

152
29^o



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA
FLAGELINA DE RHODOBACTER
SPHAEROIDES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A

MARIANA PEIMBERT TORRES



DIRECTOR DE TESIS GEORGES DREXIS CORTES



MEXICO, D. F.

1996

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Estudio sobre la estructura de la flagelina de *Rhodobacter sphaeroides*.

realizado por Mariana Pelmbert Torres

con número de cuenta 8923027-1, pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Georges Dreyfus Cortes

Propietario Dra. Georgina Regina Garza Ramos Martínez

Propietario Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

Suplente Dr. Alfonso Miguel Torre Blanco

Suplente M. en IBB. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid

Congreso Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena

El presente trabajo se realizó en el laboratorio y bajo la dirección del Dr. Georges Dreyfus Cortés, en el Departamento de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, con el apoyo de CONACyT (0817-N9110) y DGAPA (IN-204595).

A Galo

Agradecimientos

Deseo agradecer al Dr. Georges Dreyfus por haber aceptado ser mi director de tesis y por todo el apoyo que me brindó durante la realización de la misma. También quiero agradecerle el haberme iniciado en la investigación.

Para la realización del trabajo experimental conté con el apoyo incondicional de Georgina Garza que me enseñó a usar el espectrofotómetro de dicroísmo circular y de Jorge Ramírez quien me reveló los misterios del microcalorímetro.

Agradezco la confianza que me mostró el Dr. Antonio Peña al darme acceso al uso del microcalorímetro.

Los profesores Dra. Georgina Garza, Dr. Alejandro Fernández, Dr. Alfonso Torre Blanco y M. en IIB. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos fungieron como sinodales. Su colaboración en la lectura y discusión de las ideas planteadas en esta tesis ayudaron a mejorar considerablemente el contenido de la misma.

Las fotografías del microscopio electrónico fueron obtenidas en la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular, UNAM por Jorge Sepúlveda.

Agradezco la ayuda técnica de la QFB. Teresa Ballado Nava y la Biol. Marcela Sosa Garrocho.

A lo largo de estos tres años tuve el privilegio de contar con el apoyo y amistad de: Bertha, Eugenia, Hilario, Ernesto, Tere, Marcela, Gerardo, Edgar y Lety (miembros del H.H.H. Lab. 322N).

Son muchos los amigos que con su cariño me han ayudado. Si bien la lista es demasiado larga no he podido dejar de mencionar a Tata, Mónica, Leo y Erika. Gracias también a Canek, Cuauhtémoc y Benji por su trabajo sucio.

Quiero agradecer muy especialmente a toda mi familia y a mis maestros.

Durante mis estudios de licenciatura gocé de una beca de Fundación UNAM y otra de DGAPA.

Introducción	2
Estructura y función del flagelo	3
Organización y regulación génica	10
Ensamblaje	13
Quimiotaxis	17
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> y su flagelo	20
Objetivos	24
Materiales y métodos	25
Medios de cultivo	25
Siembra de bacterias	27
Purificación de flagelina de <i>R. sphaeroides</i>	28
Despolimerización de los filamentos	29
Determinación de la concentración de proteína	29
Electroforesis de proteínas	30
Preparación de anticuerpos policlonales	32
Inmunorreplica tipo western	32
Calorimetría	33
Espectroscopía de absorción	34
Espectroscopía de dicroísmo circular	34
Otros procedimientos	35
Resultados	36
Aislamiento de la flagelina de <i>R. sphaeroides</i>	36
Despolimerización de los filamentos	39
Calorimetría diferencial de barrido	39
Espectro de absorción en el UV	43
Elipticidad en función de la temperatura	43
Dicroísmo circular	48
Discusión	48
Conclusiones y perspectivas	54
Apéndice (dicroísmo circular)	56
Bibliografía	59

Abreviaturas¹

AdoMet	s-adenosilmetionina
ATP	adenosín-5'-trifosfato
BCA	ácido bicinconínico
cAMP	adenosín-5'-monofosfato cíclico
cAMP/CAP	proteína activadora de catabolismo
CCW	en contra de las manecillas del reloj (counter clock wise)
CD	dicroísmo circular
CW	a favor de las manecillas del reloj (clock wise)
ΔC_p	cambio en la capacidad calorífica
ΔH	cambio en la entalpía
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
IgG	inmunoglobulinas gama
K'	constante de equilibrio
PC	computadora personal
SDS	detergente dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
TTBS	amortiguador Tris 20mM pH 7.5, NaCl 500mM, Tween-20 0.05%

¹ Las abreviaturas provienen del inglés.

Abreviaturas¹

AdoMet	s-adenosilmetionina
ATP	adenosín-5'-trifosfato
BCA	ácido bicinconínico
cAMP	adenosín-5'-monofosfato cíclico
cAMP/CAP	proteína activadora de catabolismo
CCW	en contra de las manecillas del reloj (counter clock wise)
CD	dicroísmo circular
CW	a favor de las manecillas del reloj (clock wise)
ΔC_p	cambio en la capacidad calorífica
ΔH	cambio en la entalpía
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
IgG	inmunoglobulinas gama
K'	constante de equilibrio
PC	computadora personal
SDS	detergente dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
TTBS	amortiguador Tris 20mM pH 7.5, NaCl 500mM, Tween-20 0.05%

¹ Las abreviaturas provienen del inglés.

Introducción

La mayoría de las bacterias son móviles, ya que la capacidad de dirigirse hacia ambientes más favorables es una ventaja adaptativa. Existen diferentes tipos de movilidad procarionte de los cuales el nado a través del flagelo es el más frecuente. El número de flagelos y su localización varía mucho de especie a especie, sin embargo el mecanismo de nado es básicamente el mismo: el flagelo rota (Berg *et al.*, 1973).

Las bacterias pueden ser peritricas cuando tienen flagelos distribuidos en todo el cuerpo celular, lofotricas cuando tienen varios flagelos que surgen en un extremo de la célula o polares cuando tienen un flagelo en un extremo.

Las bacterias flageladas no nadan de manera aleatoria, nadan hacia donde aumenta la concentración de nutrientes (atrayentes) tales como azúcares o aminoácidos. Se alejan de los compuestos químicos nocivos (repelentes) y pueden integrar estímulos muy diversos para responder de la mejor forma (Alberts *et al.*, 1989); es decir las bacterias son quimiotácticas (Figura 1).

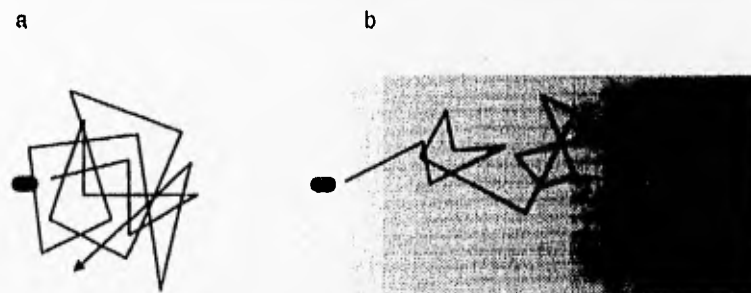


Figura 1. Esquema de la trayectoria de nado de una bacteria. **a** En ausencia de un quimioefector la bacteria se mueve azarosamente. **b** En presencia de un atrayente, la célula se desliza por más tiempo al acercarse al atrayente (modificado de Armitage, 1992).

El desplazamiento neto de la bacteria está relacionado con la dirección en la que rota el flagelo, en general si éste da vueltas en contra de las manecillas de reloj (CCW) entonces la bacteria avanza (Figura 2a), mientras que si rota a favor de las manecillas del reloj (CW) la bacteria se detiene y se reorienta a través de movimiento Browniano (Figura 2b). En algunas especies como *R. sphaeroides* la reorientación se da al detenerse el flagelo (Armitage, 1992). En un ambiente homogéneo la bacteria se reorienta constantemente al cabo de unos pocos segundos; al acercarse a un atrayente la bacteria disminuye la frecuencia de reorientación mientras que al alejarse ésta aumenta, dando como resultado el desplazamiento neto hacia el atrayente (Springer *et al.*, 1979)

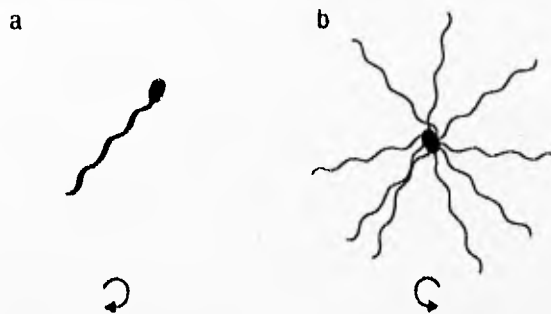


Figura 2. Esquema de la rotación bidireccional de los flagelos de *S. typhimurium* y *E. coli*. a Al rotar CCW se forma una trenza que sirve como *propela* y la bacteria se desplaza. b Al rotar CW la bacteria se reorienta (Alberts *et al.*, 1992).

Estructura y función

El flagelo se divide en tres partes: el filamento, el gancho y el cuerpo basal. El filamento y el gancho están fuera de la célula, mientras que el cuerpo basal está unido a las membranas interna y externa. El flagelo es una de las estructuras procariontes más complejas, tiene más de 20 polipéptidos distintos y

miles de subunidades (Figura 3). Para hacer más sencillo el estudio de esta estructura la nomenclatura de las proteínas proviene de los nombres de los genes², y estos a su vez están dados por la localización de los genes en el cromosoma.

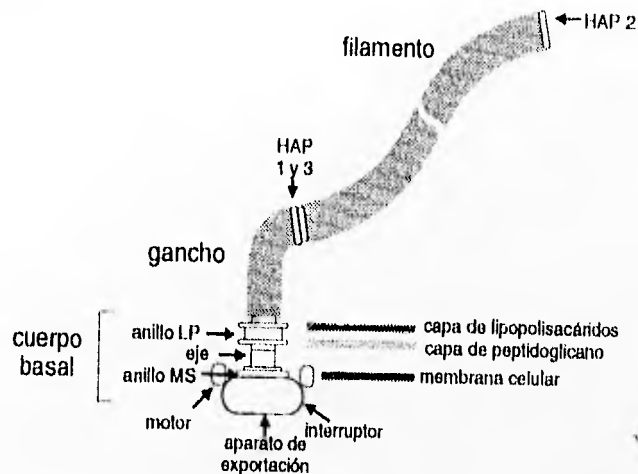


Figura 3. Representación esquemática del flagelo de *S. typhimurium*. Se muestran las tres estructuras básicas del flagelo: el filamento constituye la propela de la célula. El gancho funciona como conector entre el filamento y el cuerpo basal. El cuerpo basal sirve para anclar al flagelo en la célula. (Modificado de Macnab, 1992).

Filamento

El filamento es la porción más grande del flagelo, mide alrededor de 10 μm de largo por 24 nm de diámetro y tiene aproximadamente 20 000 subunidades proteicas. En la mayoría de las especies estudiadas está constituido por una sola proteína: la flagelina.

² cuando se hace referencia a la proteína el nombre se escribe con mayúsculas, mientras que cuando se trata del gene el nombre se escribe en cursivas.

El filamento presenta un arreglo tubular teniendo 5.5 monómeros de flagelina por vuelta (Figura 4), como resultado existen 11 líneas de monómeros orientadas casi paralelas al eje del filamento, a estas líneas se les ha denominado protofilamentos. Cada subunidad está inclinada 45° en relación al eje del filamento formando así una hélice levógira macroscópica que funciona como *propela* (O'Brien *et al.*, 1972).



La hélice macroscópica del filamento puede variar en amplitud y longitud, incluso existen formas dextrógiras (Asakura, 1972). Estas formas diferentes se pueden observar

Figura 4. Arreglo helicoidal de los monómeros de flagelina en el filamento, se muestran las 5.5 unidades por vuelta y como la doceava se empalma con la primera.

in vitro modificando el pH, la fuerza iónica, la temperatura, etc. (Kamiya *et al.*, 1976) e *in vivo* al cambiar la dirección de rotación (Macnab *et al.*, 1977).

Calladine (1978) propuso que la flagelina puede adquirir dos conformaciones denominadas R y L. Ambas conformaciones están presentes en el filamento pero en cada protofilamento todas las subunidades se encuentran en el mismo estado; la coexistencia de protofilamentos en diferentes estados produce estrés dentro de la estructura, lo cual causa la formación de las diferentes hélices macroscópicas. Así el polimorfismo está dado por el número de protofilamentos que se encuentran en la conformación R y L.

Mediante estudios de microcalorimetría se ha observado que la flagelina tiene tres dominios y forma un cuarto al polimerizarse (Fedorov *et al.*, 1984). Estas observaciones han sido complementadas con espectroscopía de dicroísmo circular (CD) a partir de la cual se ha inferido que la flagelina monomérica tiene una estructura secundaria de tipo $\alpha\beta^3$ y que el filamento tiene una mayor proporción de α -hélices (Uratani *et al.*, 1972 y Vonderviszt *et al.*, 1990). Utilizando fragmentos proteolíticos Vonderviszt demostró que los segmentos N y C-terminal se organizan en un dominio tipo α durante la polimerización y sugirió que este dominio es el que se modifica para dar lugar a los distintos polimorfismos (Vonderviszt *et al.*, 1991 y Alzawa *et al.*, 1990).

Los grupos de Namba y De Rosier utilizaron la difracción de rayos X y la reconstrucción de imágenes respectivamente, y modelaron la estructura cuaternaria del filamento. En este modelo las regiones terminales de la flagelina dan al canal interior, mientras que la región central está expuesta al medio y por lo tanto constituye



Figura 6. Modelo de la estructura del filamento de *S. typhimurium* determinado por difracción de rayos X. Arriba se observa la organización de los protofilamentos (casi paralelos al eje del filamento). Abajo se muestra un corte transversal donde se observa la disposición de los monómeros (Namba *et al.*, 1989).

³ es decir tiene dominios con estructura secundaria de α -hélices y hojas β -plegadas

los epítopes (Trachtenberg *et al.*, 1987 y Namba *et al.*, 1989) (Figura 5). La región central de la flagelina es muy variable, lo cual ayuda a las bacterias entéricas a evadir la detección del sistema inmune del hospedero.

Gancho

El gancho es un conector flexible que permite que la torsión del motor se redirija hacia donde sea necesario (Schuster *et al.*, 1994b) (Figura 3). En las bacterias peritricas el gancho permite la formación de la trenza de flagelos que funciona como propela. *S. typhimurium* y *E. coli* tienen un gancho de forma curva de 55 nm de largo por 20 nm de diámetro; forma una hélice dextrógira de simetría pseudo-hexagonal con un canal central de 2.5 nm de diámetro, esta estructura está constituida de ~120 copias de una sola proteína FigE.

La proteína FigE y la flagelina (FliC) tienen propiedades en común: la misma simetría de 11 protofilamentos, ambas pueden autoensamblarse *in vitro*, presentan transiciones polimórficas y sus regiones terminales se ordenan durante la polimerización. Sin embargo, sus secuencias de aminoácidos no se parecen, además la estructura secundaria de FigE es predominantemente de hojas β -plegadas (Vonderviszt *et al.*, 1995).

Cuerpo basal

El cuerpo basal es la estructura que ancla al flagelo a la célula. Está compuesto por tres anillos y un eje. A diferencia del filamento y el gancho, tiene una simetría cilíndrica (Figura 6). Esta estructura está localizada en las membranas interna y externa. El cuerpo basal parece ser simplemente la suma

de sus partes ya que su disociación por pH ácido ocurre en pasos discretos, lo cual indica que los componentes del cuerpo basal son estructuralmente independientes (Sosinsky *et al.*, 1992).

El anillo M-S (membranal y supramembranal) está situado a nivel de la membrana citoplásmica y por afuera de la misma, está compuesto de una sola proteína, FlhF y es una estructura que gira pasivamente. El anillo P (peptidoglicano) está integrado a la capa de peptidoglicano

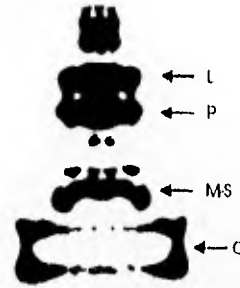


Figura 6. Imagen del cuerpo basal reconstruida a partir de micrografías electrónicas. Se aprecian los anillos C, M-S, P y L rodeando al eje (Sosinsky *et al.*, 1992).

de la bacteria, mientras que el anillo L (lipopolisacáridos) pertenece a la capa de lipopolisacáridos, ambos anillos forman un cilindro que le permite al eje rotar libremente. Cada uno de los anillos está compuesto por 26 subunidades (Jones *et al.*, 1990). Las bacterias Gram-positivas carecen de los anillos L y P.

Existe un eje que une al anillo M-S con el gancho, está compuesto por cuatro proteínas y se divide en dos regiones estructurales: la proximal que tiene un diámetro de 13 nm y la distal de 18 nm (Stalmeyer *et al.*, 1989) (Figura 6).

Interruptor y motor

El motor flagelar es muy parecido a los motores creados por el hombre ya que rota libremente. Este motor es energizado directamente por el gradiente

electroquímico de protones creado en la membrana interna⁴ (Khan *et al.*, 1980). Cada revolución consume 1200 protones y su velocidad máxima es de 300 Hz (Meister *et al.*, 1987).

Las proteínas que generan la torsión son MotA, MotB, FliG, FliM y FliN. El estator está formado por MotA y MotB que son proteínas intramembranales y constituyen al canal de protones. FliG, FliM y FliN forman el anillo C (citoplásmico) son el interruptor del motor (Figura 6), FliG interactúa con el anillo M-S (Francis *et al.*, 1992) mientras que FliM interactúa directamente con CheY (Welch *et al.*, 1993), no está claro si todo el interruptor forma parte del rotor o si FliN y FliM son parte del estator.

Las características físicas más importantes del motor son:

- Está compuesto por al menos ocho unidades generadoras de fuerza independientes (Blair *et al.*, 1988).
- En algunas especies (*S. typhimurium*) la rotación es bidireccional (puede rotar en sentido CW y CCW).
- En las bacterias a las cuales se les sujeta el flagelo (muchas veces) la eficiencia es del 95% y el motor opera a torsión constante.
- En las bacterias libres la eficiencia es del 5% y opera a velocidad constante (velocidad máxima) (Meister *et al.*, 1989) (Figura 7).

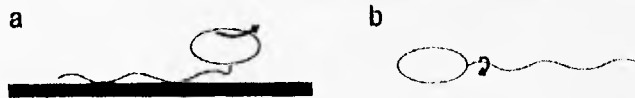


Figura 7. Formas de medir la rotación del flagelo. a bacterias sujetadas por el flagelo (*tethered*), b bacterias libres.

⁴ Los organismos que viven en medios básicos utilizan gradientes de sodio.

A partir de estas y otras características se han diseñado diversos modelos, uno de los más sencillos es el de Berry (1993). En este modelo el rotor gira mediante fuerzas electrostáticas. El rotor (anillo M-S) presenta cargas negativas y positivas alrededor de su estructura cilíndrica, generando zonas de alto y bajo potencial eléctrico que interactúan directamente con el flujo de protones (Figura 8).

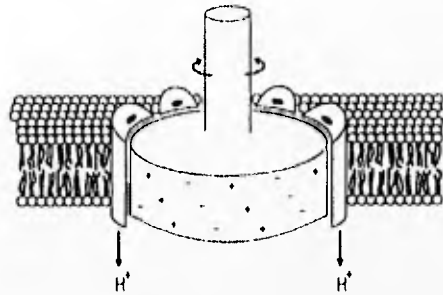


Figura 8. Modelo del motor flagelar en el cual el rotor presenta cargas positivas y negativas que al interactuar con el flujo de protones dan el movimiento al flagelo. El rotor está constituido por el anillo M-S, mientras que los canales de protones están formados por MotA y MotB (Berry 1993).

Organización y regulación génica

Los genes involucrados en la formación y en el funcionamiento del flagelo son más de 50 y se encuentran localizados en cuatro regiones del cromosoma bacteriano (Macnab, 1992).

Debido a que la estructura del flagelo es muy compleja y a su alto costo biosintético, la expresión de estos genes está altamente organizada; a este sistema de operones se le ha dado el nombre de regulón flagelar.

Los operones flagelares están divididos de acuerdo con su jerarquía transcripcional en tres clases 1, 2 y 3⁵ (Kutsukake *et al.*, 1990). La clase 1 tiene al operón maestro que es indispensable para la expresión de todos los demás operones. La clase 2 tiene los genes que forman al aparato exportador, al interruptor, al cuerpo basal y al gancho. Mientras que la clase 3 tiene los genes tardíos en expresión como lo son los de motilidad, de quimiotaxis y *flhC* que codifica para la flagelina (Tabla 1 y Figura 9).

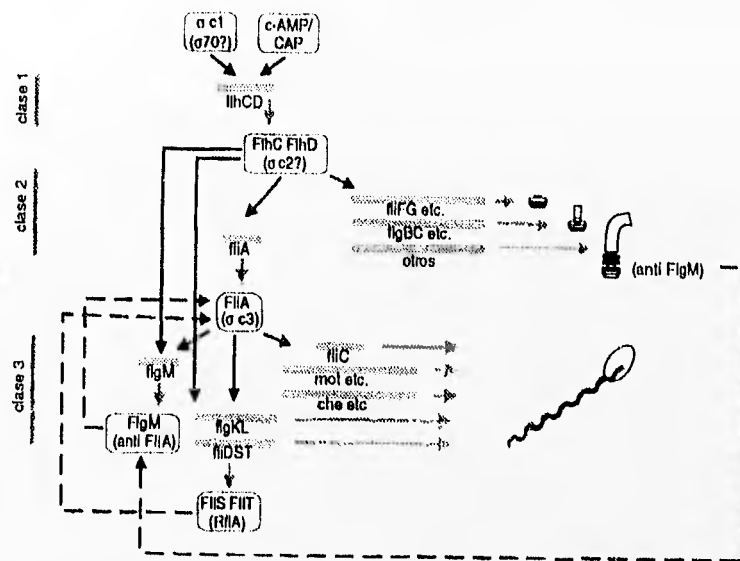


Figura 9. Esquema de la regulación génica del sistema flagelar. Se muestran las clases en las que se jerarquizan los genes según el orden de su expresión. Se indican los productos de cada gene y las estructuras que forman. La regulación positiva se señala con líneas continuas, mientras que la regulación negativa se señala con líneas punteadas (Macnab, 1992).

⁵ La clase tres se ha subdividido en 3a y 3b, debido a que la expresión de la clase 3a es dada tanto por el operón maestro como por FliA, mientras que la 3b sólo responde a FliA.

Tabla 1. Tabla de los productos génicos flagelares y sus funciones.

PRODUCTO GÉNICO	FUNCIÓN- LOCALIZACIÓN
Proteínas reguladoras	
FliC, FliD	Regulador maestro del regulón flagelar.
FliA	Factor (σ) de iniciación de la transcripción para los genes de la clase 3.
FlgM	Factor anti-FliA. Activo sólo cuando la estructura formada no ha completado el gancho.
FliS, FliT, FliD	Represores de los genes de la clase 3.
FliA	Represor del operon FliC.
Proteínas involucradas en el proceso de ensamblaje	
FliA, FliB, FliH, FliI FliP, FliQ, FliR	Posibles componentes del aparato de exportación.
FlgA	Ensamblaje del anillo P.
FlgD	Ensamblaje del gancho.
FliK	Control de la longitud del gancho.
FliB	Metilación de los residuos de lisina en la flagelina; la función de esta modificación se desconoce.
Componentes estructurales del flagelo	
FliG, FliM, FliN	Interruptor.
MotA, MotB	Componentes del estator, posiblemente canal de protones.
FliF	Anillo M-S.
FliE	Componente del cuerpo-basal, posiblemente unión al anillo M-S.
FlgB, FlgC, FlgF, FlgG	Eje.
FlgI	Anillo P.
FlgH	Anillo L.
FlgE	Gancho.
FlgK, FlgL	Unión Filamento -Gancho.
FliC, FliB	Flagelina normal y flagelina alternativa en <i>S. Typhimurium</i> .
FliD	Proteína de coronamiento.
Componentes de la transducción de señal	
CheA	Cinasa de CheY y CheB.
CheZ	Fosfatasa de CheY.
CheW	Regulador positivo de la actividad de CheA.
CheY	Regulador del interruptor, promueve la reorientación.
CheR	Metila los transductores. Adaptación a la señal.
CheB	Fosforilada desmetila los transductores. Adaptación de la señal.

Se ha propuesto que el operón maestro (*flhC-flhD*), forma un factor sigma específico que promueve la transcripción de los operones de la clase 2 y 3a. La expresión de FlhC-FlhD está regulada por el sistema de cAMP/CAP de tal forma que al disminuir los niveles de cAMP no se sintetiza el flagelo (debido a que el medio es favorable no es necesario moverse) (Komeda *et al.*, 1975).

Los genes de los operones de las clases 2 y 3 tienen una secuencia (GCCGATAA) que actúa como promotor específico para los genes flagelares (Helmann *et al.*, 1987). En la clase 2 se localiza el gene *flhA* que codifica para un factor sigma (σ^{28}) específico para la clase 3 (Arnosti *et al.*, 1989).

Existen dos mecanismos de regulación negativa que actúan sobre FlhA ambos provienen de la clase 3a. Un mecanismo es un factor anti-sigma FlgM que al unirse a FlhA impide su asociación con la RNA polimerasa (Ohnishi *et al.*, 1990), se requiere la formación correcta del gancho y el cuerpo basal para que se exporte FlgM y se libere FlhA, de tal forma que los genes de la clase 3 sólo se expresan cuando es posible utilizarlos (Losick *et al.*, 1993). El otro mecanismo está dado por los genes *flhDST* (también llamado RflA) aunque se desconoce su mecanismo se sabe que defectos en el operón aumentan la expresión de los genes de la clase 3, y que mutantes en FlhD, FlhS y FlhT incrementan la exportación de FlgM (Yokoseki *et al.*, 1995).

Ensamblaje

Existen dos reglas básicas en la construcción del flagelo, la primera es que el ensamblaje se lleva a cabo mediante la adición secuencial de monómeros. La

segunda es que la estructura crece de la parte proximal a la célula hacia la distal (Figura 10)(Alzawa, 1996). La integración del flagelo comienza al autoensamblarse FlIF creando el anillo M-S (Kubori *et al.*, 1992), al cual se le unen proteínas citoplásmicas del interruptor constituyendo el anillo C (Driks *et al.*, 1990). Se ha propuesto que es en este momento cuando se incorpora el aparato de exportación.

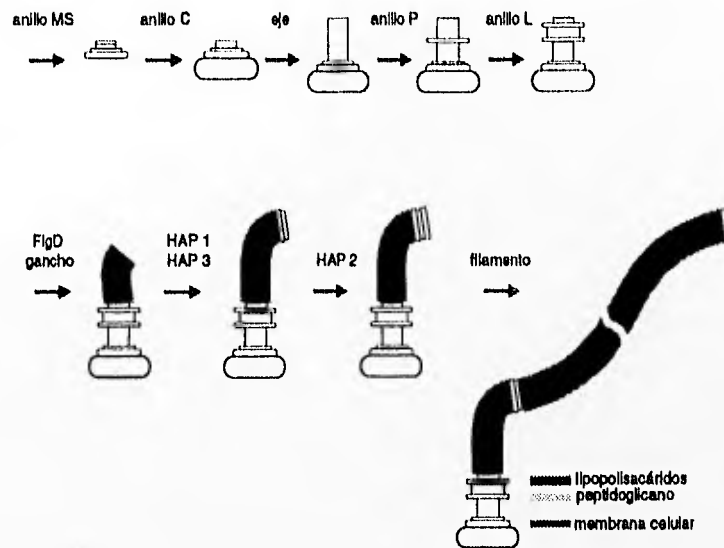


Figura 10. Esquema de las etapas sucesivas de la vía morfológica del ensamble flagelar. Se muestran las estructuras que conforman al cuerpo basal, el gancho y el filamento. El gancho y el filamento no se autoensamblan, requieren las proteínas de coronamiento FigD y HAP2 (o FlIF) respectivamente (modificado de Alzawa, 1996).

La mayoría de las proteínas flagelares no tienen la secuencia señal reconocida por el sistema Sec (principal mecanismo de exportación procarionte) en el que todas las proteínas a exportarse presentan una secuencia de

aminoácidos en el amino terminal la cual se llama señal líder. Es posible que para las proteínas del flagelo exista un sistema de exportación especial. Una de las proteínas, FliI es capaz de unir ATP por lo que se supone actúa como una proteína-translocasa que requiere de la hidrólisis de ATP; esta idea es apoyada por su homología con proteínas del sistema exportador de proteínas relacionadas con la invasividad (Dreyfus *et al.*, 1993).

Una vez instalado el sistema exportador, se ensambla el eje formado por FigB, FigC, FigF y FigG, estas proteínas se requieren simultáneamente. Posteriormente se forman el anillo P (FigI) y el anillo L (FigH), estos son los únicos componentes flagelares exportados por el sistema Sec. Se ha propuesto (Kubori, *et al.*, 1992) que al estar formado el eje, los monómeros de FigI y FigH se van acoplado alrededor del mismo, y una vez constituidos los anillos L y P la interacción con el eje se vuelve mínima permitiendo que este último gire libremente.

El gancho empieza a crecer cuando se termina de ensamblar el eje. Para la polimerización *in vivo* se requiere de la proteína de coronamiento FigD, que permanece en la punta del gancho hasta que éste alcanza una longitud predeterminada (Ohnishi *et al.*, 1994). Es claro que existe un control en la longitud del gancho ya que tiene un tamaño de 55 ± 6 nm; sobre el mecanismo de control se sabe poco, existen mutantes que tienen ganchos muy largos y de tamaños indeterminados (mutantes poligancho) las cuales corresponden a dos genes: *fliK* y *fliB*. La ausencia de FliB resulta en mutantes sin cuerpo basal,

por lo cual se supone que esta proteína forma parte del sistema exportador y es FliK la que regula directamente el tamaño del gancho (Hirano *et al.*, 1994).

Para la construcción del filamento se requieren las proteínas asociadas al gancho HAP1 y HAP3 (FigK y FigL respectivamente) y la de coronamiento HAP2 (FliD). Al igual que en el caso del gancho, la flagelina (FliC) se va incorporando al filamento en la punta del mismo, por debajo de FliD. A diferencia de FigD, HAP2 permanece en el flagelo a menos de que éste sea roto mecánicamente (Macnab, 1992). Mutantes en HAP2 dan como resultado que la flagelina se exporte al medio (Ikeda *et al.*, 1993). La función de HAP1 se desconoce, HAP3 estabiliza al filamento en condiciones de estrés haciendo que mantenga su función de *propela* (Fahrner *et al.*, 1994).

Iino (1969) ha postulado que la ruta de exportación de la flagelina es a través de un canal central en la estructura del flagelo, a pesar de que no existe una evidencia directa esta idea ha sido ampliamente aceptada. El canal ha sido identificado y caracterizado por dos técnicas: difracción de rayos X y microscopía electrónica. En la primera se ha observado un canal de 6.0 nm de diámetro lo que permite el paso de los monómeros de flagelina plegados (Namba *et al.*, 1989). Sin embargo mediante microscopía electrónica se ha calculado que el canal mide 3.0 nm de diámetro (Ruiz *et al.*, 1993) en este caso la flagelina debería estar "desdoblada" para que pueda pasar, o bien que el canal pudiera expandirse localmente (De Rosier *et al.*, 1995).

Por otro lado se ha observado que todas las proteínas axiales tienen en sus extremos héptadas de aminoácidos hidrofóbicos lo cual es característico de los *haces de α -hélices* (coiled coil), este tipo de estructura podría ser reconocida por el aparato exportador.

Quimiotaxis

El sistema de quimiotaxis es aquel que les permite a las bacterias dirigirse hacia ambientes más favorables y alejarse de ambientes tóxicos. Las bacterias sienten una gran variedad de estímulos simultáneamente, los cuales se integran temporalmente, es decir, las bacterias hacen una comparación de los estímulos actuales y pasados (Macnab *et al.*, 1972). El sistema de quimiotaxis involucra a una serie de fosforilaciones que dan como resultado la transducción de una señal química extracelular a una mecánica: el sentido de la rotación del flagelo.

La señal que desencadena el proceso de transducción es la disminución en la ocupación del receptor (salida del atrayente), información que es transmitida a los componentes quimiotácticos del citoplasma. Existen seis proteínas citoplásmicas denominadas Che (del inglés *chemotaxis*): CheA, CheB, CheR, CheW, CheY y CheZ, encargadas de transducir la señal desde el receptor hasta el motor flagelar.

A *grosso modo* la excitación quimiotáctica se da de la siguiente manera: cuando el receptor (localizado en la membrana citoplásmica) no tiene atrayente se forma el complejo receptor-CheW-CheA, lo que permite que CheA se autofosforee y que posteriormente done el fosfato a CheY; este último

componente interactúa con el interruptor flagelar causando que el flagelo gire CW y la bacteria se reorienta (Maddock *et al.*, 1993) (Figura 11).

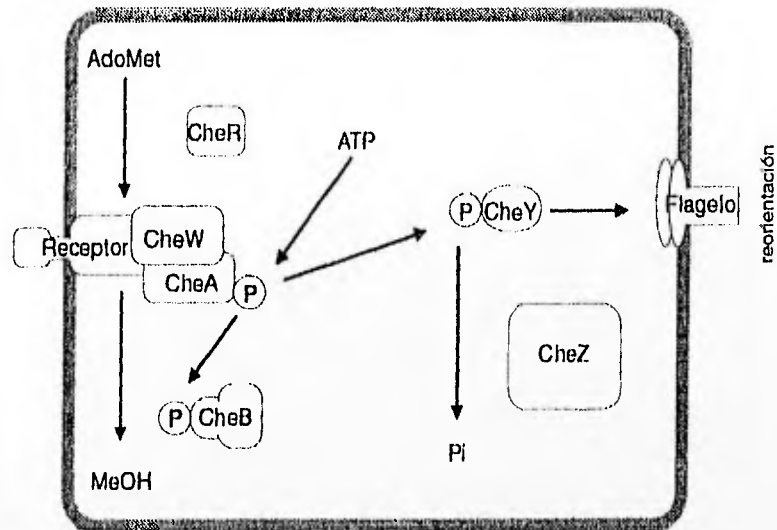


Figura 11. Esquema del sistema de la transducción de señal que media la quimiotaxis. El estímulo extracelular se transduce hacia el flagelo a través de las proteínas citoplásmicas Che. En ausencia de atrayente el receptor produce la fosforilación de CheY por CheA, lo cual ocasiona la reorientación de la bacteria. CheR y CheB regulan los niveles de metilación del receptor.

Quando hay atrayente la cadena de fosforilaciones no ocurre por lo cual el flagelo se mueve **CCW** y la bacteria continúa nadando en la misma dirección. A esta parte de la quimiotaxis se le ha denominado excitación y la respuesta desde el receptor al flagelo se da en menos de 200 ms (Segall *et al.*, 1982).

Los receptores son proteínas homodiméricas transmembranales y están localizados en parches (Parkinson, 1993). Tienen un dominio sensorial periplásmico que reconoce atrayentes y repelentes, así como un dominio

citoplásmico que interactúa con el complejo CheW-CheA. Este complejo está formado por dos monómeros de CheW y un dímero de CheA. CheA es una proteína histidina cinasa.

CheY es una cinasa que se fosforila a partir de CheA, los niveles de fosforilación de CheY determinan el sentido de rotación del flagelo. CheY se caracteriza por poder utilizar moléculas pequeñas como acetilfosfato, carbamilsulfato y fosforamidato como fuente de fosfato (Lukat *et al.*, 1992). Además de estas proteínas existe CheZ que es una fosfatasa homomultimérica que facilita la desfosforilación de CheY, lo cual permite que este sistema sea sensible en todo momento (Hess *et al.*, 1988).

Existe además un mecanismo de retroalimentación en el cual los quimiorreceptores son metilados y desmetilados. En este mecanismo intervienen las proteínas CheR y CheB. CheR es una metiltransferasa que une el grupo metilo de la *s*-adenosilmetionina (AdoMet) a un glutamato del receptor (existen de cuatro a seis sitios sujetos a metilación). CheB es una metilerasa que funciona sólo cuando es fosforilada por CheA; CheB interactúa con el receptor para regenerar el glutamato y liberar metanol (Sanders *et al.*, 1988). El receptor metilado favorece la formación del complejo receptor-CheW-CheA e indirectamente disminuye la afinidad por el atrayente.

Al aumentar la concentración de atrayente en el medio, aumenta la población de receptores metilados lo cual facilita la reorientación de la bacteria. Esto permite que exista una respuesta a los cambios de la concentración del

quimioefector en un rango de alrededor de cinco órdenes de magnitud (Segall *et al.*, 1986). A este mecanismo se le ha denominado de adaptación y a diferencia del de excitación se lleva a cabo en minutos (Figura 12).

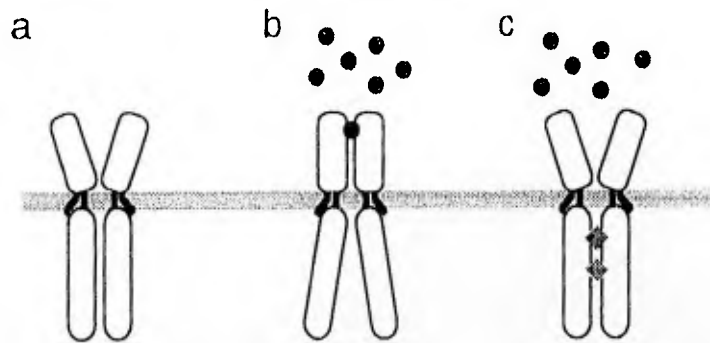


Figura 12. Esquema de la adaptación del receptor quimiotáctico. En presencia de atrayente se exponen los glutamatos de la región citoplásmica y se metila el receptor, lo que ocasiona que disminuya su afinidad por el atrayente; **a** receptor en ausencia de atrayente; **b** receptor en presencia de atrayente; **c** receptor *adaptado* en presencia de atrayente. Los rombos indican los residuos metilados que favorecen la unión del complejo ternario CheW-CheA, y los círculos representan al atrayente.

J.B. Stock (1992) basado en el análisis de la secuencia de aminoácidos del receptor, ha propuesto que al metilarse los aminoácidos glutámicos y neutralizarse las cargas de los mismos, se forma una asa de α -hélices (o *coiled coil*) que favorece la formación del complejo ternario e indirectamente disminuye la afinidad por el atrayente.

***Rhodobacter sphaeroides* y su flagelo**

R. sphaeroides pertenece al orden Rhodospirillaceae también llamado bacterias púrpuras no sulfurosas (Figura 13). Las bacterias pertenecientes a este orden son acuáticas y coexisten con organismos estrictamente

heterótrofos, viven en lagos y pantanos meromícticos (donde el fondo no se mezcla con la superficie debido a que son aguas muy calmadas) alimentados por mucha materia orgánica en descomposición: en particular habitan en el estrato profundo que es fangoso y anaeróbico, llamado el hipolimnion.



Figura 13. Micrografía electrónica de *R. sphaeroides* donde se observa el flagelo subpolar (Armitage *et al.*, 1967).

El orden Rhodospirillaceae es fotosintético, y se caracteriza por utilizar como donador de electrones compuestos como azúcares y ácidos orgánicos (succinato, piruvato, lactato, etc.). Son especies con un metabolismo muy versátil: en condiciones de luz y anaerobiosis son fotoheterótrofos; de microaerobiosis a aereobiosis en la oscuridad son heterótrofos y en anaerobiosis en la oscuridad realizan fermentación (Imhoff *et al.*, 1989).

R. sphaeroides es muy diferente de *S. typhimurium* y *E. coli* tanto en su comportamiento de nado como en su quimiotaxis. *R. sphaeroides* tiene un flagelo subpolar que gira sólo en una dirección **CW**. A pesar de que tiene un

sólo flagelo nada cuatro veces más rápido que las bacterias entéricas, su velocidad de nado es de $100 \mu\text{m s}^{-1}$, lo que equivale a 50 cuerpos celulares (Armitage *et al.*, 1987).

Sobre la estructura del flagelo de *R. sphaeroides* existen únicamente estudios preliminares, los cuales indican que el cuerpo basal el mismo número de anillos y que el gancho es recto; esto último se ha asociado con el hecho de que al ser una bacteria uniflagelada no requiere la formación de una trenza (Sackett *et al.*, 1991).

El patrón de nado es diferente al de las bacterias entéricas, el desplazamiento se da cuando el flagelo gira a favor de las manecillas del reloj (CW) y mientras que la reorientación se da cuando se detiene la rotación. Este paro cambia significativamente la estructura del filamento modificándolo de una hélice funcional de pequeña longitud y amplitud, a una hélice de gran amplitud que se encuentra retraída hacia el cuerpo celular (Armitage *et al.*, 1987) (Figura 14).

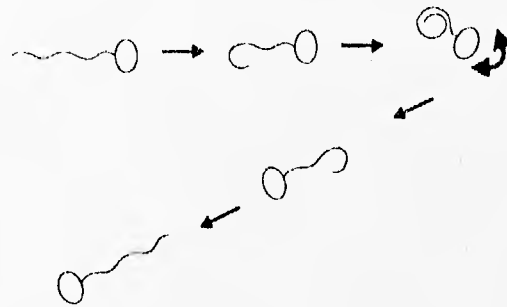


Figura 14. Esquema del patrón de nado de *R. sphaeroides*, cuando el flagelo gira CW la bacteria se desplaza y el flagelo se mantiene estirado. Cuando el flagelo deja de girar la bacteria se reorienta y el flagelo se retrae (Armitage *et al.*, 1987).

La quimiotaxis de esta bacteria ha sido muy estudiada por el grupo de Armitage. Los principales atrayentes de la bacteria son ácidos orgánicos, azúcares, amonio, potasio y rubidio, a la fecha no se han identificado repelentes. Originalmente se propuso que el mecanismo de quimiotaxis de esta bacteria no requiera de un receptor (Sockett *et al.*, 1990) y en cambio era indispensable transportar y metabolizar a los quimioefectores para que se produjera la respuesta (Ingham *et al.*, 1987 y Poole *et al.*, 1993). Sin embargo recientemente se localizaron receptores y proteínas Che (Ward *et al.*, 1995a y Ward *et al.*, 1995b). Al parecer existen dos CheY, una que interactúa con CheA y la otra que interactúa directamente con algunas rutas metabólicas.

R. sphaeroides además presenta quimioinercia, es decir modifica la velocidad de su nado sin cambio alguno en el gradiente electroquímico de protones, todo parece indicar que es una respuesta independiente de la quimiotaxis. También presenta cinesis a la luz que es ocasionada por el aumento en la fuerza protón motriz (Armitage *et al.*, 1985).

Objetivos

Mucho se ha estudiado sobre el flagelo de *E. coli* y *S. typhimurium*, por lo que se han tomado como paradigmas del sistema flagelar, sin embargo no necesariamente las características de estos organismos son las más generalizadas; *Rhodobacter sphaeroides* al tener un sólo flagelo que rota unidireccionalmente representa un sistema más simple lo cual podría resultar en un mejor modelo.

El filamento de *R. sphaeroides* se comporta muy diferente al de las bacterias peritricas ya que al detenerse la rotación se relaja el filamento flagelar cambiando significativamente: de su forma funcional, a una forma *relajada* retraída hacia el cuerpo celular (Armitage *et al.*, 1987).

Por lo anterior, este trabajo tiene como objetivo caracterizar estructuralmente la flagelina de *R. sphaeroides*. Para abordar el objetivo planteado se establecieron los siguientes objetivos particulares:

- Purificación de los filamentos.
- Monomerización de los mismos.
- Determinación del patrón de desnaturalización térmica para conocer los dominios del monómero y del polímero.
- Determinación de la estructura secundaria del monómero y del polímero mediante espectroscopía de dicroísmo circular.

Materiales y métodos

Se utilizó la cepa silvestre WS8 de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*, la cual fue amablemente donada por la Dra. Liz Sockett. La cepa se creció tanto en medio líquido como en sólido.

Medios de cultivo

Para los cultivos líquidos en condiciones fotoheterotróficas se utilizó el medio mínimo descrito por W. R. Siström en 1962, el cual fue diseñado a partir de modificaciones del medio reportado por Cohen-Bazire y colaboradores (1957). Para preparar este medio se hizo una solución concentrada (10x), que contiene la mayoría de los reactivos, y que se puede congelar por periodos prolongados de tiempo, esta solución incluye lo siguiente:

	masa (g)	concentración (mM)
Ac. Succínico	40	340
K ₂ HPO ₄	34.8	200
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0	37.8
NaCl	5.0	85
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3.0	12
Ac. Nitrilotriacético	2.0	1.05
Ac. L-Glutámico	1.0	6.7
Ac. L-Aspártico	0.4	2.5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.334	2.3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.02	0.07
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · H ₂ O	0.002	0.0016
Sol. Elementos traza	1 ml	
Sol. Vitaminas	1 ml	
H ₂ O destilada	c.b.p.	1l

Para obtener el medio 1x, se diluyó la solución anterior 1:10 y se le ajustó el pH a 7.0 con lentejas de KOH, posteriormente se esterilizó en la autoclave durante 20 minutos a 121° C y a 20 lb de presión.

Para preparar 100 ml de la solución de vitaminas 1000x se agregaron:

Ac. Nicotínico	1.0 g	80 mM
Tiamina · HCl	0.5 g	15 mM
Biotina	0.01 g	0.4 mM
H ₂ O destilada	c.b.p.	100 ml

mientras que para 100 ml de la solución de elementos traza 1000x se requirió de:

EDTA	1.675 g	45 mM
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	10.95 g	380 mM
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5.0 g	180 mM
MnSO ₄ · 7H ₂ O	1.54 g	100 mM
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.392 g	16 mM
Co (NH ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.248 g	8.5 mM
H ₃ BO ₃	0.114 g	18 mM
H ₂ O destilada	c.b.p.	100 ml

se le agregó ácido sulfúrico gota a gota hasta que la solución se aclaró.

Tanto la solución de vitaminas como la de elementos traza se guardaron a 4° C.

Para preparar el medio sólido se le agregó al medio anterior 2% de bactoagar, se esterilizó en la autoclave durante 20 minutos a 121° C y a 20 lb de presión, posteriormente se vació en cajas de Petri de 30 ml de capacidad.

Siembra de bacterias

En condiciones estériles, se tomó de una caja de Petri una colonia de *R. sphaeroides* y se depositó en un vial de 20 ml, el cual se llenó al máximo de capacidad con medio de cultivo líquido, se cerró con una tapa de rosca y se expuso a la luz de tres focos de 100 watts. A los 3-4 días cuando el cultivo se encuentra en fase estacionaria se inocularon frascos Wheaton de 1.22 l con 5 ml de bacterias. Después de poner el inóculo se rellenaron con medio líquido tratando de dejar la menor cantidad de aire entre el medio y la tapa, para generar la microaerobiosis.

Las botellas se colocaron en una pecera de 40 litros de capacidad, que contenía 20 litros de agua, se iluminó con 6 focos de 100 watts colocados a una distancia aproximada de 25 cm y la temperatura se mantuvo constante a 30° C (Maldonado, 1995). A las 18 horas cuando el cultivo está en fase logarítmica ($DO_{600} = 0.6$) se procedió a cosechar. Las bacterias se cosecharon mediante centrifugación a baja velocidad (5 500 x g) durante 10 minutos a 4° C, en un rotor Sorvall GSA.

Para mantener la cepa se sembró constantemente en cajas de Petri en condiciones fotoheterotróficas, logradas en una cámara de anaerobiosis expuesta a tres focos de 100 watts.

Purificación de flagelina de *Rhodobacter sphaeroides*

Una vez cosechadas las células, se desechó el sobrenadante y el precipitado (conteniendo las células) se resuspendió en un amortiguador de fosfatos (NaPO₄ 10 mM pH 7.0, NaCl 150 mM), se utilizaron 5 ml por cada litro de medio de cultivo. Cada 2 ml se agitaron fuertemente en vórtice durante 1.5 minutos. Se centrifugó a baja velocidad (20 000 x g) durante 30 minutos en un rotor Sorvall SS-34, el sobrenadante se centrifugó a alta velocidad (75 000 x g) durante una hora a 4^o C en un rotor Beckman 60 Ti. La pastilla se resuspendió en el mismo amortiguador de fosfatos y se sometió a un gradiente de cloruro de cesio (4.9 g de CsCl en 12 ml) en un rotor vertical Beckman 65.1 vTi a 200 000 x g durante 130 minutos. Se colectaron 5 fracciones, en la primera se localizaron los pigmentos y en la tercera los filamentos. La fracción que contenía los filamentos se dializó contra el amortiguador de fosfatos y se centrifugó a 75 000 x g durante una hora, el precipitado se resuspendió en el menor volumen posible (Ruiz *et al.*, 1993)

(Figura 15).

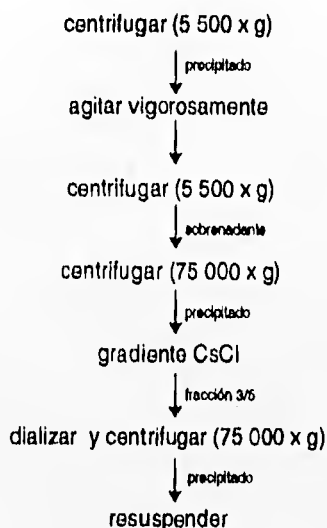


Figura 15. Diagrama de flujo para la purificación de flagelina de *R. sphaeroides*. Se menciona la fracción (sobrenadante o precipitado) utilizada para el siguiente paso.

Purificación de flagelina de *Rhodobacter sphaeroides*

Una vez cosechadas las células, se desechó el sobrenadante y el precipitado (conteniendo las células) se resuspendió en un amortiguador de fosfatos (NaPO_4 , 10 mM pH 7.0, NaCl 150 mM), se utilizaron 5 ml por cada litro de medio de cultivo. Cada 2 ml se agitaron fuertemente en vórtice durante 1.5 minutos. Se centrifugó a baja velocidad (20 000 x g) durante 30 minutos en un rotor Sorvall SS-34, el sobrenadante se centrifugó a alta velocidad (75 000 x g) durante una hora a 4°C en un rotor Beckman 60 Ti. La pastilla se resuspendió en el mismo amortiguador de fosfatos y

se sometió a un gradiente de cloruro de cesio (4.9 g de CsCl en 12 ml) en un rotor vertical Beckman 65.1 vTi a 200 000 x g durante 130 minutos. Se colectaron 5 fracciones, en la primera se localizaron los pigmentos y en la tercera los filamentos. La fracción que contenía los filamentos se dializó contra el amortiguador de fosfatos y se centrifugó a 75 000 x g durante una hora, el precipitado se resuspendió en el menor

volumen posible (Rulz *et al.*, 1993) (Figura 15).

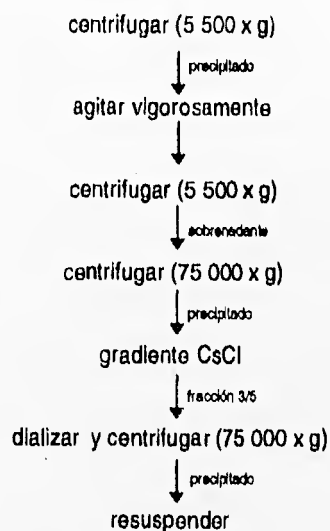


Figura 15. Diagrama de flujo para la purificación de flagelina de *R. sphaeroides*. Se menciona la fracción (sobrenadante o precipitado) utilizada para el siguiente paso.

Despolimerización de los filamentos

Para la obtención de monómeros de flagelina los filamentos se sonicaron (tres veces durante un minuto) para disminuir su tamaño, razón por la cual la turbidez de la solución disminuía. Se calentaron durante cinco minutos a 65° C para lograr la completa despolimerización. Posteriormente se centrifugaron a 75 000 x g en un rotor 60 Ti. Los monómeros de la flagelina se localizaron en el sobrenadante. La monomerización se verificó mediante geles nativos de poliacrilamida (en gradiente de 5-20%). El monómero es estable en amortiguador de fosfatos 10 mM pH7.0 NaCl ó KF 150 mM a 4° C, por lo menos durante dos semanas.

Se probó disociar los filamentos con pH ácido siguiendo el método de Asakura y colaboradores (1972) para *S. typhimurium* y *E. coli*, sin embargo no fue posible obtener el monómero. Este método consiste en incubar los filamentos durante toda la noche en amortiguador de glicina 50 mM pH 2.5 o en ácido cítrico 50 mM pH 1.2.

Determinación de la concentración de proteína

Se utilizó el método descrito por Smith *et al.*, (1985) del ácido bicinconínico (BCA), que consiste básicamente en:

Solución A:

CuSO₄ · 5H₂O 0.4 g

H₂O desionizada c.b.p. 10 ml

Solución B:

bicinchoninato de sodio	1 g
Na ₂ CO ₃	2 g
tartrato de sodio	0.16 g
NaOH	0.4 g
NaHCO ₃	0.95 g
H ₂ O desionizada	c.b.p. 100 ml

Se agregaron de 2 a 50 µl de la solución problema y se completaron con agua desionizada a un volumen de 100 µl, posteriormente se añadió 1 ml de la mezcla 1A:50B, y se incubó durante 30 minutos a 37° C. Se leyó la absorbancia de las mezclas a 562 nm. Se interpoló contra una curva patrón (realizada de igual manera) de 4 a 24 µg de albúmina de bovino.

Electroforesis de proteínas

Para determinar el grado de pureza de la flagelina se realizaron electroforesis en SDS-PAGE al 12%, utilizando el equipo y los reactivos de PhastSystem™ tal y como el proveedor recomienda. Así mismo se corrieron geles nativos en gradiente de poliacrilamida del 4-15% para conocer el grado de asociación de la flagelina.

Los geles se tiñeron con nitrato de plata (Alzawa, 1993) reduciendo los tiempos a la mitad debido al pequeño espesor de estos geles. Para un resumen del proceso ver **Figura 16**.

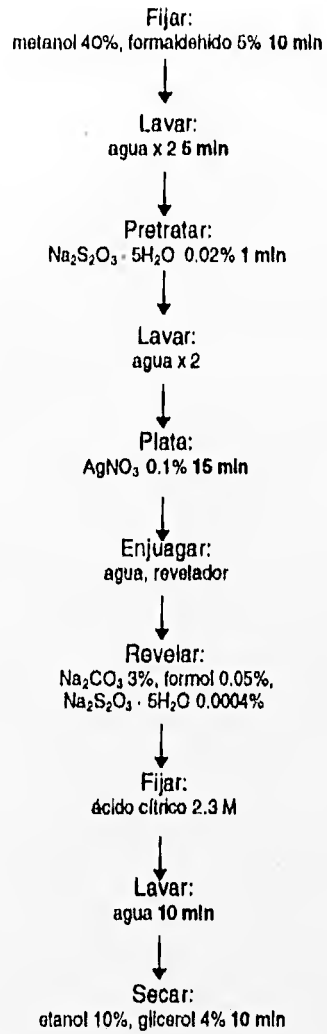


Figura 16. Diagrama de flujo para la tinción con nitrato de plata de los geles de SDS-PAGE (Alzawa, 1993).

Preparación de anticuerpos policlonales

Se inoculó a un conejo hembra, vía intramuscular, con 150 µg de flagelina pura de *Rhodobacter sphaeroides* en adyuvante completo de Freund. Se aplicaron tres refuerzos de 100 µg en adyuvante incompleto de Freund espaciados por 21 días, 10 días después del último refuerzo el conejo se sangró a blanco por punción cardiaca. Se dejó coagular el suero (dos horas a 4° C) y se separó del paquete celular por centrifugación (20 000 x g durante 30 minutos), la fracción de gammaglobulinas del suero se precipitó con sulfato de amonio saturado al 50% y se guardó a -70° C (Harlow *et al*, 1988).

Inmunorréplica tipo *western*

La técnica consiste en transferir a la proteína de un gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se decora con el antisuero específico (anticuerpos primarios), y posteriormente con anticuerpos secundarios (contra los primarios) biotinilados.

Se corrió un gel SDS-PAGE al 12%, al cual se le colocó una membrana de nitrocelulosa previamente humedecida en agua. La proteína se transfirió por difusión durante 30 minutos a 70° C. A continuación el papel se bloqueó durante 45 minutos con gelatina al 3% en agua a temperatura ambiente. A continuación se incubó con 10 ml de TTBS (Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 500 mM, Tween20 0.05%) más 40 µl de suero normal de cabra durante toda la noche. Posteriormente se lavó la membrana tres veces durante 5 minutos con TTBS, se

incubó con el anticuerpo primario en gelatina al 1% TTBS durante 30 minutos. Se volvió a lavar de igual manera y se procedió a utilizar los reactivos del proveedor Vectastain™ que revelan los anticuerpos por medio de la reacción enzimática de la fosfatasa alcalina, para un resumen del proceso ver figura 17.

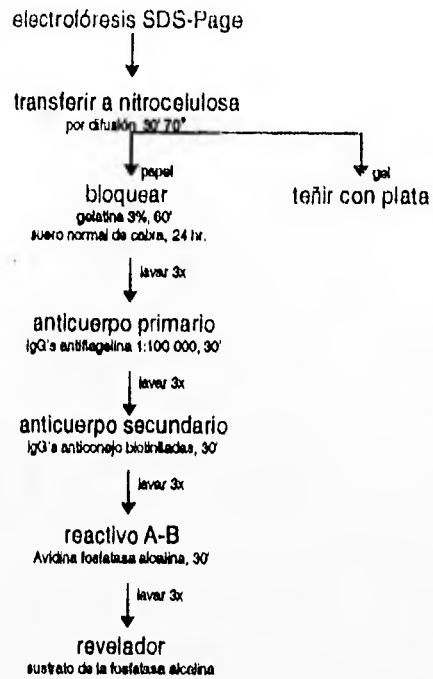


Figura 17. Diagrama de flujo para la inmunoréplica tipo western.

Calorimetría

Los barridos de calorimetría diferencial se llevaron a cabo en un microcalorímetro MC-2™ (Ultrasensitive scanning calorimeter). Las medidas calorimétricas se realizaron en un amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0, NaCl 150 mM. Las muestras fueron desgasificadas a presión reducida durante 10 min. La velocidad de calentamiento fue de 1° C/min. Se utilizaron concentraciones de proteína en el rango de 0.7 a 1.0 mg/ml. (Voderviszt *et al.*, 1995).

Espectroscopía de absorción

Los espectros de absorción se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu 160U. El espectro se obtuvo en una celda de cuarzo de 100 μ l haciendo un barrido de 220 a 400 nm. Se utilizó como línea base un amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0, NaCl 150 mM, mismo en el que se encontraba la proteína. La concentración de proteína fue de 1 mg/ml.

Espectroscopía de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular (CD) se llevaron a cabo en un espectropolarímetro Aviv 62Ds en una celda de cuarzo con un paso de luz de 0.1 cm, los datos se colectaron de 190 nm a 250 nm cada 0.5 nm a temperatura ambiente (25°C). La concentración de proteína fue de 0.16 mg/ml en el caso del filamento y de 0.14 mg/ml para el monómero de flagelina. En ambos casos la proteína se encontraba en un amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0, KF 150 mM (Uratani *et al.*, 1972).

Estos espectros de CD fueron analizados para predecir la estructura secundaria de la flagelina utilizando el programa PROSEC que trabaja con una base de datos de 15 proteínas de estructura conocida mediante rayos X (Yang *et al.*, 1986). Este programa supone que el espectro de CD observado es la superposición lineal de los espectros de cuatro conformaciones dominantes: α -hélices, hojas β , giros β y el no regular. PROSEC hace un análisis de mínimos

cuadrados acotados en el que restringe la suma de las fracciones a 1, lo que mejora el estimado de hojas β y giros β .

También se midió la dependencia de la elipticidad a 222 nm a la temperatura, desde 15° C hasta 70° C con un incremento de temperatura de 1° C/min.

Otros procedimientos

Cajas de agar suave

En el caso de que la motilidad disminuyera, las colonias se volvían a seleccionar en cajas de agar suave (0.03% de bacto peptona, 0.03% de extracto de levadura y 0.3% de bacto agar). En estas cajas las bacterias se siembran por punción y crecen formando un halo, ya que la viscosidad del medio les permite nadar. Se seleccionan las bacterias que se han desplazado mejor, es decir las de la orilla del halo.

Microscopía óptica

La motilidad de los organismos se revisó constantemente en un microscopio óptico con el sistema de iluminación de campo oscuro de alta intensidad. Esta técnica permite observar claramente los flagelos de las bacterias vivas y no hay necesidad de teñirlos. (Macnab, 1976)

Microscopía electrónica

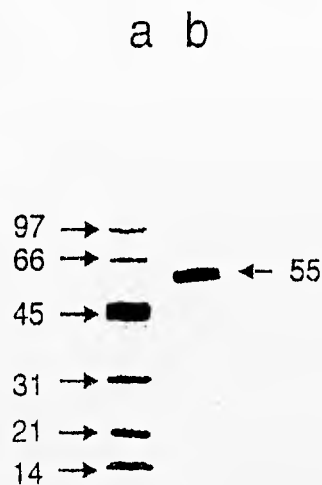
Las muestras de filamentos fueron examinadas por microscopía electrónica en un microscopio **Jeól 1200X II** de la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular a un voltaje de 60 a 80 kv. Se utilizó una tinción negativa de acetato de uranilo 1.0% pH 4.0 (Raska *et al.*, 1976).

Resultados

Aislamiento de la flagelina de *R. sphaeroides*

Los filamentos de *R. sphaeroides* se purificaron mediante una modificación a la técnica descrita por Ruiz y colaboradores (1993), la modificación consiste en utilizar bacterias crecidas en fase logarítmica temprana. Esto nos permitió tener la fracción de filamentos libre de pigmentos, debido a que en esta fase la producción de pigmentos es menor y la motilidad es máxima (Armitage *et al.*, 1987).

El método de purificación permite obtener una flagelina con una pureza mayor al 95%. Esto se determinó por medio de geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS. Como se ve en la figura 18 sólo se obtiene una banda, lo cual es evidente incluso tiñendo el gel con nitrato de plata. Este gel nos indica que los filamentos de *R. sphaeroides* están compuestos por un polipéptido. Éste tiene un peso molecular aparente de 55 kDa que es semejante al del resto de las flagelinas purificadas, cuyos pesos moleculares se encuentran típicamente entre 50 y 60 kDa (Macnab, 1995).



Resultados

Aislamiento de la flagelina de *R. sphaeroides*

Los filamentos de *R. sphaeroides* se purificaron mediante una modificación a la técnica descrita por Ruiz y colaboradores (1993), la modificación consiste en utilizar bacterias crecidas en fase logarítmica temprana. Esto nos permitió tener la fracción de filamentos libre de pigmentos, debido a que en esta fase la producción de pigmentos es menor y la motilidad es máxima (Armitage *et al.*, 1987).

El método de purificación permite obtener una flagelina con una pureza mayor al 95%. Esto se determinó por medio de geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS. Como se ve en la figura 18 sólo se obtiene una banda, lo cual es evidente incluso tiñendo el gel con nitrato de plata. Este gel nos indica que los filamentos de *R. sphaeroides* están compuestos por un

polipéptido. Éste tiene un peso molecular aparente de 55 kDa que es semejante al del resto de las flagelinas purificadas, cuyos pesos moleculares se encuentran típicamente entre 50 y 60 kDa (Macnab, 1995).

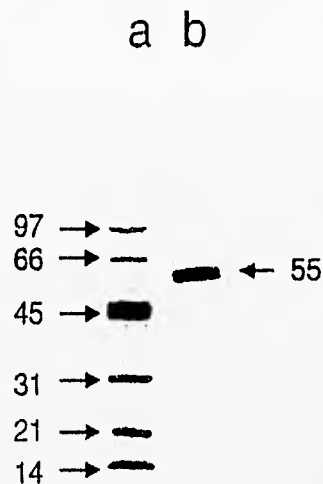


Figura 18. Electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida 12.5% de la flagelina de *R. sphaeroides* purificada. Carril a estándares de peso molecular 97, 66, 45, 31, 21 y 14 kDa (fosforilasa b, albúmina sérica de bovino, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina de soya y ilsozima respectivamente). Carril b flagelina de *R. sphaeroides*, se indica su peso molecular aparente en kDa.

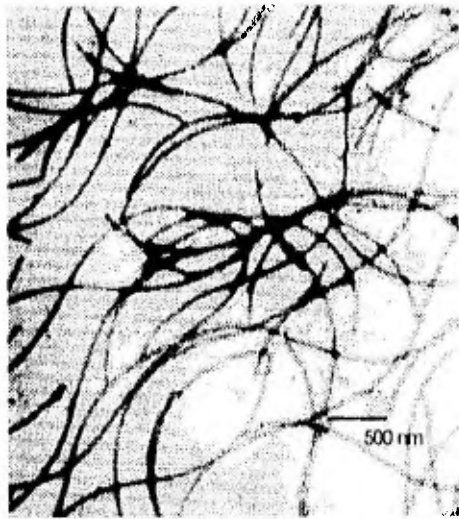


Figura 19. Micrografía electrónica de filamentos puros de *R. sphaeroides* teñidos con acetato de uranilo al 1% pH 4.0.

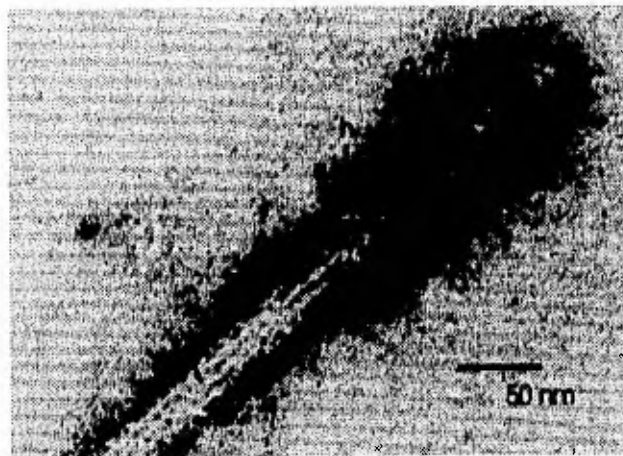


Figura 20. Micrografía electrónica de un flagelo de *R. sphaeroides*. Se muestra con flechas el sitio donde se observa el filamento *f* con una superestructura de líneas paralelas, las proteínas de unión *u* y el gancho *g* recto con una superestructura helicoidal.

Mediante microscopía electrónica se verificó la presencia de los filamentos así como su tamaño (Figura 19). Un acercamiento del filamento permite ver su estructura que consiste de un patrón de líneas paralelas ligeramente inclinadas con respecto al eje del flagelo. Además en la parte proximal es posible apreciar las proteínas de unión (HAP) y el gancho (Figura 20).

Se realizó una Inmunorréplica tipo *western* con la finalidad de asegurarse de que la proteína purificada era la flagelina. Se utilizaron anticuerpos dirigidos contra la flagelina de *S. typhimurium*, sin embargo este anticuerpo no dio reacción cruzada con la proteína de *R. sphaeroides* (Figura 21a). Debido a lo anterior se procedió a generar anticuerpos contra la flagelina de *R. sphaeroides*. Estos anticuerpos tampoco cruzan contra la flagelina de *S. typhimurium*, probablemente debido a que tienen diferentes epítomos (Figura 21b).

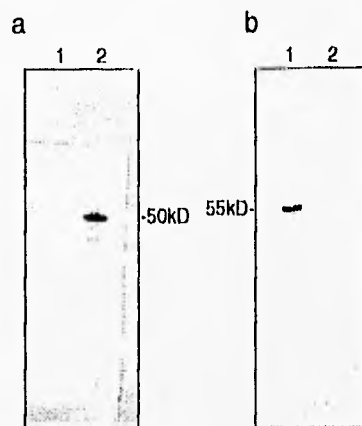


Figura 21. inmunorréplicas tipo *western*. En el carril 1 flagelina de *R. sphaeroides*, carril 2 flagelina de *S. typhimurium*. a. Inmunorréplica decorada con IgG dirigidas contra los filamentos de *S. typhimurium*. (dilución 1:50 000). b. Inmunorréplica decorada con IgG dirigidas contra los filamentos de *R. sphaeroides* (dilución 1:100 000). En ambos casos se observa que los anticuerpos no cruzan.

Despolimerización de los filamentos

Los filamentos se despolimerizaron con la finalidad de comparar la estructura de la proteína de forma polimérica y monomérica. Debido a que no fue posible disociar a los filamentos a pH ácido con el método de Asakura y col.

(1972), los filamentos se despolimerizaron por calor. Se modificó la técnica de Uratani y col. (1972) calentando los filamentos durante cinco minutos a 65°C.

La despolimerización se verificó mediante geles nativos en gradiente de poliacrilamida (5-20%). Como se observa en el carril b de la figura 22

sólo se obtiene una banda con un peso cercano a 66 kDa (carril a), además se puede observar en el carril c que la forma polimérica no entra al gel.



Figura 22. Electroforesis en gel nativo de poliacrilamida 5-20% de la flagelina de *R. sphaeroides*, carril a albúmina sérica bovina con un peso molecular de 66 kDa, carril b flagelina en su forma monomérica, carril c en su forma polimérica. Se observa en el carril b una sola banda y en el carril c que los filamentos no entran en el gel.

Calorimetría diferencial de barrido

El calorímetro registra como cambia la capacidad calorífica con respecto a la temperatura. Durante el desdoblamiento de las proteínas se presentan cambios bruscos en la capacidad calorífica que indican la exposición de los residuos hidrofóbicos al agua.

En la curva de desdoblamiento de la flagelina en su forma monomérica (Figura 23a) se observa un máximo a 42.4° C. Al calentar la proteína (hasta 75° C), dejarla enfriar y volverla a calentar se obtiene la misma curva. Esto indica que la proteína vuelve a plegarse esencialmente a la misma forma, por lo tanto el desdoblamiento por calor de la flagelina en su forma monomérica es un proceso reversible.

En la curva de desdoblamiento del polímero de flagelina (Figura 23b) se observa un máximo a 50.7° C. En este caso el proceso es aparentemente irreversible debido a que al calentar la muestra por segunda vez se obtiene la curva del monómero.

Para caracterizar el cambio de energía de estos procesos, se calculó directamente el cambio en la entalpía calorimétrica (ΔH^{cal}) integrando el área bajo la curva de la capacidad calorífica mediante la siguiente ecuación

$$\Delta H^{cal}(T) = \int_0^1 [\Delta C_p(T)] \delta T$$

donde C_p es la capacidad calorífica a presión constante y se integra desde que la proteína está en su estado nativo (0) hasta donde se encuentra totalmente desdoblada (1).

La entalpía de desnaturalización del monómero (109 kcal) y su temperatura media de transición (T_m) (42.4° C) son considerablemente menores que las del polímero ($\Delta H^{cal} = 284$ kcal y $T_m = 50.7°$ C) (Tabla 2), lo que indica que se requiere más energía para desdoblar al polímero y por lo tanto es más estable que el monómero.

También se calculó el cambio en la capacidad calorífica de van't Hoff (ΔH^{vh}) a partir de las curvas de Cp (Tabla 2). En este caso el cambio de entalpía se calcula a partir de la constante de equilibrio aparente K' inferida a partir de la temperatura media de transición (T_m). Se utilizó la siguiente ecuación

$$\Delta H^{vh} = \frac{4RT_{max}^2 (\Delta C_{p_{max}} - \frac{\Delta H^{cal}}{2})}{\Delta H^{cal}}$$

donde R es la constante de los gases $\Delta C_{p_{max}}$ es la Cp máxima (o sea la capacidad calorífica evaluada en la T_m), y T_{max} es la T_m .

Para saber si era posible suponer una transición de dos estados se hizo el cociente de la entalpía calorimétrica y la de van't Hoff ($\Delta H^{cal} / \Delta H^{vh}$) (Tabla 4). Este cociente es igual a uno sólo cuando se trata de dos estados, esto es debido a que ΔH^{vh} se calcula a partir de la constante de equilibrio aparente.

En el caso del monómero el cociente de la entalpía calorimétrica y la de van't Hoff es semejante a uno, por lo tanto existe un solo dominio que se derrite cooperativamente. En el polímero este cociente es mayor a uno indicando que hay más de dos estados, por lo cual se realizó la deconvolución del trazo. La curva del polímero se ajustó mejor a un modelo de tres estados con al menos dos dominios.

Tabla 2. Características termodinámicas de la desnaturalización térmica de la flagelina, en su forma monomérica y polimérica.

	T_m (°C)	ΔH^{cal} (kcal)	ΔH^{vh} (kcal)	$\Delta H^{cal}/\Delta H^{vh}$
polímero	50.7	284	102	2.80
monómero	42.4	109	123	0.89

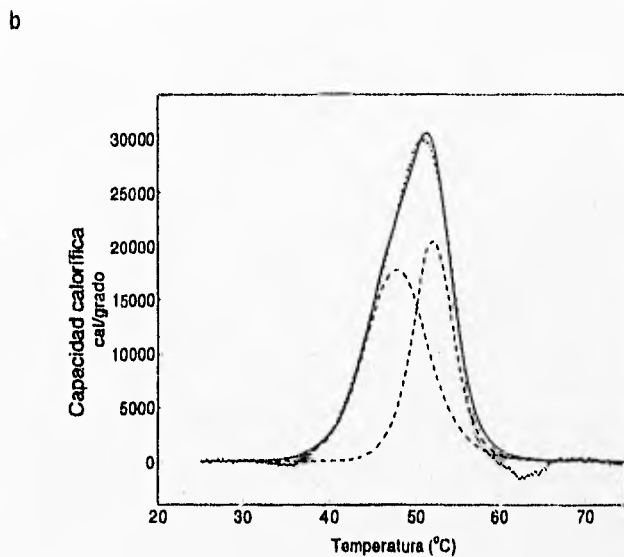
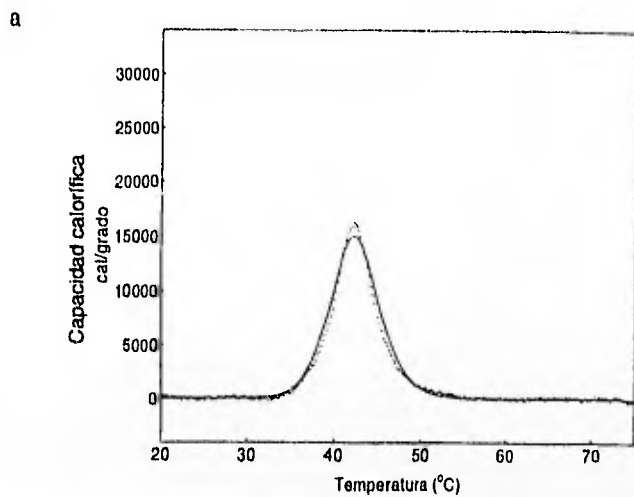


Figura 23. Capacidad calorífica (cal/grado) de la flagelina en función de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$). a. monómero, b. polímero. experimental, ----deconvolución, —pico calculado.

Espectro de absorción en el UV

Se hizo un espectro de absorción de la flagelina en la región del UV para ver las características de absorción (Figura 24). Este espectro nos sirvió para saber que rango de longitudes de onda se tomaría en cuenta para recopilar el espectro de CD. Debido a la baja absorción de la flagelina en el UV cercano (250-300 nm), los espectros de CD en este rango mostraban una relación ruido-señal muy alta por lo que no se tomaron en cuenta para el presente trabajo.

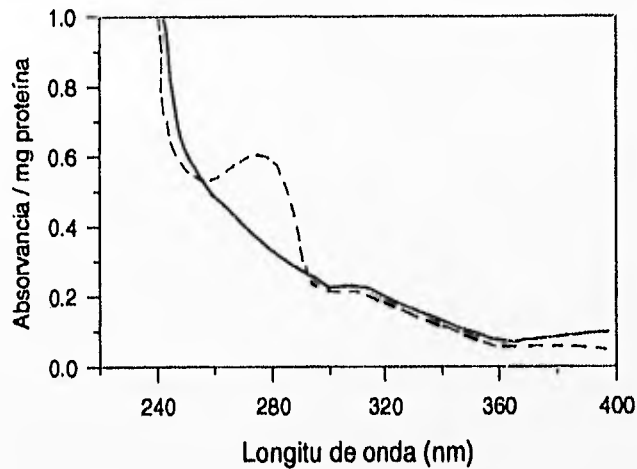


Figura 24. Espectro de absorción en la región del ultravioleta de la flagelina de *R. sphaeroides* y *S. typhimurium* -----, esta última tiene 5 fenilalaninas y 9 tirosinas.

Elipticidad (seguida a 222 nm) en función de la temperatura

Para conocer los cambios en la estructura del monómero y polímero de la flagelina se siguió la elipticidad a 222 nm en función de la temperatura (Figura 25). En este caso se hicieron curvas aumentando y disminuyendo la

temperatura para observar si el monómero y el polímero se desdoblaban de la misma manera. (para una noción del dicroísmo circular ver el **apéndice**).

En el caso del monómero la elipticidad es totalmente reversible, ya que la curva de aumento y de disminución de temperatura son iguales. A diferencia del monómero la elipticidad del polímero no es reversible. Tanto en el caso del monómero como en el del polímero, a bajas temperaturas se observa una elipticidad típica de proteínas que contienen α -hélices, mientras que a temperaturas mayores se observa una menor elipticidad que pudiera corresponder a un polipéptido sin estructura regular.

Los valores de elipticidad para los estado nativos (n) y termodinámicamente desdoblados (td) se obtuvieron al extrapolar los valores previos y posteriores a la transición, estos valores se muestran en la **figura 25** con líneas punteadas.

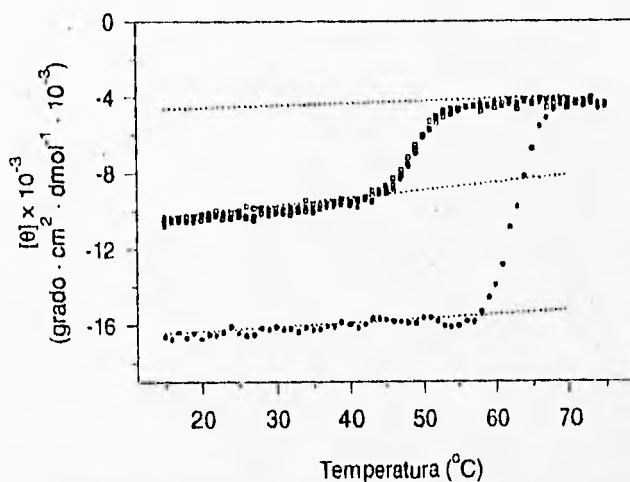


Figura 25. Elipticidad promedio por residuo ($\text{grado} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{decimol}^{-1} \cdot 10^{-3}$) a 222 nm en función de la temperatura de la flagelina de *R. sphaeroides*. ● polímero al aumentar la temperatura, ○ polímero al disminuir la temperatura, ■ monómero al aumentar la temperatura y □ monómero al disminuir la temperatura.

Para confirmar los datos obtenidos mediante calorimetría se hicieron las gráficas de van't Hoff (Figura 26), en las que se observa el logaritmo natural de la constante aparente de equilibrio ($\ln K'$) en función del inverso de la temperatura ($1/T$) donde

$$K' = \frac{[\theta](T) - [\theta]_n(T)}{[\theta]_{td}(T) - [\theta](T)}$$

utilizando la siguiente ecuación

$$\frac{\delta(\ln K')}{\delta\left(\frac{1}{T}\right)} = -\frac{\Delta H^{vh}}{R}$$

se calculó la entalpía de van't Hoff (ΔH^{vh}) (Tabla 3), que corresponde a la pendiente de estas gráficas. La entalpía de van't Hoff para el polímero es de 111 kcal, y para el monómero es de 117 kcal.

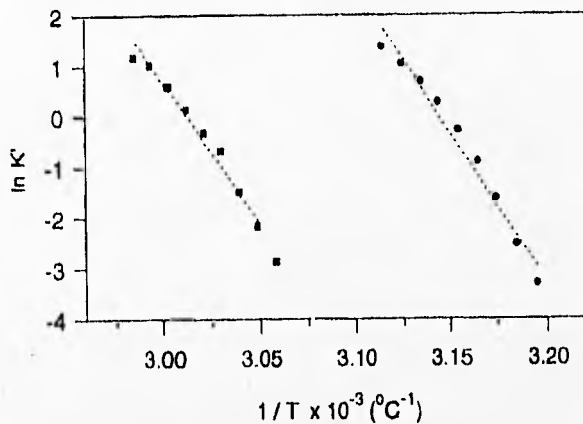


Figura 26. Gráfica de van't Hoff en la que se muestra el logaritmo natural de la constante aparente de equilibrio ($\ln K'$) en relación con el inverso de la temperatura ($^\circ\text{C}^{-1}$). A partir de estas regresiones lineales se calcularon los valores de entalpía de van't Hoff. ● monómero ■ polímero.

Se obtuvieron los valores de la temperatura media de transición (T_m) para el monómero y para el polímero (Tabla 3). Este valor nos indica la temperatura en

la que la mitad de la población se encuentra en un estado y la mitad en el otro.

Las T_m se calcularon a partir de la ecuación

$$\Delta G = -RT \ln K$$

evaluando la temperatura para una energía libre (ΔG) igual a cero.

La T_m del monómero es de 45°C, y la del polímero es de 59°C. Lo que indica que es más estable el polímero que el monómero.

Tabla 3. T_m y ΔH^{th} de la flagelina.

Obtenidos mediante el seguimiento de la elipticidad a 222 nm en la función de la temperatura.

	T_m (°C)	ΔH^{th} (kcal)
polímero	59	111
monómero	45	117

Dicroísmo circular

Para determinar la estructura secundaria de la flagelina se hicieron los espectros de CD en el UV lejano. Los espectros de CD del monómero y del polímero son semejantes, ambos presentan con un máximo alrededor de 195 nm y dos valles a 222 y 208 nm (Figura 27). Esto sugiere que en ambas formas existe un alto contenido de α -hélice; debido a que los datos ya están normalizados por mol de aminoácido, las diferencias en las magnitudes de los picos y los valles reflejan diferencias en la estructura secundaria.

Los porcentajes de α -hélices, hojas β , giros β y estructura no regular fueron calculados a partir de la elipticidad promedio por residuo en el rango de 190 a 240 nm con intervalos de 1 nm (Tabla 4). La estructura secundaria del

monómero presenta un alto contenido de α -hélice (21%) así como de hojas β (25%), mientras que la estructura del polímero es predominantemente de α -hélice (44%).

Tabla 4. Estructura secundaria de la flagelina

Las fracciones fueron estimadas a partir del espectro de CD en el UV lejano, la suma de las fracciones es igual a uno.

	α -hélice	hojas β	giros β	otras
monómero	0.21	0.25	0.16	0.38
polímero	0.44	0.16	0.17	0.23

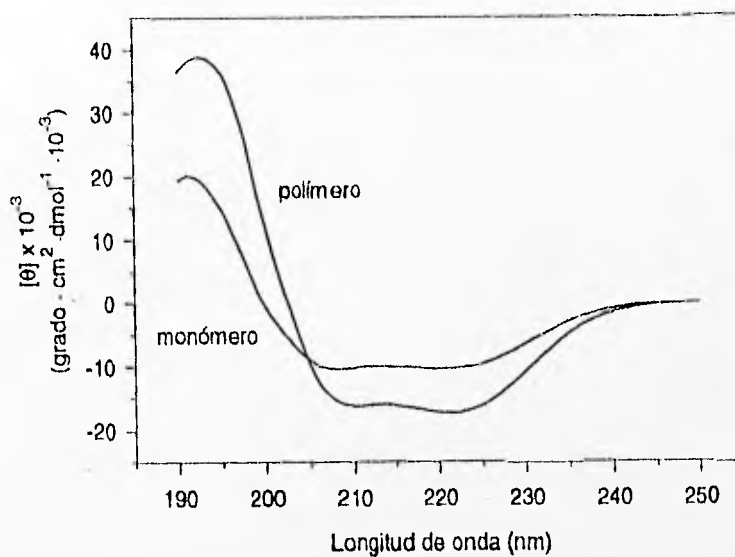


Figura 27. Espectros de dicroísmo circular en la región del UV lejano de la flagelina de *R. sphaeroides* en su forma monomérica y polimérica. Los espectros se realizaron en un amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0 KF 150 mM, en una celda de 0.1 cm de espesor. Estos espectros fueron utilizados para calcular la estructura secundaria de cada forma de la flagelina.

Discusión

El presente trabajo se realizó con el objetivo de estudiar las propiedades estructurales de la flagelina de *Rhodobacter sphaeroides*. Nosotros decidimos trabajar con el filamento de *R. sphaeroides* porque presenta un polimorfismo diferente al de los demás organismos. Al reorientarse la bacteria la rotación del flagelo se detiene, el flagelo se retrae y forma una gran hélice (**Figura 14**). Consideramos que esta peculiaridad debe tener relación con la estructura de la proteína. Por lo tanto esto hace que el estudio de la flagelina de *R. sphaeroides* sea importante para avanzar aún más en el estudio de la flagelina.

El método empleado para la purificación de la flagelina resultó ser reproducible y dio preparaciones con alto grado de pureza (lo que se muestra en los geles de poliacrilamida-SDS teñidos con plata, **Figura 17**). En particular los pigmentos de la bacteria que son el principal contaminante, se eliminaron con el gradiente de cloruro de cesio. Además se puede observar al microscopio electrónico que los filamentos no se dañan con este tratamiento (**Figura 16**); incluso con estas preparaciones se podría hacer la reconstrucción de imágenes a partir de las micrográficas electrónicas, para ubicar la disposición de los monómeros en el filamento.

En el caso de *R. sphaeroides* la flagelina monomérica se obtuvo mediante la despolimerización por calor del filamento, por lo tanto era importante demostrar que no estaba desnaturalizada. Tanto las medidas calorimétricas

como los espectros de dicroísmo circular indicaron que el monómero tiene una conformación de tipo nativo. El aumento brusco de la capacidad calorífica (Figura 20) refleja la exposición de los residuos hidrofóbicos al agua, como resultado del desdoblamiento de una estructura compacta (Privalov *et al.*, 1986). La curva de elipticidad en función de la temperatura mostró la capacidad del monómero de redoblar (Figura 25). Además en los espectros de CD en el ultravioleta lejano se observa que esta estructura compacta está ordenada (Figura 27, Tabla 4).

Al analizar la curva de capacidad calorífica del monómero de flagelina (Figura 20a), por medio de deconvoluciones y del cociente de entalpías, se observó que esta curva correspondía a un modelo de dos estados, uno de la proteína plegada y otro de la proteína desdoblada, por lo tanto, la flagelina monomérica está formada por un dominio. La deconvolución de la curva del polímero al ser desdoblado (Figura 20b) mostró dos picos; si nos ajustamos a un modelo de tres estados (obtenido por el cociente $\Delta H^{cal} / \Delta H^{th}$), el primer pico (el de menor T_m) correspondería a dos dominios, esto debido a que presentó una entalpía calorimétrica del doble que la de van't Hoff, de tal forma que existen tres dominios en el filamento dos de los cuales son termodinámicamente idénticos.

Los datos de la entalpía calorimétrica de *R. sphaeroides* (Tabla 2) son menores a los que presentan las flagelinas de otras especies como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Halobacterium halobium*, y el gancho de *S.*

typhimurium (como se muestra en la **Tabla 5**), esto pudiera reflejar un empaquetamiento hidrofóbico más extenso en los otros monómeros.

Tabla 5. Características termodinámicas de la desnaturalización térmica de las proteínas axiales de diferentes especies .

	POLÍMERO	MONÓMERO	
	ΔH^{cal} kcal (T_m °C)	ΔH^{cal} kcal (T_m °C)	
<i>S. typhimurium</i>	530	320 (47)	Fedorov <i>et al.</i> , 1984.
<i>E. coli</i>	656	346	Fedorov <i>et al.</i> , 1984.
<i>H. halobium</i>	262 (91)		Tarasov <i>et al.</i> , 1995
Gancho <i>S. typhimurium</i>	488 (69.2)	263 (51.1)	Vonderviszt <i>et al.</i> , 1995.
<i>R. sphaeroides</i>	284 (50.7)	109 (42.4)	este trabajo

Como ya se mencionó en la introducción, la flagelina monomérica de *S. typhimurium* posee tres dominios. El que se encuentra en la región central de la cadena polipeptídica (**d3**) es el que da al exterior del filamento y no está conservado ni siquiera en las flagelinas de diferentes cepas. Los otros dos dominios (**d1** y **d2**) dan al interior del filamento y son de tipo α . Durante la polimerización se forma un cuarto dominio (**d0**), también de tipo α , el cual constituye las paredes del canal central del filamento (**Figura 25a**). Este dominio es la clave para entender como se exporta la flagelina por el canal central y se ensambla en la parte distal del flagelo. Se han realizado estudios sobre la estructura en otras especies en los que se ha observado un aumento del contenido de α -hélice durante la polimerización (Uratani *et al.*, 1972, Vonderviszt *et al.*, 1990, Namba *et al.*, 1989).

typhimurium (como se muestra en la **Tabla 5**), esto pudiera reflejar un empaquetamiento hidrofóbico más extenso en los otros monómeros.

Tabla 5. Características termodinámicas de la desnaturalización térmica de las proteínas axiales de diferentes especies .

	POLÍMERO	MONÓMERO	
	ΔH^{cal} kcal (T_m °C)	ΔH^{cal} kcal (T_m °C)	
<i>S. typhimurium</i>	530	320 (47)	Fedorov <i>et al.</i> , 1984.
<i>E. coli</i>	656	346	Fedorov <i>et al.</i> , 1984.
<i>H. halobium</i>	262 (91)		Tarasov <i>et al.</i> , 1995
Gancho <i>S. typhimurium</i>	488 (69.2)	263 (51.1)	Vonderviszt <i>et al.</i> , 1995.
<i>R. sphaeroides</i>	284 (50.7)	109 (42.4)	este trabajo

Como ya se mencionó en la Introducción, la flagelina monomérica de *S. typhimurium* posee tres dominios. El que se encuentra en la región central de la cadena polipeptídica (**d3**) es el que da al exterior del filamento y no está conservado ni siquiera en las flagelinas de diferentes cepas. Los otros dos dominios (**d1** y **d2**) dan al interior del filamento y son de tipo α . Durante la polimerización se forma un cuarto dominio (**d0**), también de tipo α , el cual constituye las paredes del canal central del filamento (**Figura 25a**). Este dominio es la clave para entender como se exporta la flagelina por el canal central y se ensambla en la parte distal del flagelo. Se han realizado estudios sobre la estructura en otras especies en los que se ha observado un aumento del contenido de α -hélice durante la polimerización (Uratani *et al.*, 1972, Vonderviszt *et al.*, 1990, Namba *et al.*, 1989).

Con los estudios de calorimetría hemos visto que la flagelina monomérica de *R. sphaeroides* tiene un dominio (m) mientras que la polimérica tiene tres, dos de los cuales son termodinámicamente idénticos (p1, p2 y p2'). En este caso durante la polimerización de la flagelina aumenta el contenido de α -hélice, disminuye el contenido de hoja β y disminuye el no regular (Tabla 4) esto indica que parte de la estructura del monómero se pierde durante la polimerización por lo tanto el dominio m ya no es igual a ninguno de los dominios del polímero.

Con base a los resultados anteriores y por analogía con el filamento de *Salmonella typhimurium* se propone el siguiente modelo (Figuras 28 y 29):

En el monómero las regiones terminales de la proteína no tienen una estructura compacta definida; el dominio m está formado por la región central de cadena polipeptídica y es de tipo $\alpha\beta$. Durante la polimerización, el dominio m se modifica perdiendo parte de su contenido de hoja β , y se transforma en el dominio p1 también de tipo $\alpha\beta$; las regiones terminales se organizan formando los dominios p2 de tipo α . Los dominios p2 dan al interior del filamento, mientras que el p1 da al exterior.

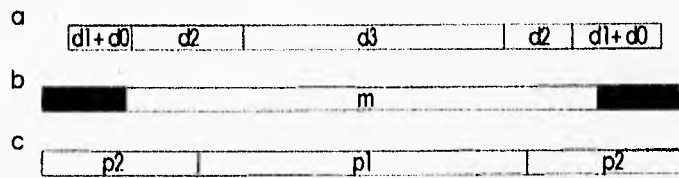


Figura 29. Esquema que muestra las partes de la secuencia de aminoácidos de la flagelina. **a** Se señalan los dominios asignados para la flagelina de *Salmonella typhimurium* (d0, d1, d2, d3) (DeRosier, 1995) **b** Dominio asignado para el monómero (m) de la flagelina de *R. sphaeroides* **c** Se señalan los dominios asignados para el polímero (p1, p2 y p2') de la flagelina de *R. sphaeroides*.

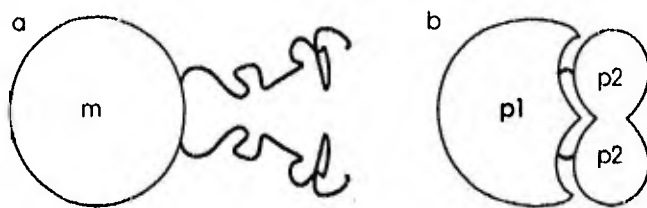


Figura 30. Esquema de los dominios de la flagelina de *R. sphaeroides*. **a** Monómero (se muestra el dominio *m*, las regiones terminales no tienen una estructura compacta estable) **b** Polímero (se muestran los dominios *p1* y *p2*, los *p2* dan al interior del filamento formando el canal).

Es importante señalar que los datos de entalpía de van't Hoff obtenidos de las curvas de capacidad calorífica y de elipticidad (seguida a 222 nm) son semejantes, sin embargo las T_m no lo son (Tabla 2 y 3). Estas diferencias son mucho más marcadas para el caso del polímero; la T_m obtenida de las curvas de capacidad calorífica (50.7°C) es mucho menor a la T_m obtenida a partir de la elipticidad seguida a 222 nm (59°C). Esto indica que existe un intermediario (I) durante el desdoblamiento de la flagelina, desde su estado nativo (N) a su estado desnaturalizado (D).



Al seguir la elipticidad a 222nm se registra un contenido de α -hélice por lo tanto el intermediario se comporta como si aún presentara estructura secundaria. Por otro lado, la T_m entre el intermediario y el estado desdoblado es de 59°C. A esta temperatura en la curva de C_p del polímero (Figura 23b) ya

no se observan transiciones, por lo que las componentes de esta curva son atribuidas a la presencia de varios dominios y a las interacciones entre los monómeros. De tal forma se puede suponer que el intermediario se encuentra hidratado y sin núcleo hidrofóbico.

Debido a la ausencia de *núcleo* y a lo laxo del intermediario, esta sería la forma en la que el monómero es exportado por ese pequeño canal central del filamento que al parecer no tiene el tamaño suficiente para permitir el paso de los monómeros totalmente plegados.

Si bien es cierto que *in vivo* la flagelina de *R. sphaeroides* no alcanza nunca temperaturas cercanas a los 50° C, el intermediario podría existir con ayuda de chaperoninas (que formen parte del aparato de exportación) y/o gracias a características peculiares del interior del canal central.

Conclusiones y perspectivas

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

- El filamento de *Rhodobacter sphaeroides* está compuesto por monómeros de flagelina con un peso molecular de 55 kDa.
- La fracción de la flagelina obtenida tiene una pureza mayor al 95%.
- La flagelina polimérica es más estable que la monomérica, debido a que el polímero tiene una T_m de desnaturalización mayor a la del monómero. (Tabla 2)
- La flagelina monomérica tiene un dominio estructural mientras que la polimérica tiene tres. (Figura 21)
- Durante la polimerización aumenta el contenido de α -hélice y disminuye el de hojas β y el no organizado. (Tabla 4)
- Por lo anterior pensamos que el monómero de la flagelina sufre grandes cambios estructurales durante la polimerización.
- Durante el desdoblamiento de la flagelina se obtiene un intermediario (I) que pudiera ser la forma en la que la flagelina se exporta a través del canal central del filamento.

Para continuar con el trabajo serían de gran utilidad los experimentos de repolimerización *in vitro* como indicadores de la funcionalidad de la flagelina monomérica. Estos experimentos podrían realizarse con diferentes solventes que simulen las condiciones *in vivo*.

Por otro lado, para conocer las partes de las moléculas que forman los dominios mencionados sería conveniente hacer experimentos de calorimetría y **CD** con fragmentos proteolíticos de la flagelina y secuenciar el gene para poder predecir la estructura y compararla con los resultados experimentales.

Apéndice 1

Dicroísmo circular

El dicroísmo circular **CD** es un método espectroscópico sensible a la interacción de los cromóforos, en ambientes asimétricos, con la luz polarizada. Este método puede discernir entre sutiles diferencias conformacionales de los enantiómeros (para una revisión en el tema ver Woody, 1996).

La señal de **CD** se observa en la misma región del espectro en el que se encuentran las bandas de absorción de un compuesto en particular. En las proteínas esta señal ocurre en dos regiones espectrales. Las bandas de **CD** en la región del UV lejano (170-250 nm) está dada principalmente por la contribución de los enlaces peptídicos, mientras que las bandas en el UV cercano (250-300 nm) se originan por los aminoácidos aromáticos.

El **CD** en el UV lejano contiene información sobre la estructura secundaria. Los diferentes tipos de estructura secundaria tienen espectros peculiares. En particular las α -hélices presentan un fuerte y característico espectro que tiene valles a 208 y 222 nm. (Figura 30). El **CD** en el UV lejano puede ser utilizado para calcular los contenidos

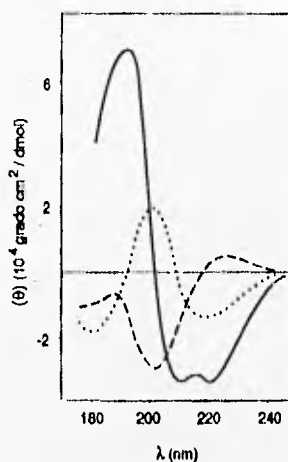


Figura 30. Espectros de dicroísmo circular de poli-L-lisina en conformación de α -hélice —, hoja β y no regular

relativos de los diferentes elementos de estructura secundaria de una proteína. Existen diferentes programas que permiten hacer estos cálculos. Estos programas están basados en que el espectro de una proteína es la combinación lineal de los espectros de los diferentes elementos de estructura secundaria, más el ruido que entre otras incluye la contribución de los cromóforos aromáticos.¹

El espectro de CD en el UV cercano puede ser utilizado como la huella dactilar de una proteína correctamente doblada.

El fenómeno de CD puede ser explicado a *grosso modo* de la siguiente manera: La luz polarizada circularmente representa una onda electromagnética, de magnitud constante, que gira alrededor de la dirección de propagación del rayo. La onda puede ser dextro-rotatoria o levorotatoria (Figura 31).

Un rayo polarizado linealmente puede ser representado como la suma vectorial de dos rayos polarizados circularmente, uno dextrorotatorio *d* y otro levorotatorio

l con la misma amplitud de vibración

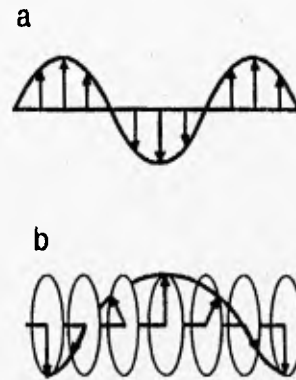
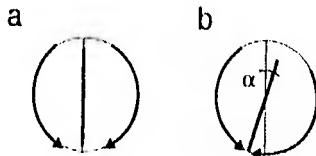


Figura 31. a Luz polarizada en un plano. b luz polarizada circularmente

¹ La revisión de Greenfield, 1998 discute las ventajas de varios de estos programas.

Si este rayo polarizado en un plano pasa a través de algún material que desfasa los rayos circularmente polarizados (es decir que el material



tenga índices de refracción diferentes para los compo-

Figura 32. Luz polarizada. a la suma de dos rayos polarizados circularmente da como resultado un rayo polarizado linealmente. b al desfasarse los rayos de luz polarizada circularmente cambia el ángulo del rayo resultante.

ponentes d y l), entonces la resultante va a ser un rayo polarizado linealmente pero rotado con respecto a su posición original. A este ángulo de rotación se le denomina α (Figura 32).

Ahora, si este rayo pasa a través de un material ópticamente activo, debido a que la absorción molar de los componentes d y l es diferente, la luz polarizada en un plano cambia a luz polarizada elípticamente. A este fenómeno se le conoce como dicroísmo circular (Figura 33).

Los espectrofotómetros de dicroísmo circular miden la elipticidad θ , que es el ángulo cuya tangente es la relación entre el eje menor y el eje mayor de la elipse. En general la elipticidad se normaliza con la concentración molar de los aminoácidos de las proteínas.



Figura 33. Luz polarizada elípticamente, construida por dos rayos de luz polarizada circularmente de diferente magnitud.

Bibliografía

- Alzawa, S.I. 1993. Comunicación personal.
- Alzawa, S.I. 1996. Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **19**:1-5.
- Alzawa, S.I., F. Vonderviszt, R. Ishima & K. Akasaka. 1990. Termini of *Salmonella* flagellin are disordered and become organized upon polymerization into flagellar filaments. *J. Mol. Biol.* **211**:673-677.
- Armitage, J.P. 1992. Bacterial motility and chemotaxis. *Sci. Progress Oxford.* **76**:452-477.
- Armitage, J.P., C. Ingham & M.C.W. Evans. 1985. Role of proton motive force in phototactic and aerotactic responses of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **161**:967-972.
- Armitage, J.P. & R.M. Macnab. 1987. Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **169**:514-518.
- Amosil, D.N. & M.J. Chamberlin. 1989. Secondary σ factor control transcription of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**:830-834.
- Asakura, S. & T. Iino. 1972. Polymorphism of *Salmonella* flagella as investigated by means of *in vitro* copolymerization of flagellins derived from various strains. *J. Mol. Biol.* **64**:251-268.
- Berry, R.M. 1993. Torque and switching in the bacterial flagellar motor and electrostatic model. *Biophys. J.* **64**:961-973.
- Blair, D.F. & H.C. Berg. 1988. Restoration of torque in defective flagellar motors. *Science.* **242**:1678-1681.
- Cohen-Bazire, G., W.R. Siström & R.Y. Stanier. 1957. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Comp. Cell. Physiol.* **49**: 25-68.
- Dreyfus, G., A.W. Williams, I. Kawagishi & R.M. Macnab. 1993. Genetic and biochemical analysis of *Salmonella typhimurium* FliI, a flagellar protein related to the catalytic subunit of the F_0F_1 ATPase and to virulence proteins of mammalian and plant pathogens. *J. Bacteriol.* **175**:3131-3138.
- DeRosier, D.J. Spinnig tails. *Cur. Op. Struc. Biol.* **5**:187-193.
- Driks, A. & D.J. DeRosier. 1990. Additional structures associated with bacterial flagellar basal body. *J. Mol. Biol.* **211**:669-672.
- Fahrner, K.A., S.M. Block, S. Krishnaswamy, J.S. Parkinson & H.C. Berg. 1994. A mutant hook-associated protein (HAP3) facilitates torsionally induced transformations of the flagellar filament of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **238**:173-186.
- Fedorov, O.V. & A.S. Kostyukova. 1984. Domain structure of flagellin. *FEBS Lett.* **171**(1):145-148.

ESTA TESIS NO DEBE
SER DE LA BIBLIOTECA

- Francis, N.R., V.M. Irikura, S. Yamaguchi, D.J. DeRosier & R.M. Macnab. 1992. Localization of the *Salmonella typhimurium* flagellar switch protein to the cytoplasmic M-ring face of the basal body. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:6304-6308.
- Greenfield, N.J. 1996. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. Biochem.* **235**:1-10.
- Harlow, E. & D. Lane. 1988. Antibodies a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A. 726 pp.
- Harrison, D.M., H.L. Packer & J.P. Armitage. 1994. Swimming speed and chemokinetic response of *Rhodobacter sphaeroides* investigated by natural manipulation of the membrane potential. *FEBS Lett.* **348**:37-40.
- Helmann, J.D. & M.J. Chamberlin. 1987. DNA sequence analysis suggests that expression of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is controlled by an alternative sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**:6422-6424.
- Hess, J.F., K. Oosawa, N. Kaplan & M.I. Simon. 1988. Phosphorylation of three proteins in a signal pathway of bacterial chemotaxis. *Cell.* **53**:79-87.
- Hirano, T., S. Yamaguchi, K. Oosawa & S.I. Alzawa. 1994. Roles of FlhK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**:5439-5449.
- Iino, T. 1969. Polarity of flagellar growth in *Salmonella*. *J. Gen. Microbiol.* **56**:227-239.
- Ikeda, T., S. Yamaguchi & H. Hotani. 1993. Flagellar growth in a filament-less *Salmonella flhD* mutant supplemented with purified hook-associated protein 2. *J. Biochem.* **114**: 9-44.
- Imhoff, J.M. & H. G. Trüper. 1989. Purple non sulfur bacteria (*Rhodospirillaceae* Pfennig and Trüper 1971, 17^A), in: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 3. J.T. Stanley ed. Ed. Williams and Wilkins. USA. p 1658-1678.
- Ingham, C.J. & J.P. Armitage. 1987. Involvement of transport in *Rhodobacter sphaeroides* chemotaxis. *J. Bacteriol.* **160**:5801-5807.
- Jones, C.J., R.M. Macnab, H. Okino & S.I. Alzawa. 1990. Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **212**:377-387.
- Kamiya, R. & S. Asakura. 1976. Helical transformation of *Salmonella* flagella *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **106**:167-186.
- Khan, S. & R.M. Macnab. 1980. Proton chemical potential, proton electrical potential and the bacteria motility. *J. Mol. Biol.* **138**:599-614.
- Komeda, Y., H. Suzuki, J.I. Ishida & T. Iino. 1975. The role of cAMP in flagellation of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* **142**:289-298.
- Kubori, T., N. Shimamoto, S. Yamaguchi, K. Namba & S.I. Alzawa. 1992. Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **226**:433-446.

- Kutsukake, K., Y. Ohya & T. Iino. 1990. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **172**:741-747.
- Losick, R. & L. Shapiro. 1993. Checkpoints that couple gene expression to morphogenesis. *Science*. **262**:1227-1228.
- Lukat, G.S., W.R. McCleary, A.M. Stock & J.B. Stock. 1992. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Procc. Natl. Acad. Sci.* **89**:718-722.
- Macnab, R.M. 1976. Examination of bacterial flagellation by dark-field microscopy. *J. Clin. Microbiol.* **4**: 258-265.
- Macnab, R.M. 1992. Genetics and biogenesis of the bacterial flagella. *Annu. Rev. Genet.* **26**:131-158.
- Macnab, R.M. 1995. Flagella. *en: Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Vol 1.* Neidhart ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Macnab, R.M. & M.K. Ornston. 1977. Normal to curly bacterial flagellar transitions and their role in bacterial tumbling stabilization of an alternative quaternary structure by mechanical force. *J. Mol. Biol.* **112**:1-30.
- Maddock, J.R. & L. Shapiro. 1993. Polar localization of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science*. **259**:1717-1723.
- Maldonado, E. 1995. Estudios sobre la catálisis en la F_1 -ATPasa de *Rhodospirillum rubrum*. Tesis profesional.
- Meister, M., G. Lowe & H.C. Berg. 1987. The proton flux through the bacterial flagellar motor. *Cell*. **49**:643-650.
- Meister, M., R. Caplan & H.C. Berg. 1989. Dynamics of a tightly coupled model for flagellar rotation. *Biophys. J.* **55**:905-914.
- Namba, K., I. Yamashita & F. Vonderviszt. 1989. Structure of the core and central channel of bacterial flagella. *Nature*. **342**:648-654.
- O'Brien, E.J. & P.M. Bennett. 1972. Structure of straight flagella from a mutant *Salmonella*. *J. Mol. Biol.* **70**:133-152.
- Ohnishi, K., K. Kutsukake, H. Suzuki & T. Iino. 1990. Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* **221**:139-147.
- Ohnishi, K., Y. Ohta, S.I. Alzawa, R.M. Macnab & T. Iino. 1994. FigD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**:2272-2281.
- Parkinson, S.P. 1993. Signal transduction schemes of bacteria. *Cell*. **73**:857-871.
- Poole, P.S., M.J. Smith & J.P. Armitage. 1993. Chemotactic signalling in *Rhodobacter sphaeroides* requires metabolism of attractants. *J. Bacteriol.* **174**:3874-3883.
- Raska, I., F. Mayer, C. Edelbluth & R. Schmitt. 1976. Structure of plain and complex flagellar hooks of *Pseudomonas rhodos*. *J. Bacteriol.* **125** (2): 679-688.

- Ruiz, T., N.R. Francis, D.G. Morgan & D. J. DeRosier. 1993. Size of the export channel in the flagellar filament of *Salmonella typhimurium*. *Ultramicroscopy* **49**: 417-425.
- Sanders, D.A. & D.E. Koehliand. 1988. Receptor interactions through phosphorylation and methylation pathways in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **65**:8425-8429.
- Schuster, S.C. & S. Khan. 1994a. The bacterial flagellar motor. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**:509-539.
- Schuster, C.S., M. Bauer, J. Kellerman, F. Lottspeich & E. Baeuerlein. 1994b. Nucleotide sequence of the *Wolinella succinogenes* flagellin, which contains in the antigenic domain two conserved regions also present in *Campylobacter* ssp. and *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **176**:5151-5155.
- Segall, J.E., M.D. Manson & H.C. Berg. 1982. Signal processing times in bacterial chemotaxis. *Nature* **296**:855-857.
- Segall, J.E., M.D. Manson & H.C. Berg. 1986. Temporal comparisons in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **63**:8987-8991.
- Slatrom, W.R. 1962. The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J. Gen. Microbiol.* **28**: 607-616.
- Smith, P.K., et al. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.
- Sockett, R.E., J.P. Armitage & M. Evans. 1987. Methylation-independent and methylation-dependent chemotaxis in *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **169**:5808-5814.
- Sockett, R.E., J.C.A. Foster & J.P. Armitage. 1990. Molecular biology of the *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. *FEMS Symp.* **63**:473-479.
- Sosinsky, G.E., N.R. Francis, D.J. DeRosier, J.S. Wall, M.N. Simon & J. Hainfeld. 1992. Mass determination and estimation of subunit stoichiometry of the bacterial hook-basal body flagellar complex of *Salmonella typhimurium* by scanning transmission electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:4801-4805.
- Springer, M.S., M.F. Goy & J. Adler. 1979. Protein methylation in behavioural control mechanisms and in signal transduction. *Nature*. **280**:279-284.
- Stalimeyer, M.J.B., S.I. Aizawa, R.M. Macnab & D.J. DeRosier. 1989. Image reconstruction of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **205**:519-529.
- Stock, J.B., M.G. Surette, W.R. McCleary & A.M. Stock. 1992. Signal transduction in bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **276**(28):19763-19766.
- Tarasov, V.Y., A.S. Kostyukova, E.I. Tiktopulo, M.G. Pyatibratov & O.V. Fedorov. 1995. Unfolding of tertiary structure of *Halobacterium halobium* flagellins does not result in flagella destruction. *J. Prot. Chem.* **14** (1):27-31.

- Trachtenberg, S. & D.J. DeRosier. 1987. Three-dimensional structure of the frozen-hydrated flagellar filament. The left handed filament of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **195**:581-601.
- Uratani, Y., S. Asakura & K. Imahori. 1972. A circular dichroism study of *Salmonella* flagellin: evidence for conformational change on polymerization. *J.Mol.Biol.* **67**:85-98.
- Vonderviszt, F., H. Uedalra, S. Kidokoro & K. Namba. 1990. Structural organization of flagellin. *J.Mol.Biol.* **214**:97-104.
- Vonderviszt, F., P. Závodszky, M. Ishimura, H. Uedalra & K. Namba. 1995. Structural organization and assembly of flagellar hook protein from *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **251**:520-532.
- Vonderviszt, F., S. Alzawa & K. Namba. 1991. Role of the disordered terminal regions of flagellin in the filament formation and stability. *J.Mol.Biol.* **221**:1461-1474.
- Ward, M.J., A.W. Bell, P.A. Hamblin, H.L. Packer & J.P. Armitage. 1995. Identification of a chemotaxis operon with two *cheY* genes in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* **17**:357-366.
- Ward, M.J., D.M. Harrison, M.J. Ebner & J.P. Armitage. 1995. Identification of a methyl-accepting chemotaxis protein in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* **18**:115-121.
- Welch, M., K. Oosawa, S.J. Alzawa & M. Eisenbach. 1993. Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**:8787-8791.
- Woody, R.W. 1995. Circular dichroism. *Meth. Enzymol.* **246**:34-71.
- Yang, J.T., C.S.C. Wu & H. Martinez. 1986. Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Meth. Enzymol.* **130**:208-269.
- Yokoseki, T., K. Kutsukake, K. Ohnishi & T. Iino. 1955. Functional analysis of the flagellar genes in the *flhD* operon of *Salmonella typhimurim*. *Microbiol.* **141**:1715-1722.

Alimentate bien, come frutas y verduras.