85].

Los componentes estructurales que hacen de *R. sphaeroides* una bacteria metabólicamente diversa están codificados en un genoma cuyo tamaño aproximado es de 4.5 Mb (Mb, refiere a un millón de pares de bases); dicho genoma está ordenado en dos cromosomas: CI, CII (de 2.9 y 0.9 Mb respectivamente) y 5 replicones más [44].

R. sphaeroides posee un flagelo subpolar (**Figura 11. B.**) que rota en un solo sentido con respecto a las manecillas del reloj. Cuando se reorienta sufre un cambio polimórfico tal que ocasiona un enrollamiento en cuya disposición el filamento continúa rotando, pero dado que lo hace tan lentamente contribuye a la reorientación del cuerpo celular por movimiento browniano [47].

Diferentes estudios sobre el flagelo de *R. sphaeroides* han demostrado que el sistema flagelar 1 (Fla1), el cual se expresa en condiciones de laboratorio, se ensambla de forma similar al del flagelo de *E. coli*. Sin embargo, existen algunas diferencias. Una de las más interesantes es la proteína FlgJ, mientras que en *E. coli* posee dos dominios (el N-terminal funciona como una proteína de andamiaje para el eje y el C-terminal es una hidrolasa capaz de hacer un hueco en la pared de peptidoglicano para facilitar el paso del eje), FlgJ de *R. sphaeroides* únicamente contiene el dominio de andamiaje para las proteínas del eje [48].

Las características de la proteína FlgE (gancho flagelar) ocasionan que éste se disponga en forma recta, este fenómeno se debe a una región rica en prolinas que se encuentra hacia el N-terminal de la secuencia proteica de FlgE, esto es contrario al gancho de *S. enterica* el cual se dispone en forma curvada [49].

R. sphaeroides posee un conjunto adicional de genes flagelares: denominado sistema flagelar 2 (Fla2). Dicho sistema se expresa sólo en ausencia del sistema flagelar 1 (Fla1), y expresa varios flagelos en el polo del cuerpo celular (**Figura 11. C**). El conjunto de genes Fla1 es el resultado de una transferencia horizontal proveniente de una γ -proteobacteria, mientras que el conjunto de genes fla2 es endógeno [50]. La expresión de ambos sistemas flagelares es excluyente [45].

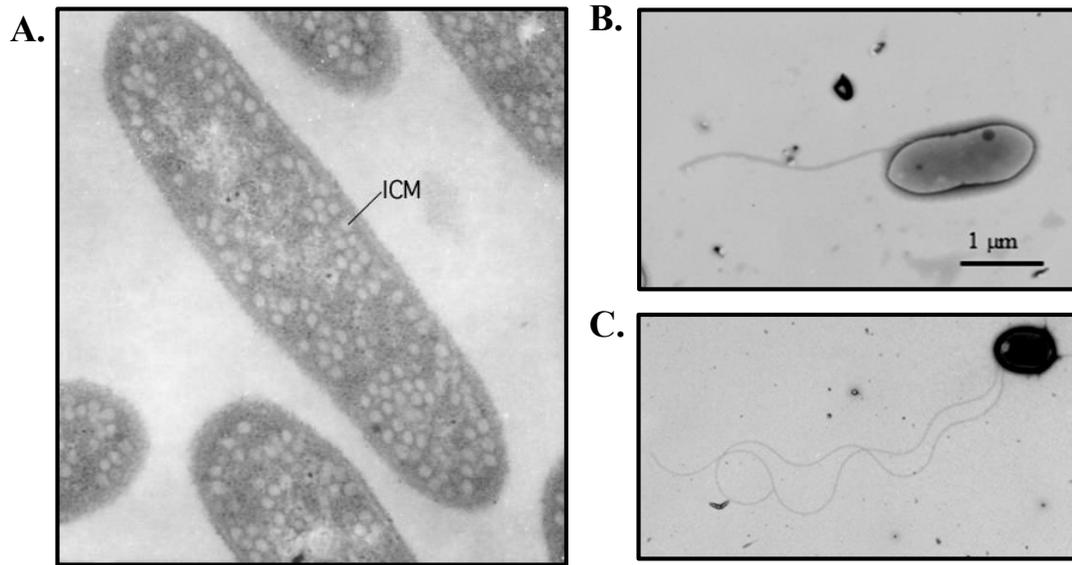


Figura 11. *Rhodobacter sphaeroides*. **A.** Vista microscópica de la bacteria, se señala con las siglas ICM el sistema de membranas intracitoplásmicas, las cuales son los sitios donde reside el aparato fotosintético [45]. **B.** Microscopía electrónica donde se muestra el flagelo 1 de *R. sphaeroides*. **C.** Microscopía electrónica de los flagelos polares resultantes de la expresión del sistema flagelar 2 [5].

Pared de peptidoglicano

El peptidoglicano es un componente esencial y específico presente en la pared celular bacteriana. Se ubica en el exterior de la membrana citoplásmica y está presente en casi todas las bacterias. Tiene diferentes papeles, siendo el más importante preservar la integridad de la célula al soportar la turgencia, además de permitirle conservar su forma y servir como andamio para otros componentes de pared celular como proteínas y ácidos teicóicos. Degradación específica o cualquier clase de inhibición en la biosíntesis resultarán en la lisis de la célula [51]. Las principales características estructurales del peptidoglicano son hebras lineales de polisacáridos unidas de forma entrecruzada por péptidos cortos (**Figura 12**).

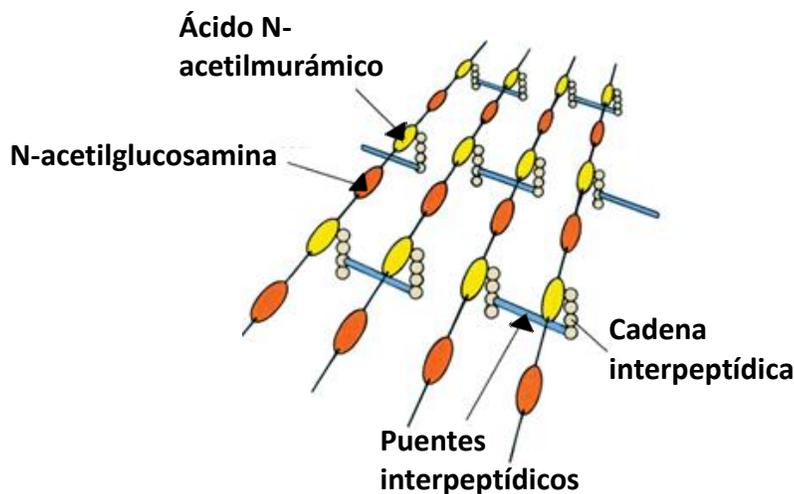


Figura 12. Diagrama esquemático de un modelo de peptidoglicano. Se representan las cadenas de polisacáridos señalando diferencialmente los residuos: N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, las cadenas laterales peptídicas, y los puentes interpeptídicos conectando a los polímeros [52].

Las hebras de polisacáridos están formadas por dos residuos dispuestos alternadamente: N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos por un enlace β -1 \rightarrow 4 (**Figura 13**). El grupo D-lactoil de cada ácido N-acetilmurámico es sustituido por un péptido cuya composición suele ser L-Ala - γ -D-Glu-meso-A₂pm (o L-Lys) -D-Ala -D-Ala (A₂pm 2,6- ácido diaminopimérico).

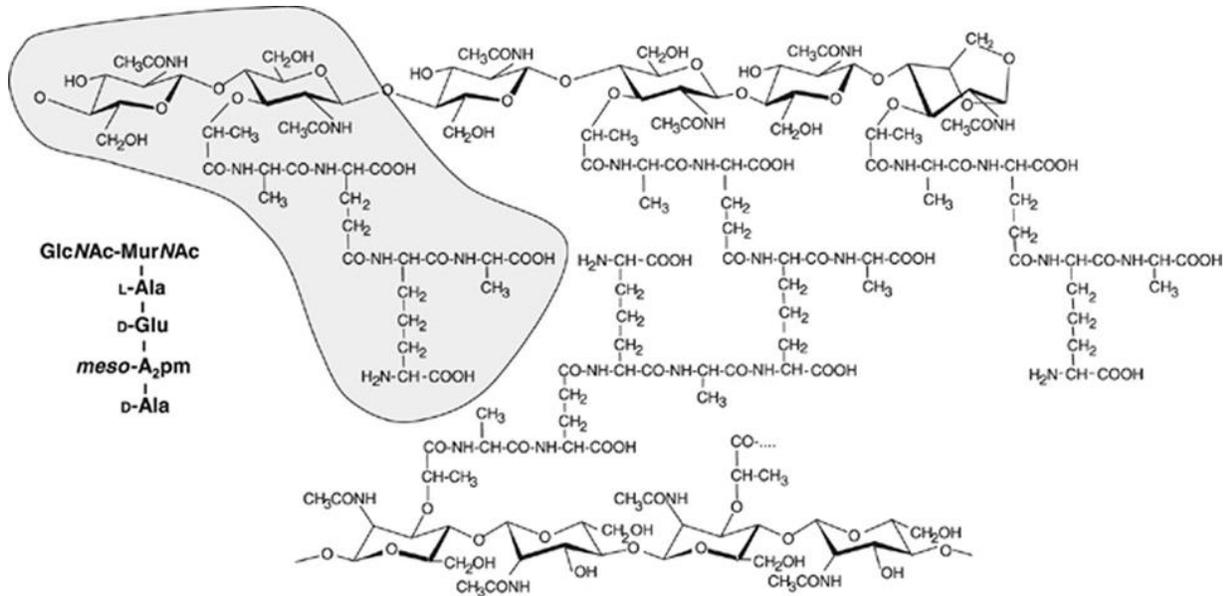


Figura 13. Estructura del peptidoglicano de *E. coli*. La estructura consiste en residuos alternados de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos por un enlace tipo β -1 \rightarrow 4 con una terminación 1,6 anhidromurámico. La parte sombreada corresponde a la unidad estructural del peptidoglicano (monómero), y a un costado se indica en la nomenclatura abreviada [51].

Dichas características estructurales están presentes en todas las especies bacterianas conocidas, sin embargo, pueden existir ciertos niveles de variación en los péptidos, las hebras de polisacáridos o en la composición de los puentes interpeptídicos [51].

La pared celular es una estructura rígida y dinámica, por lo que el crecimiento y la división de la bacteria deben estar acompañados por modificaciones a nivel de la pared celular, los cuales involucran la síntesis del peptidoglicano y su incorporación a la estructura existente, además de la degradación y reciclamiento de la misma.

Las enzimas necesarias para la síntesis de peptidoglicano son: las glicosiltransferasas (GTasas): que polimerizan las cadenas de glúcidos. Las DD-transpeptidasas (DD-TPasas) unen a los péptidos que también se denominan PBPs (por sus siglas en inglés *Penicillin-Binding Proteins*).

La adición de nuevo material a la estructura de peptidoglicano por reacciones de transpeptidación provocaría un aumento en el grosor del mismo sin lograr la elongación requerida, por lo que para que la pared se extienda es necesaria una ruptura de enlaces covalentes que permitan al nuevo material incorporarse en la misma capa sin aumentar el grosor. La degradación del peptidoglicano es de suma importancia durante la división celular [53].

Enzimas líticas

La pared celular representa una barrera física para el ensamblaje de los diferentes sistemas de secreción al impedir el transporte de proteínas que excedan los 50, 000 Daltons (Da), debido a esto se propone la existencia de enzimas especializadas que facilitan selectivamente la apertura de la pared celular [54]. Las enzimas capaces de degradar el peptidoglicano no son exclusivas de sistemas de secreción, pues como se mencionó anteriormente, participan en una gran variedad de procesos fisiológicos fundamentales: recambio de pared celular durante el crecimiento, autólisis, esporulación, formación de biopelículas, patogénesis y el ensamblaje del flagelo [55].

Se han identificado enzimas capaces de romper cada enlace covalente presente en la estructura del peptidoglicano; entre estas enzimas se encuentran (**Figura 14**):

- **Amidasas**, rompen el enlace amida entre el ácido N-acetilmurámico y la L-Ala por medio de una hidrólisis.
- **Endopeptidasas**, hidrolizan los entrecruzamientos peptídicos.
- **Carboxipeptidasas**, rompen los enlaces peptídicos cortando el extremo del carboxilo terminal de los péptidos.
- **Glucosaminidasas**, hidrolizan el enlace glicosídico entre la N-acetilglucosamina y el N-acetilmurámico.
- **Transglicosilasas líticas**, cortan el enlace glicosídico entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina. En esta reacción no participa una molécula de agua.

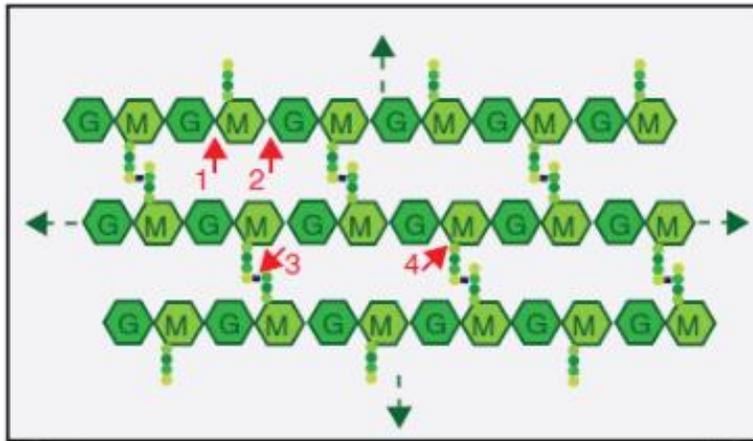


Figura 14. Sitios de acción de las enzimas líticas. Se muestra un diagrama de la estructura química del peptidoglicano. Los puntos coloreados de los diferentes tonos de verde representan a los péptidos unidos a la cadena, **M**: ácido N-acetilmurámico. **G**: N-acetilglucosamina. Las flechas color rojo indican los sitios de corte de las enzimas líticas: **1)** Glucosaminidasas. **2)** Transglicosilasas líticas. **3)** Endopeptidasas y Carboxipeptidasas. **4)** Amidasas [56].

Transglucosilasas líticas

Las transglucosilasas líticas son enzimas capaces de degradar el peptidoglicano por una ruptura en el enlace glicosídico β -1 \rightarrow 4 entre los residuos N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. Rompen el sustrato en una reacción en la que se forma un anillo intramolecular entre el carbono 1 y 6 del ácido N-acetilmurámico, para dar lugar a un residuo 1,6 anhidromurámico (**Figura 15**) [57].

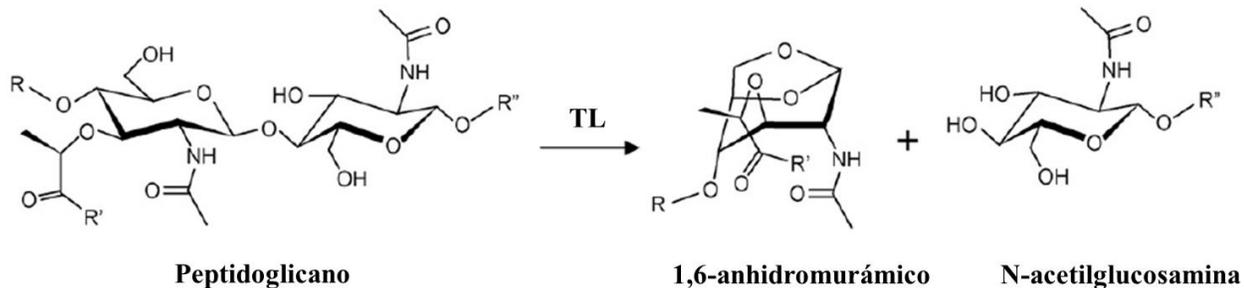


Figura 15. Reacción catalizada por las transglucosilasas líticas. Las transglucosilasas líticas (TL) catalizan la escisión del peptidoglicano entre los residuos N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina formando concomitantemente un residuo terminal 1,6 anhidromurámico [55].

Dado que las transglucosilasas líticas se definen como enzimas capaces de crear espacios en la pared de peptidoglicano, su aptitud para romper dicha estructura hace de ellas elementos indispensables para la realización de diferentes procesos celulares [54].

Las transglucosilasas líticas están presentes en todos los grupos de bacterias (excepto micoplasmas) y existen en gran variedad, por lo que se ha propuesto una clasificación que agrupa a las enzimas en cuatro diferentes familias según su similitud a nivel de estructura primaria y la identificación de motivos catalíticos (**Figura 16**). Dicha clasificación establece la existencia de 4 familias:

- La **familia 1** es una superfamilia que se divide a su vez en 5 subfamilias: 1A o Slt, 1B o YfhD, 1C o MltC, 1D o MltD y 1E o EmtA, las enzimas que pertenecen a esta familia poseen 3 motivos catalíticos en el N-terminal y un cuarto motivo hacia el C-terminal. Los miembros de esta familia comprenden enzimas ampliamente distribuidas entre las bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas e incluso están presentes en algunos bacteriófagos.
- La **familia 2** agrupa enzimas hipotéticas que pertenecen a las bacterias Gram negativas. Las caracteriza la presencia de 6 motivos sumamente conservados.

- La **familia 3** también agrupa enzimas que pertenecen a bacterias Gram negativas resaltando la presencia de 4 motivos conservados.
- Finalmente, la **familia 4** agrupa las transglicosilasas líticas pertenecientes a bacteriófagos, estas enzimas muestran 4 motivos conservados a lo largo de su secuencia. Las enzimas que componen a este grupo parecen no estar relacionadas con el resto de las familias [58].

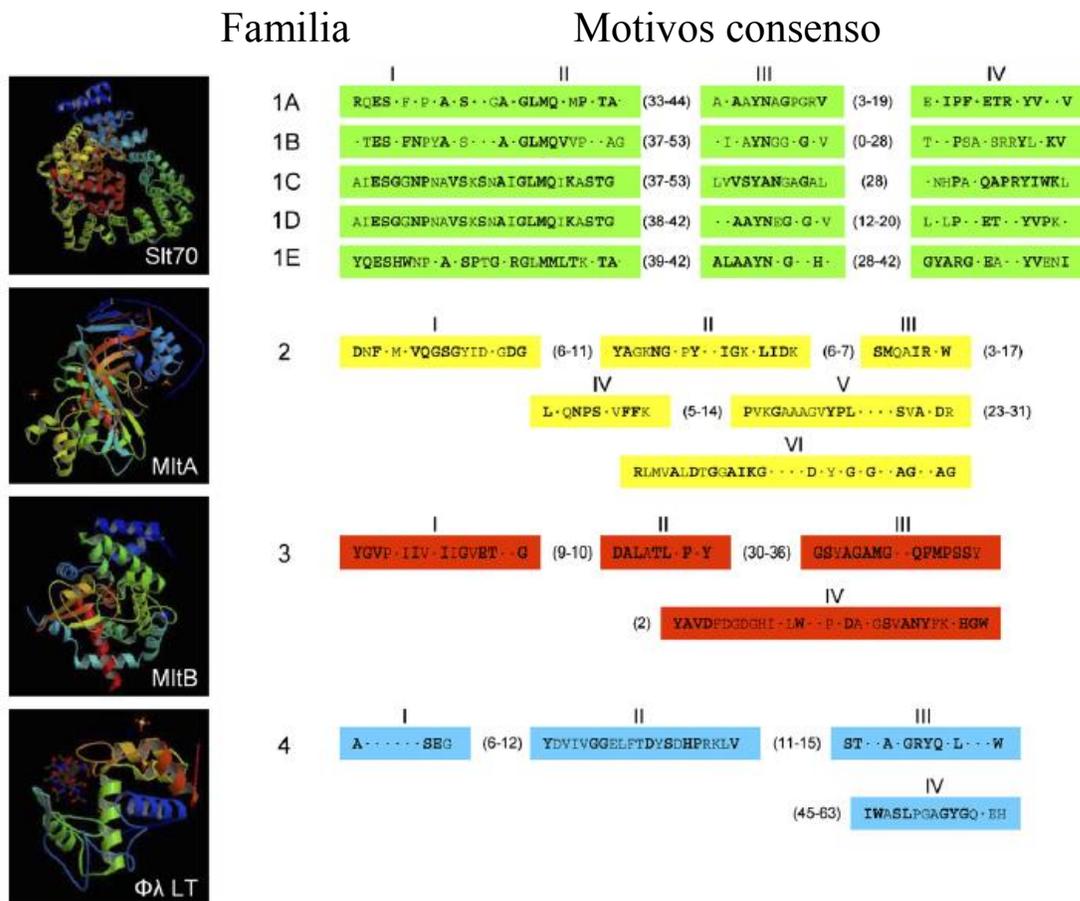


Figura 16. Estructura de las transglicosilasas líticas. Estructuras tridimensionales representativas de las cuatro familias identificadas mediante análisis de secuencia y la identificación de motivos catalíticos. Las estructuras presentadas son: Slt70 de *E. coli*: familia 1A. MltA de *Neisseria gonorrhoeae*: familia 2. MltB de *E. coli*: familia 3. Transglicosilasa lítica de bacteriófago lambda: familia 4. Los motivos catalíticos están señalados con números romanos. Los residuos que aparecen resaltados en negritas son los más conservados, los números agrupados entre paréntesis indican el número de residuos que existen entre cada motivo [58].

FlgJ en *R. sphaeroides*

Dentro el operón flagelar *flgG* de *R. sphaeroides* se encuentran codificados algunos de los genes necesarios para la formación del cuerpo basal: *flgGHJ* y los genes que codifican para las proteínas asociadas al gancho (HAPs): *flgK* y *flgL* [48].

En la bacteria modelo *S. enterica* la proteína FlgJ consta de dos dominios funcionales. El N-terminal funciona como una proteína de andamiaje que participa en la polimerización de las proteínas del eje y el C-terminal actúa como una enzima lítica, específicamente una β -N-acetilglucosaminidasa que rompe por medio de una hidrólisis una región en el peptidoglicano y permite el paso del eje [59,61]. En *R. sphaeroides* la proteína FlgJ es mucho más corta. Alineamientos revelaron que las similitudes entre ambas solo se mantienen hacia N-terminal, el dominio de hidrólisis del peptidoglicano está ausente en FlgJ_{RS} [48]. La presencia de una FlgJ monodominio es una condición presente en un gran número de grupos bacterianos [59].

Posteriormente en el operón *flgG* se identificó por secuencia a una transglicosilasa lítica soluble flanqueada por los genes *flgL* (HAP3) y *fleQ*. Posteriormente, y por las características mencionadas, se denominó a dicha proteína SltF (por sus siglas en inglés Soluble Lytic Transglycosylase Flagellar) [48,63].

En el extremo N-terminal de SltF se encuentra una secuencia consenso para la exportación por la vía general de secreción Sec, el sitio predicho de corte se encuentra entre los residuos 27 y 28 (entre dos alaninas). Esto hace de SltF al igual que FlgA, FlgI y FlgH una más de las proteínas flagelares exportadas por esta vía general de secreción, y no por la vía específica de secreción flagelar tipo III [63].

Análisis previos demostraron que SltF interacciona con la proteína flagelar FlgJ, y considerando que SltF es exportada por una vía distinta a la flagelar, su interacción con FlgJ resulta crucial para la localización específica de la enzima en el sitio de ensamblaje del flagelo [63,64]. Sin embargo, los detalles específicos en SltF que permiten la interacción aún están por resolverse.

SltF es una proteína de 265 aminoácidos pero solamente 170 de ellos pertenecen al dominio consenso de las transglicosilasas líticas. El resto de la secuencia no presenta homología con ninguna proteína conocida por lo que se consideró que dichos aminoácidos no conservados podrían tener un papel importante en su interacción con FlgJ [64]. En la secuencia de SltF la mayoría de los aminoácidos no conservados (95 aminoácidos) se encuentran hacia el C-terminal de la proteína, el resto de los aminoácidos no conservados se encuentran hacia el N-terminal entre el sitio de corte de la secuencia señal y el inicio del dominio catalítico.

En un trabajo previo se caracterizó el papel de los primeros 48 aminoácidos del C-terminal y se determinó que juegan un importante papel modulando la interacción de SltF con FlgJ, pero no necesariamente en la interacción [64]. Entre las perspectivas del trabajo previo se propuso realizar

la deleción de las regiones de aminoácidos no conservados en SltF (C- y N- terminal) con la finalidad de confirmar que el sitio de interacción SltF-FlgJ se encuentra en alguna de ellas.

Planteamiento del problema

La biogénesis flagelar es un proceso jerárquico que requiere la expresión regulada de hasta 50 genes [40]. Durante el ensamblaje del cuerpo basal la estructura nascente necesita de atravesar la pared de peptidoglicano, y dado que el peptidoglicano es una estructura rígida que representa una barrera física, su ruptura es fundamental para la formación del eje del flagelo [59]. Para poder ensamblar un eje funcional es necesario contar con las cinco proteínas estructurales que lo componen (FliE, FlgB, FlgC, FlgF y FlgG) y con la presencia de la proteína de andamiaje FlgJ, pues en su ausencia son incapaces de ensamblarse al ser incapaces de polimerizar [12].

La proteína FlgJ en la bacteria modelo *S. enterica* está compuesta por 316 aminoácidos. Hacia el C-terminal posee un dominio enzimático de β -N-acetilglucosaminidasa el cual le permite hidrolizar la pared de peptidoglicano [60,61] mientras que hacia el N-terminal posee un dominio ensamblador para las proteínas del eje [62]. Este modelo aplica únicamente para bacterias que pertenecen a las clases γ y β - proteobacterias [59].

R. sphaeroides es una bacteria púrpura fotosintética que pertenece al grupo de las α -proteobacterias. En su genoma se identificó la presencia del homólogo de FlgJ de *S. enterica*, sin embargo, su secuencia corresponde únicamente al dominio ensamblador (N-terminal) [48]. Más tarde, se identificó dentro del contexto flagelar (6kb río abajo de la secuencia de *flgJ*) un gen que codifica para una transglicosilasa lítica, la cual es una enzima capaz de degradar el peptidoglicano durante el proceso de ensamblaje del flagelo y se denominó a dicha proteína SltF (*Soluble Lytic Transglycosylase Flagellar*) [63].

SltF es exportada por la vía general Sec y se sugiere que por su capacidad para interactuar *in vitro* con la proteína FlgJ, es el componente flagelar con el que interactúa y el cual le permite encontrar su sitio de acción [64].

Análisis bioinformáticos identifican una región hacia el C-terminal que no forma parte del dominio catalítico (aproximadamente 95 aminoácidos), pero que es fundamental para su función durante la biogénesis del flagelo. Al deletar los últimos 48 aminoácidos del C-terminal de SltF se observó que su ausencia tiene un efecto negativo en la motilidad de *R. sphaeroides*, también se observó en ensayos *in vitro* que se aumentaba su afinidad por FlgJ, por lo que se concluyó que el C-terminal tiene un efecto negativo sobre la interacción, posiblemente haciéndola únicamente transitoria [64].

Es necesario continuar explorando los aminoácidos no conservados dentro de la secuencia de SltF con la finalidad de caracterizar a la región determinante para su interacción con FlgJ. Adicionalmente es necesario determinar con análisis bioinformáticos la existencia de características que determinen la especificidad de transglicosilasas líticas en contextos flagelares.

Hipótesis

En *R. sphaeroides* SltF es la enzima responsable de degradar la pared de peptidoglicano en el sitio de formación del flagelo al interactuar con FlgJ. SltF contiene una región determinante para la interacción.

Objetivos

General

- Describir el papel de distintas regiones de la secuencia de SltF en la interacción con FlgJ.

Particulares

- Construir versiones mutantes de la proteína SltF y analizar su capacidad para complementar el nado en una cepa con un fondo genético $\Delta sltF$.
- Establecer que cada una de las mutantes de SltF utilizadas mantengan su capacidad enzimática.
- Determinar la capacidad *in vitro* de las mutantes construidas de SltF para interactuar con la proteína FlgJ.
- Analizar secuencias de transglicosilasas líticas en contextos flagelares de especies que presentan una FlgJ monodominio con la finalidad de clasificarlas.

Materiales y métodos

Medios de cultivo, condiciones de crecimiento y cepas bacterianas.

Las cepas de *E. coli* y *R. sphaeroides* utilizadas en este trabajo se describen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Cepas bacterianas.

Cepas	Características relevantes	Referencia
<i>E. coli</i>		
JM103	<i>hsdR4</i> Δ(lac-pro) F' <i>traD36 proAB lacI^q lacZ</i> ΔM15	[65]
BL21(DE3)pLysS	F' <i>ompT hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm</i> (DE3)/pLysS Cm ^r	Novagen
M15 [pREP4]	<i>thi lac ara+</i> <i>gal mlt</i> F' <i>recA⁺ uvr⁺ lon⁺</i> . Plásmido pREP4. Kan ^r	Qiagen
Top 10	F' <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacx74</i>	Invitrogen
S17-1	<i>recA endA thi hsdR</i> RP4-2-Tc::Mu::Tn7; Tp ^r Sm ^r Kan::Tn7	[66]
<i>R. sphaeroides</i>		
WS8-N	Cepa silvestre. Resistente espontanea Nal ^r	[67]
Δ <i>sltF</i>	WS8-N, Δ <i>orf_0072NH₂(1-336)::aadA, Fla⁻, Spc^r Nal^r</i>	[68]
<i>sltF</i> Δ4	Derivada de WS8-NΔ <i>sltF</i> /pRK415 <i>sltF</i> Δ(723-795)Spc ^r Nal ^r	[46]
<i>sltF</i> Δ5	Derivada de WS8-NΔ <i>sltF</i> /pRK415 <i>sltF</i> Δ(651-723)Spc ^r Nal ^r	[46]
<i>sltF</i> Δ6	Derivada de WS8-NΔ <i>sltF</i> /pRK415 <i>sltF</i> Δ(651-795)Spc ^r Nal ^r	[46]
<i>sltF</i> Δ23*	Derivada de WS8-NΔ <i>sltF</i> /pRK415 <i>sltF</i> Δ(510-589)Spc ^r Nal ^r	Este trabajo
<i>sltF</i> Δ24*	Derivada de WS8-NΔ <i>sltF</i> /pRK415 <i>sltF</i> Δ(589-658)Spc ^r Nal ^r	Este trabajo
<i>sltF</i> Δ47*	Derivada de WS8-NΔ <i>sltF</i> /pRK415 <i>sltF</i> Δ(510-651)Spc ^r Nal ^r	Este trabajo
<i>sltF</i> Δ95*	Derivada de WS8-NΔ <i>sltF</i> /pRK415 <i>sltF</i> Δ(510-795)Spc ^r Nal ^r	Este trabajo
<i>sltF</i> Δ17*	Derivada de WS8-NΔ <i>sltF</i> /pRK415 <i>sltF</i> Δ(27-78)Spc ^r Nal ^r	Este trabajo

Kan (kanamicina), Nal (ácido nalidixico), Spc (espectinomicina), Tc (tetraciclina), Str (estreptomycin), Cm (cloranfenicol).

* La notación correcta es Δ*sltF*(número), sin embargo, se utilizó como se indica para continuar con la nomenclatura reportada para las mutantes de *sltF*.

Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio LB (**Tabla 2**) [6], a 37°C con una agitación de 250 revoluciones por minuto (rpm).

Tabla 2. Medio LB (Luria-Bertani)

Triptona	1%
Extracto de levadura	0.5%
NaCl	0.5%
Agar ¹	2%

¹Únicamente para cultivos sólidos

En los casos requeridos se añadieron los siguientes antibióticos al medio de cultivo de *E. coli* a las concentraciones indicadas:

Ampicilina 200 µg/ml

Kanamicina 25 µg/ml

Cloranfenicol 25 µg/ml

Espectinomicina 50 µg/ml

Tetraciclina 25 µg/ml

Las cepas de *R. sphaeroides* se crecieron en medio Sistrom (**Tabla 3**) [69], en dos condiciones diferentes: quimioheterotróficamente en obscuridad a 30°C con una agitación a 250 rpm, o fotoheterotróficamente, iluminadas continuamente con la luz artificial de 6 focos (40 watts cada uno).

Tabla 3. Medio Sistrom

KH ₂ PO ₄	20 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.78 mM
Ácido succínico	34 mM
Ácido L-glutámico	0.67 mM
Ácido L-aspártico	0.25 mM
NaCl	8.5 mM
Ácido nitrilotriacético	1.04 mM
MgSO ₄	1.2 mM
CaCl ₂	0.23 mM

FeSO ₄	0.007 mM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.16 μM
Elementos traza	0.1 ml
Agar ¹	2%

¹ Únicamente para cultivos solidos

Se ajustó el pH del medio a 7 con KOH 3M y se esterilizó utilizando una autoclave a 121°C durante 20 minutos y posteriormente se agregó 1 ml de solución de vitaminas (**Tabla 4**) por cada litro de medio Sistrom. La solución de vitaminas se esterilizó por filtración.

Tabla 4. Solución de vitaminas

Ácido nicotínico	1%
Tiamina	0.5%
Biotina	0.01%

En los casos requeridos se añadieron los siguientes antibióticos al medio de cultivo de *R. sphaeroides* a las concentraciones indicadas:

Espectinomicina 50 μg/ml

Tetraciclina 1 μg/ml

Plásmidos y oligonucleótidos.

Los plásmidos y oligonucleótidos utilizados se enlistan en la **tabla 5**.

Tabla 5. Plásmidos y oligonucleótidos utilizados

	Características relevantes	Referencia
Plásmidos		
pQE60	Vector de expresión. Amp ^r . Epítotope 6xHis C- terminal	Qiagen
pQE30	Vector de expresión. Amp ^r . Epítotope 6xHis N- terminal	Qiagen
pRK415	Plásmido de expresión para <i>R. sphaeroides</i> . Promotor lac; <i>lacZ mob⁺</i> ; Tc ^r	[70]
pRK415/SltF	Contiene <i>sltF</i> . Nal ^r	[63]
pRK415/SltFΔ4	Δ <i>sltF</i> (723-795) Tc ^r	[64]
pRK415/SltFΔ5	Δ <i>sltF</i> (652-723)Tc ^r	[64]
pRK415/SltFΔ6	Δ <i>sltF</i> (651-795)Tc ^r	[64]
pRK415/SltFΔ24	Δ <i>sltF</i> (510-589)Tc ^r	Este trabajo
pRK415/SltFΔ23	Δ <i>sltF</i> (589-658)Tc ^r	Este trabajo
pRK415/SltFΔ47	Δ <i>sltF</i> (510-651)Tc ^r	Este trabajo
pRK415/SltFΔ95	Δ <i>sltF</i> (510-795).Tc ^r	Este trabajo
pRK415/SltFΔ17	Δ <i>sltF</i> (27-78).Tc ^r	Este trabajo
pQE30/SltF Sec-	Contiene <i>sltF</i> . Sin secuencia señal. Amp ^r	[64]
pQE30/SltFΔ95Sec-	Δ <i>sltF</i> (510-795). Sin secuencia señal. Amp ^r	Este trabajo
pQE30/SltFΔ47Sec-	Δ <i>sltF</i> (510-651). Sin secuencia señal. Amp ^r	Este trabajo
pRSJ	Derivado de pQE60. Contiene flgJ. Amp ^r	[63]
pTZ19R/SltF	Derivado de pUC. Contiene lacZ ⁺ . Amp ^r Contiene SltF (sec+) – 95 pb y + 550 pb.	[63]
pTZ19R/SltFΔ47	Derivado de pUC. Contiene lacZ ⁺ . Amp ^r Δ <i>sltF</i> (510-651)	Este trabajo
pTZ19R/SltFΔ23	Derivado de pUC. Contiene lacZ ⁺ . Amp ^r Δ <i>sltF</i> (589-658)	Este trabajo
pTZ19R/SltFΔ24	Derivado de pUC. Contiene lacZ ⁺ . Amp ^r Δ <i>sltF</i> (510-589)	Este trabajo
pTZ19R/SltFΔ17	Derivado de pUC. Contiene lacZ ⁺ . Amp ^r Δ <i>sltF</i> (27-78)	Este trabajo
Oligonucleótidos		
Mur/sec/NH2	5'CATGGAGCTCGCGGACGAGGGCTGCGAGACG3'	[64]
Mur/sec/COH2	5'CCCGAAGCTTTCACGGTTGCATTGCGAGCAG 3'	[64]
MurNH2pQE60	5'CATGCCATGGCGGACGAGGGCTGCGAGACG 3'	[64]
Fwdelta24	5'TCGCCAAGGTCGAGGCCGAGCAGGGTATCCTC GTGCTGGC 3'	Este trabajo
Rvdelta24	5'GCAAGCACGAGGATAACCCTGCTCGGCCTCGAC CTTGGCGA 3'	Este trabajo
Fwdelta23	5'CCCTCGCCGCCGCGCGCGTGGCGGCCTCCGAC ATTCCCTC 3'	Este trabajo
Rvdelta23	5'GAGGGAATGTCGGAGGCCGCCACGCGCGCGGC GGCGAGGG 3'	Este trabajo
Fwdelta47	5'TCGCCAAGGTCGAGGCCGAGGCGGCCTCCGAC ATTCCCTC 3'	Este trabajo
Rvdelta47	5'GAGGGAATGTCGGAGGCCCGCCTCGGCCTCGAC CTTGGCGA 3'	Este trabajo

Fwdelta95(1558)	5'CTTTCGATGCCGCGTGAGC 3'	Este trabajo
Rvdelta95	5'CCCGAAGCTTTCACCTCGGCCTCGACCTTGGCC3'	Este trabajo
Rvdelta95His	5' CCTGAGATCTCTCGGCCTCGACCTTGGC 3'	Este trabajo

Amp (ampicilina), Tc (tetraciclina).

Construcciones de SltF.

El gen correspondiente a *sltF* con secuencia señal está clonado en el vector base pTZ19R/18R, el cual se generó mediante la clonación de un fragmento de 1440 pares de bases que incluye el gen codificante para *sltF* y 95 y 550 pares de bases río arriba y río abajo respectivamente [63]. A partir de este vector base se amplificó a las construcciones mutantes de *sltF* utilizadas en este trabajo. Las construcciones intermedias SltF Δ 23, SltF Δ 24, SltF Δ 47 y SltF Δ 17 se amplificaron utilizando oligonucleótidos que omiten dichas regiones pero que permiten amplificar al resto de la secuencia de *sltF* y el resto del vector. La construcción SltF Δ 95 se amplificó con un oligonucleótido cuyo apareamiento omite 285 pares de bases hacia el extremo C-terminal, incluye además del sitio de restricción una señal de paro o de 'stop'. El diseño de los oligonucleótidos para amplificar de los vectores base a las construcciones mutantes incluye sitios de restricción que permitieron clonarlas en el vector para complementar: pRK415 y en el vector de sobreexpresión: pQE30.

PCR y clonación.

Las reacciones de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) se realizaron en un termociclador PTC-200 MJ research, se utilizó la enzima Taq polimerasa. Para clonar se utilizó a la ligasa T4-DNA (*New England Biolabs*), las reacciones con la enzima ligasa para insertar construcciones de DNA en los vectores se incubaron a 16°C durante 18 horas.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa [65].

Para separar los fragmentos de DNA se corrieron geles de agarosa al 1% preparados con amortiguador TE (Tris-base 40mM, ácido acético 32mM, acetato de sodio 2mM, EDTA 1mM), se corrieron los geles a 80V durante aproximadamente 1 hora, se incubaron durante 20 minutos en bromuro de etidio, el cual es capaz de intercalarse entre las bases del DNA, finalmente se observó el resultado al exponer el gel a la luz ultravioleta.

Digestiones con endonucleasas.

Para la digestión enzimática del DNA se utilizaron enzimas del tipo endonucleasa. El vector pRK415 se digirió con las enzimas HindIII y SacI (*Promega, New England Biolabs*), el vector pQE30 fue digerido con HindIII y SacI (*Promega, New England Biolabs*), el vector pQE60 fue digerido con NcoI y HindIII (*New England Biolabs, Promega*).

Secuenciación de DNA.

El DNA fue secuenciado en la Unidad de biología molecular del Instituto de Fisiología Celular, se utilizó un secuenciador automático ABI PRISM 310 de Perkin-Elmer Applied Biosystems.

Transformación de *E. coli* [65].

Se creció un cultivo de una cepa de interés de *E. coli* hasta una densidad óptica de $(DO_{550nm})=0.5$, se dejó enfriar en hielo durante 5 minutos, se cosecharon las células a 3,500 xg por 6 minutos a 4°C, se resuspendió el paquete celular en medio volumen del cultivo original con una solución estéril de CaCl₂ 100 mM, se incubaron las células en hielo durante 20 minutos, se cosecharon nuevamente a 3,500 xg por 6 minutos a 4°C y se resuspendieron en 1/15 del volumen de cultivo original con la solución estéril de CaCl₂ 100 mM. Se incubó a las células competentes en hielo a 4°C durante 12 horas. Transcurridas las 12 horas, se agregó el ADN para transformarlas en 200 µl de células, se incubaron con el ADN de interés durante 1 hora en hielo e inmediatamente después se incubaron a 42°C durante 2 minutos, se les colocó en hielo durante 5 minutos, y se agregó 0.8 ml de LB, se incubaron a 37°C durante 1 hora. Se sembró a las células transformadas en cajas de LB con el antibiótico de selección y se incubaron las cajas a 37°C durante toda la noche.

Complementación.

La mutante $\Delta sltF$ en *R. sphaeroides* (cepa WS8) se complementó con las versiones mutantes de *sltF* en el vector pRK415 (Tabla 2), cada construcción se introdujo a la mutante por el método de conjugación, se utilizó a la cepa de *E. coli* S17-1.

Conjugación [71].

Se prepararon cultivos de *E. coli* y *R. sphaeroides* de 2 y 10 ml respectivamente y crecieron durante toda la noche. Al día siguiente se inoculó 50 µl del cultivo de *E. coli* en 5 ml de LB y se creció hasta una $(DO_{550nm})=0.5$, los cultivos de ambas cepas se colocaron en hielo 5 minutos, se centrifugaron a 3,000 xg por 5 minutos y se resuspendió el paquete celular en 0.5 ml de LB, nuevamente se centrifugaron a 3,000 xg por 5 minutos y se resuspendieron ambos paquetes celulares en 0.5 ml de medio LB se añadió el cultivo de *E. coli* sobre el de *R. sphaeroides* y se centrifugaron bajo las mismas condiciones, se resuspendió el paquete celular en 50 µl de LB y la mezcla se colocó sobre un recuadro de nitrocelulosa estéril en una caja Petri con medio LB, se incubó aproximadamente 12 horas a 30°C, se recuperó el papel de nitrocelulosa, se colocó en un tubo de 1.5 ml y se añadió 1 ml de medio LB, se mezcló vigorosamente a las células para lograr desprenderlas y se sembraron en medios selectivos.

Ensayos de motilidad.

Se prepararon cajas de Petri con medio Sistro [69] sin ácido succínico, se adicionó agar a una concentración de 0.25% y se añadió como atrayente 100 µM de propionato de sodio. Se inoculó 2 µl de un cultivo crecido durante la noche en condición fotoheterótrofa. Se incubaron las cajas a 30°C durante 24 horas. Se registraron los resultados fotografiando a las cajas con una cámara Panasonic configurada a blanco y negro.

Sobreexpresión y purificación de SltF silvestre.

El gen correspondiente a SltF silvestre (sin secuencia señal) fue clonado en el vector de sobreexpresión pQE30 N-terminal 6xHis. La sobreexpresión se realizó en la cepa de *E. coli* M15 [pREP4]. Se preparó un cultivo de LB de 12 ml que se creció durante la noche y se utilizó para inocular 500 ml de LB, se dejaron crecer a 37°C hasta una densidad óptica $(DO_{600nm})=0.6$, una vez alcanzada la densidad óptica se agregó 1mM IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido, el cual es un análogo no hidrolizable de la molécula de lactosa, y se utiliza para inducir la expresión génica) al cultivo y se dejó crecer a 25°C durante 5 horas. Las células se recuperaron centrifugando a 3,500 xg durante 15 minutos y se guardó el botón de células a -20°C hasta su uso.

El botón de células se resuspendió en 10 ml de amortiguador (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6) con una pastilla inhibidora de proteasas (*Roche*). Las células se sonicaron en un baño de hielo (Sonicador marca *Branson* modelo 250) con una potencia de 3 durante 1 minuto, el proceso se repitió 5 veces y se permitió enfriar en hielo entre cada intervalo del proceso de sonicado. La muestra se centrifugó a 20,000 xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se ultracentrifugó a 25,000 xg durante 1 hora. Se recuperó el sobrenadante y se incubó a 4°C durante 2 horas con una

resina de agarosa acoplada a níquel (Ni^{2+}). El sobrenadante se pasó por una columna que contiene una resina con afinidad a níquel y se lavó con amortiguador (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6) y concentraciones crecientes de imidazol (10, 15, 20, 25, 30 y 100 mM). La proteína eluye en 100 mM de imidazol, por lo que dicha elución se dializó en amortiguador (Na_2HPO_4 50 mM, pH 7.6) durante la noche, y posteriormente se concentró utilizando el sistema Amicon (*Millipore*), que posee una membrana que impide el paso a moléculas con un peso superior a los 10,000 Da, finalmente se determinó la concentración de proteína obtenida.

Sobreexpresión y purificación de SltF Δ 47 y SltF Δ 95.

Los genes correspondientes a SltF Δ 47 y SltF Δ 95 (ambas sin secuencia señal) se clonaron en el vector de sobreexpresión pQE30 N-terminal 6xHis. La sobreexpresión de cada una de ellas se realizó en la cepa de *E.coli* M15 [pREP4]. Para cada una de las cepas transformadas se prepararon cultivos de LB de 12 ml que crecieron durante la noche y se utilizaron para inocular 500 ml de LB, se dejaron crecer a 37°C hasta una densidad óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$)=0.6, una vez alcanzada la densidad óptica se agregó 1mM de IPTG al cultivo y se dejó crecer a 37°C durante 4 horas. Las células se recuperaron centrifugando a 3,500 xg durante 15 minutos y se guardó el botón de células a -20°C hasta su uso.

El botón de células se resuspendió en 10 ml de amortiguador (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6), Se sonicó en un baño de hielo a las células (Sonicador marca *Branson* modelo 250) con una potencia de 3 durante 1 minuto, el proceso se repitió 5 veces y se permitió enfriar en hielo entre cada intervalo del proceso de sonicado, se centrifugó la muestra a 14,000 xg durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el botón con los cuerpos de inclusión.

Purificación de las proteínas a partir de cuerpos de inclusión [77].

Se resuspendió a los cuerpos de inclusión para lavarlos en 10 ml de amortiguador PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.6 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1.8 mM, pH 7.3) y Tritón al 0.5%, se centrifugó la muestra a 14,000 xg durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el botón. Se lavó la muestra dos veces con 25 y 30 ml de agua fría y filtrada, se centrifugó ambas veces a 14,000 xg durante 10 minutos a 4°C. Nuevamente se resuspendió la muestra en 20 ml de amortiguador PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.6 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1.8 mM, pH 7,3) y tritón al 0.5%, se centrifugó la muestra a 14,000 xg durante 10 minutos a 4°C. Se lavó la muestra tres veces más con 25, 20 y 20 ml de agua fría y filtrada, se centrifugó las tres veces a 14,000 xg durante 10 minutos a 4°C descartando el sobrenadante.

El botón se resuspendió en amortiguador (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 150 mM y GuHCl 6 M pH 7.6) y se incubó a 4°C durante 1 hora, se centrifugó a 3,500 xg durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante para ultracentrifugar a 25,000 xg durante 1 hora, se recuperó el sobrenadante, y se incubó a 4°C durante la noche con una resina de agarosa acoplada a níquel (Ni^{2+}), se pasó el

incubado por una columna que contiene una resina con afinidad a níquel y se lavó con amortiguador (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 150 mM, GuHCl 6M pH 7.6) y concentraciones crecientes de imidazol (15 y 250 mM) ambas proteínas eluyen en 250 mM de imidazol, por lo que dicha elución se renaturalizó en amortiguador de diálisis (Na_2HPO_4 50 mM, pH 6.5 para SlfF Δ 95) y (Na_2HPO_4 50 mM, pH 7 para SlfF Δ 47) durante la noche, y posteriormente se concentró utilizando el sistema Amicon (*Millipore*), que posee una membrana que impide el paso a moléculas con un peso superior a los 10,000 Da, finalmente se determinó la concentración de proteína obtenida para cada una de ellas.

Sobreexpresión y purificación de FlgJ.

El gen correspondiente a FlgJ se clonó en el vector de sobreexpresión pQE60 C-terminal 6xHis. La sobreexpresión se realizó en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Se preparó un cultivo de LB de 12 ml que creció durante la noche y se utilizó para inocular 500 ml de LB, se dejaron crecer a 37°C hasta una densidad óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$)=0.6, y a una vez alcanzada dicha densidad se dejó crecer durante 8 horas a 37°C, las células se recuperaron centrifugando a 3,500 xg durante 15 minutos y se guardó el botón de células a -20°C hasta su uso.

FlgJ se purificó de cuerpos de inclusión, se resuspendieron las células en 10 ml de amortiguador (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6) se sonicó a las células (Sonicador marca *Branson* modelo 250) con una potencia de 3 durante 1 minuto, se repitió 5 veces el proceso enfriando a las células en hielo entre cada intervalo. Se centrifugó la muestra a 14,000 xg durante 10 minutos a 4°C, se resuspendió el botón de células en el amortiguador utilizado más 1 M de GuHCl y se incubó a 4°C durante 1 hora. Se centrifugó a 3,500 xg durante 10 minutos a 4°C, el botón se resuspendió en el amortiguador utilizado más 6 M de GuHCl y se incubó a 4°C durante 1 hora. La muestra se centrifugó a 3,500 xg durante 10 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, el cual se ultracentrifugó a 25,000 xg durante 1 hora. El sobrenadante se incubó a 4°C durante 3 horas con una resina de agarosa acoplada a níquel (Ni^{2+}), se pasó el sobrenadante por una columna que contiene una resina con afinidad a níquel y se lavó con amortiguador (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 150 mM, GuHCl 6M pH 7.6) y concentraciones crecientes de imidazol (15 y 250 mM) FlgJ eluye en la fracción de 250 mM de imidazol, por lo que dicha elución se renaturalizó en amortiguador de diálisis (Na_2HPO_4 50 mM, pH 6.5) durante la noche. Posteriormente, la fracción se concentró utilizando el sistema Amicon (*Millipore*), que posee una membrana que impide el paso a moléculas con un peso superior a los 5,000 Da. Finalmente se determinó la concentración de proteína obtenida.

Precipitación de proteínas [77].

Se precipitó a las proteínas utilizando el método de metanol-cloroformo, el cual se basa en una partición mediante la conformación de un sistema terciario de agua, metanol y cloroformo, en el que las proteínas permanecerán precipitadas en la interfase. En un tubo de 1.5 ml se añadió 100 o 50 μ l de muestra, 300 μ l de H₂O, 400 μ l de metanol y 100 μ l de cloroformo, se agitó vigorosamente con ayuda de un vórtex y se centrifugó la muestra a 16,000 xg durante 7 minutos, se descartó la fase superior resultante cuidando no perturbar la interfase, y se añadió a la muestra 300 μ l de metanol, se agitó con ayuda de un vórtex y se centrifugó a 16,000 xg durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se evaporó los residuos remanentes de metanol a 80°C durante 5 minutos, finalmente se añadió amortiguador de carga para poder cargar las muestras en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (Tris-base 62.5mM, glicerol al 10%, SDS al 2%, azul de bromofenol al 0.01%, pH 6.8) y se hirvió el tubo con la muestra durante 7 minutos.

Cuantificación de proteína [73].

Para cuantificar la fracción de proteína purificada se utilizó el método de TCA-Lowry [10]. Se disolvió la proteína aforando a 1 ml con H₂O, se añadió 100 μ l de deoxicolato de sodio al 0.15% y se incubó 10 minutos, se añadieron 100 μ l de ácido tricloroacético (TCA) 72%, se centrifugó a 8,500 xg por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de Solución C, preparada en una proporción 1:50 de solución A y solución B (Solución A: CuSO₄ 0.04 mM y Na₃C₆H₅O₇ 0.7 mM. Solución B: Na₂CO₃ 190 mM y NaOH 100 mM), se incubó por 10 minutos y se añadieron 100 μ l de solución de Folin (SIGMA) al 50%, se incubó por 20 minutos y se determinó la absorbancia a 750 nm. Para la curva estándar se utilizó albúmina sérica bovina (SIGMA).

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE [74].

La separación de proteínas por peso molecular se realizó en geles de 12, 15 y 17.5% de acrilamida, se utilizaron como estándares marcadores de peso molecular preteñidos (Color Plus) y no preteñidos (*New England*), los geles se tiñeron con Coomassie R250 al 0.2%, metanol al 50% y ácido acético al 10%.

Inmunoréplica tipo *Western* [75].

Un vez realizada la electroforesis de proteínas, se transfirió el gel a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ M, se utilizó amortiguador de transferencia (NaHCO₃ 10 mM, Na₂CO₃ 3 mM y metanol al 20%) y se realizó en una cámara de transferencia húmeda a 350 mA durante 1

hora. Posteriormente la membrana se incubó en una solución al 5% de leche libre de grasa (marca *Svelty light*) en amortiguador TTBS (Tris-base 2.4 mM, NaCl 0.5 M, Tween-20 al 0.05% pH 7.6) durante 1 hora y se realizaron tres lavados con 50 mL de amortiguador TTBS de 15, 10 y 5 minutos cada uno. Se incubó con el anticuerpo de interés a la dilución requerida para un volumen de 15 ml de amortiguador TTBS durante 1 hora, se repitieron los tres lavados y en el caso necesario se incubó en las mismas condiciones el anticuerpo secundario, el cual está acoplado a la enzima peroxidasa (*Amersham*), se hicieron nuevamente los lavados y se reveló mediante una reacción quimioluminiscente. Los resultados de la quimioluminiscencia fueron revelados en placas radiográficas marca Kodak.

Ensayos de coimmunoprecipitación [64].

Se prepararon viales (tubos *Eppendorf*) de 1.5 ml con 20 μ l de resina acoplada a proteína A (SIGMA) y 4 μ g de γ -inmunoglobulinas anti-SltF en 1 ml de amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 50 mM pH 7.6), se incubaron a 4°C durante la noche. Se centrifugaron los tubos a 12, 000 xg por 10 minutos a 4°C y se descartó sobrenadante. Se incubó 0.14 μ M de cada una de las proteínas en 1 ml de amortiguador de fosfatos durante 1 hora a 4°C, transcurrida se centrifugó a 24,000 xg rpm durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se agregó al botón de la resina y se incubó a 4°C durante 1 hora. Se centrifugó la mezcla a 12, 000 xg durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante, se agregó 1 ml de amortiguador de fosfatos y se repitió el lavado 4 veces más. Se resuspendió el paquete de resina de cada tubo en 20 μ l de amortiguador de carga y se hirvieron durante 7 minutos, se centrifugó a 12,000 xg por 1 minuto y el sobrenadante se cargó en un gel desnaturizante, dicho gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para realizar una inmunoréplica tipo *Western Blot* con anti-Histidinas (*Pierce chemicals*) diluido 1:10,000 en amortiguador TTBS.

Ensayo cualitativo de actividad enzimática.

Para establecer la actividad catalítica de las versiones mutantes de la proteína SltF utilizadas en este trabajo, se realizaron ensayos de lisoplato [76]. Este ensayo permite observar la actividad de lisis. En el lisoplato se encuentra como sustrato el peptidoglicano que es un compuesto insoluble de gran tamaño, si una enzima es capaz de romperlo este se encontrará en pedazos más pequeños solubles y se observará como resultado un halo transparente. Se preparó los lisoplatos en cajas Petri añadiendo 10 ml de amortiguador Na_2HPO_4 pH 6.5 con agarosa al 1%, y como sustrato células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* a una concentración del 0.05%. Se probó la proteína silvestre y cada una de las mutantes inoculando cada una de ellas a una concentración final de 7 μ g. Se utilizó 1 μ g de lisozima de huevo (SIGMA) como control positivo y 7 μ g de la proteína quimiotáctica CheY5 como control negativo. Se incubó la caja a 30°C durante 18 horas.

Análisis bioinformáticos.

La búsqueda de transglicosilasas líticas (putativas y caracterizadas) en contextos genómicos flagelares de diferentes bacterias con FlgJ monodominio reportadas se realizó con ayuda de la herramienta bioinformática Gene Context Tool III del IBT-UNAM [78], la cual se puede encontrar en la siguiente dirección: <http://operons.ibt.unam.mx/gct3/> El análisis de la presencia de secuencia señal se realizó con el programa Psignal, el cual al ser alimentado con una secuencia de aminoácidos arroja (o no) la predicción de la secuencia señal [79]. Los alineamientos múltiples aquí presentados se realizaron con el programa MUSCLE. El árbol filogenético presentado se construyó utilizando el algoritmo de máxima verosimilitud (maximum-likelihood) [80].

Resultados

Con la finalidad de identificar una o más regiones no conservadas en la secuencia de SltF de *R. sphaeroides* se realizó un alineamiento múltiple de dicha proteína con las secuencias de diferentes transglicosilasas líticas caracterizadas. La proteína SltF se agrupa en la familia 1 de las transglicosilasas líticas, esta se agrupa como un miembro de la subfamilia 1D o MltD. El resto de las transglicosilasas líticas incluidas en el alineamiento también pertenecen a la familia 1. Se incluyeron secuencias para a cada una de las subfamilias que la componen.

Las secuencias incluidas para la subfamilia 1A o Slt son transglicosilasas líticas de *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis*, *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Para la subfamilia 1B o MltC de *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *H. haemolyticus* y *K. pneumoniae*. Para la subfamilia 1C o EmtA de *K. pneumoniae*, *Cupriavidus taiwanensis*, *Enterobacter cloacae* y *E. coli*. Para la familia 1D o MltD de *P. aeruginosa*, *Vibrio cholera*, *E. coli* y *K. pneumoniae*. Finalmente para la familia 1E o YfhD de *P. aeruginosa*, *Xanthomonas beticola*, *Y. pestis*, *E. coli* y *K. pneumoniae*.

El alineamiento muestra una región de aproximadamente 95 aminoácidos no conservados hacia el C-terminal y una región de aproximadamente 17 aminoácidos en el N-terminal. Estos aminoácidos no forman parte del dominio y no muestran similitud ni homología con ninguna proteína conocida (**Figura 17**).

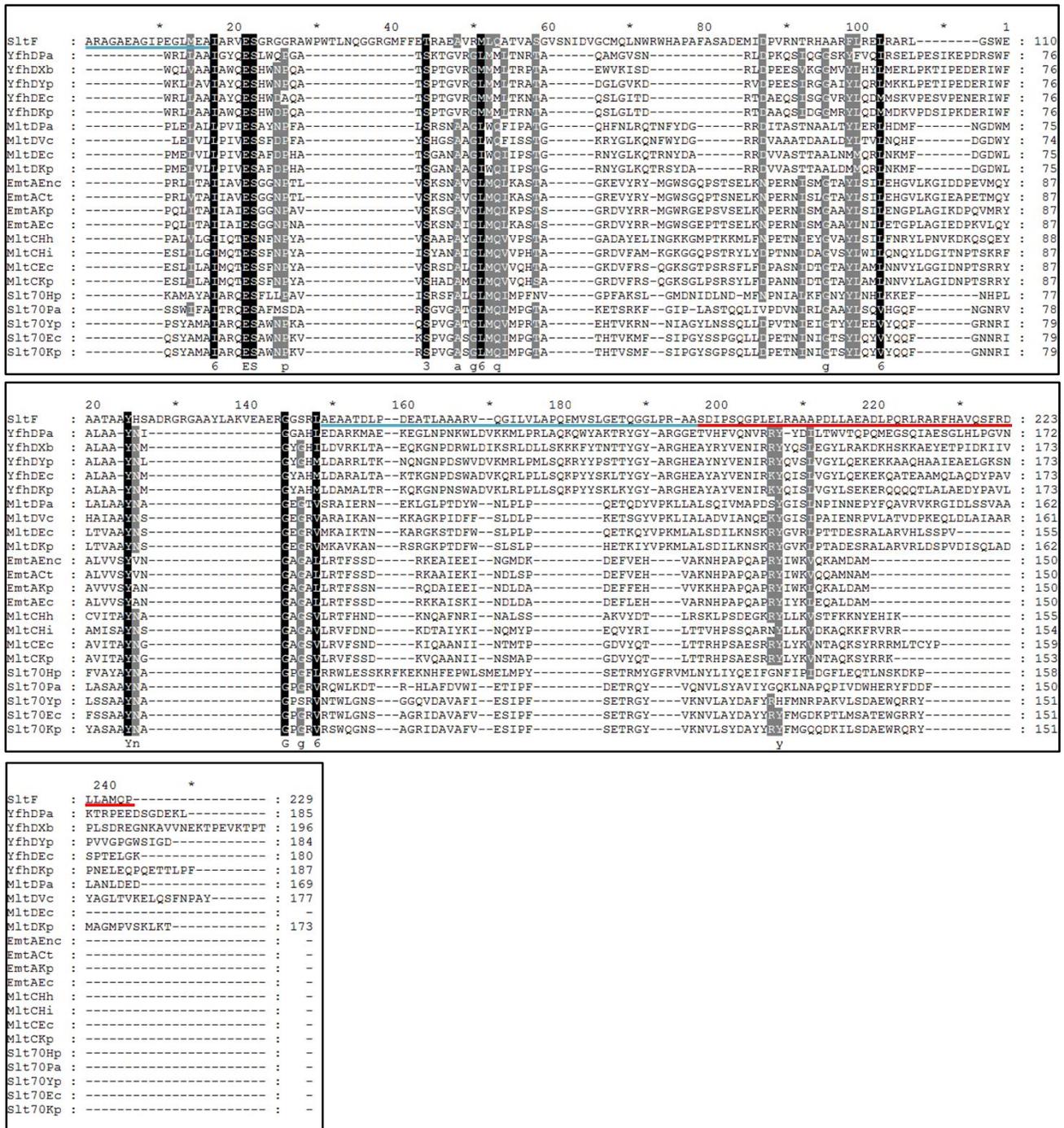


Figura 17. Alineamiento múltiple del dominio de transglicosilasas líticas. Se incluye a la proteína SltF de *R. sphaeroides* (sin secuencia señal) y 22 transglicosilasas líticas miembros de la familia 1 [58]. Se marcan en color negro y gris los aminoácidos más conservados. El alineamiento fue realizado en el programa MUSCLE. Se muestra en color rojo los 48 aminoácidos previamente deletados y caracterizados [64]. Se muestra en color azul los aminoácidos eliminados y caracterizados en este trabajo.

Por lo que con la finalidad de obtener información que permitiera conocer la función de las regiones poco conservadas en SltF y bajo la hipótesis de que en su secuencia hay una región determinante para la interacción con FlgJ, se construyeron diferentes mutantes. SltF es una proteína de 265 aminoácidos, las mutantes construidas se esquematizan en la **Figura 18**.

Las mutantes carecen de distintas regiones de aminoácidos. La mutante SltF Δ 4 carece del aminoácido 241 al 265 (24 aminoácidos). La mutante SltF Δ 5 del 217 al 241 (24 aminoácidos). La mutante SltF Δ 6 del 217 al 265 (48 aminoácidos) [64]. La mutante SltF Δ 24 del 170 al 193 (24 aminoácidos). La mutante SltF Δ 23 del 193 al 217 (23 aminoácidos). La mutante SltF Δ 47 del 170 al 217 (47 aminoácidos). La mutante SltF Δ 95 del 170 al 265 (95 aminoácidos). Finalmente, la mutante SltF Δ 17 del aminoácido 27 al 44 (17 aminoácidos).

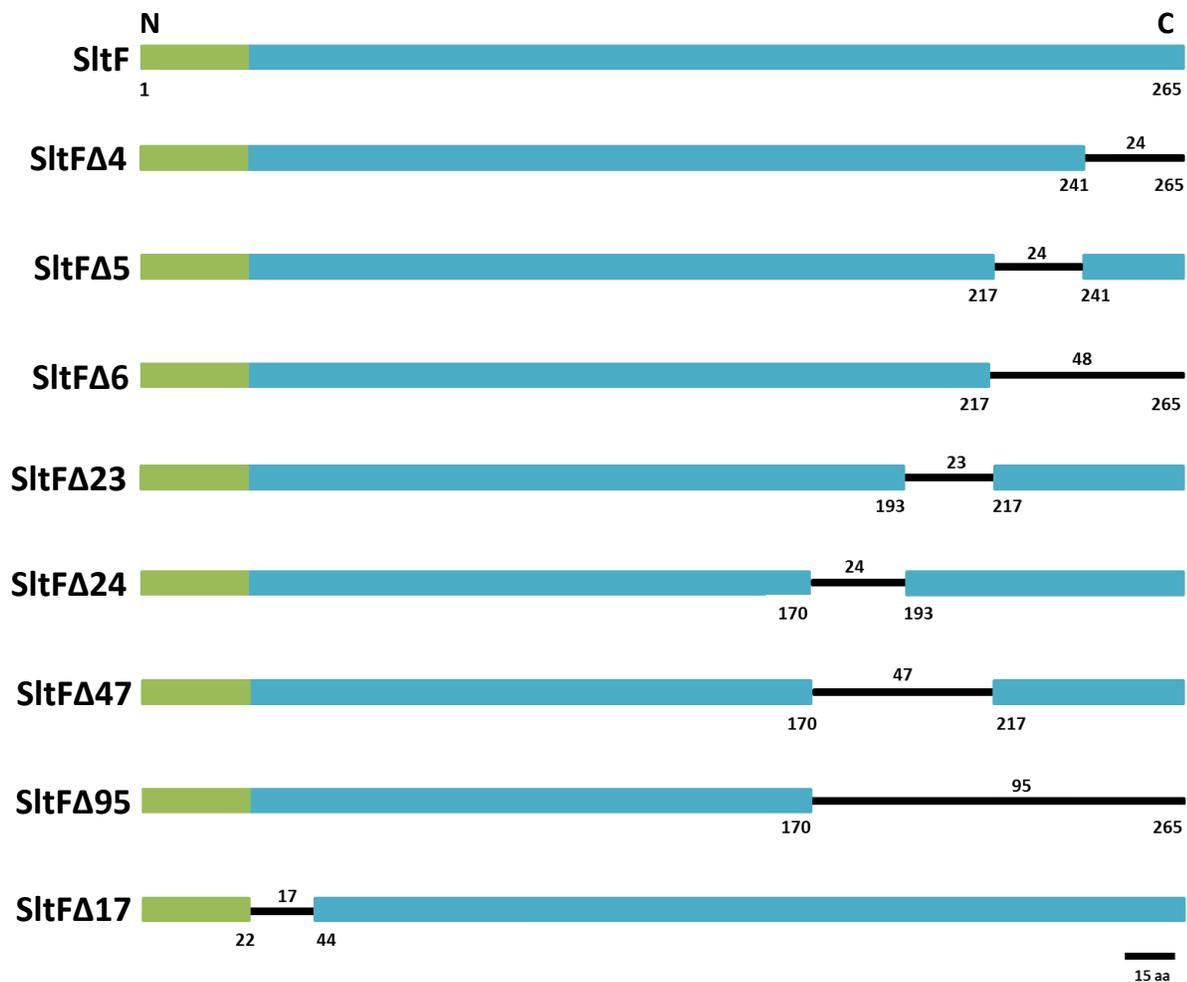


Figura 18. Representación esquemática de las construcciones mutantes de SltF. En el esquema se representa a las construcciones caracterizadas previamente (SltF Δ 4, SltF Δ 5 y SltF Δ 6) las cuales aunque son incapaces de restaurar el fenotipo de nado interaccionan fuertemente con FlgJ *in vitro* [64] (**Figura 27**). Las mutantes utilizadas en este trabajo son de SltF Δ 23 a SltF Δ 17. La secuencia señal en el N-terminal se indica en color verde. Para cada mutante se indican los aminoácidos deletados. Barra de escala: 15 aminoácidos.

En primer lugar, se evaluó la capacidad para complementar el nado de cada una de las mutantes de *sltF* construidas (**Figura 18**) mediante ensayos de nado en agar suave. Los genes codificantes para las proteínas mutantes se introdujeron en el plásmido específico pRK415 y se conjugaron en una cepa de *R. sphaeroides* con un fondo genético $\Delta sltF$, se utilizaron para comparar el nado: la cepa silvestre WS8, la mutante $\Delta sltF$ y la mutante $\Delta sltF$ complementada con el gen silvestre *sltF* en pRK415.

Como se había reportado anteriormente, las mutantes SltF Δ 4, Δ 5 y Δ 6 son incapaces de restaurar el fenotipo de nado [64]. De las mutantes caracterizadas en este trabajo *sltF* Δ 24 y *sltF* Δ 17 son capaces de nadar, mientras que las mutantes SltF Δ 95, SltF Δ 47 y SltF Δ 23 son incapaces de nadar mostrando un fenotipo similar al de la mutante $\Delta sltF$ (**Figura 19**).

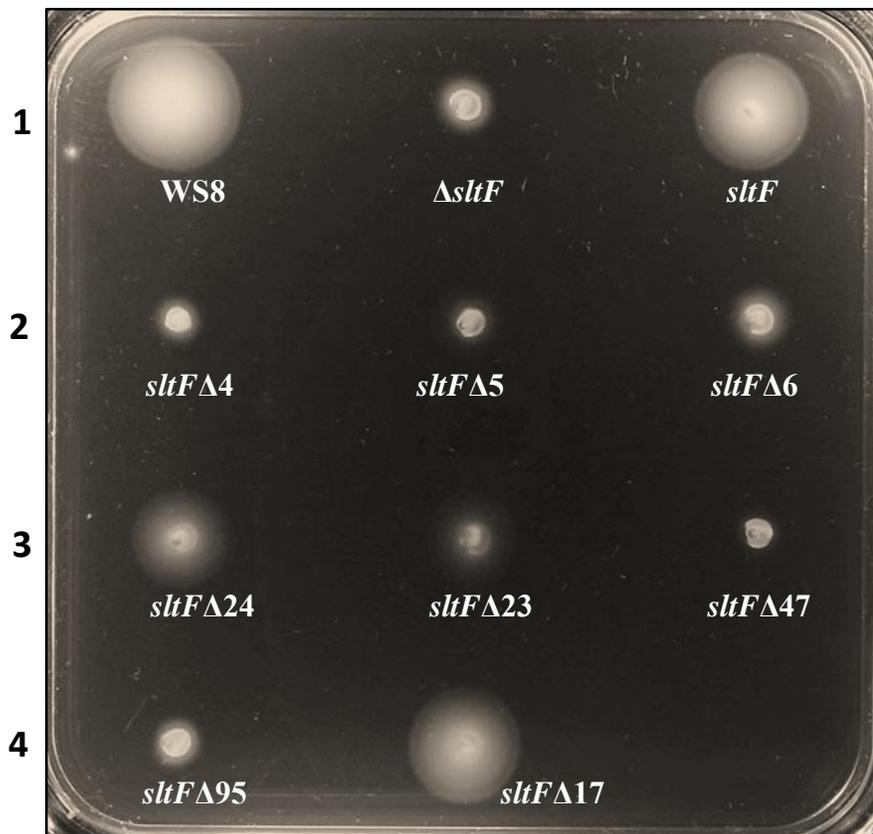


Figura 19. Ensayos de motilidad. Medio Sistrom con agar al 0.25%. De izquierda a derecha, primera fila: cepa silvestre WS8, delección total de *sltF* en el cromosoma y complementación con la versión silvestre de *sltF*. Segunda fila: complementación de la mutante $\Delta sltF$ con las construcciones mutantes *sltF* Δ 4, *sltF* Δ 5 y *sltF* Δ 6. Tercera fila: complementación de la mutante $\Delta sltF$ con las construcciones mutantes *sltF* Δ 24, *sltF* Δ 23 y *sltF* Δ 47. Cuarta fila: complementación de la mutante $\Delta sltF$ con las construcciones mutantes *sltF* Δ 95 y *sltF* Δ 17.

Dado que las construcciones mutantes SltF Δ 24 y 17 son capaces de restaurar el fenotipo de nado, se puede concluir que los cambios realizados no le afectan, por lo tanto, en el presente trabajo no se realizó ningún experimento con dichas versiones. Las mutantes SltF Δ 4, SltF Δ 5 y SltF Δ 6 son incapaces de complementar el fenotipo de nado, estas versiones interactúan fuertemente con FlgJ (**Figura 26**), lo cual se reportó en un trabajo previo [64].

La proteína SltF silvestre tiene un peso molecular predicho de 25,524 Da, las diferentes versiones mutantes utilizadas presentan variaciones en el peso molecular por los cambios en su secuencia, la predicción de cada uno de los pesos se realizó utilizando el portal de recursos bioinformáticos ExPASy, el cual al ser alimentado por una secuencia de aminoácidos arroja diferentes parámetros, entre ellos el peso molecular (**Tabla 6**).

Tabla 6. Pesos moleculares

Proteína	Peso molecular
SltF	25,524 Da
SltF Δ 4	22,550 Da
SltF Δ 5	23,040 Da
SltF Δ 6	20,191 Da
SltF Δ 24	23,005 Da
SltF Δ 23	23,054 Da
SltF Δ 47	20,661 Da
SltF Δ 95	15,454 Da
SltF Δ 17	23,768 Da

Con la finalidad de descartar que las afectaciones en el fenotipo de nado se deban a la ausencia de la proteína, se confirmó la presencia de las distintas versiones mutantes de SltF mediante ensayos de inmunoréplica tipo *Western* (**Figura 20**). Se detectó la presencia de cada una de las mutantes. Se observaron claras diferencias en el patrón de migración debido a los diferentes tamaños que tiene cada una de ellas (**Figura 18**). Todas las cepas de *R. sphaeroides* utilizadas están en condiciones de crecimiento idénticas.

El nivel de expresión génica de SltF es indetectable por ensayos de inmunoréplica tipo *Western*, sin embargo, la cepa Δ *sltF* transformada con el plásmido pRK415 con *sltF* silvestre permite detectarla. En la **Figura 20**, panel A en el carril *sltF* se observa una banda adicional de menor peso molecular, es posible que sea degradación o reconocimiento inespecífico.

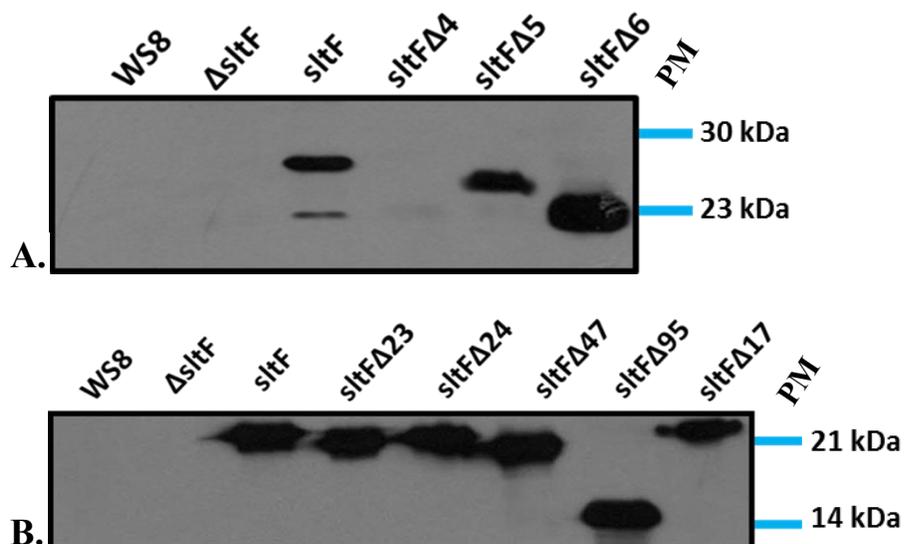


Figura 20. Inmunoréplica tipo *Western* de las versiones mutantes utilizadas para complementar (**Figura 19**). Se utilizaron gamma globulinas α -SltF preadsorbidas utilizando una dilución de 1:2,500. **A.** Inmunodetección de las mutantes SltF Δ 4, Δ 5 y Δ 6. Gel SDS-PAGE 15%. **B.** Inmunodetección de las mutantes SltF Δ 23, Δ 24, Δ 47, Δ 96 y Δ 17. Gel SDS-PAGE 17.5%. PM, marcador de pesos moleculares.

Se observó la presencia de cada una de las mutantes, por lo que es posible descartar que la afectación en el nado se deba a la ausencia de la proteína. La mutante SltF Δ 4 se detecta en niveles casi imperceptibles, esto se debe a que la delección genera una proteína inestable dificultando detectarla en el ensayo de la **Figura 20** [64].

Dado que la proteína de interés (SltF) es una enzima identificada por secuencia como una transglicosilasa lítica [64] es necesario descartar que las mutaciones hayan ocasionado la pérdida de su actividad catalítica, y aunque se eliminaron regiones que aparentemente no son parte del dominio catalítico es necesario establecer que la enzima sea capaz de realizar su función, por lo que para observar su actividad enzimática y su capacidad para interactuar con FlgJ *in vitro* se sobre expresaron y purificaron las siguientes proteínas: SltF silvestre, SltF Δ 95, SltF Δ 47 y FlgJ. Las mutantes SltF Δ 23 y SltF Δ 24 serán caracterizadas posteriormente.

Los genes codificantes para SltF, SltF Δ 95 y SltF Δ 47 se clonaron en vectores de sobre expresión, estas versiones de SltF no incluyen a la secuencia señal dado que esto ocasiona que sean exportadas al periplasma y al encontrarse en niveles propios de sobreexpresión rompen a la célula. Se muestra en la **Figura 21** la inducción de proteína para cada una de ellas.

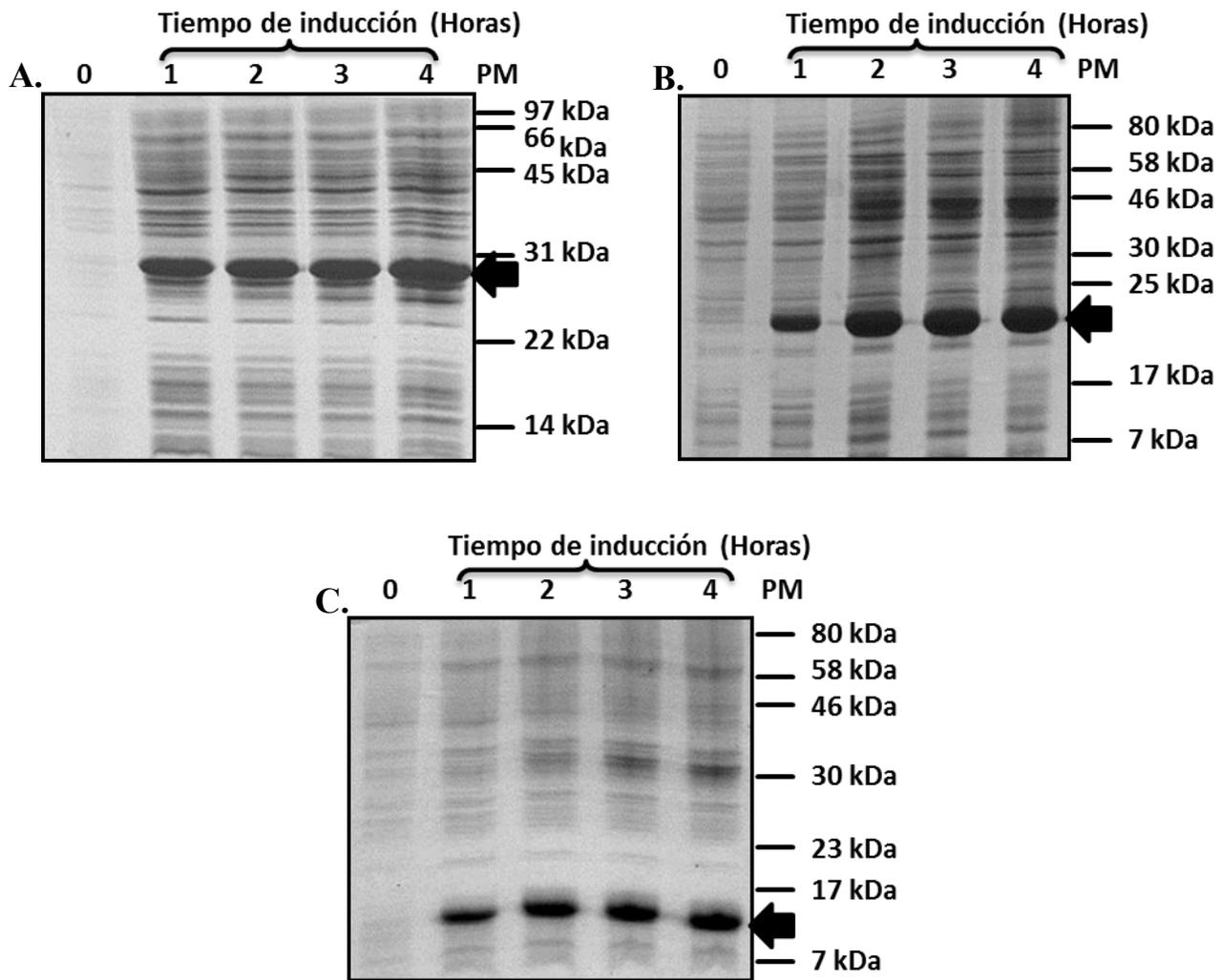


Figura 21. Geles SDS-PAGE de las curvas de inducción para cada proteína. Se crecieron las células a 37°C y se indujeron con 1 y 0.5 mM de IPTG. 0, cultivo sin inducir. 1, 2, 3 y 4: horas del cultivo luego de la inducción con IPTG. A. SltF. B. SltF Δ 47. C. SltF Δ 95. Se indica la proteína de interés en cada caso con una flecha. Geles SDS 15, 12.5 y 17%. PM, marcador de pesos moleculares.

Las proteínas anteriormente mencionadas se purificaron. La proteína SltF silvestre se purificó en condiciones nativas. Las versiones de SltF Δ 47 y SltF Δ 95 se recuperaron de cuerpos de inclusión y se purificaron en condiciones desnaturizantes. Adicionalmente se purificó a FlgJ cuyo protocolo se realiza también en condiciones desnaturizantes.

Cada una de las proteínas se purificó mediante cromatografía líquida utilizando la resina de agarosa Ni-NTA y lavados de concentraciones crecientes de imidazol hasta eluir la proteína de interés. Las fracciones resultantes para cada una de las purificaciones se analizaron mediante electroforesis de poliacrilamida (**Figura 22**).

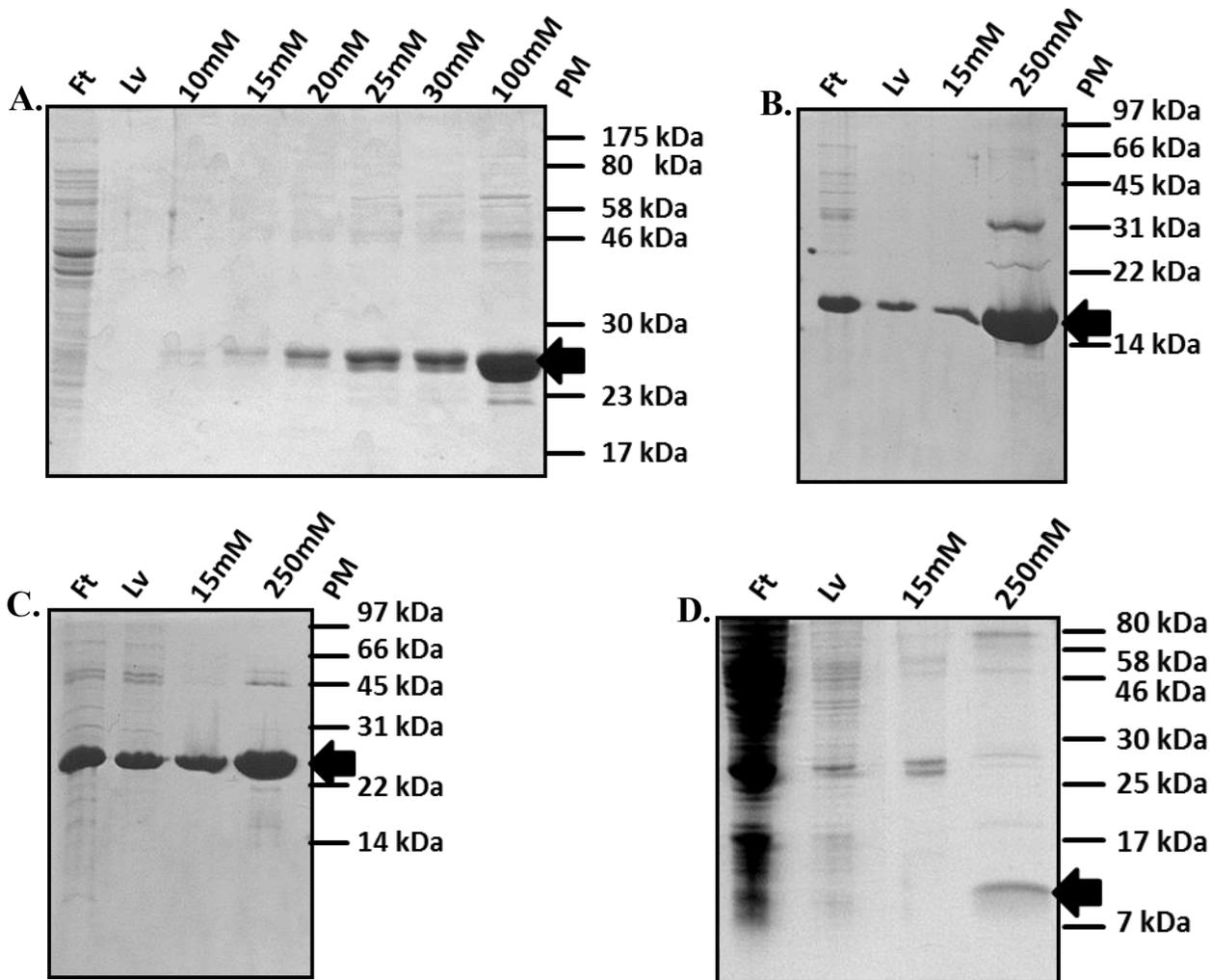


Figura 22. Purificación de proteína. **A.** SltF, **B.** SltF Δ 95, **C.** SltF Δ 47 y **D.** FlgJ. Ft: extracto incubado con la resina. Lv: Lavado con el amortiguador utilizado durante las purificaciones. 10, 15, 20, 25, 30, 100 y 250 mM corresponden a las concentraciones de imidazol utilizadas para cada una de las fracciones. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína de interés. Geles SDS-PAGE 15 y 17.5%. PM, marcador de pesos moleculares.

Se guardó la fracción en donde eluyen las proteínas (100 mM para SltF y 250 mM para el SltF Δ 47, SltF Δ 95 y FlgJ) para cada una de las purificaciones, se dializó y concentró como se indicó en materiales y métodos. Se precipitó 1/100 de la muestra de cada una de ellas con metanol-cloroformo y la muestra se cargó en un gel de poliacrilamida (**Figura 23**).

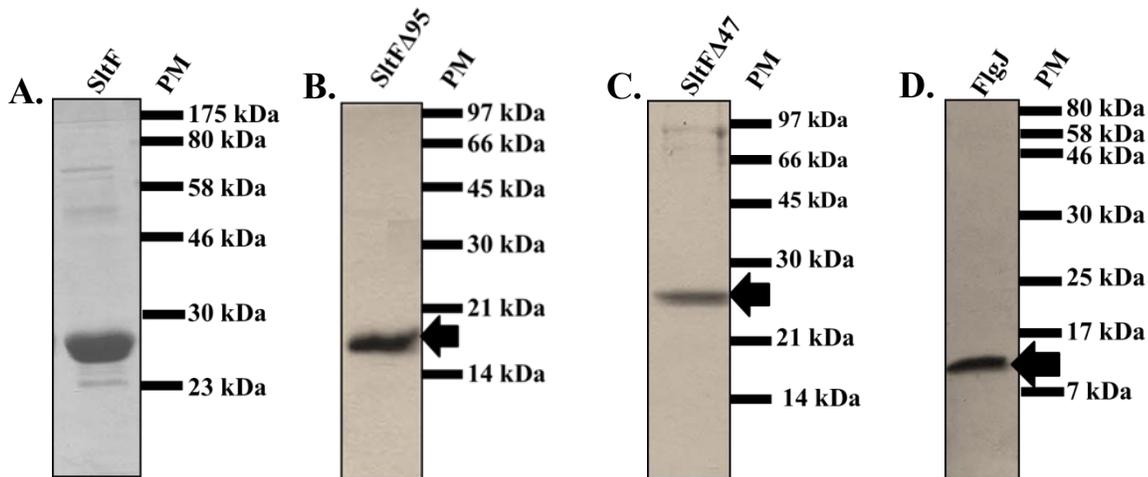


Figura 23. Purificación de proteína. A. SltF, B. SltF Δ 95, C. SltF Δ 47 y D. FlgJ. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína de interés. Geles SDS-PAGE 15 y 17.5%. PM, marcador de pesos moleculares.

Dado que la proteína SltF es una enzima, las modificaciones aquí presentadas podrían haber ocasionado la pérdida de su actividad, por lo que es fundamental descartar que las mutaciones hayan afectado su capacidad para realizar su función, y que su incapacidad para complementar el fenotipo de nado (**Figura 19**) se deba solamente a una alteración en su función.

Se realizaron ensayos de actividad con lisoplatos, los cuales contienen como sustrato células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* (**Figura 24**). Este ensayo permite observar la actividad lítica de las enzimas. Dado que el peptidoglicano es un polímero insoluble de gran tamaño, si existe una enzima capaz de romperlo esta lo va a descomponer en pedazos más pequeños capaces de solubilizarse. Al comienzo del ensayo, el lisoplato de actividad se observa turbio, si se inocula una enzima con actividad lítica se observará un halo transparente por la degradación del sustrato. La lisozima es una hidrolasa lítica caracterizada por lo que se incluye en cada ensayo como control positivo, también se incluye a la proteína quimiotáctica CheY5 como control negativo.

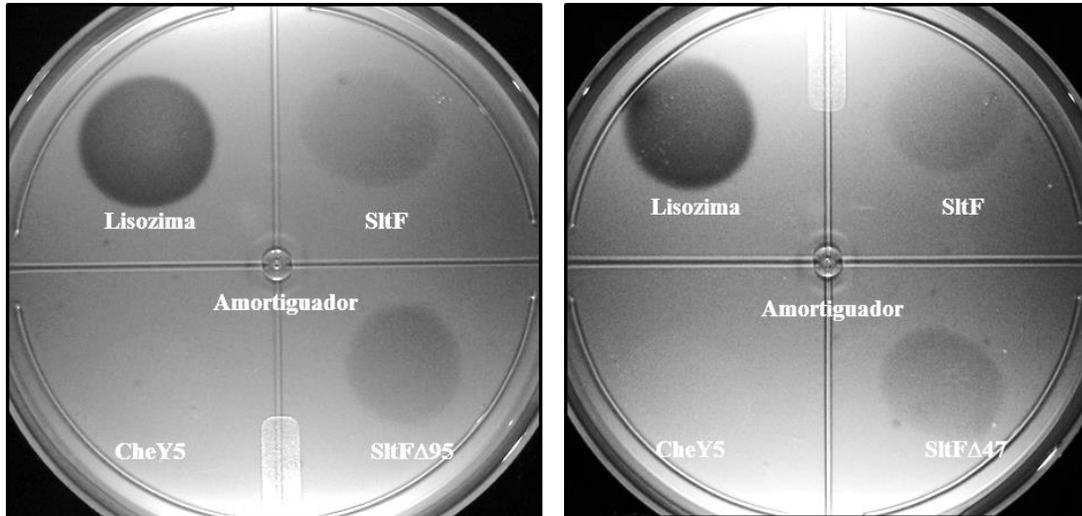


Figura 24. Lisoplato de actividad. En este ensayo se observa un halo transparente cuando la proteína presenta actividad lítica. Para cada una de las cajas Petri cuyo sustrato son células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus*, se inoculó 1 µg de lisozima o 7 µg de SlfF, CheY5, SlfFΔ47 o SlfFΔ95, en un volumen final de 100 µl, adicionalmente se inoculó en el centro 100 µl de amortiguador de fosfatos para descartar un posible efecto de dilución.

Las construcciones mutantes SlfFΔ95 y SlfFΔ47 conservan su actividad catalítica, por lo que es posible descartar que las mutantes incapaces de complementar el fenotipo de nado sean el resultado de una alteración en la enzima al haberla mutado.

Una vez establecido que la mutante SlfFΔ47 y la mutante SlfFΔ95 mantienen su actividad, se prosiguió a explorar si la incapacidad para complementar el nado de cada una de ellas se debía a un cambio en su capacidad para interactuar con la proteína FlgJ. Para lo cual se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación. Utilizando las proteínas purificadas de SlfF silvestre y las mutantes SlfFΔ95 y SlfFΔ47, se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación con la proteína FlgJ. Se agregaron en diferentes tubos perlas de sefarosa acopladas a la proteína A incubadas con gamma globulinas anti-SlfF, cada una se incubó con SlfF y las dos versiones mutantes, y finalmente con FlgJ, los resultados se analizaron por *Western Blot* (**Figura 25 y Figura 26**).

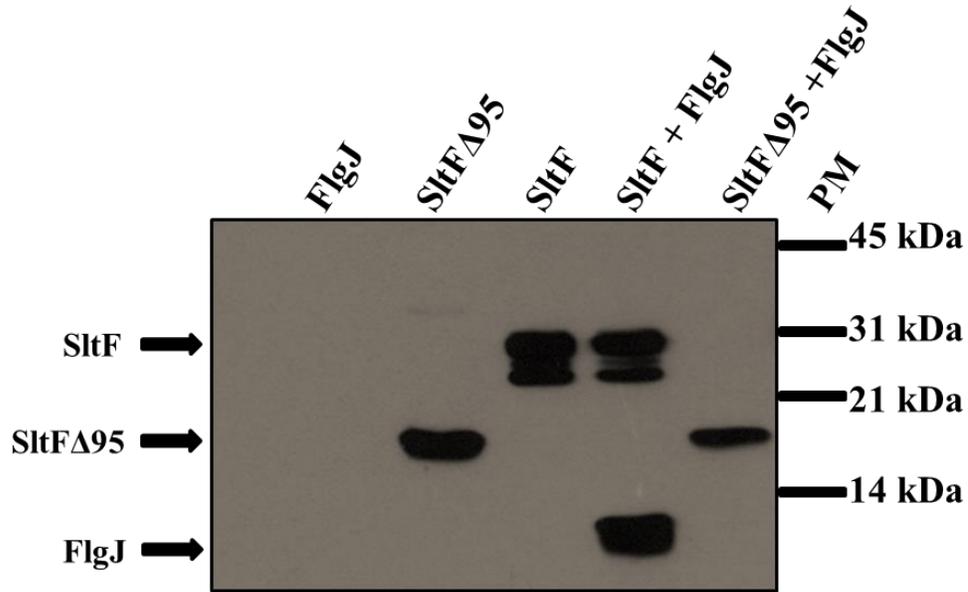


Figura 25. Ensayos de Coimmunoprecipitación. Coimmunoprecipitación de SltF silvestre y la versión mutante SltFΔ95 en presencia o en ausencia de FlgJ. El análisis se realizó por inmunoréplica tipo *Western*. Anticuerpo α -His en dilución 1:10,000. Gel SDS-17.5 % PAGE.

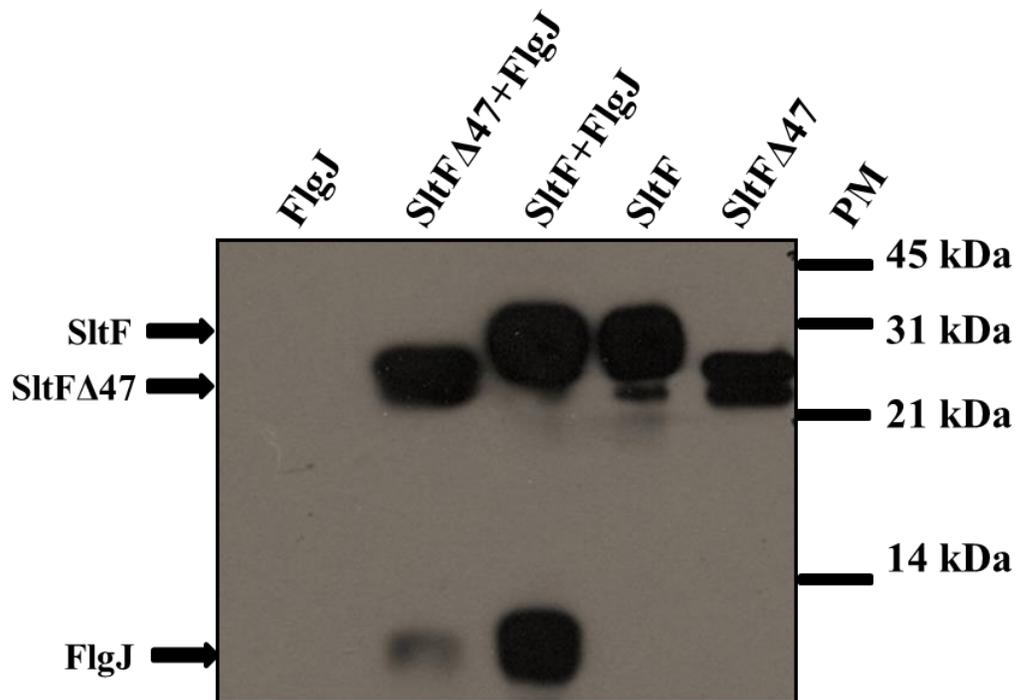


Figura 26. Ensayos de Coimmunoprecipitación. Coimmunoprecipitación de SltF silvestre y la versión mutante SltFΔ47 en presencia o en ausencia de FlgJ. El análisis se realizó por inmunoréplica tipo *Western*. Anticuerpo α -His en dilución 1:10,000. Gel SDS-17.5 % PAGE.

La mutante SltF Δ 95 parece ser incapaz de retener a FlgJ mientras que la mutante SltF Δ 47 si es capaz de retenerla pero no en los mismos niveles que SltF silvestre. El ensayo se repitió 6 veces para cada una de ellas, y en cada ocasión los resultados obtenidos permitieron llegar a la misma conclusión. Estos resultados difieren totalmente a lo reportado anteriormente para las mutantes SltF Δ 4, SltF Δ 5 y SltF Δ 6, las cuales interaccionan fuertemente con FlgJ superando el nivel de interacción de SltF silvestre con FlgJ [64] (**Figura 27**).

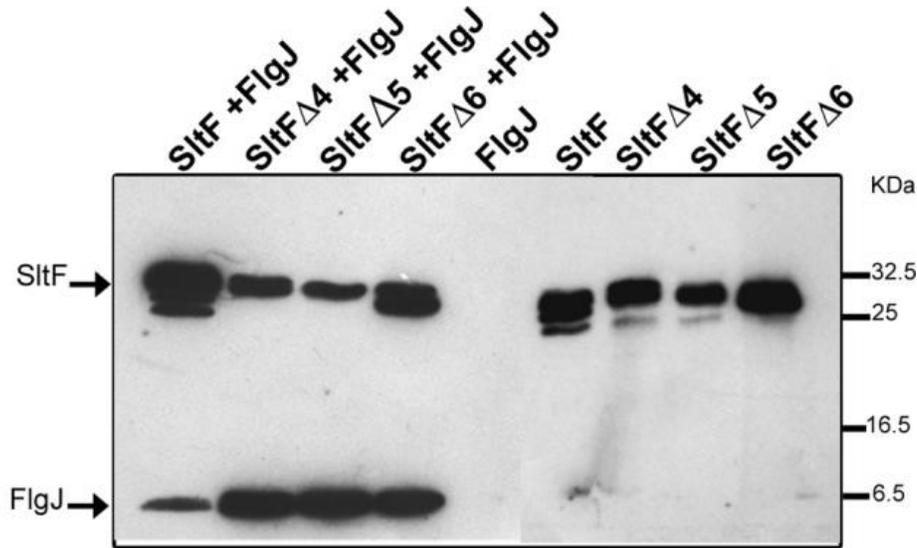


Figura 27. Ensayos de Coimmunoprecipitación. Coimmunoprecipitación de SltF silvestre y las versiones de SltF Δ 4, SltF Δ 5 y SltF Δ 6 en presencia o en ausencia de FlgJ. El análisis se realizó por inmunoréplica tipo Western. Anticuerpo α -His en dilución 1:10,000. Gel SDS-17.5 % PAGE [64].

Análisis de transglicosilasas líticas en contextos flagelares.

Con la finalidad de identificar transglicosilasas líticas flagelares, se realizó una búsqueda bioinformática de transglicosilasas líticas en contextos genéticos flagelares. La búsqueda se realizó en el genoma de bacterias que presentan una FlgJ monodominio reportada (**Figura 28**).

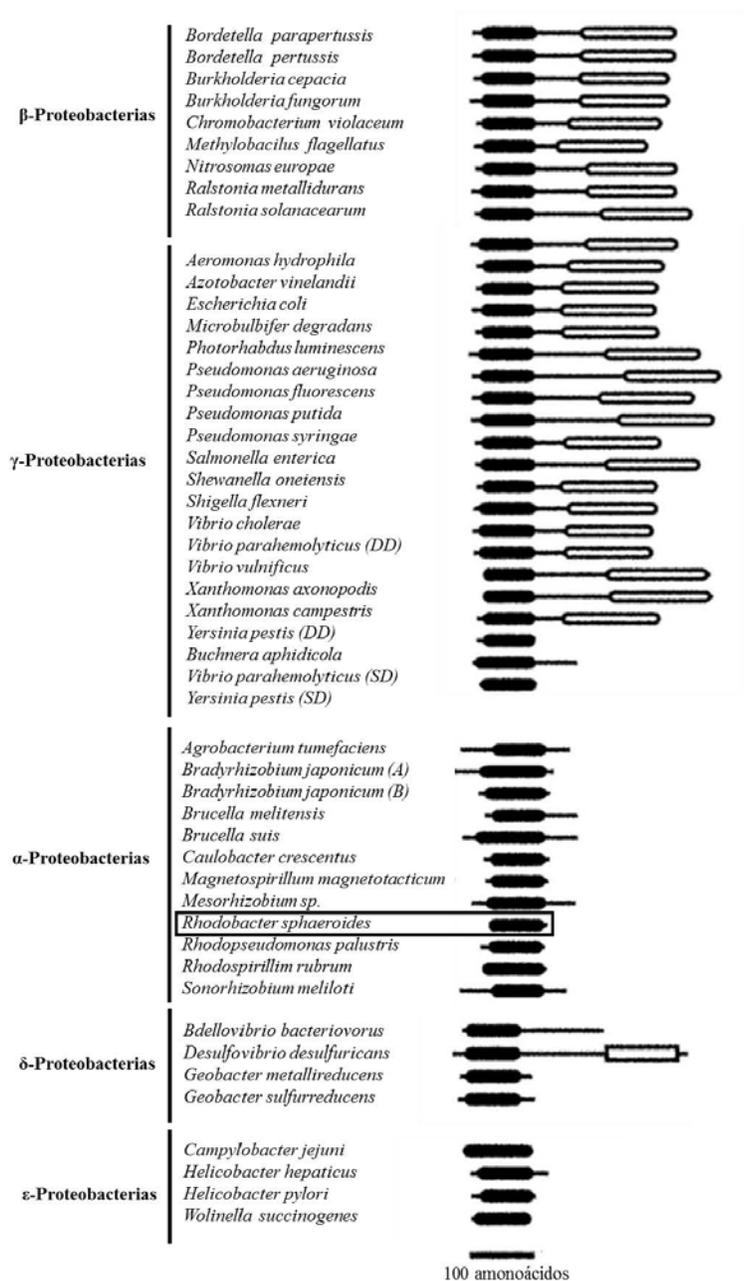


Figura 28. Arquitectura de los dominios homólogos de FlgJ. Las proteínas están representadas por líneas horizontales, y sus dominios estructurales están representados por: Óvalos rellenos, región central (FlgJ). Óvalos sin relleno, dominio de muramidasa. Rectángulo sin relleno, dominio de peptidasa. Se señala en un recuadro la arquitectura monodominio de la proteína FlgJ de *R. sphaeroides* (Modificado de Nambu, et al. 2006) Barra de escala: 100 aminoácidos [59].

Se encontraron 43 secuencias con estas características: una secuencia que codifica para una proteína que tiene un dominio de transglicosilasa lítica flanqueada por un contexto genético flagelar (**Figura 29**). Se buscó además la secuencia de transglicosilasas líticas propias de otros sistemas de secreción, tipo III no flagelar y tipo IV [81].

Rhodobacter sphaeroides



Agrobacterium tumefaciens



Bdellovibrio bacteriovorus



Vibrio parahaemolyticus



Bradyrhizobium japonicum



Ochrobactrum anthropi



Rhodospirillum centenum



Figura 29. Transglicosilasas líticas encontradas en contextos flagelares cuya FlgJ únicamente codifica para el dominio de chaperona de andamiaje, se esquematiza el contexto genómico de *R. sphaeroides* (RSP_0072 es la proteína SltF previamente caracterizada), *A. tumefaciens*, *B. bacteriovorus*, *V. parahaemolyticus*, *B. japonicum*, *O. anthropi* y *R. centenum*. Se muestra la posición de las transglicosilasas líticas en un recuadro color rojo.

Se realizó un análisis bioinformático de las transglicosilasas líticas encontradas en los distintos contextos flagelares con la finalidad de identificar la presencia de una secuencia señal (también

llamada péptido señal) que sugiriera su exportación al periplasma mediante la vía Sec (al igual que SltF de *R. sphaeroides*), únicamente 25 de las 43 secuencias contienen una secuencia señal predicha. Se eliminó la secuencia señal de aquellas proteínas que según la predicción realizada tenía una secuencia señal, se muestra la predicción para algunas de las secuencias (**Figura 30**).

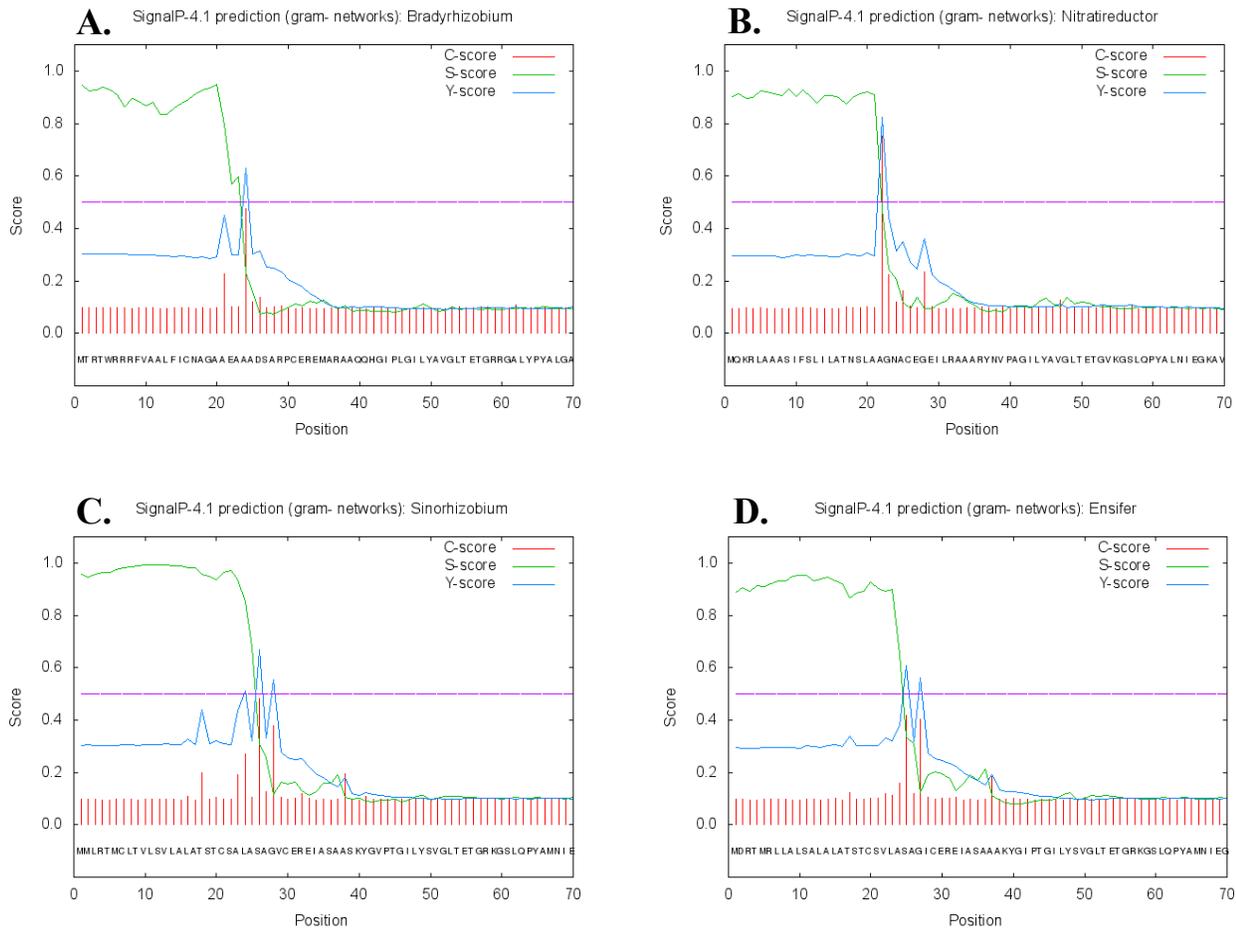


Figura 30. Gráficas generadas mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos de las transglucosilasas líticas putativas. Se muestran algunas de las gráficas de las secuencias de aminoácidos que predicen una secuencia señal. Se realizó el análisis con el programa SignalP 4.1. Se indican los aminoácidos entre los cuales se predice el corte: **A.** *Bradyrhizobium japonicum* entre las alaninas 23 y 24 **B.** *Nitratireductor indicus* entre las alaninas 21 y 22 **C.** *Sinorhizobium meliloti* entre alanina 25 y serina 26. **D.** *Ensifer fredii* entre alanina 24 y serina 25.

Posteriormente, se utilizaron las secuencias de transglucosilasas líticas encontradas, la secuencia de SltF, las secuencias de las familias ya establecidas y las secuencias de otros sistemas de secreción para realizar un alineamiento múltiple con el algoritmo MUSCLE [80]. A partir del

alineamiento de estas secuencias aminoácidos se construyó un árbol filogenético con el algoritmo de máxima verosimilitud (maximum-likelihood) (**Figura 31**).

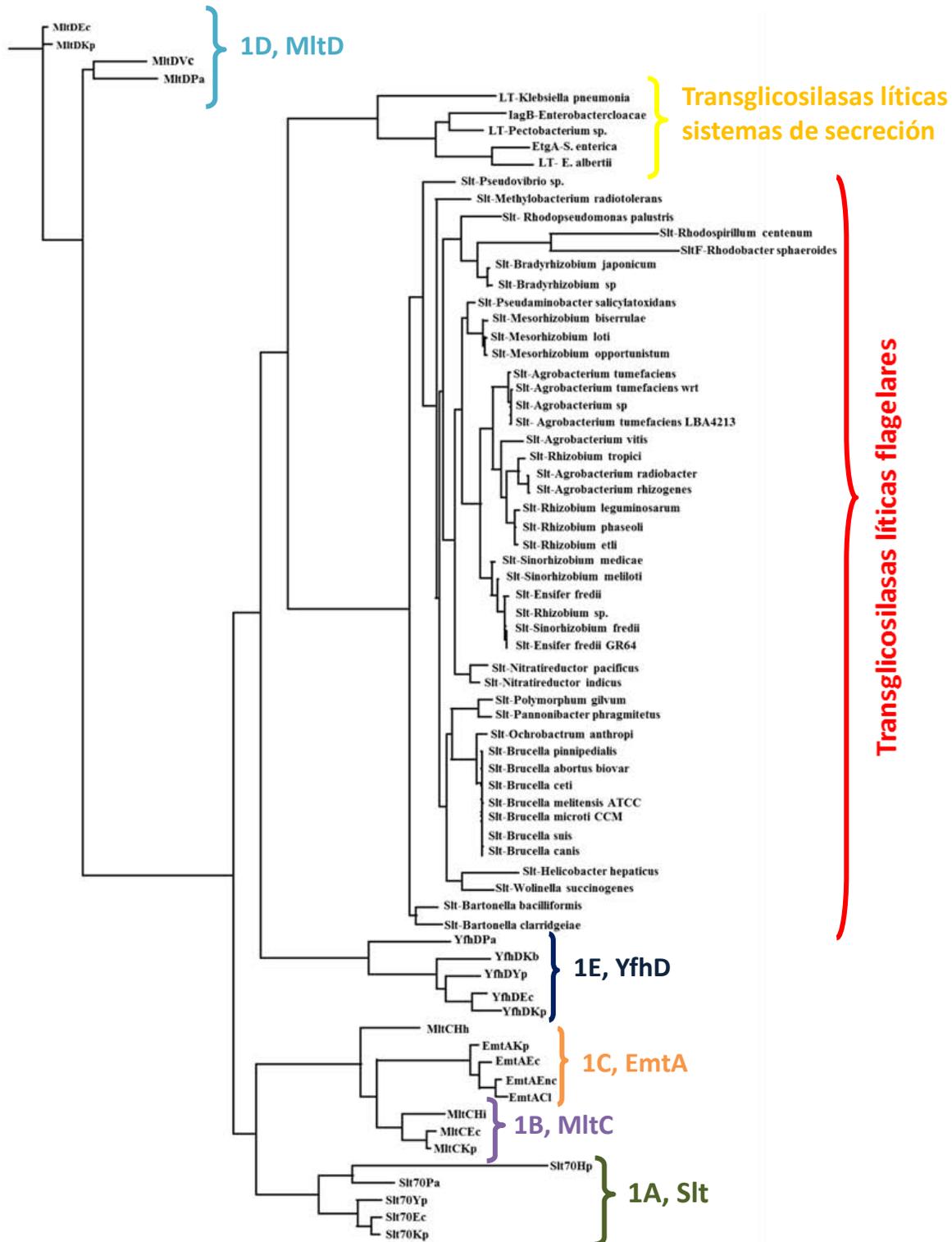


Figura 31. Análisis de transglycosilasas líticas caracterizadas y transglycosilasas líticas flagelares putativas. A. Análisis filogenético de transglycosilasas líticas. Se muestra, en azul celeste: Subfamilia 1B, MltC. En naranja: Subfamilia 1C, EmtA. En morado: Subfamilia 1D, MltD. En verde: Subfamilia 1A, Slt. En azul oscuro: Subfamilia 1E, YfhD. En amarillo: transglycosilasas líticas de sistemas de secreción. En rojo: transglycosilasas líticas flagelares.

Discusión

Dentro de la secuencia de aminoácidos de SltF existe lo que parecen ser dos regiones no conservadas en los extremos N-y C- terminal, una de aproximadamente 17 aminoácidos hacia el amino terminal y una de aproximadamente 95 hacia el carboxilo terminal.

Dado que SltF es exportada por una vía independiente a la vía de secreción flagelar su localización a la estructura es indispensable pues le permite crear el hueco del que se vale el naciente flagelo para poder penetrar la pared de peptidoglicano, la interacción de SltF con FlgJ ya se había probado; sin embargo, el trabajo aquí presentado brinda un panorama más detallado sobre el papel de distintas regiones de SltF en la interacción con FlgJ.

Se construyeron 5 mutantes diferentes con la intención de eliminar a las regiones no conservadas de los extremos. Se analizó el efecto de hacerlo en el fenotipo de motilidad (nado) y en la interacción *in vitro* con FlgJ. Las mutantes incapaces de complementar el fenotipo de nado carecen de los aminoácidos no conservados que se encuentran hacia el C-terminal (excepto *sltF* Δ 24 la complementa el fenotipo de nado), mientras que la mutante *sltF* Δ 17, (la cual no incluye a los aminoácidos no conservados del N-terminal) sí complementa el fenotipo de nado. Aparentemente esos 17 aminoácidos no son relevantes para su función y su ausencia no ocasiona ningún efecto ya que el halo de nado que se observa al complementar a la mutante Δ *sltF* con la construcción *sltF* Δ 17 es similar al halo de motilidad de la mutante complementada con *sltF* silvestre.

En este trabajo nos enfocamos a estudiar las mutantes SltF Δ 95 y SltF Δ 47. La primera no incluye ninguno de los 95 aminoácidos del C-terminal, mientras que la mutante SltF Δ 47 deja intactos los últimos 48 aminoácidos del C-terminal ya caracterizados (eliminarlos impide complementar el fenotipo de nado en una mutante Δ *sltF*. Dicha delección ocasiona que las mutantes de SltF interaccionen fuertemente con FlgJ) y no incluye a los siguientes 47 aminoácidos. Después de realizar ensayos de motilidad observamos que ninguna de las dos mutantes complementaba el fenotipo de nado. El análisis de su actividad enzimática fue fundamental para descartar que los efectos negativos en el fenotipo fueran el resultado de haberla alterado. Esto a pesar de que los alineamientos indican que las regiones mutadas no forman parte del dominio enzimático; sin embargo, los cambios podrían haber ocasionado alguna alteración en el plegamiento de la proteína afectando su actividad. Por lo que se realizaron ensayos de lisoplato de actividad se descartó que su incapacidad para complementar el fenotipo de nado se deba a una alteración en el dominio enzimático de SltF, ya que se demostró que ambas proteínas conservan su actividad lítica pues ambas (SltF Δ 95 y SltF Δ 47) son capaces de degradar el sustrato, si las mutaciones ocasionan un efecto sutil o indetectable en su actividad está aún por resolverse. Esto nos permitió continuar explorando si la incapacidad de las construcciones mutantes para

complementar el fenotipo de nado se debía más bien a un efecto negativo en la interacción de SltF-FlgJ.

Generar distintas mutantes en SltF nos permitió observar el papel que juegan distintas regiones de la secuencia en la interacción con FlgJ. La mutante SltF Δ 95 es incapaz de interaccionar y retener a FlgJ en los ensayos de coimmunoprecipitación. Por otro lado, se observa que la mutante SltF Δ 47 también tiene dificultades para interaccionar con FlgJ pues en los ensayos de coimmunoprecipitación se observó en niveles claramente menores a los observados con SltF silvestre, los resultados del ensayo parecen indicar que dicha mutante tiene un nivel aparentemente mínimo de interacción con FlgJ. Sin embargo, al comparar con SltF silvestre es bastante evidente que los niveles de interacción son claramente menores y por ello aparentemente insuficientes para poder mantener los niveles necesarios para llevar a cabo la interacción.

Con claridad se puede observar que las regiones mutadas que aquí se caracterizaron juegan un papel importante en la interacción con FlgJ. Esto es opuesto a lo que se observó al mutar únicamente los primeros 48 aminoácidos del C-terminal, los cuales interaccionan fuertemente con FlgJ pues son capaces de retenerla en niveles significativamente mayores a los de SltF silvestre. Por lo tanto, se propuso que la región contenida en los últimos 48 aminoácidos del C-terminal regula negativamente la interacción y es relevante para permitir que el ensamblaje se logre eficientemente [64]. Dado que esos 48 aminoácidos tienen ese papel, los resultados aquí presentados sugieren fuertemente que los 47 aminoácidos intermedios en SltF son fundamentales para la interacción con FlgJ pues en su ausencia SltF es incapaz de interaccionar con FlgJ *in vitro*.

Las mutantes *sltF* Δ 24 y *sltF* Δ 23 se vuelven particularmente interesantes a la luz de estos resultados. Específicamente en la mutante *sltF* Δ 23 pues parece ser que la región deletada es fundamental para la interacción, ya que cuando se complementa a la mutante Δ *sltF* con dicha construcción esta es incapaz de complementar el fenotipo de nado mientras que la mutante *sltF* Δ 24 sí complementa el fenotipo de nado. Los resultados del lisoplato de actividad de SltF Δ 47 sugieren que la ausencia de los aminoácidos contenidos en esas regiones no afectan la actividad enzimática, además de que como se mencionó anteriormente y se demostró *sltF* Δ 24, sí complementa. Es necesario realizar los experimentos pertinentes para determinar experimentalmente si en los aminoácidos ausentes en la mutante *sltF* Δ 23 está la región específica de interacción.

La búsqueda de transglicosilasas líticas en contextos flagelares se centró en genomas cuyo gen *flgJ* estuviera identificado como del tipo monodominio, es decir, sin dominio de ruptura del peptidoglicano. Se buscó entre los genes flagelares un gen que codificara para una transglicosilasa lítica. Se identificaron 43 secuencias con estas características. Al realizar el análisis de predicción de secuencia señal se encontró que 25 de las secuencias predecían una secuencia señal para ser exportadas por la vía Sec, (independiente a la flagelar). Es necesario caracterizar a las transglicosilasas líticas encontradas y establecer que son específicas para el flagelo, si es o no FlgJ el componente flagelar con el que interaccionan y si dentro de la secuencia de aminoácidos de las

transglicosilasas líticas existe una región específica determinante para su interacción y si dicha región es similar al C-terminal de SlfF.

El alineamiento múltiple de transglicosilasas líticas putativas encontradas en contextos genómicos flagelares incluyen transglicosilasas líticas de las familias ya reportadas y transglicosilasas líticas propias de otros sistemas de secreción. Este alineamiento permitió la construcción de un árbol filogenético que muestra una clara agrupación de las transglicosilasas líticas flagelares. Parece que guarda similitud con transglicosilasas líticas de otros sistemas de secreción ya que ambas surgen de un mismo nodo, sin embargo, no se agrupan en las mismas ramas. Los resultados nos permiten proponer la existencia de una subfamilia de transglicosilasas líticas específicas de sistemas flagelares. Posiblemente la incorporación de las transglicosilasas líticas al sistema flagelar fue un evento temprano en la historia evolutiva de las bacterias con flagelo, sin embargo, es posible que hubiera más de un evento de recombinación que tuviera como resultado la fusión de FlgJ a una enzima lítica. Dentro de los diferentes contextos flagelares también se encontró la presencia de peptidasas, además del claro ejemplo de la ya caracterizada glucosaminidasa en el C-terminal de la proteína FlgJ de *S. enterica* [61], por lo que aparentemente hubo más de un evento de arreglo genómico para permitir la fusión. Por un lado es claro que es ventajoso contar con una FlgJ bifuncional pues evidentemente el proceso se vuelve mucho más eficiente, pues una vez que el eje flagelar y su chaperona de andamiaje se ponen en contacto físico con la pared de peptidoglicano la chaperona que asistió a las proteínas del eje durante el proceso de ensamblaje es capaz de hidrolizar la pared de peptidoglicano permitiendo el paso de la naciente estructural flagelar simultáneamente a su elongación. A pesar de esto es claro que se ha conservado la existencia de una versión de FlgJ monofuncional. La versión de FlgJ monofuncional según se ha propuesto es la versión que presentaba un ancestro común flagelado, es decir, el contar con una FlgJ monodominio es una característica evolutiva mucho más antigua que la fusión de FlgJ de andamiaje con una enzima lítica.

Es posible que las versiones separadas se conserven porque una mutación en la enzima lítica es capaz de suprimirse. El flagelo se vale de los huecos que se generan durante la división celular y/o la remodelación de la pared de peptidoglicano para ensamblarse por lo que básicamente ‘se escapa’ por los huecos en el peptidoglicano. Esto, por ejemplo, se ha observado al mutar a SlfF, aunque inicialmente se observa que es incapaz de nadar, las incubaciones prolongadas permiten ver un pequeño halo de nado eventualmente. Por el contrario, el mutar una FlgJ bifuncional resulta en una cepa incapaz de nadar, pues para la célula no es posible ‘ignorar’ la ausencia de ésta pues al no contar con la chaperona de andamiaje imposibilita que las proteínas del eje se ensamblen evitando el armado del cuerpo basal flagelar. Lo anterior podría explicar la razón por la que aunque han existido eventos de fusión entre la chaperona de andamiaje FlgJ y algunas enzimas líticas, las versiones separadas se han logrado conservar en un gran número de grupos, por ejemplo en la gran mayoría de las α -proteobacterias (**Figura 28**).

La información filogenética que se presenta en este trabajo habla un poco de la historia evolutiva de la enzima y particularmente de su coevolución con el sistema flagelar. Está claro que

las enzimas líticas han jugado un papel importante en la historia evolutiva del flagelo pues este sistema requiere de ellas. Estudiar a las transglicosilasas líticas nos permite conocer un poco más del camino evolutivo que han recorrido a la par del sistema flagelar.

Conclusiones

- La eliminación de los aminoácidos no conservados del C-terminal en la secuencia de SlfF ocasiona la pérdida de la motilidad en *R. sphaeroides*.
- Los aminoácidos no conservados del C-terminal en la secuencia de SlfF no alteran su actividad lítica.
- Dentro de la secuencia de SlfF hay una región fundamental para su interacción con FlgJ, dicha región es fundamental para su función de transglicosilasa lítica flagelar pues le permite crear un hueco para el paso del flagelo.
- Las secuencias de transglicosilasas líticas encontradas en contextos genéticos flagelares se agrupan de forma específica filogenéticamente, esto aún en presencia de otras transglicosilasas líticas.

Perspectivas

- Caracterizar la mutante SltF Δ 23 para determinar si dicho fragmento contiene el sitio preciso de interacción, ya que la mutante SltF Δ 47 contiene dos construcciones, las cuales al encontrarse por separado se observa que solamente una de ellas complementa el fenotipo de nado y la otra construcción no lo hace (SltF Δ 24 y SltF Δ 23 respectivamente), sería interesante estudiar a la mutante SltF Δ 23 y determinar si también es incapaz de retener a FlgJ en ensayos *in vitro* e *in vivo*.
- Realizar ensayos de *Far Western* y de doble híbrido en levadura con la finalidad de confirmar independientemente los resultados aquí obtenidos. Confirmar estos resultados fortalecería la propuesta de que en la secuencia de SltF existe una región específica y fundamental para su interacción con FlgJ.
- Determinar experimentalmente que SltF es una transglicosilasa lítica demostrando que la catálisis que esta enzima realiza es independiente a la molécula de agua.
- Es evidente que las mutantes SltF Δ 47 y SltF Δ 95 conservan su actividad de enzimas líticas, sin embargo, sería interesante determinar la cinética enzimática de cada una de ellas y compararlas con la cinética de SltF silvestre.
- Dado que los detalles que regulan la actividad lítica de SltF son aún desconocidos, sería importante analizar la actividad enzimática de SltF en presencia de la proteína más distal del eje, pues en el sistema de secreción tipo III se observó que la transglicosilasa lítica propia del sistema aumenta su actividad enzimática hasta 10 veces en presencia de la proteína estructural del eje.
- Dado que FlgJ en *S. enterica* y algunas otras bacterias es bifuncional se podría construir una proteína quimérica en *R. sphaeroides* fusionando el gen *flgJ* monofuncional con *sltF* y determinar si dicha fusión es funcional, es decir si permite el ensamblaje del flagelo.
- La proteína SltF aquí utilizada está codificada por uno de los genes del flagelo 1, sin embargo esta parece no ser la única transglicosilasa lítica flagelar presente en el genoma de *R. sphaeroides*, pues en los genes que codifican para el flagelo 2 existe también un gen que por secuencia se identifica como una transglicosilasa lítica por lo que sería sumamente interesante caracterizarla.

- Identificar y determinar con precisión las firmas de los motivos consenso característicos para las transglicosilasas líticas flagelares. Es necesario analizar un mayor número de secuencias de transglicosilasas líticas putativas flagelares para así poder determinar los detalles característicos de las transglicosilasas líticas presentes en los sistemas flagelares que requieren de ellas para penetrar la pared celular.
- Analizar la secuencia de aminoácidos de las transglicosilasas líticas flagelares exportadas por vía independiente a la flagelar (como SltF de *R. sphaeroides*) y en caso de que existieran regiones poco conservadas compararlas con el C-terminal de SltF para determinar si existe un región similar para poder localizarlas con su respectivas chaperonas de andamiaje (FlgJ).

Referencias

1. Armitage J.P. (1999) Bacterial Tactic Responses. *Adv Microb Physiol* **41**:229-289.
2. Hottes A.K. Freddolino P.L. Khare A. Donnell Z.N. Liu J.C. and Tavazoie S. (2013) Bacterial adaptation through loss of function. *PLoS Genet* **9**(7):3617.
3. Apel D. and Surette M.G. (2007) Bringing order to a complex molecular machine: The assembly of the bacterial flagella. *Biochim Biophys Acta* **1778**(9):1851-1858.
4. Guttenplan S.B. Shaw S. and Kearns D.B. (2012) The cell biology of peritrichous flagella in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **87**(1):211-229.
5. Shin-Ichi Aizawa. (2014) The Flagellar world. Prefectural University of Hiroshima. Academic Press. *Elsevier*.
6. Evans L.D. Hughes C. and Fraser G.M. (2014) Building a flagellum outside the bacterial cell. *Trends Microbiol* **14**:1118-1125.
7. Rüdiger Schmitt. (2003) Helix Rotation Model of the Flagellar Rotary Motor. *Biophys J* **85**(2):843-852.
8. Jarell K.F. and McBride M.J. (2008) The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol* **6**(6):466-476.
9. Jones J.C. and Macnab R.M. (1990) Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **212**:377-378.
10. Ueno T. Oosawa K. and Aizawa S. (1992) M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF. *J Mol Biol* **227**(3):672-677.
11. Francis N.R. Irikura V.M. Yamaguchi S. DeRosier J.D. and Macnab R.M. (1992) Localization of the *Salmonella typhimurium* flagellar switch protein FliG to the cytoplasmic M-ring face of the basal body. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(14):6304-6308.
12. Saijo-Hamano Y. Uchida N. Namba K. and 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.
13. Nambu T. and Kutsukake K. (2000) The *Salmonella* FlgA protein, a putative periplasmic chaperone essential for flagellar P ring formation. *Microbiology* **146**(5):1171-1178.

14. Macnab M.R. (2003) How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* **57**:77-100.
15. Chevance F.F. Takahashi N. Karlinsey J.E. Gnerer J. Hirano T. Samudrala R. Aizawa S. and Hughes K.T. (2007) The mechanism of outer membrane penetration by the eubacterial flagellum and implications for spirochete evolution. *Genes Dev* **21**: 2326-2335.
16. Morimoto Y.V. and Minamino T. (2014) Structure and Function of the Bi-Directional Bacterial Flagellar Motor. *Biomolecule*. **4**(1):217-234.
17. Sato K. and Homma M. (2000) Functional reconstitution of the Na (+)-driven polar flagellar motor component of *Vibrio alginolyticus*. *J Biol Chem* **275**(8):5718-5722.
18. Zhou J. Lloyd S.A. and Blair F.D. (1998) Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:6436-6441
19. Braun T.F. Al-Mawsawi L.Q. Kojima S. and Blair D.F. (2004) Arrangement of Core Membrane Segments in the MotA/MotB Proton-Channel Complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **43**:35-45.
20. Samatey F.A. Matsunami H. Imada K. Nagashima S. Shaikh T.R. Thomas D.R. Chen J.Z. Derossier D.J. Kitao A. and Namba K. (2004) Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. *Nature* **431**(7012):1062-1068.
21. Takanori H. Shigueru Y. Oosawa K. and Aizawa S.I. (1994) Roles of FliK and FlhB in Determination of Flagellar Hook-Length in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**(17):5439-5449.
22. Wagenknecht T. DeRosier, D. J. Aizawa S.I. and Macnab R. M. (1982) Flagellar hook structures of *Caulobacter* and *Salmonella* and their relationship to filament structure. *J Mol Biol* **162**:69-87.
23. Aizawa S.I. Dean G.E. Jones C.J. Macnab R.M. and Yamaguchi S. (1985) Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **161**(3):836-849.
24. Moriya N. Minamino T. Imada K. and Namba K. (2011) Genetic analysis of the bacterial hook-capping protein FlgD responsible for hook assembly. *Microbiology* **157**(5):1354-1362.

25. Ikeda T. Homma M. Iino T. Asakura S. and Kamiya R. (1987) Localization and stoichiometry of hook-associated proteins within *Salmonella typhimurium* flagella. *J Bacteriol* **169**(3):1168-1173.
26. Homma M. and Iino T. (1985) Locations of hook-associated proteins in flagellar structures of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **162**(1):183-189.
27. Turner L. Ryu W.S. and Berg H. (2000) Real-Time Imaging of Fluorescent Flagellar Filament. *J Bacteriol* **182**(10):2793-2801.
28. Yonekura K. Maki-Yonekura S. and Namba K. (2003) Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* **424**(6949):643-650.
29. Beatson S.A. Minamino T. and Pallen M.J. (2006) Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure. *Trends Microbiol* **14**:151-155.
30. Yonekura K. Maki S. Morgan D.G. DeRosier D.J. Vonderviszt F. Imada K. and Namba K. (2000) The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science* **290**(5499):2148-2152.
31. Macnab R.M. (2004) Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochimica et Biophysica Acta* **1694**:207-217.
32. Williams A.W. Yamaguchi S. Togashi F. Aizawa S.I. Kawagishi I. and Macnab R.M. (1996) Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **178**(10):2960-2970.
33. Minamino T. Morimoto Y.V. Hara N. and Namba K. (2011) An energy transduction mechanism used in bacterial flagellar type III protein export. *Nature Communications* **2**(475):doi: 10.1038/ncomms1488.
34. Minamino T. González-Pedrajo B. Kihara M. Namba K. and Macnab R.M. (2003) The ATPase *FliI* can interact with the type III flagellar protein export apparatus in the absence of its regulator, *FliH*. *J Bacteriol* **185**(13):3983-88
35. Ibuki T. Uchida Y. Hironaka Y. Namba K. and Minamino T. (2013) Interaction between *FliJ* and *FlhA*, Components of the Bacterial Flagellar Type III Export Apparatus. *J Bacteriol* **195**(3):466-473.
36. Minamino T. Chu R. Yamaguchi S. and Macnab R.M. (2000) Role of *FliJ* in Flagellar Protein Export in *Salmonella*. *J Bacteriol* **182**(15):4207-4215.

37. Minamino T. and Namba K. (2008) Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature* **451**(25):485-489.
38. Chilcott G.S. and Hughes K.T. (2000) Coupling of Flagellar Gene Expression to Flagellar Assembly in *Salmonella enterica* Serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(4):694-708.
39. Erhardt M. Mertens M.E. Fabiani F.D. and Kelly T. Hughes. (2014) ATPase-Independent Type-III Protein Secretion in *Salmonella enterica* *PLoS Genetics* **10**(11): e1004800.
40. Anderson J.K. Smith T.G. and Hoover T.R. (2010) Sense and sensibility: flagellum-mediated gene regulation. *Trends Microbiol* **18**(1):1-17
41. Shin-ichi Aizawa. (1996) Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology* **19**(1):1-5.
42. González-Pedrajo B. and Dreyfus G. Motilidad, biogénesis flagelar y quimiotaxis bacteriana. *BEB* **18**(4):142-52.
43. Hamer R. Chen P.Y. Armitage J.P. Reinert G. and Deane C.M. (2010) Deciphering chemotaxis pathways using cross species comparisons. *BMC Syst Biol* **4**:3.
44. Mackenzie C. Choudhary M. Larimer F.W. Predki P.F. Stilwagen S. Armitage J.P. Barber R.D. Donohue T.J. Hosler J.P. Newman J.E. Shapleigh J.P. Sockett R.E. Zeilstra-Ryalls J. and Kaplan S. (2001) The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Photosynthesis Research* **70**:19-41.
45. Vega-Baray B. Domenzain C. Rivera A. Alfaro-López R. Gómez-César E. Poggio S. Dreyfus G. and Camarena L. (2015) The Flagellar Set Fla2 in *Rhodobacter sphaeroides* Is Controlled by the CckA Pathway and Is Repressed by Organic Acids and the Expression of Fla1. *J Bacteriol* **197**(5):833-47.
46. Fabela S. Domenzain C. De la Mora J. Osorio A. Ramirez-Cabrera V. Poggio S. Dreyfus G. and Camarena L. (2013) A distant homologue of the FlgT protein interacts with MotB and FliL and is essential for flagellar rotation in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **195**(23):5285-96.
47. Armitage J.P. Pitta T.P. Vigeant M.A. Packer H.L. and Ford R.M. (1999) Transformations in flagellar structure of *Rhodobacter sphaeroides* and possible relationship to changes in swimming speed. *J Bacteriol* **181**(16):4825-4833.

48. González-Pedrajo B. de la Mora J. Ballado T. Camarena L. and Dreyfus G. (2002) Characterization of the *flgG* operon of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 and its role in flagellum biosynthesis. *Biochimica et Biophysica* **159**:55-63.
49. González-Pedrajo B. Ballado T. Campos A. Sockett R.E. Camarena L. and Dreyfus G. (1997) Structural and Genetic Analysis of a Mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 Deficient in Hook Length Control. *J Bacteriol* **179**(21):6581-6588.
50. Poggio S. Abreu-Goodger C. Fabela S. Osorio A. Dreyfus G. Vinuesa P. and Camarena L. (2007) A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **189**(8):3208-3216.
51. Waldemar V. Blanot D. and de Pedro M.A. (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 149–167.
52. Willey, Sherwood and Woolverton. (2008) *Microbiología de Prescott, Harley y Klein*. Séptima edición. McGrawHill.
53. Typas A. Banzhaf M. Gross C.A. and Vollmer W. (2012) From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol* **10**:123-136.
54. García-Gómez E. and González-Pedrajo B. (2011) Transglicosilasas Líticas Asociadas A Los Sistemas de Secreción En Bacterias Gram Negativas. *REB* **30**(2):45-55.
55. Scheurwater E. Reid W.C. and Clarke A.J. (2007) Lytic transglycosylases: Bacterial space-making autolysins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**(2008):586-591.
56. Uehara T. and Bernhardt T.G. (2011) More than just lysins: peptidoglycan hydrolases tailor the cell wall. *Curr Opin Microbiol* **14**(6):689-703.
57. Holtje J.V. (1996) Lytic transglycosylases. *Lysozymes Model Enzymes in Biochemistry and Biology*. *EXS* **75**:425-429.
58. Blackburn N.T. and Clarke A.J. (2001) Identification of Four Families of Peptidoglycan Lytic Transglycosylases. *J Mol Evol* **52**:78–84.

59. Nambu T. Inagaki Y. and Kutsukake K. (2006) Plasticity of the domain structure in FlgJ, a bacterial protein involved in flagellar rod formation. *Genes Genet Syst* **81**:381-389.
60. Nambu T. Minamino T. Macnab R.M. and Kutsukake K. (1999) Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **181**:1555-1561.
61. Herlihey F.A. Moynihan P. J. and Clarke A.J. (2014) The Essential Protein for Bacterial Flagella Formation FlgJ Functions as a β -N-Acetylglucosaminidase. *J Biol Chem* **289**:31029-31042.
62. Hirano T. Minamino T. and Macnab R.M. (2001) The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase. *J Mol Biol* **312**(2):359-369.
63. de la Mora J. Ballado T. González-Pedrajo B. Camarena L. and Dreyfus G. (2007) The flagellar muramidase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **189**:7998-8004.
64. de la Mora J. Osorio-Valeriano M. González-Pedrajo B. Ballado T. Camarena L. and Dreyfus G. (2012) The C Terminus of the Flagellar Muramidase SltF Modulates the Interaction with FlgJ in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **194**: 4513-4520.
65. Ausubel F.M. R. Brent E. Kingston D.D. Moore J.G. Seidman J.A. Smith and Struhl. (1987) Current protocol in molecular biology.
66. Simon R. Prierer U. and Puhler A. (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/technology* **1**:37-45.
67. Sockett R.E. and Armitage J.P. (1991) Isolation, characterization, and complementation of a paralyzed flagellar mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8. *J Bacteriol* **173**(9):2786-2790.
68. Sambrook, Joseph and Russell D.W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
69. Sistro W.R. (1960) A requirement for sodium in the growth of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J Gen Microbiol* **22**:778-785.

70. Keen N.T. Tamaki S. Kobayashi D. and Trollinger D. (1988) Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* **70**(1):191-197.
71. Davis J. Donohue T.J. and Kaplan S. (1988) Construction, characterization and complementation of a Puf-mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **170**(1):320-329.
72. Peterson G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**(2):346-356.
73. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259):680-685.
74. Towbin H.T. Staehelin T. and Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**(9):4350-4354.
75. Becktel W.J. and Basse W.A. (1985) A lysoplate assay for *Escherichia coli* cell wall-active enzymes. *Anal Biochem* **150**:258-263.
76. Burgess R.R. (2009) Chapter 17. Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. *Methods in Enzymology* **463**:259-282.
77. Wessel D. and Flugge U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**(1):141-143.
78. Abdala D. A. Ciria R. and Merino E. GeConT 3: gene context analysis for orthologous proteins, conserved domains and metabolic pathways.
79. Bendsten J.D. Nielsen H. Von Heijne G. and Brunak S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**(4):783-785.
80. Edgar R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acid Res* **32**(5):1792-1797.
81. García-Gómez E. Espinosa N. de la Mora J. Dreyfus G. and González-Pedrajo B. (2011) The muramidase EtgA from enteropathogenic *Escherichia coli* is required for efficient type III secretion. *Microbiology* **4**:1145-1160.

82. Burkinshaw B.J. Deng W. Lameignère E. Wasney G.A. Zhu H. Worrall L.J. Finlay B.B. and Strynadka N.C. (2015) Structural Analysis of a Specialized Type III Secretion System Peptidoglycan-cleaving Enzyme. *J Biol Chem* **290**(16):10406-10417.
83. Fujii T. Kato T. and 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.
84. Zhang K. Tong B.A. Liu J. and 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.
85. Mackenzie C. Eraso J.M, Choudhary M. Roh J.H. Zeng X. Bruscella P. Puskás A. and Kaplan S. (2007) Postgenomic Adventures with *Rhodobacter sphaeroides*. *Annual Review of Microbiology* Vol. **61**:283-307.
86. Kazmierczak B.I. and Hendrixson D.R. (2013) Spatial and numerical regulation of flagellar biosynthesis on polarly flagellated bacteria. *Molecular Microbiology* **88**(4): 655-663.