



Caracterización genética y molecular de la proteína FlgK (HAP1), componente estructural del flagelo bacteriano de *Rhodobacter sphaeroides*.

Tesis Doctoral

PRESENTA:

Biol. David Jaime Castillo Cornejo
Departamento de Genética Molecular
Instituto de Fisiología Celular UNAM
Para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Director de tesis:

Dr. Georges Dreyfus Cortés
Departamento de Genética Molecular
Instituto de Fisiología Celular UNAM

Abril 2009



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.

Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Ciudad de México
Abril de 2009

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Georges Dreyfus por albergarme estos años bajo su tutela y permitirme continuar mi desarrollo dentro de la investigación científica. Sin lugar a dudas también deseo reconocer la labor no solo académica sino formativa de mi comité tutorial: Dra. Laura Camarena y Dr. Dimitris Geogellis, por su apreciable visión crítica y aguzado sentido de objetividad científica.

A los profesores miembros del jurado del presente trabajo: Dra Carmen Gómez Eichelmann, Dra. Guadalupe Espin, Dr. David Romero, y Dr. Diego González Halphen, que han evaluado el contenido de éste proyecto y han hecho palpable su compromiso en velar por la formación de nuevos investigadores, agradezco su tiempo y dedicación.

A los todos los profesores del posgrado que no solo compartieron conmigo sus conocimientos, si no que han sembrado en mi el rigor y la curiosidad de seguir investigando.

Al Instituto de Fisiología Celular que a través de su personal académico y administrativo hacen de esta cede una de las mejores en el campi universitario

A las unidades de apoyo del IFC: La Unidad de Microscopía (Dra. Araceli Patrón, Rodolfo Paredes y Ma. Rosa Picasso), a la unidad e Biología Molecular: (Dra Laura Ongay) y a la Unidad de cómputo.

Deseo agradecer el apoyo económico que recibí del CONACyT, durante mis años de becario (2003-2007).

Y finalmente pero no menos importante deseo expresar mi absoluto agradecimiento y refrendar mi lealtad a esta Máxima Casa de Estudios: la UNAM.

David Jaime Castillo Cornejo

Agradecimientos Personales

Querido lector,

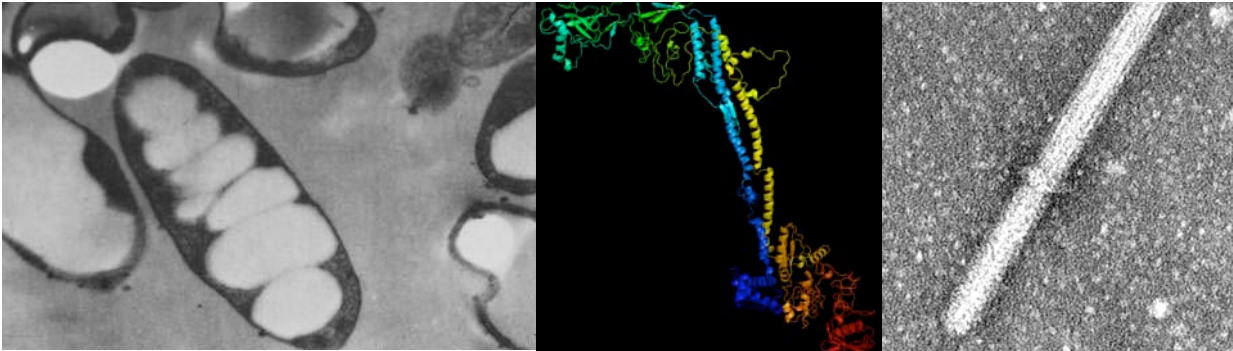
Para mi...han sido muchos años, muchas puestas de sol, muchos falsos positivos, muchos regaños, muchas palabras de motivación, muchos días de frustración, muchos desengaños, muchos días de pequeñas victorias, muchos "Buenos días"... muchos a veces no tan buenos... muchos geles, muchos... (pero muuuuchos) PCR's, muchos cumpleaños, muchos pasajes, muchas cajas petri, muchos nuevos amigos, muchas risas, muchos desvelos, mucho tráfico, mucho estrés... pero... ¿saben algo?... Lo volvería hacer. Por que simplemente nadie me va a contar como es el camino hasta que lo recorre uno. En estos casi 10 años que el IFC se ha convertido en mi segundo hogar, he aprendido... "mucho"... de ciencia, de la naturaleza humana, del valor de los amigos y de la integridad personal. La ciencia es una disciplina donde no solo se forjan habilidades y talentos, también se forjan personalidades, se moldean ideologías, se cuestionan egos propios y ajenos, de desvelan fantasmas y se rompen prejuicios... ante todo es un reto personal. ¿Pero que reto personal se hace completamente solo?... Ninguno. Nada de esto hubiera sido posible si no tuviera un lugar en el clan "Dreyfus". Mi estimado Dr. Dreyfus, a Ud. primero que a nadie le agradezco la oportunidad de permitirme crecer, de haber expandido mis fronteras personales y de haber cruzado otras (estas últimas literalmente). El "clan" no estaría completo sin la diversidad y el contraste de otros "clanes" hermanados: el de Dra Laura Camarena, el de la Dra Bertha González y el del Dr. "Diego" González-Halphen con quien compartimos ideas, pasteles de cumpleaños, reactivos y hasta la lectura de tasas de té... Cuando las fronteras del "vecindario" se hacen más grandes, llegan nuevos inquilinos o aparecen nuevos conocidos, quiero agradecer al "clan" del Prof Keiichi Namba y a sus colaboradores: Tohrú Minamino, K. Imada, T. Kato, M. Miyata, junto con otra decena mas, por albergarme en su laboratorio y haber compartido su tiempo y conocimientos, así como su amistad en un verano como ningún otro.

Existen otros "clanes" a quien no puede pasar desapercibida mi gratitud, La familia Laborde-Franzoni, mi "familia adoptiva" en Japón los Sres. Hidaka: Jessica y Eiki... el pequeño Yuuki. A los amigos de siempre y de toda la vida: Isadora Andrade, Paola García, Diego Carmona, Tony Pitman, Rodrigo Ramirez, Gjalt Gwybenga, etc..., por aguantar mis neurosis y compartir otras tantas. A los compañeros de la Asociación de Montañismo UNAM (Básico 5 y escalada técnica), que no solo dan lecciones de cómo trepar una montaña o de cómo exorcizar miedos y demonios por más fría, afilada o alta que sea la pendiente... sino de cómo hacer las fracturas de peroné menos traumáticas.

Finalmente y no en último plano, a la "Fundación Castillo" que ha sido, como el apellido lo dice, la piedra angular del apoyo incondicional que he recibido de una familia como muy pocas.

A tod@s mi profunda gratitud.

Ciudad Universitaria, Abril 2009



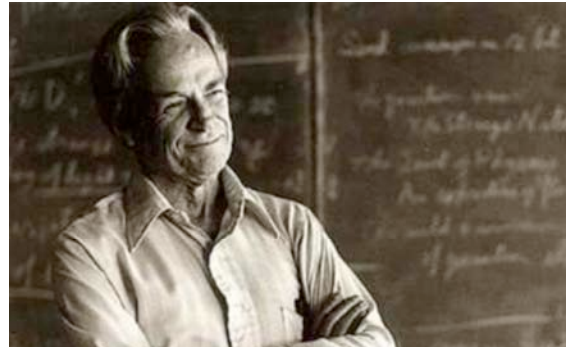
Indice

1.0 Introducción	1
“There’s plenty of Room at the bottom” Feynman y el problema de la información: Nanomáquinas	1
1.1 ナノテクノロジー (jap. Nanotecnología)	2
2.0 Mecanismos de propulsión bacteriana	2
2.1 Del salón del automóvil, al salón de la fama	2
2.2 Mecanismos no flagelares	3
2.3 Twitching motility (retracción de los Pili)	4
2.4 Deslizamiento	6
2.5 El papel de los exopolisacáridos: <i>Mixococcus xanthus</i> y la adhesión localizada	7
2.6 Deslizamiento en <i>Mycoplasma</i>	8
2.7 Otros motores extravagantes	9
3.0 El flagelo bacteriano	9
3.1 El flagelo en arqueas	10
4.0 Estructura del flagelo bacteriano	12
4.1 Filamento	12

4.2 Diversidad en las flagelinas	16
4.3 El gancho	17
4.4 Proteínas asociadas al gancho o HAP's	18
4.4 Cuerpo basal	19
5.0 Propulsión flagelar y generación de torca	21
5.1 Maglev: ¿Un motor flagelar lineal?	21
5.2 Motores moleculares rotatorios: ¿suspensión electrodinámica?	21
5.3 El motor flagelar	23
5.3 Organización del motor flagelar	24
5.4 Generación de la torca	27
6.0 Características hidrodinámicas del flagelo bacteriano	30
7.0 Ensamblaje flagelar	31
7.1 Biogénesis y regulación de la expresión de los genes flagelares	32
8.0 Aparato de exportación	33
8.1 Biogénesis de FlgK (HAP1Rs) y su interacción con otras proteínas axiales.	34
9.0 Quimiotaxis	37
9.1 Organización y función del complejo supramolecular	39
9.2 Moduladores de la respuesta quimiotáctica.	40
10.0 Interruptor o complejo de "switch"	41
10.1 Quimiotaxis de R. sphaeroides.	42
11.0 Antecedentes del HAP1	43
11.1 Análisis de la región central de HAP1 Rs	44
12.0 Objetivos	44
13.0 Materiales y métodos	45
13.1 Clonación, sobre-expresión y purificación de HAP1 Rs (His6)	52
13.2 Purificación por filtración en gel de la proteína recombinante HAP1Rs(His6)	53
13.3 Generación de anticuerpos α -HAP1Rs(His6) de conejo	55
13.4 Análisis de secreción e inmunolocalización HAP1Rs	56
13.5 Microscopía electrónica de transmisión	57

13.6 Ensayos de motilidad	57
13.7 Análisis de velocidad de nado y rastreo del patrón de nado.	58
14.0 Resultados	58
14.1 Análisis funcional de los alelos <i>flgKRs</i> Δ300	61
15.0 Discusión	67
15.1 Características generales de la región central de HAP1Rs	67
15.2 Análisis estructural de HAP1Rs	68
15.3 Organización modular de HAP1Rs	68
15.4 Características estructurales y funcionales del dominio central de HAP1Rs.	69
15.5 Origen de la organización modular de HAP1Rs.	70
15.6 Proteínas axiales y su posible evolución	74
15.7 Propiedades hidrodinámicas de las HAP's : ¿moduladores del estrés mecánico?	75
15.8 Función de las HAP's en el desempeño mecánico del filamento	75
15.9 Dinámica de las transiciones polimórficas del filamento	76
16.0 Conclusiones	84
17.0 Perspectivas	85
18.0 Bibliografía	86
19.0 Artículo	113

1.0 Introducción



R. Feynman

“There’s plenty of Room at the bottom” Feynman y el problema de la información: Nanomáquinas

El 29 de diciembre de 1959, Richard Feynman ofreció una charla en la reunión anual de la American Physical Society en el California Institute of Technology (Caltech). La transcripción de esta conferencia publicada en febrero de 1960 en la revista del Caltech: *Engineering and Science* (<http://pr.caltech.edu/periodicals/EandS/>), revolucionaría la forma de apreciar los fenómenos físicos y biológicos a escalas de nanómetros. Uno de los principales argumentos que posiblemente motivaron a Feynman a volcar su interés en los sistemas biológicos a dichas escalas, es central en su trabajo como pionero de la computación moderna: ¿Qué tan pequeña puede ser una máquina que “escriba”, “procese”, “duplica” y “transforme” información?.

“The biological example of writing information on a small scale has inspired me to think of something that should be possible. Biology is not simply writing information; it is doing something about it. A biological system can be exceedingly small. Many of the cells are very tiny, but they are very active; they manufacture various substances; they walk around; they wiggle; and they do all kinds of marvelous things...all on a very small scale. Also, they store information. Consider the possibility that we too can make a thing very small which does what we want, that we can manufacture an object that maneuvers at that level!... “

Parecía que la clave, en sus propias palabras, estaba en la miniaturización y no cabe la menor duda que las “máquinas” a las que se refería, existen desde hace millones de años, pero el entendimiento de los mecanismos como hacen todas esas “cosas maravillosas” estaba lejos de su clara comprensión en el momento que se planteó como un problema de frontera en la ciencia en la década de 1960. Feynman falleció en febrero de 1988 pero fue testigo de los avances que se han aproximado con rigurosa precisión para entender los mecanismos comunes en la biología para almacenar, procesar y manipular la información. A más de cuarenta años de la charla en el Caltech, la clonación genética, la biotecnología y la nanotecnología resultan ser vástagos entrelazados de esa inspiración “Feynmaniana”.

1.1 ナノテクノロジー (jap. Nanotecnología)

1974, Universidad de Tokio. Norio Taniguchi acuña el término “nanotecnología” para describir los procesos de ensamblaje de semiconductores en películas ultra delgadas y litografía por medio de un



Norio Taniguchi

haz de iones. La “nanotecnología” principalmente consiste en la separación, consolidación y deformación de materiales del orden de nanómetros (1×10^{-9} m) por medio de un átomo o una molécula. Sin embargo el término es actualmente mucho más amplio e involucra el estudio de los fenómenos físicos que ocurren a escalas nanométricas en sistemas inorgánicos y/o biológicos.

2.0 Mecanismos de propulsión bacteriana

2.1 Del salón del automóvil, al salón de la fama

Desde hace más de un siglo, los fabricantes de automóviles muestran al público las novedades y prototipos de los autos que han marcado tendencias en la industria, así como aquellos que pueden esbozar el futuro de la transportación personal. Con más de una decena de salones en todo el mundo, algunos de los más emblemáticos se han destacado por presentar la intensa investigación en el diseño estético y funcional, pero también en resolver limitaciones energéticas experimentando con diferentes mecanismos de propulsión: París, Berlín, Tokio, Chicago, Frankfurt, Detroit e incluso México, estos salones han sido testigos de la historia del automóvil.

Parecería extraño, pero técnicamente una bacteria con capacidades de desplazamiento autónomo también puede ser un “automóvil”. La palabra "automóvil" proviene del griego *auto* ("por sí mismo") y del latín *movil* ("que se mueve"), La palabra "coche" que utilizamos coloquialmente viene de la palabra húngara *kocsi*.

Así como cada 2 años los fabricantes sorprenden con sus prototipos, también cada año se encuentra en la literatura información sobre la impresionante diversidad en los mecanismos de motilidad que han evolucionado en los procariontes. Desde apéndices superficiales como el flagelo bacteriano, que rota sobre su eje, el pili que empuja a la célula, hasta “pies” que caminan en *Mycoplasma*, incluso algunas estructuras intracelulares como el citoesqueleto y vesículas de gas están involucradas en algunos tipos de motilidad. Sea cual fuere el mecanismo de propulsión, muchos microorganismos móviles utilizan un complejo sistema de señalización que controla sus movimientos en respuesta a los estímulos ambientales. Esta ventaja les permite a éstas bacterias migrar y colonizar ambientes más favorables. Las células procariontes han desarrollado varios mecanismos de motilidad, el uso de flagelos para nadar, ha sido estudiado detalladamente en bacterias entéricas como *Salmonella* serovar *typhimurim* pero hay muchas variaciones a este tema que profundizaremos mas adelante, incluida la utilización de diferentes sistemas flagelares en una misma célula, o el flagelo periplásmico en las espiroquetas.

En realidad muchas células carecen de flagelo y se mueven asistidas por otros mecanismos como la retracción del pili (twitching motility), deslizamiento, y otros nanomotores que no se han estudiado con detalle. Algunas arqueas se desplazan utilizando un flagelo cuyo ensamblaje y desempeño poco tiene que ver con los flagelos de las bacterias (Jarrell y McBride, 2008).

2.2 Mecanismos no flagelares

A pesar de que los mecanismos flagelares en bacterias y arqueas están representados extendidamente, hay un gran número de bacterias que utilizan otros mecanismos de motilidad, como es el caso de *Spiroplasma spp.* Este patógeno común de plantas e insectos, carece de paredes celulares, pero mantiene su morfología helicoidal (Wolgemuth *et al.*, 2005) y se desplaza por medio de movimientos amiboideos utilizando filamentos internos que conforman un citoesqueleto (Trachtenberg *et al.*, 2006). Los filamentos se ensamblan en series de “listones” compuestos por la proteína fibrilar: Fib y la actina bacteriana MreB (Kurner *et al.*, 2005). En contraste a las espiroquetas, que poseen un flagelo periplásmico, *Spiroplasma spp.*, es capaz de nadar rápidamente en medios de alta viscosidad sin distinción de la naturaleza del espesante o gelificante. Lo que podría sugerir algún tipo de especialización a dichos medios. En esta bacteria se sospecha que el citoesqueleto contráctil funciona como un motor lineal que permite su movilidad. Mutaciones que afectan la distancia entre las subunidades que componen a dicho cito esqueleto, modifican la helicidad de la bacteria y alteran la frecuencia del emplazamiento ondulatorio de un “nudo” que atraviesa a lo largo del cuerpo bacteriano, desplazando los fluidos del citoplasma. El emplazamiento ondulatorio de la bacteria se origina desde un de sus polos, sin embargo, los mecanismos subyacentes en la generación de dichas contracciones aun permanecen desconocidos. Otras bacterias marinas también poseen mecanismos de motilidad aún no caracterizados en detalle. Tal es el caso de *Synechococcus* una bacteria sodio dependiente que aparentemente requiere de unos apéndices proteicos pequeños sobre su superficie llamados espículas que por medio de movimientos ondulatorios puede desplazarse con una velocidad de entre 5 y 25 $\mu\text{m/s}$ (Waterbury *et al.*, 1985; Samuel *et al.*, 2001)

2.3 Twitching motility (retracción de los Pili)

Los sistemas de motilidad que emplean el pilus o T4P (Sistema de secreción tipo 4), se ha sospechado que pertenecen a un sistema complejo independiente de motilidad, pero sólo hasta la década pasada se han identificado algunos de sus componentes y mecanismos subyacentes (Merz *et al.*, 2000). La velocidad promedio que una alcanza una bacteria empleando este mecanismo es de entre 0.05–1 $\mu\text{m/s}$ y una fuerza de 100pN (Skerker y Berg, 2001; Burrows, 2005); Este mecanismo requiere del contacto intercelular para un desplazamiento eficiente y se encuentra ampliamente distribuido entre diferentes géneros bacterianos entre los que se encuentran: *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Myxococcus xanthus*, algunas de ellas con la capacidad de desarrollar cuerpos fructíferos y esporas de supervivencia; también se incluyen cianobacterias unicelulares y filamentosas como *Synechocystis* sp. PCC6803 y *Nostoc punctiforme*, así como bacterias Gram-

positivas tales como *Clostridium perfringens* (Duggan *et al.*, 2007; Adams y Duggan, 2008; Varga, 2006). El sistema T4P, posee un filamento o Pilus de aproximadamente 6nm de diámetro y varios micrómetros de largo (usualmente más de 10 μ m). Cerca de 12 a 15 proteínas se han caracterizado como componentes del Pilus y están involucradas en el ensamblaje y la función; otras proteínas adicionales regulan la expresión y su actividad (Mattick, 2002). En el caso de *P. aeruginosa*, las fibras de los Pili están compuestas principalmente por múltiples copias de la pilina PilA. Esta proteína posee una secuencia señal que es procesada por la prepilina peptidasa PilD, una enzima que es homóloga a la preflagelina peptidasa FlaK/PilD para la flagelina de las bacterias y arqueas respectivamente (Bardy y Jarrell, 2002 y 2003). El extremo N-terminal de la pilina procesada, forma una α -hélice hidrofóbica, larga, mientras que el extremo C-terminal se pliega en hojas- β . El ensamblaje de múltiples monómeros de PilA resulta en el empaquetamiento de las α -hélices que son rodeadas por los segmentos β (Craig *et al.*, 2004). Las fibras del Pilus son helicoidales, con aproximadamente cinco pilinas por vuelta. La hidrólisis de ATP se ha asociado por la extensión/retracción del Pili por medio de la adición y/o remoción de subunidades desde la base (Chiang *et al.*, 2005). Dos ATPasas con actividades competitivas están involucradas en estos procesos (Jakovljevic *et al.*, 2008). PilB se requiere para la extensión de los Pili, mientras PilT está involucrada en la retracción (Wu *et al.*, 1997, 2001).

El análisis cristalográfico de PilT sugiere que esta proteína al unir ATP despliega una serie de movimientos de sus dominios que podrían ser responsables de la retracción del Pilus (Satyshur *et al.*, 2007). En *E. coli*, se ha demostrado que la proteína citosólica BfpE (homóloga a PilC en *P. aeruginosa*) interacciona con motores que hidrolizan ATP (Crowther *et al.*, 2004). Por lo que esta familia de ATPasas no solo podría tener una diversidad en función sino también en su compartimentalización. Se ha propuesto que la hidrólisis de ATP por medio de PilB y PilT genera un movimiento de pistón de una proteína de membrana (aparentemente PilC) que permite la adición/remoción de monómeros de pilina durante su ensamblaje/desmontaje.

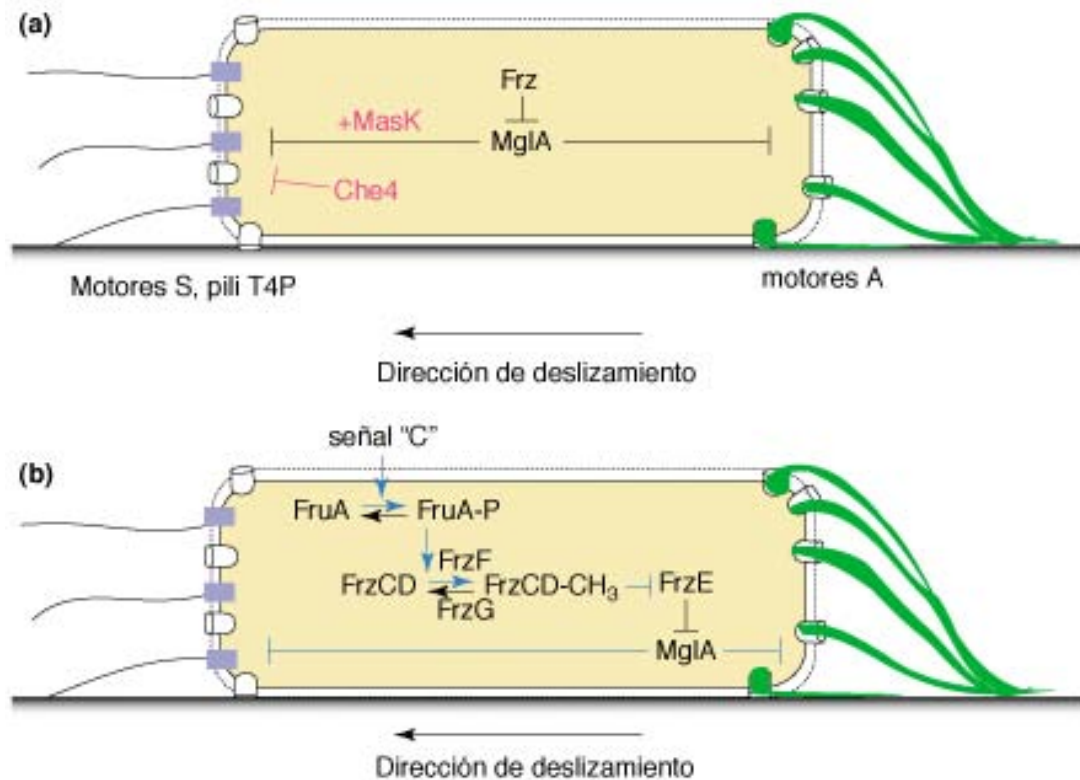


Fig
El

2.3-I

deslizamiento en *Myxococcus xanthus* esta modulado por el Pili T4P y una compleja red de señales intra y extra celulares que modifican la localización de sus motores de forma oscilante. En a) la dirección del movimiento está regulada por un regulador de respuesta Che4. En b), la orientación del deslizamiento se frena y comienza una re localización de pili en el polo opuesto, cuando la señal "c" estimula la vía de transducción FruA, una cinasa sensora asociada a MCP's citoplásmicas. Figura modificada de Sögaard-Andersen, 2004

En las bacterias Gram-negativas, PilQ forma un poro en la membrana externa que permite la exportación de componentes del Pilus. En bacterias Gram-positivas que poseen sistema T4P, PilQ está ausente (Varga, 2006), debido a que no existe la necesidad de una secretina ya que no poseen membrana externa. Se han identificado otras pilinas que poseen funciones similares a PilA posiblemente modulando la extensión/retracción de los Pili por medio de una exportación selectiva. La localización del T4P en *M. xanthus* está acoplada a la migración de los complejos de los motores "A" y "S", dependiendo de oscilaciones en la localización de dichos motores durante el desarrollo del cuerpo fructífero (Sögaard-Andersen *et al.*, 2004), sin embargo aun se desconocen los mecanismos que determinan su polaridad. (I. Bulyha, L. Sögaard-Andersen, comunicación personal)

2.4 Deslizamiento

Otro tipo de motilidad bacteriana es el deslizamiento, anteriormente algunas bacterias se asociaba a este tipo de motilidad pero los mecanismos que emplean usualmente son aquellos que se describieron anteriormente en la retracción de los Pili o "twitching motility". El deslizamiento ocurre cuando el desplazamiento de una bacteria depende del movimiento lateral de "adhesinas" localizadas en la superficie. Este mecanismo se encuentra muy generalizado en el phyla de los Bacteroidetes (McBride, 2001), entre ellas, el género más estudiado es *Flavobacterium spp.* Estas bacterias pueden deslizarse con velocidades de entre 3 a 4 $\mu\text{m/s}$ y ocasionalmente revertir la dirección de su movimiento. Al adherirse en un polo, rotan de forma concéntrica a 2rps (revoluciones por segundo) como si fuera la hélice de un avión.

Se cree que la fuerza protón motriz está involucrada en el deslizamiento de *Flavobacterium johnsoniae* y otros Bacteroidetes deslizantes. A través de análisis genéticos se han identificado múltiples genes y proteínas involucradas en este tipo de movimiento, muchos de ellos exclusivos de las Bacteroidetes, lo que podría sugerir que el deslizamiento de *Flavobacterium* y sus grupos emparentados evolucionaron de forma independiente a otras formas de locomoción bacteriana. Algunos de sus componentes son los transportadores transmembranales dependientes de ATP (GldA, GldF y GldG), cinco lipoproteínas de función desconocida (GldB, GldD, GldH, GldJ y GldK), una proteína citoplásmica asociada a la membrana (GldL) y dos proteínas periplásmicas (GldM y GldN), (Braun *et al.*, 2005). Algunas de estas proteínas constituyen al motor de deslizamiento, dado que la mutación de cualquiera de los respectivos genes genera una pérdida en la motilidad. Existen otros componentes redundantes que se asocian a la superficie celular, como un producto de 66kDa: SprB que es requerido para la motilidad y es un elemento difusible del sistema (Nelson *et al.*, 2008). Esta proteína se localiza a lo largo de la membrana externa. Cuando las células son tratadas con un anticuerpo α -SprB las células inhiben su movilidad, si los anticuerpos son acoplados a esferas de látex marcadas, se puede seguir su trayectoria a una velocidad de $2\mu\text{m/s}$, recorriendo la superficie de la célula de un polo al otro y reaparecer en el lado contrario de la célula. Existen múltiples copias homólogas de *SprB*, las mutaciones en este gen disminuyen pero no abaten por completo la motilidad, lo que podría sugerir que existen diversos productos que tienen funciones similares complementarias (Liu *et al.*, 2007). La presencia de copias múltiples de este gen puede explicar la capacidad que posee *F. johnsoniae* a adherirse selectivamente a diversas superficies como vidrio, teflón, agar y poliestireno. Los estudios de criomicroscopía revelan que existen apéndices de 5nm de ancho que podrían constituir filamentos de adhesinas, probablemente homopolímeros de SprB.

2.5 El papel de los exopolisacáridos: *Mixococcus xanthus* y la adhesión localizada

M. xanthus es uno de los organismos procariontes que despliegan un proceso complicado de desarrollo, que culmina con la formación de un cuerpo fructífero multicelular, especializado en generar esporas resistentes. Este proceso posee múltiples estados de comunicación y motilidad. En *M. xanthus* co-existen dos tipos de motilidad la motilidad social o “S” mediada por el pili, que ha sido descrito previamente y la motilidad “A” o exploratoria. El tipo “A” requiere de la síntesis coordinada de exopolisacáridos secretados desde unas estructuras en forma de toberas, ubicadas en el polo contrario al ensamblaje del pili. Las mutaciones en los genes homólogos de *E. coli* TolB, TolQ y TolR son indispensables para la motilidad en *M. xanthus*. Estas proteínas están involucradas en el transporte de moléculas a través de la membrana externa. Recientemente se ha identificado un candidato que podría mediar la interacción de productos entre el citoesqueleto helicoidal de *M. xanthus* y la secreción/polaridad de los motores “S” y “A”: Aglz es una proteína que se localiza estáticamente en la cara deslizante de *M. xanthus* (Mignot *et al.*, 2007). Las mutaciones en esta proteína alteran la motilidad mediante el sistema “A” pero se desconoce como podría modular el transporte o la localización de los componentes del motor “A” (D. Zusman, L. Sögaard-Andersen, comunicación personal)

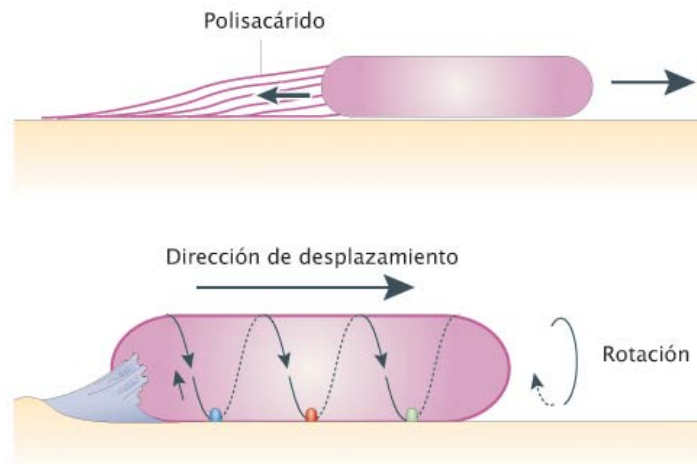


Fig 2.5-1:

Modelo de la adhesión focal en *M. xanthus*. Este modelo propone la participación de la proteína Aglz como un motor lineal que interacciona con el citoesqueleto bacteriano (MreB). Se ha propuesto que estas proteínas permanecen estáticas en puntos focales de adhesión en el sustrato, pero movilizan al citoesqueleto generando un desplazamiento rotatorio de la célula. Modificado de [Jarrell y McBride, 2008](#).

2.6 Deslizamiento en *Mycoplasma*

Mycoplasma es un género de bacterias que poseen un genoma pequeño en comparación a otras bacterias. Sin embargo codifica para un complejo sistema de deslizamiento que depende de un citoesqueleto ([Miyata, 2005, 2008](#)). Actualmente el trabajo en *Mycoplasma mobile* se encuentra muy limitado debido a que no existen herramientas moleculares que permitan su manipulación genética ([D. Nakane, comunicación personal](#)), sin embargo los mecanismos de motilidad encontrados en estas bacterias se han estudiado por medio de microscopía óptica, electrónica y mutantes espontáneas o interrupciones por transposición. Las mutantes que se han podido identificar están asociadas a proteínas denominadas Gli “gliding” ([Uenoyama y Miyata, 2005](#)) que forman un andamio con el citoesqueleto de la bacteria. El producto co-transcrito con los genes *gli* (P42) codifica para una ATPasa atípica que podría ser responsable de energizar este tipo de desplazamiento ([Hasselbring y Krause, 2007](#)). (Al solubilizar las membranas de ésta bacteria y adicionar ATP, las células tratadas no son viables pero pueden recuperar la motilidad [D. Nakane, M. Miyata comunicación personal](#)). En *Mycoplasma pneumoniae* se ha localizado por críotomografía un andamiaje similar al encontrado en *M. mobile*. El modelo que impera en estas bacterias es que existe un “brazo” o “pies” (cuya naturaleza proteica no se ha identificado) que se adhieren al sustrato: al energizarse, los “pies” se desplazan coordinadamente asistidos por la interacción con un segmento especializado del citoesqueleto organizado en un “cuello” o cinturón en un extremo de la bacteria.

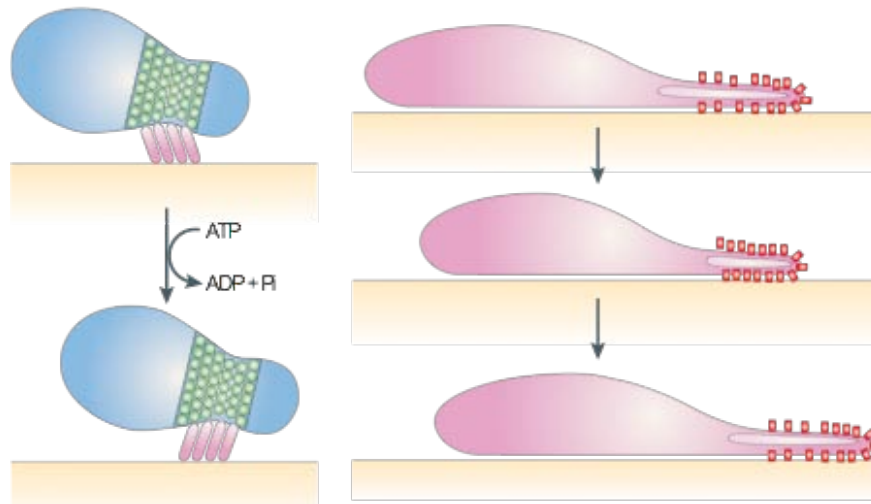


Fig 2.6-I:

Modelo de desplazamiento en *Mycoplasma*. Tomado de Jarrell y McBride, 2008.

2.7 Otros motores extravagantes

Otras bacterias como *Shigella flexneri* y *Listeria monocytogenes* emplean mecanismos similares al deslizamiento bacteriano pero que dependen de la polimerización o despolimerización de un citoesqueleto compuesto por actinas y receptores transmembranales de la superfamilia WASP (Wiskott-Aldrich Sndrome Proteins). Estas proteínas de acoplamiento multimodular, conectan la actina bacteriana a una serie de receptores transmembranales, entre ellos cinasas de tirosina y proteínas heterodímeras capaces de hidrolizar guanosin trifosfato (Ikeda *et al.*, 2003; Stevens *et al.*, 2006).

En la arquea *Halobacterium salinarum* y otras cianobacterias se han identificado una familia de genes *gvp* asociados a la formación de vesículas de gas que. Estas vesículas se emplean como sistema de desplazamiento “vertical” modulando la flotabilidad del organismo en la columna de agua (Das-Sarma *et al.*, 1994). Este sistema se encuentra asociado a la regulación de la fotosíntesis y/o el metabolismo de carbohidratos (Walsby *et al.*, 2006). Dichas vesículas están formadas completa y exclusivamente por proteínas hidrofóbicas como GvpA (Offner *et al.*, 1998). Este sistema lo constituyen cerca de 10 productos/genes que regulan el ensamblaje y la flotabilidad de estos organelos.

3.0 El flagelo bacteriano

El flagelo está bacteriano ampliamente distribuido entre los procariontes, el cual es responsable de la motilidad. Es una nanomáquina biológica constituida de tres componentes: un motor, una articulación universal o gancho, un filamento helicoidal o propela, semejante a un tornillo de Arquímedes. El ensamblaje de esta nanomáquina se posibilita gracias a la existencia de un aparato de exportación dedicado para el ensamblaje flagelar. El motor es alimentado por el gradiente electroquímico de protones o iones de sodio que cruzan la membrana citoplásmica. El motor consiste en un rotor, un eje, un buje, forro o casquillo (*bushing*) y un estator compuesto de cerca de una docena de unidades. El parecido con un motor eléctrico diseñado por los humanos es sorprendente y al mismo tiempo supera a cualquier motor fabricado hasta la fecha, por eso entre otros aspectos, el flagelo bacteriano es uno de los organelos más intrigantes encontrado en la biología.

En organismos modelo clásicos como *Escherichia coli*, el flagelo tiene una longitud de 10 μm , pero su filamento helicoidal es de solo 20nm de ancho y su cuerpo basal de 45nm de ancho. El filamento está constituido por aproximadamente 20 proteínas estructurales y por medio de otras 20 a 30 proteínas con un papel regulatorio durante la biogénesis y la quimiotaxis (Berg, 2003; Macnab, 2003). La mayoría de esas proteínas son requeridas para el ensamblaje y su función, generalmente con modestas variaciones entre las especies donde se ha estudiado. A lo largo de los últimos treinta años varios artículos y trabajos han descubierto gradualmente los detalles estructurales, los mecanismos de ensamblaje y función. Muchas de estas conclusiones han arrojado resultados sorprendentes. Berg y Anderson (1973) encontraron la primera evidencia contundente de que el filamento flagelar es impulsado por un motor rotatorio. Esta hipótesis fue confirmada cuando el filamento flagelar fue fijado a portaobjetos para su observación directa (Silverman y Simon, 1974). La fuente de energía de motor es la fuerza protón-motriz (Manson *et al.*, 1977), a diferencia del uso de ATP en otros motores moleculares bacterianos como en *Mycoplasma mobile*. El filamento flagelar se ensambla desde el interior de la célula, con los monómeros de la flagelina añadidos en el extremo distal después de ser exportados a través de un canal de 2nm dentro del filamento flagelar (Namba *et al.*, 1989). El flagelo de *E. coli* rota bidireccionalmente a 100 Hz, esta frecuencia permite propulsar a la células (con un tamaño de entre 1 a 2 μm) con una velocidad 10-30 $\mu\text{m}/\text{seg}$. Mientras que el flagelo de otras especies, alimentado por iones de sodio, en vez de hidrogeniones, puede rotar cerca de los 1500 Hz (ciclos de rotación) y puede desplazar a las células a velocidades de varios cientos de $\mu\text{m}/\text{seg}$ (Berg, 2008). La eficiencia de conversión de energía de un gradiente de iones a rotación se aproxima al

100% (DeRosier, 1998). Las interacciones entre el rotor y el estator y aquellos complejos solubles y los componentes membranales del sistema de exportación es altamente dinámica. Las estructuras de los componentes del cuerpo basal incluyendo aquellos del aparato de exportación, se han podido observar por cristalografía de rayos X de alta resolución (Vonderviszt *et al.*, 1991, Mimori-Kiyosue *et al.*, 1996, Yamashita *et al.*, 1998), criomicroscopia electrónica y criotomografía (Morgan y DeRosier 1992, 1993, 1995; Mimori *et al.*, 1995, Yonekura *et al.*, 2003) ofreciendo una comprensión más detallada de sus mecanismos.

3.1 El flagelo en arqueas

El flagelo de las arqueas posee muchas similitudes funcionales con los flagelos bacterianos, pero evolutivamente sus sistemas son homólogos al sistema T4P que ha sido descrito para el Pili (Cohen-Krausz, S. y Trachtenberg, S., 2008). Los flagelos en arqueas son muchos más estrechos (10 a 12nm) y generan velocidades más lentas: 2-3 μ m/s, poseen una biogénesis similar al pili, con la incorporación de sus subunidades desde la base del flagelo y no a través de un sistema de exportación, ya que carecen de un poro interno que incorpore las subunidades hasta el extremo distal (Cohen-Krausz, S. y Trachtenberg, S., 2008). Tampoco existe una especialización funcional entre las interfaces encontradas en el flagelo de las bacterias: gancho o filamento.

Las “flagelinas” en las arqueas forman una estructura continua y no hay una distinción estructural clara. Aun que no existen muchas observaciones directas sobre su motilidad, el flagelo en las arqueas es un flagelo rotatorio que emplea tanto la fuerza protón motriz y Na-motriz para desplazarse (Nutsch *et al.*, 2005).

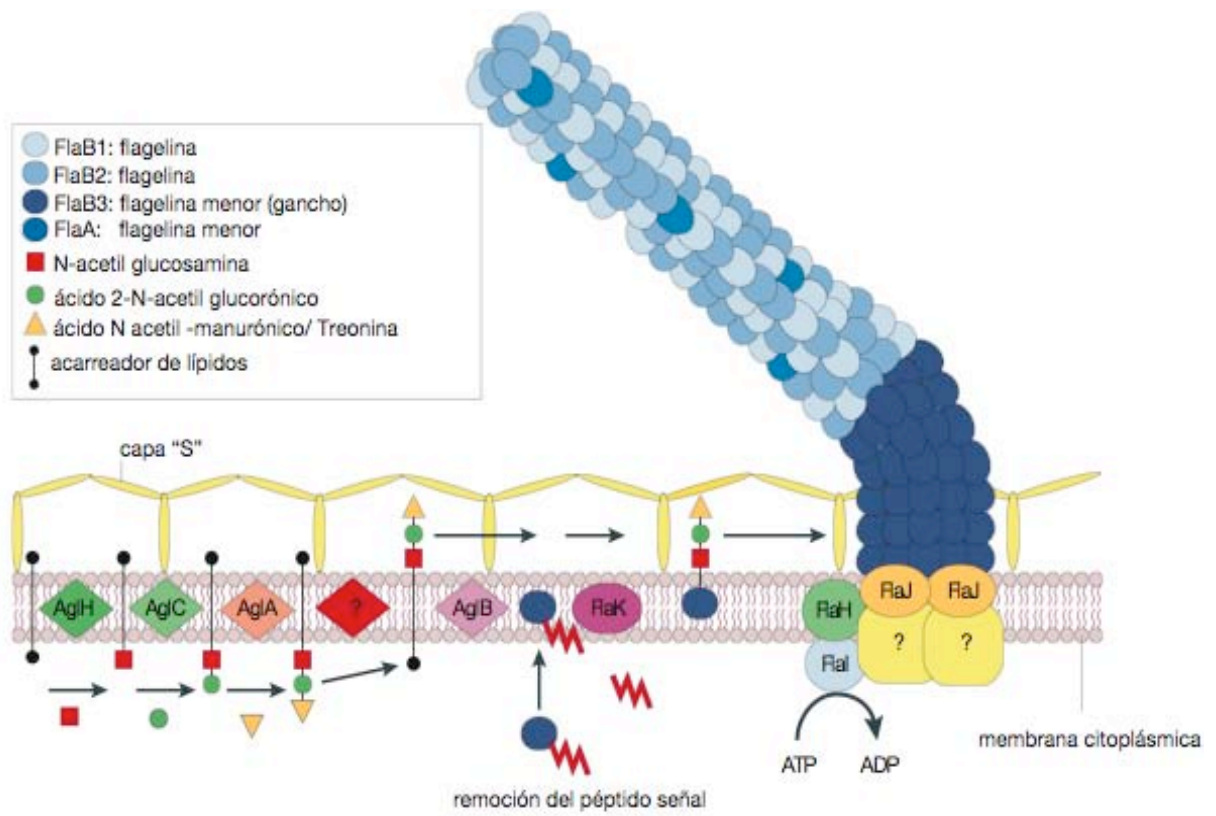


Fig3.1-I:

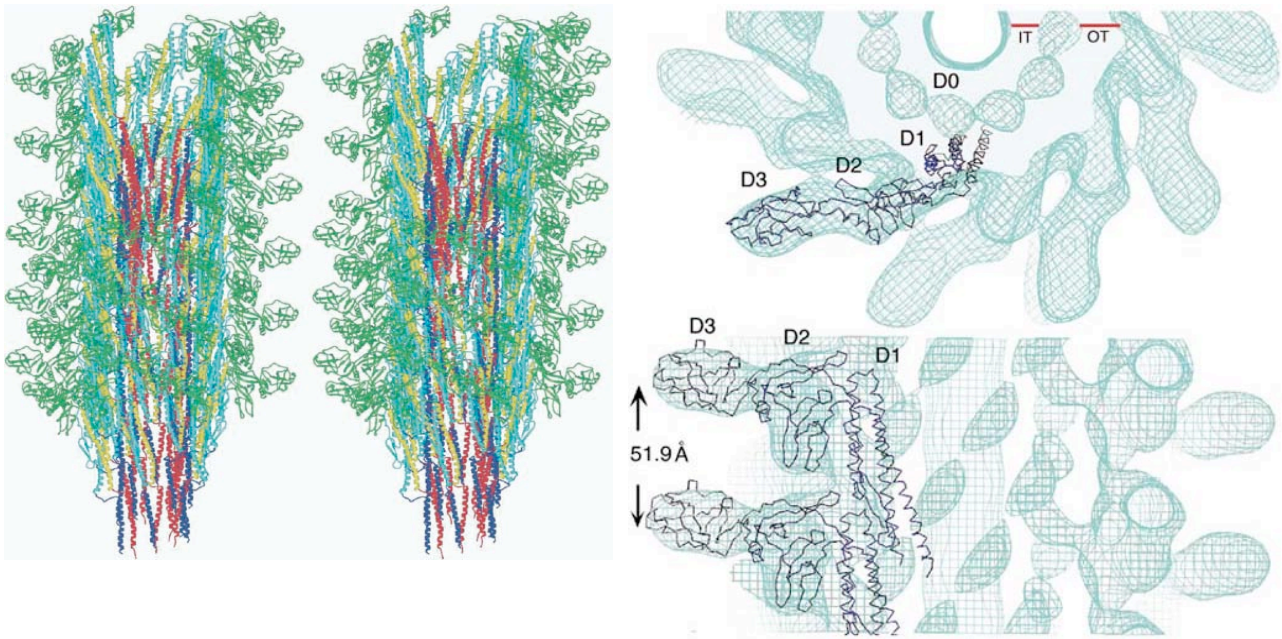
Modelo de la biogénesis flagelar en las arqueas. Modificado de [Jarrell y McBride, 2008](#).

4.0 Estructura del flagelo bacteriano

En las bacterias, el flagelo es una estructura compleja que posee tres componentes básicos: un filamento helicoidal, una estructura curva denominada gancho que une a la bacteria con el filamento y finalmente el cuerpo basal; que incluye al motor responsable de generar la fuerza motriz. El filamento y el gancho son estructuras extracelulares, mientras el cuerpo basal se halla embebido entre la membrana y la pared celular y posee una cara citoplásmica (Jones y Aizawa 1999; Macnab, 2003).

4.1 Filamento

El filamento es el componente responsable del desempeño del trabajo hidrodinámico extracelular y representa el principal componente flagelar en términos de costo biosintético. Se requiere de cerca del 1% de la energía de la célula bacteriana para sintetizar y exportar al espacio extracelular los componentes que constituyen al flagelo. El filamento se compone de aproximadamente 20,000 subunidades de monómeros de flagelina (FliC) con un peso molecular entre 50 y 60 kDa. y con un coeficiente de rigidez de 10^{-15} dinas /cm², dos órdenes de magnitud mayor a la actina (Macnab 1996, 2003). La flagelina tiene 3 dominios, un dominio carboxilo-terminal y un dominio amino-terminal altamente conservados entre las especies flageladas y un dominio central que aparente no es indispensable para el ensamblaje (Kuwajima 1988). Sin embargo es en ésta región donde se hallan los epítopes antigénicos (Macnab 2003), además algunos de sus segmentos hidrofóbicos están implicados en su capacidad de nado en medios semisólidos (Malapaka *et al.*, 2007). El filamento posee una longitud variable que va de entre 5 a 10 μ m y un diámetro conservado de aproximadamente 20 nm. Su simetría helicoidal se debe a la disposición de los monómeros de flagelina (FliC) dispuestos en una red cilíndrica de 11 protofilamentos, con 5.5 monómeros por vuelta de hélice y cada una de las subunidades posee una inclinación de 45° en relación al eje de simetría del filamento (Yonekura *et al.*, 2005).



A

B

Fig 4.1-I:

Modelo atómico de flagelo de *Salmonella enterica serovar* Typhimurium, se muestra el diámetro interno del filamento (120Å) y el diámetro del canal interno (30Å) compuesto por las α -hélices, rígidas (rojo y azul), correspondientes al dominio D0. El diámetro externo del flagelo está constituido por los dominios D1, D2 y D3 que sobresalen de la estructura (verde). En el panel B (inferior), se muestra la reconstrucción obtenida por resonancia magnética de un filamento de *Salmonella enterica serovar* Typhimurium, y la posición de los monómeros de la flagelina ensamblada en la estructura. Figuras modificadas de [Yonekura et al., 2005](#)

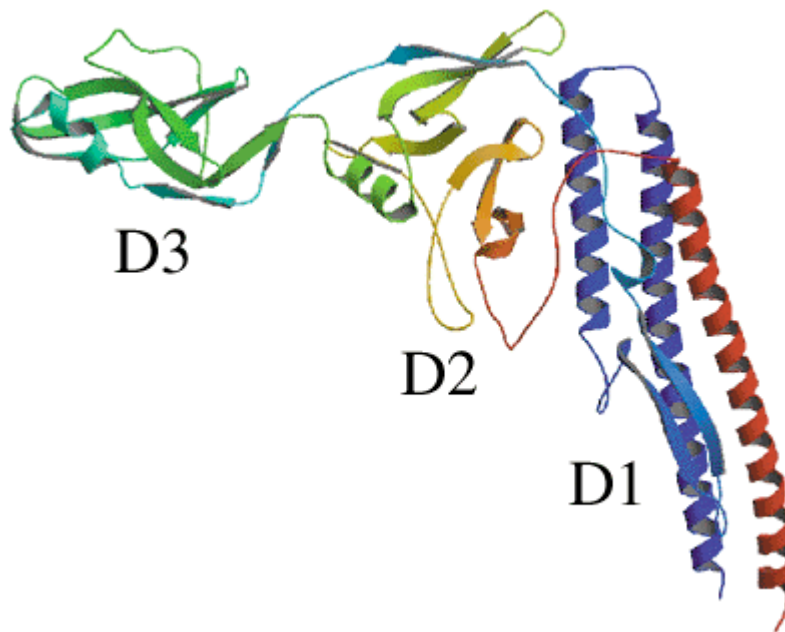


Fig 4.1-II:

Organización de los dominios estructurales de la flagelina cristalizada de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* segmento F40 (Samatey *et al.*, 2001).

El filamento bacteriano tiene una conformación helicoidal, la longitud de onda que hay entre una cresta y un valle es de 2 y 2.5 μm y un posee un diámetro helicoidal de entre 0.4 y 0.5 μm (Macnab 2003), su organización genera variaciones en la estructura del filamento tanto macroscópicas como hidromecánicas, por ejemplo el filamento posee un canal central de aproximadamente 30 Å de diámetro (Ver figura 4.1-IB), por donde pasan los monómeros de flagelina, aparentemente desnaturalizados hacia el espacio extracelular donde se auto ensamblan el extremo del filamento naciente. El filamento se organiza en 11 protofilamentos de flagelina paralelos al eje, que oscilan entre dos estados de conformación helicoidales o de superenrollamiento (Shimada *et al.*, 1975, Hotani, 1982). Cuando el filamento cambia entre un estado de desplazamiento al de reorientación (Morgan *et al.*, 1995), el superenrollamiento se genera cuando dos tipos de interacciones entre las proteínas del filamento se orientan con una helicidad diestra denominada “R” (Right) o siniestra denominada “L” (Left), (Ver figura 2). Estas interacciones afectan la distancia y el empaquetamiento lateral entre las subunidades de flagelina, desplazando a los 11 protofilamentos (Vonderviszt, *et al.*, 1991). En *S. typhimurium* la distorsión entre las hebras del filamento desplaza la distancia entre la subunidades (52 Å), disminuyendo en un 15% (8 Å) la interacción entre los tres dominios identificados de la flagelina. (Ver Fig 4.1-II). Existen variaciones elásticas entre los dominios centrales y el extremo carboxilo terminal de la flagelina que generan desplazamientos en sus α -hélices, provocando la modificación en la disposición axial de las subunidades acortando las distancias y desplazando a los protofilamentos. (Kanto *et al.*, 1991; Samatey *et al.*, 2001).

Mutaciones en las subunidades de la flagelina de *S. typhimurium*: D107E, R124A, R124S, G426A y A449V dan lugar a filamentos rectos, mientras que mutaciones D313Y, A414V, A427V, N433D y A449T generan filamentos con una disposición helicoidal excéntrica (R), (Samatey *et al.*, 2001).

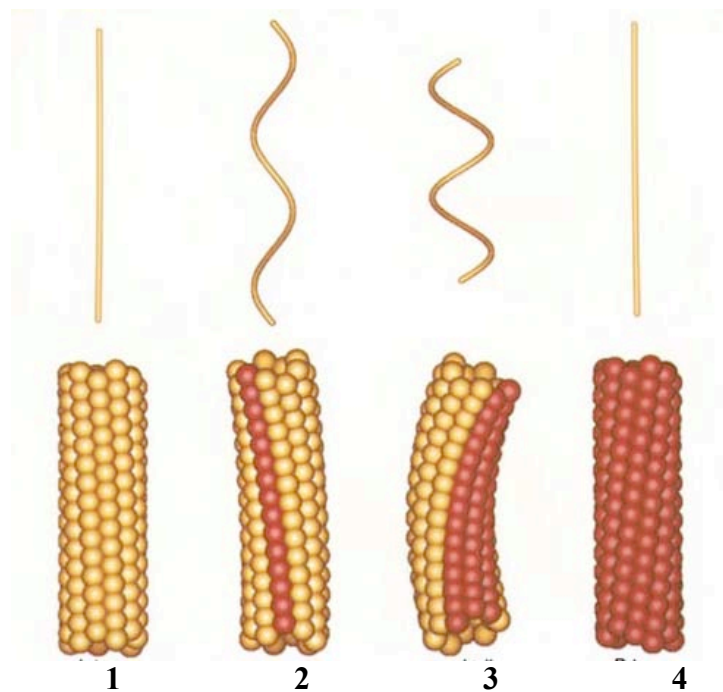


Fig 4.1-III:

Las transiciones polimórficas observadas en el filamento flagelar se deben cambios en la disposición de los monómeros de flagelina en alguno de los protofilamentos. En ésta figura se muestran la morfología adquirida por los filamentos dependiendo el número de protofilamentos desplazados, 1) muestra un filamento recto resultado de un tipo de flagelina disposición “L”; 2) Arreglo usualmente hallado en filamentos normales y sin transiciones, presenta una hélice orientada hacia la izquierda, 3) filamento con una torsión mayor, resultado de un desplazamiento de los protofilamentos hacia un estado “R”, 4) cuando el número de protofilamentos con ésta orientación aumenta se conforma un filamento recto (Namba *et al.*, 1997). Algunos filamentos poseen mutaciones en residuos hidrofóbicos del dominio D0 y D1 que pueden modificar la interacción entre las subunidades, esto se manifiesta en un empaquetamiento anormal que genera filamentos inestables (Samatey *et al.*, 2001, Kitao *et al.*, 2006)

El filamento bacteriano además posee un interés clínico debido a que la antigenicidad de los residuos de las proteínas del filamento es comúnmente referida como el principal factor patogénico responsable en enfermedades infecciosas (Bergman *et al.*, 2005) y de la evasión del reconocimiento del sistema inmunitario (Andersen-Nissen *et al.*, 2005).

Las flagelinas son potentes inductores de la respuesta inmune innata en los vertebrados. Tres vías de señalización se encuentran implicadas en detectar a las flagelinas, estas involucran al receptor análogo de “contacto” 5 (Toll-Like Receptor 5) y las proteínas citosólicas Birc1e/Naip5 e Ipaf. (Smith *et al.*, 2003).

La interacción estructural precisa entre el receptor TLR5 y la flagelina no es muy conocida, sin embargo, se propone que puede ser translocalizada hacia el citosol para inducir la señalización a través del reclutamiento de Bir1e/Naip5 e Ipaf. La translocalización de la flagelina requiere de la isla de patogenicidad I en el sistema de secreción tipo III (SPI-1 T3SS), pero no del sistema de transporte tipo III flagelar (T3SS) (Hawn *et al.*, 2003; Orsi *et al.*, 2008).

4.2 Diversidad en las flagelinas

Es posible que hace millones de años, el ancestro de las subespecies difásicas de la flagelina de *Salmonella*, adquirió un repertorio de diversidad genética. Se han identificados tres genes (*fljB*, *fljA* y *hin*) que se convirtieron en el sitio de “explosión” de diversidad genética en cuatro subespecies de *Salmonella* (McQuiston, *et al.*, 2008). Las flagelinas alternativas, posiblemente sólo sea una segunda fuente de variabilidad antigénica para evadir al sistema inmune del hospedero o del ambiente. Sin embargo la habilidad de alternar la expresión de estos *loci*, probablemente ocurra en forma periódica como un mecanismo de selección. En el caso de *Campylobacter jejuni* existe un mecanismo regulación de la expresión de flagelinas alternativas que depende de un sistema de dos componentes: La expresión de la histidina cinasa FlgR y del regulador de respuesta FlgS, (homólogo a la familia de activadores transcripcionales NtrC), son requeridos para la activación de la expresión de genes dependientes de σ_{54} , pero también dependen de un mecanismo de “variación de fase de lectura”, que tiene como blanco un par de secuencias contiguas en la secuencia de *flgR* (Hendrixson, 2006). Así mismo se han identificado mutantes que son incapaces de expresar productos dependientes de σ_{54} pero continúan expresando a FlgR. Si se asume que los genes dependientes de σ_{54} , también son sujetos de “variación de fase de lectura” y otros mecanismos mutagénicos aleatorios (Ikeda *et al.*, 2001). Esta evidencia se ha encontrado en un repertorio en mutantes incapaces de expresar los genes flagelares con mutaciones espontáneas en la cepa DRH665 de *C. jejuni* (81–176 SmR *DastA flaB::astA*). DRH665 es una cepa resistente a estreptomycin con una remoción en los sitios 81–176 de la copia nativa a *astA*, codificante para una arilo-sulfatasa y para una fusión transcripcional (carente de promotor), de *astA* y *flaB* en el cromosoma (Hendrixson y DiRita, 2003). La arilo-sulfatasa puede expresarse desde el promotor de *flaB*. *flaB*, codifica para una flagelina menor; la mutantes en *flaB* sintetizan flagelo y genera células móviles, al igual que la cepa silvestre (Guerry *et al.*, 1991). Por lo tanto DRH665 es flagelada y sintetiza arilo-sulfatasa desde el promotor de *flaB*. Recientemente se ha encontrado que la síntesis de FlgS está sujeta a mutaciones aleatorias que pueden a la pérdida de un solo nucleótido en un tramo de poliA's, o bien la pérdida de una repetición hetero polimérica en la secuencia de *flgS* (Wösten *et al.*, 2004).

Algunas de las variantes de esas mutaciones pueden revertir durante su crecimiento *in vivo* en el tracto digestivo del pollo y en ensayos de motilidad *in vitro*, permitiendo el restablecimiento de la expresión de los genes dependientes de σ_{54} , y por lo tanto de la motilidad flagelar. Mutaciones intragénicas, incluidos mecanismos típicos, de cambios de fase lectura, reversiones, inserciones u remociones, reestablecen la síntesis de FlgS. Como muchas otras bacterias, *C. jejuni* debe asegurarse que las mutaciones que afectan regiones codificantes de genes de virulencia y factores de colonización no ocurran cuando esas proteínas son requeridas en su interacción con el hospedero.

Cuando esas mutaciones ocurren, las bacterias deben repararlas para iniciar y mantener la infección. En *C. jejuni* esta habilidad de reparación no existe, ya que carece de un sistema de reparación de apareamiento erróneo o "mismatch", para disminuir la frecuencia de mutaciones espontáneas (Parkhill *et al.*, 2000; Fouts *et al.*, 2005). Las unidades mínimas para que el sistema de reparación de "mismatch" repare errores de replicación del DNA consiste en las proteínas MutS, MutH y MutL (Kunkel y Erie, 2005). En el caso de *S. typhimurium*, LuxS cataliza la síntesis del autoinductor 2 de la vía de señalización de "quorum-sensing". Al ser removido el gen que codifica para dicho inductor, se polariza la variación de las fases de la flagelina hacia la forma más inmunogénica (Flagelina 1). (Karavolos *et al.*, 2008)

4.3 El gancho

El gancho es una estructura ubicada entre el eje y el filamento (Vonderviszt *et al.*, 1995), flexible y transmite la energía de propulsión generada en el motor y que probablemente también posee un papel amortiguador (Samatey *et al.*, 2004). Las propiedades elásticas del gancho (Furuta *et al.*, 2007) lo determinan como una estructura que posee una rigidez suficiente para transmitir la fuerza de torque generada desde el motor (Shaik *et al.*, 2005). La secuencia amino y carboxilo terminal tanto en las proteínas del gancho, las proteínas de unión (HAP's) y la flagelina, posee dominios hidrofóbicos que forman estructuras secundarias llamadas "coiled coils" o hélices entrelazadas (Uedaira *et al.*, 1999), estas estructuras se organizan en héptadas rígidas orientadas hacia el filamento (Homa *et al.*, 1987, 1990). Esta estructura está compuesta por aproximadamente 130 subunidades de la proteína FlgE que posee un arreglo helicoidal similar al filamento; forma una "malla" de 11 protofilamentos con una helicidad de media vuelta y una longitud de onda de 130 nm, con una longitud de 55 a 105 nm en contraste con los 10µm del filamento (Muramoto *et al.*, 1998, 1999). Las regiones amino y carboxilo terminal de FlgE son similares a la flagelina del filamento a diferencia del resto de la proteína (Homma *et al.*, 1990). El arreglo helicoidal de las subunidades del gancho también genera un canal de 2.5 nm donde se ha sugerido se realiza la exportación de otros componentes axiales del flagelo. Al igual que las proteínas del filamento (FliC), las proteínas del gancho tienen la capacidad de polimerizarse *in vitro* (Kagawa *et al.*, 1979; Kato *et al.* 1982) y de la misma forma los ganchos resultantes sufren de transiciones polimórficas, en respuesta a variaciones en las condiciones experimentales como la salinidad, pH y fuerza iónica, entre otras. (Shah *et al.*, 2000).

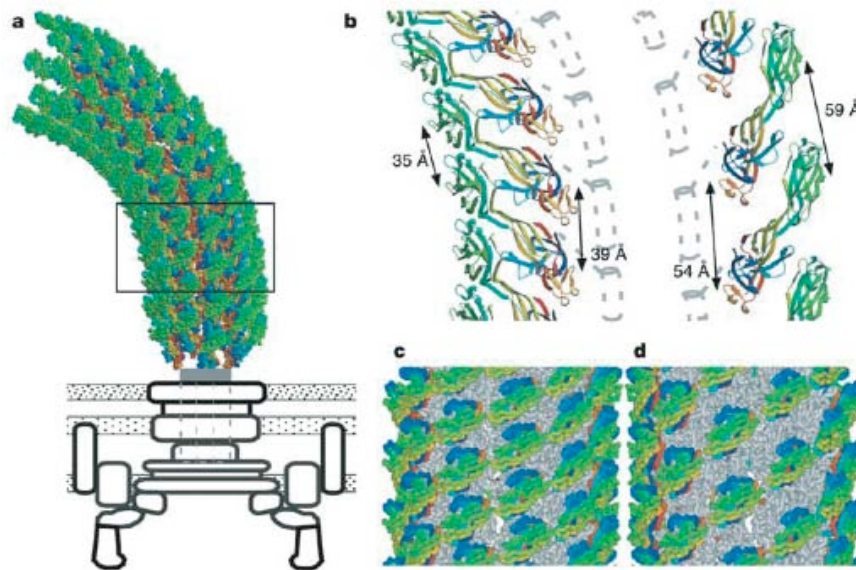


Fig 4.3-I:

Modelo atómico de la estructura del gancho en *S. typhimurium* (Samatey *et al.*, 2004). El gancho también se dispone en un malla cilíndrica de 11 protofilamentos con un arreglo helicoidal (a). En *S. typhimurium*, la disposición de las unidades presenta una compresión (b) y relajación en las caras opuestas del filamento (c y d), con un espacio de 15 Å que continuamente se desplaza. Es posible que ese espacio de compresión le ofrezca mayor flexibilidad a esta estructura.

4.4 Proteínas asociadas al gancho o HAP's

Existen además otras proteínas accesorias esenciales para el ensamblaje del flagelo (Homma *et al.*, 1984, 1985) llamadas proteínas asociadas al gancho o HAP's (Hook Associated Proteins) identificadas como componentes menores del gancho (Ikeda *et al.* 1983,1989). Estas proteínas son HAP1 (*flgK*), HAP2 (*fliD*) y HAP3 (*flgL*). HAP1 y HAP3 funcionan como conectores o adaptadores entre las proteínas del gancho y el filamento. Al igual que la flagelina y FlgE, poseen extremos amino y carboxilo terminales muy conservados (Homma y Iino 1985). La proteína HAP1 en el caso de *Rhodobacter sphaeroides*, que estudiamos en el presente trabajo, posee una secuencia primaria de aproximadamente tres veces más grande que las reportadas en otros organismos, con un dominio central particularmente sobresaliente de aproximadamente 860 aminoácidos. La longitud del gancho está regulada por una proteína moduladora FliK (Muramoto *et al.*, 1999). El fenotipo resultante de una mutante de FliK modifica la longitud del gancho generando un fenotipo con ganchos más largos que los silvestres, sin embargo se requiere de la presencia de FlgK (HAP1) y FlgL (HAP3) para que el gancho se ensamble apropiadamente. FliK inicia el ensamblaje del gancho y posteriormente la exportación de los monómeros de flagelina (Chilcott y Hughes, 1998; Karlinsey *et al.*, 2000; Bennett *et al.*, 2001). HAP 2 o proteína de coronación forma un doble pentámero que controla la polimerización de los monómeros de flagelina en el extremo distal del filamento (Maki *et al.*, 1998), funcionando como una chaperona que modula el ensamblaje de los monómeros de flagelina (Ikeda *et al.*, 1996).

Las subunidades exportadas son acopladas por un mecanismo rotatorio que permite al auto ensamblaje de los monómeros de FliC. (Yonekura *et al.*, 2000). Cabe aclarar que en *Rhodobacter sphaeroides* el gancho es una estructura recta, a diferencia de los ganchos flagelares en bacterias entéricas cuyo arreglo es curvo (West y Dreyfus 1997).

4.4 Cuerpo basal

El filamento y el gancho se unen a la célula a través del eje que interacciona con un complejo embebido en la membrana y pared celular denominado cuerpo basal (Khan, 1992). Esta estructura se compone de un eje central de simetría cilíndrica y no hexagonal, además de un grupo de cuatro polímeros anulares. Uno de ellos, el anillo MS, está constituido por monómeros de la proteína FliF (Ueno *et al.*, 1994) y es una de las estructuras que interacciona con el rotor y el complejo del switch, específicamente con la proteína FliG (Aizawa, 1996, 1998 Oosawa 1994).

Los anillos externos P (FlgI) y L (FlgH) forman dos “empaques” que sostienen al eje entre la pared de péptidoglicano y la membrana de fosfolípidos (DePamphilis y Adler 1971). Estos anillos se encuentran ausentes en bacterias Gram positivas, lo que supone que su papel es evidente en organismos Gram negativos donde además requieren de dos proteínas para el acoplamiento de dichos anillos: FlgA, que es necesaria para formación del anillo P (Onishi *et al.*, 1987) y FlgJ que posee actividad de muramidasa (Nambu *et al.*, 1999). El anillo P es uno de los componentes del cuerpo basal, en las bacterias Gram negativas se ensambla en la parte proximal al cuerpo basal y se piensa que se encuentra adherido a la capa de péptidoglicano, formando una estructura rígida anular, que mantiene al eje central con el anillo L, ensamblado en la membrana externa (Akiba *et al.*, 1991). El anillo P es parte de cuerpo basal, pero se cree que es un componente no rotatorio, que mantiene al eje, funcionando como el casquillo o el balero de un motor. El anillo P se piensa que lo componen 26 copias de la proteína FlgI (Jones *et al.*, 1990; Sosinsky *et al.*, 1992), la cual se expresa como una forma precursora con un sitio de proteólisis en el extremo amino terminal, con una secuencia líder de 19aa y que se exporta al espacio periplásmico por la vía Sec (Homma *et al.*, 1987; Jones *et al.*, 1989) donde se ensambla en el anillo P, rodeando al eje (Kubori *et al.*, 1992). La interrupción en *flgI*, causa un defecto en la motilidad, debido a que durante el ensamblaje del flagelo, éste se trunca en el eje. Recientemente se ha demostrado que enlaces intramoleculares de disulfuro entre las subunidades de FlgI no son necesarias para el ensamblaje del anillo P pero son importantes para proteger a la proteína de la degradación. (Hizukuri *et al.*, 2006). Varias interacciones se han propuesto de forma especulativa para la función del anillo P. Sustituciones selectivas de cisteínas en la proteína FlgI, se ha identificado que poseen un papel en la estabilidad del cuerpo basal, así como en la motilidad (Hizukuri *et al.*, 2008). El eje está conformado por cuatro subunidades FlgB, FlgC y FlgF en la región proximal y FlgG en la región distal (Homma, 1990). El eje interacciona con el motor y el complejo del switch, debido a que el anillo MS y el eje forman una unidad estructural que rota en conjunto.

Su estructura tridimensional aun no se conoce, pero aparentemente su organización no es helicoidal, aunque sus proteínas tienen en sus extremos secuencias conservadas y se polimerizan *in vitro* con facilidad (Saijo-Hamano *et al.*, 2004). El anillo MS, en bacterias entéricas, se proyecta hacia el citoplasma, por esa razón también se le denomina anillo “C” ó citoplásmico, formando una estructura

parecida a la de una campana. El anillo MS esta formado por un “cinturón” de las proteínas FliF. Mutaciones en el anillo MS, no solo generan fenotipos paralíticos, sino que la afinidad del anillo MS por una proteína del complejo de switch o interruptor (FliG) disminuye drásticamente. La estequiometría deducida de FliF y FliG es de 1:1 a partir del número de copias de FliF que son alrededor de 25 (Macnab, 2003, 2004).

Localización de los componentes estructurales del flagelo bacteriano

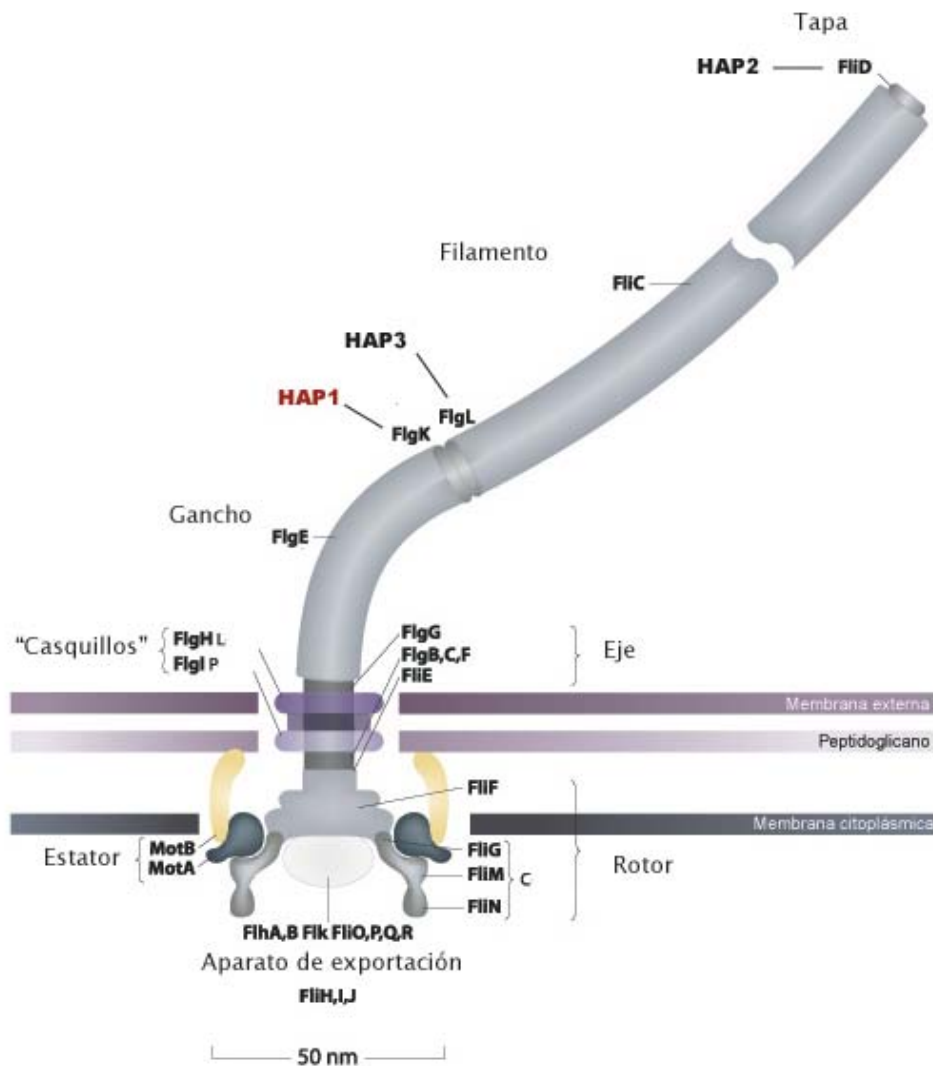


Fig 4.4-I
Modelo de la estructura y componentes generales del flagelo bacteriano Modificado de Berg, 2008

5.0 Propulsión flagelar y generación de torca

A más de treinta años en la investigación de la propulsión bacteriana a través del flagelo, aún se desconocen los mecanismos exactos por medio de los cuales las bacterias pueden interconvertir o transducir energía de un gradiente electroquímico en energía mecánica de propulsión. Se han propuesto múltiples modelos y aparentemente aún no existe alguno que integre satisfactoriamente las evidencias genéticas y fisiológicas encontradas experimentalmente. Algunos de los modelos más aventurados y aceptados es el de las interacciones electrostáticas que genera la torca, y dichos modelos poseen una profunda analogía con mecanismos de propulsión empleado en diferentes sistemas de transporte:

5.1 Maglev: ¿Un motor flagelar lineal?

En la década de 1960, la Gran Bretaña mantenía el liderazgo en la investigación de vehículos de levitación magnética. Eric Laithwaite, profesor del departamento de ingeniería de industria pesada en el Imperial College, desarrolló un vehículo maglev funcional. Pesaba cerca de una tonelada y podía transportar a cuatro pasajeros. Durante el tiempo que duró el proyecto, fue financiado por la compañía Británica de trenes (British Rail), la comisión británica de transporte. (British Transport Commission) la universidad de Manchester, la Universidad de Surrey y la fundación Wolfsom. Este prototipo tenía una milla de línea (1.6km) y fue ampliamente probado, sin embargo el proyecto fue cancelado en 1973 debido a la falta de fondos. Paralelamente la compañía de trenes mantenía una instalación para la investigación de trenes de levitación magnética en Derby, que tampoco dio muchos frutos. En la década de 1970, Alemania y Japón, comenzaron la investigación y desarrollo de vehículos de levitación magnética, pero no sería hasta la década de 1990 que ambos países, después de múltiples fallas, desarrollaron tecnologías maduras... Pero, ¿Cómo funciona un Maglev? Actualmente existen dos tecnologías para la propulsión de vehículos de levitación magnética que emplean principios muy similares:

5.2 Motores moleculares rotatorios: ¿suspensión electrodinámica?

En un sistema de suspensión electrodinámica, el vehículo levita debido a la repulsión del campo generado por el tren y la vía. El campo magnético en el tren es generado por ambos electroimanes. (como en el Maglev japonés) o por un arreglo permanente de electroimanes (como el Induttrak norteamericano). La fuerza de repulsión en la vía se genera por un campo magnético inducido por medio de cables u otras partes conductoras en la vía.

A bajas velocidades, la corriente induce a los electroimanes que a su vez generan un flujo magnético, no lo suficientemente grande para sostener el peso del tren, debido a ello, el tren posee llantas para soportar su peso, hasta que alcance una velocidad que permita mantener la sustentación durante la levitación. Los electroimanes de propulsión en la guía, ejercen una fuerza sobre los magnetos del tren, haciendo que el tren se mueva. Este tipo de propulsión es efectivamente un motor lineal: una corriente alterna fluye a través de los electroimanes que se mueven a lo largo de la vía. La frecuencia de la corriente alternante se sincroniza para alcanzar la velocidad del tren. El actual record de velocidad lo posee el Maglev japonés MLX01 probado en 2003 en las instalaciones de Yamashi al sur de Tokio, con una velocidad promedio de 581km/h. Este tren entrará en funcionamiento hacia el 2025, con un tiempo de 25 a 30 min. de recorrido entre la ciudades de Tokio y Nagoya, el recorrido actual es de 1h 15min a 300km/h (en los trenes de la serie 500 Nozomi).



Fig 5.2-I

Trenes japoneses de alta velocidad (Shinkansen), en primer plano la generación mas reciente y velóz: Nozomi 500 (En el momento que se editó esta tesis, se ha estrenado el primero de la serie E5 con una velocidad máxima de 350km/h)

La fórmula del éxito de estas máquinas radica en que su diseño ha superado muchos obstáculos que ahora representan francas ventajas tecnológicas respecto a métodos previos de transporte y propulsión. Para el diseño de maglev, se han superado problemas de vibración, alimentación de energía, control en la velocidad y fricción. La eficiencia energética de la levitación magnética no solo ha servido para el diseño de bólidos transnacionales, sino en el desarrollo de motores miniaturizados empleados en la electrónica y la medicina. A nivel molecular, la aproximación alternativa para la creación de esas máquinas se encuentra en explotar la arquitectura y función de los rotaxanos (Ben-Shir *et al.*, 2008), los cuales consisten en moléculas macro cíclicas que pueden albergar un molécula lineal en su interior que en sus extremos está unida a moléculas de mayor volumen que funcionan como remaches.

Los rotaxanos muestran tres tipos de movimiento: rotación del anillo macro cíclico alrededor de una molécula eje, (o rotación de un “balero” dentro de un estator, dependiendo del marco de referencia desplazamiento del anillo macro cíclico) a lo largo del eje a modo de pistón y finalmente un movimiento pendular o pivotar, en donde el ángulo de rotación entre el eje y el de la molécula central cambia de forma oblicua (Leigh *et al.*, 2000, 2005).

Estímulos externos como la luz, temperatura o energía electroquímica se han utilizado para controlar el movimiento, incluida la tensión y la compresión. Un campo eléctrico externo ha demostrado inducir la rotación del anillo macro cíclico alrededor del eje, demostrando que los rotaxanos pueden interconvertir diferente tipos de energía y potencialmente podrían emplearse como interconvertidores de energía en nanomotores y sensores (Arfaoui *et al.*, 2006). Los rotaxanos sintetizados poseen múltiples fracciones de aceptores y donadores de electrones, como grupos hidroxilo, grupos amida y oxígeno, a través de los cuales pueden interactuar por medio de puentes de hidrógeno con otras moléculas como los aminoácidos, así mismo pueden reconocer la quiralidad de los mismos por medio de interacciones estéricas, tal como ocurre en algunos grupos prostéticos de muchas proteínas.

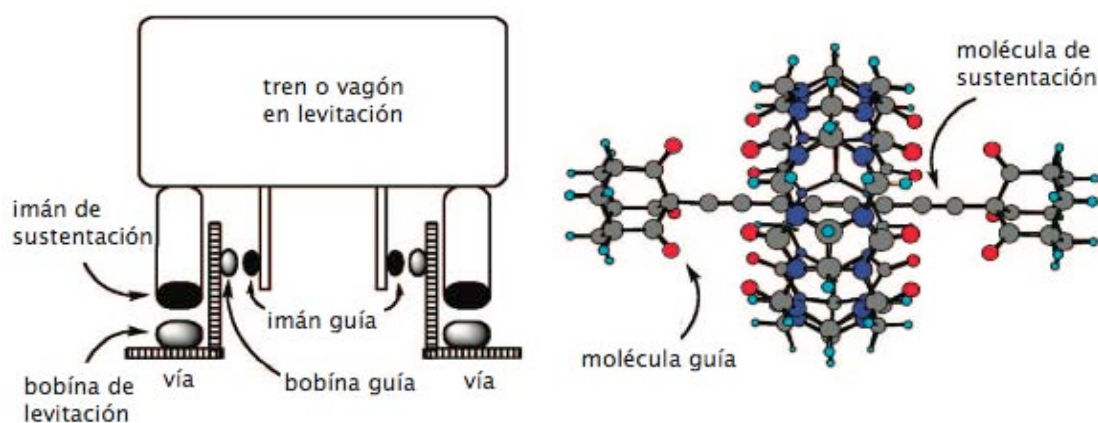


Fig 5.0-II

Comparación entre los sistemas de propulsión/sustentación de los trenes magnéticos y rotaxanos. Modificado de (Ben-Shir *et al.*, 2008).

5.3 El motor flagelar

Los motores flagelares son motores rotatorios, como se describe en el trabajo de Berg y Anderson (1973) donde se encontró la primera evidencia contundente de que el filamento flagelar es propulsado por un motor rotatorio. Esto fue comprobado por Silverman y Simon, (1974). Los motores estudiados poseen varios comportamientos de rotación, pueden girar en sentido de las manecillas del reloj u horario, (CW) o en sentido contrario a las manecillas del reloj o anti horario (CCW) en la misma velocidad. Estas son las direcciones de rotación que se observan cuando se coloca el eje del motor de forma perpendicular al plano del observador.

En los sistemas mejor estudiados (*E. coli*), el motor cambia de dirección en promedio una vez por segundo (en ausencia de un estímulo externo), los intervalos de reversa se distribuyen en forma exponencial; existiendo una constante de reversa por unidad de tiempo (Berg, 2008). El motor flagelar es similar a un motor eléctrico fabricado por el ser humano, ya que requiere de una fuente de poder, un solenoide o bobina, un eje y un estator. La energía generada en un motor de corriente continua produce la rotación del eje que se sostiene por un estator constituido por bobinas. La torca es generada por un potencial electromotriz que se desplaza de forma perpendicular al plano del eje y en el caso de las bacterias, perpendicular al plano de la membrana. La composición del motor flagelar se ha estudiado intensivamente y existen evidencias bioquímicas, biofísicas y estructurales de su organización y función.

5.3 Organización del motor flagelar

El motor flagelar consiste de tres partes principales: El anillo MS, el anillo C y un número variable de complejos de las proteínas MotA/B. El rotor, que está constituido por el anillo MS y la proteína FliG la cual está fija en el filamento flagelar. Alrededor del rotor se localizan varias copias del complejo MotA/B. Cuatro α -hélices transmembranales de MotA y una de MotB conforman el canal iónico para H^+ o Na^+ , las regiones citoplásmicas de MotA (119 residuos entre las hélices 2 y 3 y 75 residuos entre las hélices 4 y el extremo carboxilo) se cree están asociadas para la generación de la torca (Togashi *et al.*, 1997, Zhou y Blair 1997, 1998) y se requiere de un flujo de iones o de protones (*E. coli*) o iones de sodio como en las especie de *Vibrio* (Atsumi *et al.*, 1996). Existe un numero de elementos independientes generadores de fuerza. Cada uno comprende cuatro copias de MotA y dos copias de MotB, adosados a la pared celular, por medio del extremo carboxilo de MotB. Estos elementos ejercen una fuerza en la periferia del rotor por medio de la interacción entre una parte citoplásmica de MotA y la proteína del rotor FliG. No se conoce como ocurren estas interacciones debido a que no se poseen modelos de las estructuras atómicas de MotA y MotB, sin embargo para *E. coli* es claro que la protonación y la desprotonación de un residuo aspártico esencial ubicado cerca del extremo citoplásmico de cada canal de protones genera cambios conformaciones que causan que se mueva una subunidad de MotA de una FliG hacia la siguiente; existen aproximadamente 26 FliG's (Zhou *et al.*, 1998). Si comparamos a un motor eléctrico con el motor del flagelo, las bobinas estarían representadas por un sistema quimioosmótico constituido por un grupo de canales iónicos (Meister *et al.*, 1989), que corresponde a las proteínas MotA y MotB, estas proteínas son responsables del paso de protones H^+ deslocalizados por una diferencia de potencial traducida en voltaje (Meister *et al.*, 1987; Kleutsch y Läger, 1990).

Las bacterias alcalófilas emplean Na^+ y su activación es independiente del consumo de ATP. MotA y MotB son proteínas integrales de membranas, indispensables para la rotación del flagelo. Aun no se conocen los mecanismos exactos como estas proteínas interconvierten energía, pero es probable que ocurra de alguna forma similar a como lo hacen los rotaxanos.

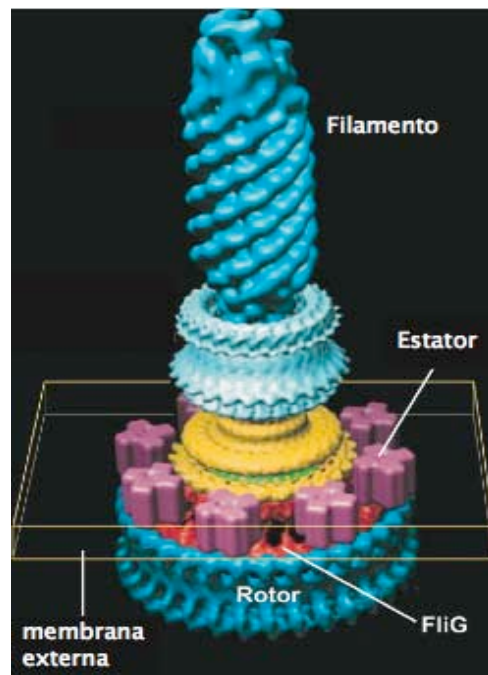


Fig5.3-I

Organización espacial de los componentes del motor flagelar. Modificado de [Xing et al., 2006](#)

Cuando MotA y MotB están ausentes generan un fenotipo paralizado, independientemente que se ensamble el filamento, gancho y cuerpo basal; la estructura final es incapaz de rotar ([Blair y Berg 1990](#)). MotB posee un solo cruce transmembranal y un dominio de unión a la capa de peptidoglicanos ([Muramoto y Macnab, 1998](#)); recientemente se ha cristalizado la región carboxilo terminal de MotB, este extremo posee un plegamiento hidrofílico de hojas- β que forman una muesca, flanqueadas por dos hélices semirígidas que se proyectan hacia el enlace peptídico de una unidad pentamuro-peptídica. ([Roujeinikova, 2008](#)). MotA posee cuatro cruces transmembranales, dos asas y una región citoplásmica ([Dean 1983](#)). Los complejos de MotA/B forman el canal de protones e interactúan de forma dinámica con el anillo C que se considera el estator. La velocidad rotacional generada por un flagelo es proporcional a la fuerza motriz generada por el flujo de protones, hasta de un valor de -80 mV ([Berg & Turner 1993](#)). Para generar una revolución el sistema requiere 1000 protones que atraviesan del espacio periplásmico hacia el citoplasma. El motor alcanza una velocidad de rotación cercana a los 100Hz equivalente a 15,000 rpm ([Berg, 1995](#)).

Mutaciones en el extremo carboxilo de FliG y en MotA, demuestran que existen residuos cargados positivamente (Asp289, Asp288 en FliG, Glu98 en MotA y Arg281 en FliG y Arg90 en MotB) que son esenciales para la rotación del motor ([Lloyd y Blair, 1997](#); [Zhou et al., 1998](#)). Otras evidencias demuestran que la estabilidad de la estructura terciaria de la proteína FliG modula la velocidad de rotación del flagelo ([Donato y Kawula, 1998](#)).

La frecuencia de rotación generada por estos rotores es similar a la encontrada en muchos motores flagelares. En *E.coli* la velocidad de rotación puede alcanzar los 100Hz (ciclos de rotación), en otras especies se conocen velocidades de rotación mayores a los 110Hz ciclos de rotación ([Berg 1995, 2008](#); [Magariyama et al., 2001](#)).

La relación entre el torque y velocidad de rotación parece ser inversamente proporcional, debido a que la fuerza necesaria para desplazar una cierta unidad de volumen del medio en el que se desplaza depende más de la fuerza de arrastre generada que de la velocidad (Atsumi 2001). Como hay un límite de carga que el flagelo es capaz de soportar, el desplazamiento de la célula y la velocidad de rotación del flagelo son dos variables dependientes entre sí.

El motor flagelar de las bacterias entéricas (*E. coli*, *Salmonella*, etc.), no funciona como un engrane térmico, debido a que la relación entre la velocidad y la generación de torca es irrelevante a velocidades relativamente altas y su capacidad para desacelerar rápidamente es una de las características esperadas de un motor donde la energía la extrae continuamente a partir de un gradiente de iones. Particularmente, es posible mover el motor en sentido reverso al aplicar una torca externa (Gauthier M. et al., 2008). Esto implica que no hay barreras para la rotación, física o funcional que no dependa exclusivamente del movimiento de protones para el desenganche del “trinquete” o “engrane”. Sin embargo, estas observaciones no se han realizado con detalle en motores unidireccionales como en el caso de *R. sphaeroides*.

A pesar que se han encontrado mutantes que pueden rotar en ambas direcciones, no se ha estudiado si existen mecanismos diferentes de rotación entre motores uni y bidireccionales. A temperatura ambiente (25°C) *E. coli* es capaz de formar una trenza flagelar a 100Hz, cuando se adhiere a un portaobjetos el cuerpo celular puede rotar a 25 Hz, por lo tanto el motor gira a 125 Hz. El motor flagelar puede desplazar una esfera de oro de 60nm a 300Hz (cuando ésta se une al gancho, en ausencia del filamento). Los motores que emplean protones y sodio utilizan el mismo principio interconvierten un potencial electroquímico en rotación, sin embargo los motores que emplean iones de sodio, rotan cerca de cinco veces más rápido. Si en *E. coli* MotA y MotB son sustituidas por componentes homólogos en las especies de *Vibrio* PomA y PomB, los motores quiméricos se propulsan con sodio en vez de protones (Yakushi et al 2006).

En un rotor de motores quiméricos impulsado por una sola unidad generadora se han medido 26 pasos para completar una revolución. Esto fue medido a muy baja velocidad y torca, el desplazamiento es mucho más suave con todas sus unidades generadoras (Sowa et al., 2003, 2005). A temperatura ambiente (25°C) *E. coli* puede alcanzar una torca de 1300 pN nm y el filamento puede rotar a 125 Hz ($2\pi \times 125$ radianes/s). La potencia generada es de 10^6 pN nm/s = 10^{-15} J/s o, es decir 1.3×10^{-18} caballos de fuerza. Estas cifras parecen insignificantes, pero el motor es muy pequeño, un cilindro de 50 nm de diámetro y 50 nm de longitud, con un volumen de aproximadamente 10^5 nm³. Dado que la densidad de la proteína es de 1.3 gm/cm³, trabajando a 1.3×10^{-16} gm, la potencia resultante es de cerca de 5 hp/lb. Esto es cercano a la potencia generada por libra de una turbina de avión, suficiente para alcanzar velocidades “supersónicas” (Berg 1995, 2008).

En diferentes géneros bacterianos como *Vibrio* donde se han identificado proteínas accesorias a las unidades de fuerza (Mot/Pom): En *Vibrio alginolyticus* se identificó que MotX y MotY forman un anillo (“T”), donde podrían interaccionar las proteínas del estator (McCarter, 2004; Terashima et al., 2006, 2008; S. Kojima comunicación personal). Es posible que estos anillos también se encuentren organizados en aquellas bacterias cuyos estatores sean sodio dependientes como ocurren en muchas vibriónaceas entre ellas *Vibrio Shilonii* (Gozález-Tinoco, comunicación personal).

A diferencia de muchos vibrios donde se han identificado sistemas flagelares coexistentes en una misma bacteria: flagelos laterales dependientes de H^+ y flagelos polares Na dependientes (Kawagishi *et al.*, 1995, 1996) en *Shewanella oneidensis* existe una adaptación interesante donde el uso de estatores dependientes de Na^+ y H^+ coexisten y se colocan en un solo flagelo (Paulick A *et al.*, 2008). Estos estatores son viables y su expresión no está limitada o regulada de manera competitiva entre ellas, pero su localización se regula por medio de la disponibilidad del Na^+ . La colocación depende de MotB pero no está claro si el acoplamiento de las Pom's además requiere de MotX/Y o de algún sistema de andamiaje similar (K. Thormann, S. Kojima, comunicación personal). En el caso de *Bacillus subtilis* se han identificado dos proteínas que pudieran regular la rotación con un mecanismo similar a un “embrague” o freno: SinR es un regulador que modula la expresión de los genes flagelares y que reprime la expresión de los genes formadores de la matriz de exopolisacáridos que se adhieren a las biopelículas en *B. subtilis*. Cuando *sinR* se encuentra mutado, EpsE, una glicosiltransferasa interacciona con FliG, parte del rotor flagelar. En el momento que FliG se acompleja con EspS, el flagelo de estas células es incapaz de rotar mediante la actividad de MotA/B pero mantiene su capacidad de girar cuando se le somete a corrientes del medio extracelular (Blair *et al.*, 2008). Este mecanismo sugiere que *B. subtilis* podría requerir en algún momento del nado activo por medio del flagelo, aunque se encuentre asociado a una biopelícula. y de esta forma le permite modular su organización en tapetes de biopelículas o “biofilms”.

5.4 Generación de la torca

Se sabe que cinco proteínas son las responsables de generar la torca en el motor flagelar MotA, MotB, FliG, FliM, y FliN. MotA y MotB son proteínas de la membrana citoplasmática y forman un complejo que consiste de cuatro copias de MotA y dos copias de MotB. El complejo de MotA/B, es el estator del motor que juega un papel importante en la conductancia de los protones. Recientemente se ha estimado que existen por lo menos 11 copias de MotA/B alrededor del cuerpo basal (Sowa *et al.*, 2005). Debido a que MotB posee un motivo de unión a peptidoglicanos, se ha sugerido que el complejo MotA/B se ancla a la pared celular. Sin embargo la forma como MotB se une con la capa de péptido glicanos no se conoce claramente debido a que los estatores son dinámicamente reemplazados aun cuando el motor se encuentra en rotación.

Recientemente se ha demostrado que el rotor da 26 pasos en cada revolución, que es consistente con el número de subunidades de FliG en el anillo C (34), el sitio propuesto para la generación de torca, lo que significa que en cada paso, MotA/B harían contacto con 1.3 subunidades de FliG (Sowa *et al.*, 2003, 2005 ; Ishijima comunicación personal).

MotA consiste de cuatro cruces transmembranales (TH1 a TH4), con dos asas periplásmicas. MotB consiste de una región N-terminal, un cruce transmembranal (TM) y una región periplásmica con un dominio potencial de unión a peptidoglicanos.

Dos residuos cargados ubicados en la asa citoplásmica de MotA (Arg-90 y Glu-98), son responsables de la interacción con residuos cargados de FliG para generar la torca. Dos prolinas conservadas en MotA (Pro-173 y Pro-222), se piensa que están involucradas en los cambios conformaciona-

les del complejo del estator y que acoplan el flujo de protones con la generación de torca (Braun *et al.*, 1999). MotB se encuentra como un dímero en el complejo del estator, con los residuos conservados de aspartato, expuestos en la superficie del dímero MotB-TM. En un modelo actual del mecanismo de rotación, la torca es producida a través de los cambios conformacionales que el estator experimenta por la protonación/desprotonación del residuo Asp 32 de MotA, que esta altamente conservado (Zhou *et al.*, 1998). Cuando este residuo es sustituido por Ala, altera la conformación de MotA. Este cambio conformacional, modifica el dominio citoplásmico de MotA, en un segmento expuesto, que interacciona con el rotor. Estas evidencias sugieren que el rotor no es el principal responsable de la generación de movimiento, pero si de mantener la dirección de la rotación. Lo anterior obliga a imaginar que el interruptor o “switch” debe presentar cambios topográficos o en las propiedades químicas de la interfase del rotor/estator al momento de modificar la orientación en la rotación en sentido horario (CW) o antihorario (CCW). Aun se carece de información estructural de alta resolución del estator, y las características del arreglo de los segmentos transmembranales se han deducido por medio de estudio de entrecruzamiento de residuos de cisteína introducidos por mutagénesis (Che Y.S. *et al.*, 2008). Los patrones de enlaces bisulfuro en las proteínas modificadas han mostrado que los segmentos transmembranales (TM) de las dos subunidades de las MotB se ubican juntas en el centro del complejo, rodeadas por los segmentos TM3 y TM4 de las cuatro subunidades de MotA. Por lo tanto los segmentos TM1 y TM2, deben encontrarse en posiciones más expuestas fuera de la capa de lípidos dentro del complejo, ya que en dichos segmentos se pueden tolerar mejor las sustituciones de estos residuos por Trp, que TM3 y TM4 (Che Y.S. *et al.*,2008; Kim *et al.*, 2008).

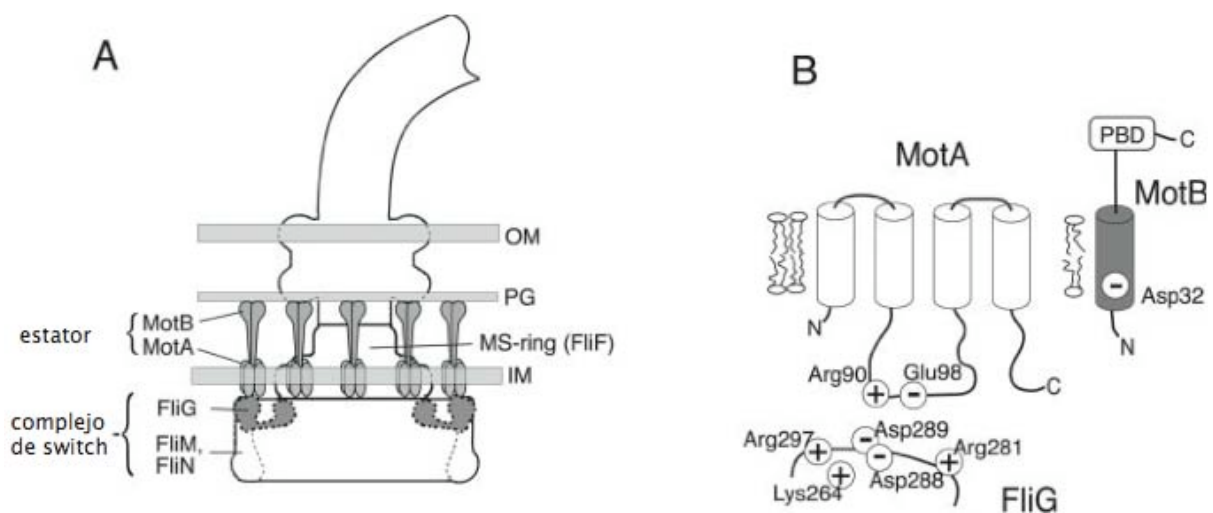


Fig 5.3-I

A) Organización de las unidades generadoras de fuerza. B) Amino acids cargados importantes involucrados en la generación de torca. Imagen modificada de Yakushi *et al.*, 2006

En cada subunidad de MotA, TM2, se localiza entre los segmentos T3 y T4, donde forma parte de la pared externa del canal entre las dos subunidades de MotA, que forman el canal de protones. El segmento TM1, no contribuye a la arquitectura del canal de protones directamente, pero es en las interfases entre las subunidades adyacentes a MotA, donde podría tener una función de estabilizador del complejo (Che Y.S. *et al* 2008).

Los segmentos núcleo membranales, (TM-B, TM3 y TM4) contienen varios segmentos muy conservados, mientras que los segmentos periféricos TM1 y TM2, solo poseen dos residuos conservados Gly 6 y Gly 39 (Braun *et al.*, 2004). Estos residuos no se encuentran en los canales pero sí en posiciones entre los segmentos membranales donde son importantes para mantener los contactos entre un segmento TM1 y TM3, de una subunidad adyacente. Excepto el residuo 209 (Thr), los aminoácidos involucrados en formar el canal, son no polares y en muchos casos pequeños (bajo peso molecular o diámetro atómico).

6.0 Características hidrodinámicas del flagelo bacteriano

El filamento es un homopolímero compuesto por cerca de 20,000 subunidades de flagelina o FliC. Su estructura helicoidal puede cambiar de una forma a otra. Estos cambios, llamados transformaciones polimórficas, rápidamente se propagan de un extremo del filamento a otro (Shimada *et al* 1975, Hotani *et al* 1982). Cuando el motor cambia la dirección de giro horario (CW) a antihorario (CCW), el cambio induce una torsión que desenrolla al filamento, que normalmente posee una orientación levógira (izquierda), con una inclinación de su curvatura de $2.5\mu\text{m}$ y un diámetro de $0.5\mu\text{m}$, hacia una forma semienrollada, con una orientación dextrógira (derecha), con la mitad de la inclinación, pero amplitud normal, y posteriormente en una forma más compacta y curvada similar a una columna salomónica, que mantiene su orientación derecha pero con una inclinación menor y amplitud de onda similar (Hotani, 1982). Cuando el motor revierte su orientación de giro a CCW, el filamento se relaja a su conformación inicial. El arrastre viscoso o desplazamiento de un filamento delgado a través del agua es cerca del doble de grande cuando se mueve de forma lateral, que cuando se mueve a lo largo (Trachtenberg *et al.*, 2003). La propulsión depende de la asimetría del filamento. En una bacteria el filamento es largo y delgado (entre 6 y 10mm de largo y 20nm de ancho). El extremo de la hélice del filamento, es cinco veces el diámetro de su grosor. Imagínenos esta hélice como una serie de “varillas” organizadas perpendicularmente al plano del eje, moviéndose se manera oblicua con el medio acuoso (Adam, 1977). Al rotar la hélice sobre su eje, se generan fuerzas agregadas debido al arrastre de la viscosidad del medio con cada “varilla”.

De esa manera, la hélice genera potencia y torca (fuerza axial y desplazamiento circunferencial). Supongamos que el observador puede sujetar el un extremo del filamento más cercano a él y éste comienza a girar en sentido horario (CW): el filamento empujaría al observador (2) hacia atrás y trataría de torcerlo en sentido antihorario (CCW). Otro observador mirando hacia el observador 1, vería a la hélice girar en sentido CCW, el cuerpo del observador 1 rota más lentamente en sentido horario (CW). Sin embargo esta apreciación macroscópica no tendría relevancia si el observador no se sumerge en un medio mucho más viscoso que el agua. En la escala de una bacteria, las fuerzas inerciales (requeridas para acelerar una masa), son cerca de un millón de veces más pequeñas que las fuerzas viscosas (requeridas para cortar la resistencia de los fluidos y moverse a capas adyacentes de un fluido a diferentes velocidades). Un parámetro que caracteriza la relativa importancia de estas fuerzas, es el número de Reynolds (R) (Trachtenberg *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Reichter *et al.*, 2005). R, representa una propiedad física, adimensional, que mide la proporción de fuerzas inerciales ($V\rho$) a las fuerzas viscosas (μ / L) de un objeto en un flujo. R, es definida como el producto del tamaño de la célula, la velocidad de la célula y la densidad del fluido, dividido por la viscosidad y con una la velocidad promedio (60mm/seg) de una célula de *E. coli*, $R \sim 10^{-5}$. Sin embargo las bacterias no tiene conciencia de las fuerzas inerciales, a pesar de ello, pueden desacelerar a alto total en una millonésima de revolución.

$$Re = \frac{\rho V D}{\mu} = \frac{V D}{\nu} = \frac{Q D}{\nu A}$$

- V es el promedio de la velocidad del fluido en unidades del SI (m/s)
- D es el diámetro(m)
- μ es la viscosidad dinámica del fluido (Pa·s o N·s/m²)
- ν es la viscosidad cinemática ($\nu = \mu / \rho$) (m²/s)
- ρ es la densidad del fluido kg/m³)
- Q es la tasa de flujo (m³/s)
- A es el área transversal de la tubería o espacio de flujo (m²)

Fig 6.0-I

Ecuación de Reynolds

7.0 Ensamblaje flagelar

El flagelo es ensamblado desde el interior de la bacteria hacia fuera, componente por componente. Los anillos MS y C son ensamblados y el aparato de exportación se añade al final para coordinar el ensamblaje de las proteínas axiales, que se ensamblan en un orden: eje, gancho, proteínas asociadas al gancho, tapa y filamento. Los genes codificantes de estos componentes son expresados en una secuencia similar. Los anillos L y P transitan a través de la membrana interna por la vía de exportación Sec. Existen múltiples puntos de control y balances en este proceso, el más dramático involucra un factor anti sigma que modula negativamente la expresión de los genes tardíos, que codifican para las proteínas FliC, las proteínas Mot A y B y varios componentes de la vía de señalización quimiotáctica (Eichelberg y Galan, 2000).

Cuando el ensamblaje del motor alcanza el nivel del gancho. FlgM (factor anti σ 28) es expulsado hacia el exterior de la célula por el aparato de exportación (Kutsukake 1994), liberando la transcripción de los genes tardíos (Karlinsey *et al.*, 2000). En el mismo tiempo, el aparato de exportación cambia la selectividad de sus sustratos del eje y gancho por las proteínas asociadas a gancho (HAP's) y flagelinas que crecen en su extremo distal (Hughes y Mathee 1998). Muchos mecanismos regulan la tasa de exportación de las subunidades de cada componente, que determina la longitud final que las estructuras macromoleculares como en el caso del gancho, que se revisará más adelante con detalle. En *E. coli* y *S.typhimurium*, parte de la energía requerida para la exportación está aparentemente acoplada al gradiente electroquímico de protones (Minamino *et al.*, 2008).

7.1 Biogénesis y regulación de la expresión de los genes flagelares

La expresión de los genes flagelares está estrictamente controlada y coordinada jerárquicamente, ya que la presencia de productos de un operón son necesarios para la expresión de los productos de operones sucesivos. En muchos casos las regiones codificantes de genes adyacentes son muy cercanas o se encuentran superpuestas, sin embargo existen operones separados; por ejemplo, los codificantes para varios quimiorreceptores como el receptor de serina (*Tsr*) (Macnab 1991). De la misma forma como se ha clasificado a los genes flagelares dependiendo de su ubicación en los cromosomas, también se ha elaborado una clasificación en referencia a su orden de expresión durante la biogénesis.

Los genes flagelares se clasifican de la siguiente forma: Genes clase I, clase II, clase IIIa y clase IIIb, esta organización puede generar confusiones al respecto de la ubicación de los genes en un mapa físico o en el cromosoma; sin embargo esta clasificación se refiere a un orden temporal de la expresión de los productos codificantes de los genes agrupados en sus respectivos *loci* (Macnab, 1991, Aldridge 2001, 2002). En la primera clase se ubica el operón maestro que es responsable de desencadenar la biosíntesis flagelar, activando a los operones de clase II. Este operón contiene dos genes *flhC* y *flhD* (en *S. typhimurium*), cuyo producto forma un complejo heteromultimérico que activa la expresión de los genes de clase II por medio de una ARN polimerasa dependiente de un factor σ^{70} (Malakooti 1994). La activación de este operón no es clara pero depende de condiciones ambientales como la temperatura, la disponibilidad de fuentes de carbono, el súper enrollamiento del DNA, los niveles de fosfolípidos, cambios en la osmolaridad, etc. Muchos de los efectores que activan al operón maestro necesitan intermediarios proteínicos como OmsR, o proteínas de choque térmico o “heat-shock” como GrpE, DnaK y DnaJ. Sin embargo existe una vía de represión de catabolitos que dirige mayoritariamente la expresión del operón maestro: cuando la disponibilidad de glucosa es mayor, los niveles de AMPc disminuyen evitando que se active el operón maestro (Komeda 1975). Los genes de clase III son regulados por factores codificados en genes de la clase II y cuyos productos son componentes estructurales tardíos como la flagelina, responsable de ensamblar el filamento flagelar, así como a los motores y canales iónicos encargados de generar la energía para la rotación, entre otros productos (Macnab 2003).

La transcripción jerárquica de los genes del flagelo determina que se completen sus estructuras en el siguiente orden: anillo MS, switch, aparato de exportación, eje, anillo P, anillo L, gancho, HAP's, a esto le sigue la exportación de flagelina (Aldridge *et al.*, 2006) y las proteínas de coronación (FliD). Estas últimas proteínas deben atravesar dos membranas y una distancia considerable para localizarse en la fracción extracelular. En *S. typhimurium*, *flgK* es un gen de clase III, sensible a la regulación transcripcional por un factor transcripcional σ^{54} y preferentemente por un factor σ^{28} , anteriormente llamado FliA (Kutsukae 1994). Este último factor de transcripción es el mismo que desencadena la síntesis de genes como *flgM*, *flgN*, *fliC*, *fliD*, *fliS*, *fliT*, *fljB*, *fljA*, *motA*, *motB*, *cheA*, *cheY*, y *cheZ* considerados como genes de expresión tardía o clase III (Macnab 1992). En la etapa de formación del gancho, FlgD complementa la función de acoplamiento de las subunidades de proteínas que son exportadas por la misma vía de secreción que HAP1 (FlgK) (Ohnishi *et al.*, 1994). La extensión del gancho está regulada por FliK que modula la exportación de los polímeros del gancho. Finalmente son exportadas las proteínas FlgK, FlgL, FliD (HAP1, HAP2 y HAP3, respectivamente), y los monómeros de flagelina (FliC) que se incorporan en la parte distal del filamento por medio de la interacción con el complejo decaimérico formado por HAP2 (Maki *et al.*, 2001).

8.0 Aparato de exportación

Para que el flagelo se ensamble se requiere de un mecanismo que permita transportar desde el citoplasma hacia el exterior de la célula, cada una de las subunidades que componen el flagelo, desde las proteínas que conforman el cuerpo basal, hasta las proteínas del filamento. Existe un complejo de aproximadamente ocho proteínas que constituyen el sistema de exportación, (FlhA, FlhB, FliH, FliI, FliO, Flp, FliQ y FliR), este complejo interactúa con los anillos MS y anillo C en *S. typhimurium* (Minamino y Macnab 1999, Katayama *et al.*, 1996). Este complejo es el responsable de la exportación o traslado de las proteínas del eje, gancho HAP's y filamento. Aun se desconocen muchos de sus mecanismos subyacentes, entre ellos la selectividad que debe poseer para que el sistema mantenga un orden durante la exportación de las proteínas (Minamino *et al.*, 1999). Ninguno de los sustratos exportados posee un péptido señal como los hallados en el extremo amino terminal de los productos del anillo L, P y FlgA, sin embargo se ha propuesto que posiblemente los motivos de héptadas repetidas encontradas en las proteínas axiales pudieran ser las responsables del reconocimiento durante su exportación (Homma *et al.*, 1990). La remoción de los residuos más conservados no interrumpe la exportación, posiblemente sea el reconocimiento de ciertos motivos en la estructura secundaria de las proteínas las que pudieran estar involucradas en la selectividad del sistema de exportación: FlhB regula la exportación ordenada de componentes flagelares induciendo la autohidrólisis de los sustratos (Ferris *et al.*, 2005).

Otras evidencias experimentales, apoyan la idea que el reconocimiento de las proteínas flagelares es más dinámico, por ejemplo una de las proteínas del complejo de exportación FliI presenta una similitud con la subunidad β de la unidad F_0F_1 de la ATP-sintasa (Müller *et al.*, 1992, Dreyfus *et al.*, 1993), esta proteína es capaz de hidrolizar ATP (Fan & Macnab 1996) y su actividad se incrementa en presencia de otros componentes que son exportados como proteínas de gancho (FlgE), y flagelina (FliC) (Silva-Herzog y Dreyfus 1999).

Algunos de los componentes del sistema de exportación interactúan con el anillo C, lo que sugiere que estos componentes facilitan la translocalización de los sustratos (Gonzalez-Pedrajo *et al.*, 2006). El eje forma un canal entre 25 y 30 Å de diámetro (Namba *et al.*, 1989) por donde son transportados los monómeros filamentosos, que viajan parcialmente plegados, desde el citoplasma hasta el extremo distal del flagelo a 10 μm; los mecanismos asociados al transporte dentro del poro y autoensamblaje permanecen aun sin ser caracterizados. Se conocen algunas propiedades de autopoli-merización y autoensamblaje de algunas proteínas axiales (Furukawa *et al.*, 2002), y que muchas de ellas se regulan con la asociación de monómeros de diferentes productos y en concentraciones críticas, desencadenan la formación espontánea de estructuras en solución, sin embargo no se conoce como se regulan esas interacciones durante el ensamblaje.

8.1 Biogénesis de FlgK (HAP1Rs) y su interacción con otras proteínas axiales.

La biogénesis del flagelo está altamente regulada, su tamaño aproximado es de 20 μm, en el caso de *S. typhimurim*. El flagelo de *R. sphaeroides*, presenta las estructuras básicas caracterizadas en los flagelos de bacterias entéricas: cuerpo basal, gancho y filamento. Entre el cuerpo basal y el filamento se encuentra una interfase compuesta por múltiples copias de las proteínas asociadas al gancho o HAP'. Las HAP's de *R. sphaeroides* son visibles al microscopio electrónico y se puede apreciar un ensanchamiento que no es común en flagelos aislados de bacterias entéricas (West y Dreyfus, 1997). Para su ensamblaje las proteínas flagelares tienen que ser liberadas del citoplasma de forma ordenada, la secreción de los monómeros de flagelina (FliC), los del gancho (FlgE) y las HAP's, tienen la misma vía de exportación: el aparato de exportación del flagelo (Homma *et al.*, 1985). La longitud del gancho, está regulada por la proteína FliK. En mutantes de *fliK* se generan polímeros de gancho de diferentes longitudes, denominados poliganchos (Kato *et al.*, 1982; Katayama *et al.*, 1996), que en *R. sphaeroides* también han sido caracterizados (González-Pedrajo *et al.*, 1997). La reconstrucción de los ganchos *in vitro* sugiere, como ocurre con el filamento, que estos monómeros se polimerizan en la región distal (Hirano *et al.*, 1994). Las mutantes poliganchos son no móviles (Homma *et al.*, 1984), debido a que no existe un acoplamiento entre las HAP's y por lo tanto la polimerización de FliC es muy pobre o inexistente, pero posiblemente también por que un filamento compuesto solo de subunidades de gancho no es hidrodinámicamente viable. Existe una interacción entre FliK y HAP's para su exportación, por medio de otras proteínas como FlhB, y Flk que forman parte del aparato de exportación (Minamino y Macnab 1999; Minamino *et al.*, 1999). Por otra parte se ha reportado que la proteína encargada de la exportación de flagelina (FliC) interactúa con la proteína FliI en forma dependiente de ATP (Fan y Macnab 1996; Silva-Herzog y Dreyfus 1999). Cepas revertantes de *fliK*, son capaces de ensamblar al filamento, indicando que el control de la longitud tanto del gancho como del filamento corresponden a dos funciones separadas (Suzuki e Iino 1981, Jones 1991). Las proteínas del gancho son exportadas por la vía flagelo específica (Homma *et al.*, 1990) y no son exportadas de células flageladas, lo que supone que la exportación de estas proteínas se encuentra regulada y no ocurre a menos que el gancho este incompleto.

Recientemente se ha caracterizado a detalle la participación de FliK en el ensamblaje del gancho, el modelo que se propone es que el ensamblaje esta mediado por la tasa de exportación y la interacción de monómeros desplegados de FliK con FlhB (Minamino *et al.*, 1999, González-Pedrajo *et al.*, 1999) y la estructura naciente del gancho, funcionando como un flexómetro, debido a que la longitud del gancho se mantiene en 55nm y mutaciones en distintos segmentos de la proteína del gancho FlgE, generan ganchos mas cortos (Moriya *et al.*, 2006; Shibata *et al.*, 2006). En mutantes de FliD (HAP2), las proteínas del gancho son exportadas continuamente, pero no en mutantes de FlgK (HAP1) o FliC (flagelina) donde su exportación está controlada (Homa e Iino, 1985) lo que implica que HAP2 funciona como un estabilizador del filamento, además de chaperona (Dioszeghy *et al.*, 2004). HAP1 y HAP3 son incapaces de ensamblarse en grandes polímeros *in vitro*, no importando si ambas proteínas se encuentren en altas concentraciones, lo que sugiere que son los mismos monómeros de estas proteínas los que autorregulan su acoplamiento (Ikeda, 1989, Jones 1990). Recientemente algunos experimentos demuestran que existen interacciones específicas entre los monómeros de HAP's. Bajo ciertas condiciones de fuerza iónica HAP3 se polimeriza formando agregados filamentosos flexibles, el diámetro de estos filamentos es de aproximadamente 100 Å. La polimerización se favorece con un incremento en la aparición de estructuras β en contraste con las halladas en estado monomérico, la aparición de estos agregados se facilita con la adición de flagelina, por medio de interacciones aun no conocidas con exactitud. El complejo formado no es estable, por lo que se puede suponer que la flagelina cataliza la formación de agregados filamentosos β -amiloides de HAP3, sin que esté involucrada en la estructura final (Furukawa *et al* 2002). Sin embargo, la formación de estos filamentos no es comparable con la hallada en las uniones HAP's - filamento que posee un diámetro de por lo menos 150 Å. Las regiones terminales de HAP3 poseen héptadas repetidas de aminoácidos hidrofóbicos que forman α -hélices y "hélices entrelazadas". Aunque la flagelina no es incorporada en los filamentos formados por HAP3, sí promueve su polimerización. A partir de estas observaciones, se ha propuesto que los extremos carboxilo terminales de la flagelina podrían estar involucrados en modular el comportamiento de la agregación de HAP3.

Es altamente probable que las regiones terminales de la flagelina apunten hacia las regiones terminales del flagelo e interaccionen con múltiples subunidades de HAP3. La interacción de HAP2 (FliD) con HAP3 (FlgL) es más estable y se favorece cooperativamente. En solución, la polimerización de estas proteínas forma un heterodímero que presenta la organización polarizada observada en los flagelos en etapa de elongación, cuando la interacción entre HAP3 (FlgL) y HAP2 (FliD) es transitoria y precede a la incorporación de flagelinas al extremo distal del filamento en formación (Imada *et al.*, 1998, Yonekura *et al.*, 2000, 2001).

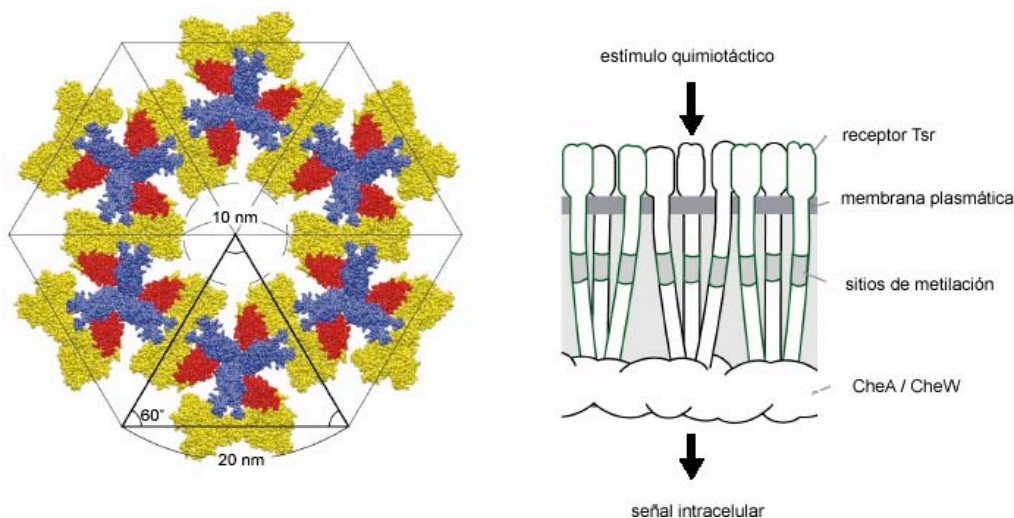
En algunos casos los experimentos presentados por Furukawa y cols.(2002) presentan evidencia que la interacción entre proteínas axiales en solución, no es activa. Esta propiedad es importante, ya que si existiera una agregación espontánea en el citoplasma, se impediría la formación del flagelo. Para evitar que esto ocurra, se piensa que las regiones terminales de los monómeros de flagelina y del gancho se encuentran parcialmente plegados (Furukawa *et al.*, 2002, Makishima *et al.*, 2001, Macnab 1996).

Las HAP's no poseen un péptido señal y aparentemente no parecen ser procesadas para ser exportadas (Homma *et al.*, 1985) excepto por la remoción de residuos de metionina en el extremo amino terminal de HAP1 y HAP2 (Homma *et al.*, 1990). Su alto grado de similitud con las flagelinas refuerza la idea que su exportación es común a la de los monómeros de flagelina, pero que tiene una interacción diferente con otras proteínas del aparato de exportación. En algunas mutantes de *fliC* (flagelina), el sistema es capaz de exportar HAP's mientras que en mutantes de HAP's la exportación de monómeros de flagelina continúa exportándose sin que sean incorporados (Homma y Iino 1985). En ensayos electroforéticos de una mutante de filamento corto, el número estimado de subunidades de HAP1 y HAP3 en *S. typhimurium* por cada flagelo es de 10 a 20 y de 10 a 40 respectivamente (Homma *et al.*, 1984). De la misma forma como el filamento y el gancho poseen un arreglo helicoidal, cabe suponer que el arreglo de las subunidades de las HAP's deberían poseer de dos a cuatro y de dos a ocho vueltas respectivamente; asumiendo que su torsión sea similar a la encontrada en el filamento o en el gancho. Por la misma razón se supone que HAP1 y HAP3 poseen una función de conector y que tienen un motivo estructural que permite distinguir la geometría entre las estructuras que forman el gancho y el filamento (Ikeda *et al.*, 1987). A partir de esta idea, cabe suponer que existirían diferencias en la afinidad entre cada una de las estructuras ensambladas, como una característica adicional a la polaridad de su expresión genética, que podría estar reflejado en el mantenimiento en la seriación de las diversas proteínas axiales ensambladas durante la biogénesis. Un ejemplo que apoya esta interpretación: Los primeros 50 aminoácidos de las secuencias de FlgK y FlgE de *Caulobacter crescentus* muestran un 46% de identidad y un 20% de similitud (Mullin *et al.*, 2001). Esta región en el extremo amino terminal, incluye la secuencia SDNIANVNT, que es una variante de la caja ANNLAN, involucrada en el ensamblaje de las proteínas axiales del flagelo de *S. typhimurium* (Homma *et al.*, 1990). Estas regiones pueden ser parte de un dominio estructural de reconocimiento entre HAP1 y la superficie expuesta del gancho. Probablemente HAP1 posea una mayor afinidad por dominios del gancho, que usualmente funcionan como sitios de reconocimiento donde se acoplan los monómeros de FlgE durante el ensamblaje del gancho. Previamente se encuentra una proteína cuya función es la de incorporar monómeros de gancho: FlgD. Entre FlgD y HAP1 debe existir una competencia de afinidad por el gancho ensamblado, desplazando la afinidad del gancho por FlgD hacia HAP1 en algún momento del ensamblaje, después que el gancho ha alcanzado su extensión máxima. Esto permite el acoplamiento de las HAP's con una seriación HAP1, HAP3 y finalmente HAP2 que permite incorporar a la flagelina en su extremo distal. Otro mecanismo posible, es que exista a nivel transcripcional, una disminución en el número de copias procesadas de ARNm codificante para gancho y que la expresión de *flgK* se incremente. Existen dos observaciones experimentales que indican que el rol de FlgD es más complejo que el imaginado: las mutantes poliganchos de *fliK*, poseen más FlgD que mutantes de *flgK* con ganchos normales, posiblemente formando una estructura de coronación similar a FliD. Por otro lado el extremo amino terminal posee una secuencia que le permite el acoplamiento con el gancho, mientras que el extremo carboxilo sólo puede sugerir que posee una función asociada a la elongación del gancho (Onhishi *et al.*, 1994, Homma *et al.*, 1990, Yunekura 2001).

9.0 Quimiotaxis

La cascada de señales que induce la movilidad flagelar en *E. coli* comienza en los receptores externos, los cuales se encuentran exclusivamente en la membrana y pared celular (Adler, 1976). Existen dos tipos de receptores: los receptores duales y los receptores quimiotáctico-específicos. Los receptores quimiotáctico-específicos son referidos como MCP (Methyl Accepting Proteins/ proteínas aceptoras de grupos metilo); estas proteínas son receptores diméricos transmembranales. Los MCP's consisten de dos hélices transmembranales (TM1 y TM2), un dominio de acoplamiento a ligando y un dominio citoplásmico (Ver figura 10).

Los receptores diméricos están involucrados en el transporte de ligandos de los receptores quimiotáctico específicos, y cinco están presentes en *E. coli*, y son responsables de transmitir la información por medio de un atractor o un repelente. Estos receptores son **Tar**, **Tsr**, **Trg**, **Aer** y **Tap** (este último el único encontrado a *E.coli*) **Tar** une aspartato y maltosa, **Tsr**, una exclusivamente serina, **Trg** une ribosa, galactosa y glucosa, y finalmente **Tap** se une a dipéptidos. Cabe hacer notar que no todos los receptores se encuentran presentes en la misma proporción en la célula. **Tsr** y **Tar** son receptores que se presentan en mayor proporción que el resto (Zhulin, 2001).



A

B

Fig 9.0-I

Representación gráfica de los receptores quimiotácticos y su organización en la membrana plasmática. En la figura A se muestra la posible estequiometría de los receptores (perspectiva superior al plano de la membrana celular) obtenida de la cristalización de los receptores Tsr. En la figura B se muestra la organización del complejo supramolecular y proteínas asociadas. Modificado de Shimizu, 2000

La composición del complejo supramolecular del receptor consiste de tres partes distintas: los receptores quimiotácticos específicos, una proteína de unión (CheW) y una cinasa de histidina (CheA) (Shimizu, *et al.*, 2006). Posterior a la interacción del receptor con su atrayente, algunos residuos de glutamato en el dominio citoplásmico de los receptores son metilados por CheR, una metiltransferasa (Kehry *et al.*, 1984 McEvoy *et al.*, 1999). La metilación de los receptores revierte los cambios conformacionales, una vez adquirida la conformación original, CheB (una metil esterasa) remueve los grupos metilo. Inicialmente se pensaba que el complejo contenía un receptor dímérico, dos moléculas de CheW y un dímero CheA. Evidencia experimental posterior, sugiere que la estructura es mucho más compleja y a partir de ello derivaron dos modelos. El primero que describe al receptor como un complejo de siete dímeros y de dos a cuatro moléculas de CheW y un único dímero de CheA. (Kim *et al.*, 2001). El segundo modelo demuestra que los extremos de tres receptores díméricos convergen, formando una estructura trimérica (Bren y Eisenbach, 2001). Por lo que se ha predicho que múltiples complejos crean un hexágono bidimensional hecho de unidades trigonales. Este modelo sugiere que cada una de estas unidades posee dímeros de MCP, tres moléculas de CheW y tres monómeros de CheA. Aún existen inconvenientes para validar este modelo, pese a ello las evidencias más recientes inclinan el crédito al modelo trigonal.

Con la cristalización de CheA de *Thermotoga maritima* con una resolución de 0.25 Å se pudo determinar los sitios de interacción entre CheA y CheW. Debido a que CheA posee dominio de dimerización, es probable que la estequiometría del complejo molecular sea dímica. Esta sería una ventaja que ofrecería estabilidad al complejo tanto en su estructura y durante el relevo de la señalización desde el receptor (Shimizu *et al.*, 2001, 2006).

9.1 Organización y función del complejo supramolecular

Se han propuesto dos modelos de señalización transmembranal (Bray *et al.*, 1998); un modelo sostiene que la señalización se lleva a cabo por medio de una rotación entre las subunidades de los monómeros del receptor. El modelo alternativo es que la señalización es generada por medio de un cambio conformacional únicamente en una de las subunidades del dímero (Borkovich *et al.*, 1990). Una de las preguntas más intrigantes es la forma como responde el complejo ante un pequeño porcentaje de receptores estimulados ante otros no estimulados y como se integran esa información para decidir la el sentido de la rotación del flagelo. Dos modelos derivan de esa pregunta: El primero es el mecanismo de apagado o “reseteo” y el segundo el mecanismo de amplificación.

El primer modelo propone que existen cambios conformacionales en el receptor que actúa como un interruptor, al ocurrir esto la actividad de la cinasa es modulada sólo por la señal del receptor estimulado. El mecanismo de amplificación propone que los mismos cambios en las interacciones del receptor causan la amplificación de la señal generada por la estimulación del receptor (Bray *et al.* 1998). La información obtenida de los receptores es transmitida por medio del complejo supramolecular para regular la actividad de cinasa de CheA. Los atrayentes inhiben la actividad de la cinasa, si su concentración favorece la permanencia de la bacteria (Borkovich *et al.*, 1990). En el caso contrario, los repelentes activarían a la cinasa. Desde el dominio de fosfotransferencia de CheA la señal continúa hacia las proteínas CheY y CheB.

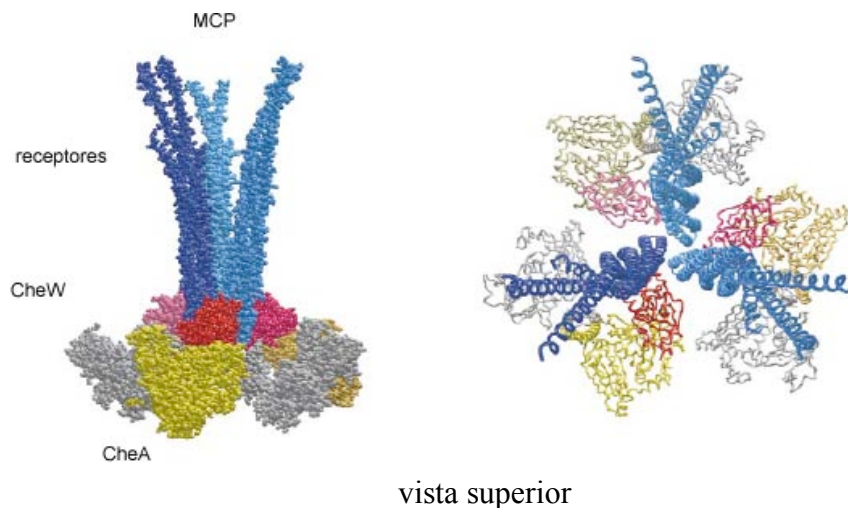


Fig 9.1-I

Unidad estructural del complejo supramolecular, reconstruido a partir de las estructuras cristalográficas de las proteínas que lo constituyen. El complejo contiene tres dímeros del receptor, tres monómeros de CheW y tres monómeros de CheA. Se muestra aquí esta unidad trigonal con tres dímeros de CheA (Modificada de Shimizu *et al.*, 2000).

9.2 Moduladores de la respuesta quimiotáctica.

CheY es una proteína de bajo peso molecular (aproximadamente 14 kDa) que transmite la señal desde el complejo supramolecular del receptor hacia el complejo de “switch” o interruptor que regula la dirección de giro del flagelo. CheA fosforila el residuo Asp57 de CheY. El acoplamiento de CheA y CheY genera un cambio conformacional en CheY, lo que permite la transferencia del grupo fosfato, al mismo tiempo que disminuye la afinidad entre el dímero CheA-CheY, permitiendo la liberación de CheY-P. En el complejo de “switch” o interruptor, FliM interactúa con CheY fosforilada que posee una alta afinidad por FliM; CheY-P se acopla en el extremo amino del FliM (Wolfe *et al.*, 1987, 1988). El resultado es la rotación del flagelo en la dirección CW, contraria a las manecillas del reloj. La probabilidad de rotación en esta dirección se incrementa con la concentración de CheY-P. La concentración de CheY-P determina si la rotación es en un sentido antihorario (CCW) u horario (CW). La concentración de CheY-P depende de la tasa con la que CheA fosforile a CheY y de que sea desfosforilada por la proteína CheZ (Blat *et al.*, 1998). Al respecto de la fosforilación de CheY por CheA; CheY experimenta cambios conformacionales que no están restringidos al sitio de fosforilación Asp57. La extensión de los cambios conformacionales no está bien caracterizada pero aparentemente abarca una región más allá de los sitios de fosforilación. La activación de CheY es el resultado de estos cambios conformacionales y no exclusivamente de la adición del grupo fosfato. Esto muestra el hecho de que mutaciones en CheY pueden mantener su actividad pese a la ausencia de fosfato (Bren y Eisenbach, 2001).

Otro cambio que CheY sufre es la acetilación en Lys92 y Lys109. Esta modificación no afecta el acoplamiento entre CheY y FliM pero sí afecta la señalización a nivel de la interacción entre FliM y CheY. Aun no es claro el papel que posee la acetilación de CheY a nivel de los residuos de lisina y su efecto en la quimiotaxis. CheY-P puede ser desfosforilada por CheZ (aunque en *R. sphaeroides* no se ha reportado esta enzima). Esta desfosforilación favorece la rotación del flagelo en sentido contrario a las manecillas del reloj (CCW), (Bren *et al.*, 1996). La interacción entre CheZ y CheY-P acoplada a FliM desfosforila a CheY por medio de su acoplamiento al extremo C terminal de CheZ. Esto ocurre en un lapso entre 50 y 100 ms y el resultado es la defosforilación de CheY y el cambio de la torca hacia el sentido inverso (CCW) (Wolfe *et al.*, 1987).

La modulación de las señales que modifican la rotación del flagelo a nivel del complejo de switch es poco conocido, pero existe evidencias para pensar que está íntimamente asociada con los sistemas de fotosíntesis, aero y quimiotaxis entre otros (Romagnoli *et al.*, 2002). Otra evidencia experimental (Turner *et al.*, 1999) sugiere la posibilidad de que el acoplamiento de CheY en el complejo de switch solo es requerido en condiciones estándar de temperatura (aproximadamente a 25°C). A 10°C y debajo de esa temperatura el motor cambia de rotación en ausencia de CheY y cerca de 0°C rota preferentemente en sentido de las manecillas del reloj contrario a su rotación habitual en sentido anti-horario. Es interesante recalcar que la modulación por medio de la interacción CheY-FliM con mutaciones dobles (13DK, 106YW) conservan su actividad aun en ausencia de fosforilación, ya que la señalización desde los receptores quimiotácticos hasta el complejo de switch está mediada por la fosforilación de las proteínas anteriormente descritas (Scharf *et al.*, 1998). En condiciones fisiológicas en las que un receptor quimiotáctico no posee ningún ligando asociado, la vía de amplificación quimiotáctica no se encuentra activa, resultando en un decaimiento en los niveles de CheY activa. En este caso la rotación antihorario habitual, continua (Montrone *et al.*, 1998).

10.0 Interruptor o complejo de "switch"

El complejo de "switch" o interruptor se encuentra localizado en la base del flagelo y esta conformado por FliG, FliM y FliN, se puede decir que forman un switch debido a que esta estructura se encuentra expuesta hacia el citoplasma de la célula. Es en este nivel donde la interacción entre CheY-P (regulador de respuesta) y el interruptor FliM se lleva a cabo. Existen aproximadamente 27 copias de FliF, 35 copias de FliG y cerca de 100 copias de FliN por complejo (Bren y Eisenbach 2001). FliN y FliM, forman al anillo C y son proteínas que tienen similitud en una parte de su estructura. FliN es homóloga al dominio C-terminal de FliM y es posible que su organización en el anillo C se encuentre de manera alternada en un patrón 3FliN:1FliM, que se aproxima a su estequiometría (Mathews *et al.*, 1998). El extremo N-terminal de FliM no es similar al de FliN, lo que permite a FliM ser el receptor de CheY-P (Bren y Eisenbach 1998). CheY-P se une al dominio receptor con mayor probabilidad de hallar su blanco, esto incrementa la probabilidad de generar un cambio de rotación en sentido horario (Bren y Eisenbach, 2001), por medio de una vía de interacción, aun no identificada con claridad, entre FliM/N y FliG. El dominio receptor de FliM es homólogo a la proteína CheC de *Bacillus subtilis* (Kirby *et al.*, 2001). CheC, se une al anillo C de *Bacillus* y se libera cuando se une a CheY-P. No se ha encontrado CheC en *E. coli*, pero existen homólogos en múltiples linajes de bacterias, incluidas las arqueas. (Kirby *et al.*, 2001). Los genes quimiotácticos "flagelares" no son en realidad específicos del flagelo; el mismo sistema de reguladores de respuesta esta acoplado a diversos sistemas de motilidad, incluidos los flagelos en arqueas y en el desplazamiento por Pili o "twitching motility" (Faguy y Jarrell, 1999; Bardy *et al.*, 2003).

Existen además, componentes homólogos compuestos por un sistema de dos componentes que modula la integración de las señales extracelulares, este sistema consiste de una histidina cinasa CheA y los reguladores de respuesta CheY para la quimiotaxis flagelar. Sin embargo este sistema se encuentra tanto en eubacterias, arqueas y eucariontes, y tienen una diversidad funcional, (Koretke *et al.*, 2000). Las MCPs también poseen una gran diversidad de homólogos con múltiples funciones (Belas *et al.*, 2008).

10.1 Quimiotaxis de *R. sphaeroides*.

R. sphaeroides posee dos juegos de genes flagelares, uno subpolar de origen γ , otro subpolar de origen α -proteobacteria (Poggio *et al.*, 2007), y seis reguladores de respuesta CheY, que son capaces de interactuar con el switch del flagelo (Poggio *et al.*, 2001) que se expresa en condiciones estándar de laboratorio, cuyo origen es de γ -proteobacterias (Ferré *et al.*, 2004). En trabajos anteriores (Shah *et al.*, 2000; Porter *et al.*, 2006) se identificó que tres de esos reguladores de respuesta (3, 4 y 6) son importantes para la modulación del flagelo γ . Recientemente se han caracterizado dos vías de señalización quimiotácticas independientes para cada flagelo, donde tres de los reguladores de respuesta (1, 2 y 5) son específicos para el flagelo de origen α -proteobacteria (del Campo *et al.*, 2007).

11.0 Antecedentes del HAP1

Las proteínas HAP fueron inicialmente identificadas en *S. typhimurium* como componentes menores, copurificados con elementos del gancho (FlgE) y el filamento (FliC) y se acoplan en zonas muy cercanas entre estos componentes (Homma y Iino, 1985; Ikeda *et al.*, 1987). Con marcaje radioactivo se ha identificado que existen aproximadamente 13 copias de HAP1, las mismas para HAP-3, y de 6 a 12 de HAP-2 en *S. typhimurium* (Jones *et al.*, 1990). La evidencia de que HAP-1 y HAP-3 se encuentran en concentraciones equimolares (Homma, 1984), sugiere que ambas proteínas pueden formar dos vueltas en la hélice del flagelo, si se ensamblan en las zonas adyacentes entre el gancho y el filamento (Aizawa 1991).

Existen además, componentes homólogos compuestos por un sistema de dos componentes que modula la integración de las señales extracelulares, este sistema consiste de una histidina cinasa CheA y los reguladores de respuesta CheY para la quimiotaxis flagelar. Sin embargo este sistema se encuentra tanto en eubacterias, arqueas y eucariontes, y tienen una diversidad funcional, (Koretke *et al.*, 2000). Las MCPs también poseen una gran diversidad de homólogos con múltiples funciones (Belas *et al.*, 2008).

10.1 Quimiotaxis de *R. sphaeroides*.

R. sphaeroides posee dos juegos de genes flagelares, uno subpolar de origen γ , otro subpolar de origen α -proteobacteria (Poggio *et al.*, 2007), y seis reguladores de respuesta CheY, que son capaces de interactuar con el switch del flagelo (Poggio *et al.*, 2001) que se expresa en condiciones estándar de laboratorio, cuyo origen es de γ -proteobacterias (Ferré *et al.*, 2004). En trabajos anteriores (Shah *et al.*, 2000; Porter *et al.*, 2006) se identificó que tres de esos reguladores de respuesta (3, 4 y 6) son importantes para la modulación del flagelo γ . Recientemente se han caracterizado dos vías de señalización quimiotácticas independientes para cada flagelo, donde tres de los reguladores de respuesta (1, 2 y 5) son específicos para el flagelo de origen α -proteobacteria (del Campo *et al.*, 2007).

11.0 Antecedentes del HAP1

Las proteínas HAP fueron inicialmente identificadas en *S. typhimurium* como componentes menores, copurificados con elementos del gancho (FlgE) y el filamento (FliC) y se acoplan en zonas muy cercanas entre estos componentes (Homma y Iino, 1985; Ikeda *et al.*, 1987). Con marcaje radioactivo se ha identificado que existen aproximadamente 13 copias de HAP1, las mismas para HAP-3, y de 6 a 12 de HAP-2 en *S. typhimurium* (Jones *et al.*, 1990). La evidencia de que HAP-1 y HAP-3 se encuentran en concentraciones equimolares (Homma, 1984), sugiere que ambas proteínas pueden formar dos vueltas en la hélice del flagelo, si se ensamblan en las zonas adyacentes entre el gancho y el filamento (Aizawa 1991).

Existe una homología entre los extremos terminales de las HAP's y de las flagelinas, los cuales participan en la polimerización del filamento (Homma *et al.*, 1990). La secuencia de amino ácidos reportada para FlgK en *Rhodobacter sphaeroides* (AF317649.1 genbank) consta de 1363 residuos de aminoácidos, que corresponden a 4089 pares de bases. Este gen se encuentra agrupado en el contig 102:54, su inusual tamaño es 2.75 veces mayor que el tamaño de las copias de este gen en otros microorganismos entéricos.

11.1 Análisis de la región central de HAP1 Rs

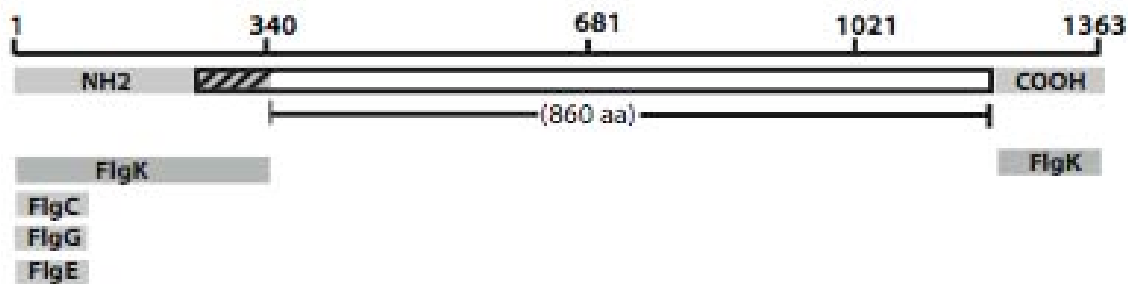


Fig 11.1-I:

Representación esquemática de los extremos N y C terminales conservados de HAP1_{Rs} y su relación con otras proteínas axiales. Los cuadros representan módulos de regiones conservadas con otras HAP's y componentes del eje: FlgC, FlgG, FlgE. El segmento “sombreado” representa la zona central con menor similitud a otras secuencias de HAP's.

De acuerdo con una búsqueda en BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y alineamientos múltiples, la región N-terminal de HAP1_{Rs} incluye una región que posee menor similitud en la misma región de otras proteínas homólogas (240-340). Debe notarse que la región N-terminal de varias proteínas axiales flagelares (FlgC, FlgG y FlgE) también se alinean con HAP1_{Rs}. Hay un cierto grado de similitud entre las regiones N- y C-terminal de múltiples proteínas axiales entre ellas: FlgC, FlgG (eje), FlgE (gancho) y FliC (flagelina) de varios microorganismos incluyendo bacterias entéricas y varias proteobacterias. (Homma, DeRosier *et al.*, 1990; Homma, Kutsukake *et al.*, 1990).

12.0 Objetivos

HAP1 de *Rhodobacter sphaeroides*, tiene una región central que comprende aproximadamente 860 aminoácidos, es decir el 58% de su tamaño, que no comparte similitud con otras proteínas con funciones similares. En el presente trabajo se pretende comprender las propiedades estructurales y funcionales de este segmento central en HAP1_{RS} (240- 1200aa), por medio de análisis bioinformáticos, genéticos y por medición de algunos parámetros físicos en la propulsión de esta bacteria.

13.0 Materiales y métodos

Antecedentes experimentales:

Previamente se había observado que una mutación por interrupción no polar de *flgK_{RS}*, empleando el cassette *aadA* que confiere resistencia a espectinomicina (Metcalf y Wanner, 1993) generaba células no móviles incapaces de moverse en medio líquido o en placas de agar semisólido (0.3%) y carentes de filamento. La cepa mutante (*flgK_{RS}::aadA*), al introducirle la construcción $\Delta 2.6K$ (ver tabla 1.0) que carece de una secuencia de la región central de 860 amino ácidos, es incapaz de recuperar la biosíntesis del filamento y la motilidad. La recuperación en la síntesis del filamento y la motilidad ocurre cuando la cepa interrumpida (*flgK_{RS}::aadA*), es complementada con una construcción que expresa el alelo silvestre: *flgK_{RS}* WT. (D. Castillo, 2003 tesis de licenciatura).

Generación de la mutante $\Delta flgK$

Para obtener una mutante nula ($\Delta flgK$), un par de oligonucleótidos FwmutD: 5'ACGCGTCGACCCCGCGCCGCCCGTGGCCAGGGTGGTG 3'-*Sal* I y RvmutD: 5'TCCCCGGGATCGATGGCGATGTTCGAGGATGGACAA 3' (*Cla* I / *Sma* I), se utilizaron para amplificar un segmento de 830 pbs, que incluyendo una secuencia río arriba del gen de *flgK_{RS}* región intergénica de 107 pbs localizada entre una posible promotor sigma 28, el codón de inicio de la secuencia de *flgK_{RS}* y las primeras 21 bases codificantes para los primeros 7 aminoácidos.

12.0 Objetivos

HAP1 de *Rhodobacter sphaeroides*, tiene una región central que comprende aproximadamente 860 aminoácidos, es decir el 58% de su tamaño, que no comparte similitud con otras proteínas con funciones similares. En el presente trabajo se pretende comprender las propiedades estructurales y funcionales de este segmento central en HAP1_{RS} (240- 1200aa), por medio de análisis bioinformáticos, genéticos y por medición de algunos parámetros físicos en la propulsión de esta bacteria.

13.0 Materiales y métodos

Antecedentes experimentales:

Previamente se había observado que una mutación por interrupción no polar de *flgK_{RS}*, empleando el cassette *aadA* que confiere resistencia a espectinomicina (Metcalf y Wanner, 1993) generaba células no móviles incapaces de moverse en medio líquido o en placas de agar semisólido (0.3%) y carentes de filamento. La cepa mutante (*flgK_{RS}::aadA*), al introducirle la construcción $\Delta 2.6K$ (ver tabla 1.0) que carece de una secuencia de la región central de 860 amino ácidos, es incapaz de recuperar la biosíntesis del filamento y la motilidad. La recuperación en la síntesis del filamento y la motilidad ocurre cuando la cepa interrumpida (*flgK_{RS}::aadA*), es complementada con una construcción que expresa el alelo silvestre: *flgK_{RS}* WT. (D. Castillo, 2003 tesis de licenciatura).

Generación de la mutante $\Delta flgK$

Para obtener una mutante nula ($\Delta flgK$), un par de oligonucleótidos FwmutD: 5'ACGCGTCGACCCCGCGCCGCCCGTGGCCAGGGTGGTG 3'-*Sal* I y RvmutD: 5'TCCCCGGGATCGATGGCGATGTTCGAGGATGGACAA 3' (*Cla* I / *Sma* I), se utilizaron para amplificar un segmento de 830 pbs, que incluyendo una secuencia río arriba del gen de *flgK_{RS}* región intergénica de 107 pbs localizada entre una posible promotor sigma 28, el codón de inicio de la secuencia de *flgK_{RS}* y las primeras 21 bases codificantes para los primeros 7 aminoácidos.

El segundo par de oligonucleótidos Fwmut2: 5' CCGGAATTCATCGATACCCTCCT-GAACGCGCTGTGA 3' (*EcoR* I / *Cla* I) y Rvmut2: 5' TCCCCCGGGCCCGTCAGGGT-GAAGCGCACCGTG 3' (*Sma* I), se utilizaron para amplificar 750 pbs que incluyen los últimos 18pbs y el codón de paro de la secuencia de *flgK_{RS}*, así como la primera mitad del gen de *flgL_{RS}*. Los amplicones resultantes fueron clonados en un sitio *Sma*I de pTZ19R (Pharmacia) generando dos construcciones: MutD (*mutD*, 830pb + pTZ19R 2.9kb = 3.73kb), y Mut2 (*mut2*, 750pb + pTZ19R 2.9kb = 3.65kb). La cepa GM33dam⁻ (Marinus 1975) fue transformada con ambas construcciones. Las construcciones MutD y Mut2 purificadas de la cepa GM33dam⁻ fueron digeridas con las enzimas *Cla* I y *Sma* I. El producto de 750pbs de Mut2, fue subclonado en MutD, en los sitios *Cla*I y *Sma* I respectivos. La construcción final generada MutD/2 (pTZ 19R 2.9kb + 0.83kb *mutD*, +0.75 *mut2*, = 4.48kb), posee un producto de 1.58Kb de homología a *flgK_{RS}*, que fue posteriormente subclonado en el vector suicida pJQ200mp18 (Quandt, 1993).

Esta construcción fue introducida en *flgK_{RS} :: aadA* a través de la cepa S17-1 (Simon 1983) para el reemplazo alélico, por medio de conjugación diparental, (Davis, *et al.*, 1988). La selección de las células con la lesión total de *flgKR*, fue positiva para colonias sensibles a espectinomicina. La cepa resultante (Δ *flgKR*) se denominó DC1. (ver Fig 13.0-I)

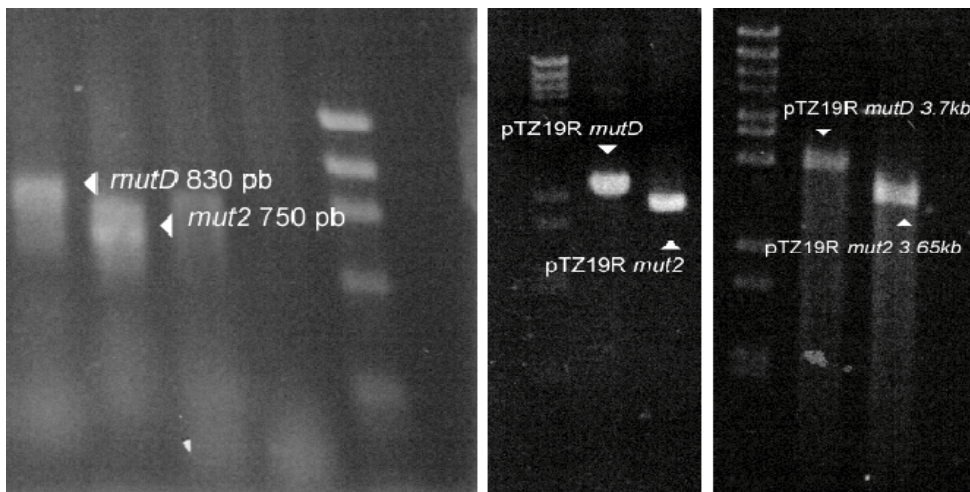


Fig 13.0-I:

A Panel A gel de TE-agarosa 1% con productos de reacción PCR, para la amplificar los fragmentos *mutD* (830pb) y *mut2* (750pb). **B** Panel B construcciones superhelicoidales pTZ19R *mutD* y *mut2*. **C** Panel C pTZ19R *mutD* y *mut2*, digeridos con *Cla*I (DNA plasmídico aislado de GM33dam⁻).

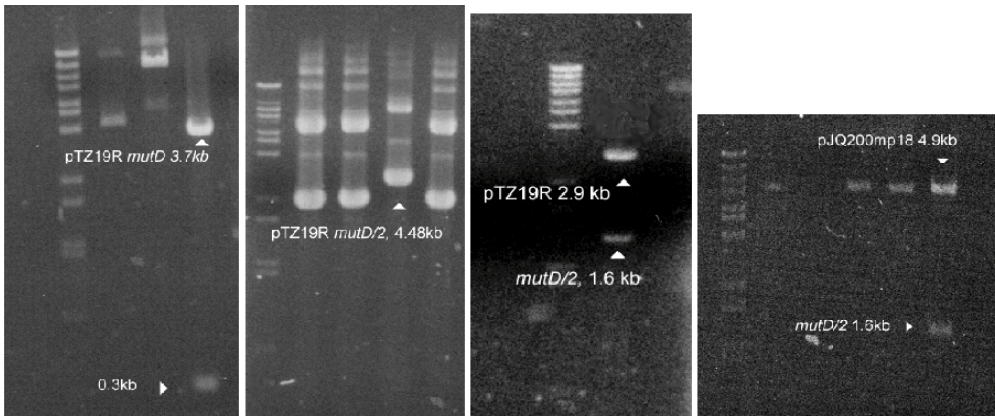


Fig 13.0-II:

A Panel A Gel de TE-agarosa 1% con productos de la construcción pTZ19R *mutD* digerida con *SacI* (DNA plasmídico aislado de GM33dam) se observan una banda de aproximadamente 3.7.kb y un fragmento de 0.3kb, por lo que se concluye que la orientación del inserto está opuesta al promotor T7 del vector (pTZ19R). Panel B) plásmido superhelicoidal de la construcción pTZ19R *mutD/2* 4.48kb. Panel C) construcción pTZ19R *mutD/2* digerida con la enzima *SalI*: se lineariza el vector pTZ19R (2.9kb) y se libera el inserto *mutD/2* 1.6kb. Panel D) construcción RecmutD/2 (pJQ200mp18 4.9kb + *mutD/2* 1.6) digerida con la enzima *SalI* se lineariza el vector pJQ200mp18 (4.9kb) y se libera el inserto *mutD/2* 1.6kb.

Tabla 1.0 Cepas y plásmidos.

CEPAS	CARACTERISTICAS RELEVANTES	FUENTE
Escherichia coli		
M15	<i>thi^r, lac^c, ara, gal, mt^r, F⁻, recA, uvr, lon.</i> ; pREP4/ Kan ^r	Qiagen
JM103	<i>hsdR4 Δ(lac-pro) F' traD36, proAB, lacI^qZ ΔM15</i>	(Ausubel 1987)
S17-1	<i>recA endA thi hsdR RP4-2 Tc::My::Tn7, TpR SmR</i>	(Simon 1983)
Rhodobacter sphaeroides		
WS8-N	cepa silvestre, Nal ^r (espontánea)	(Sockett 1990)
DC1	WS8-N; Δ <i>flgk</i> remoción alélica	Este trabajo
PLASMIDOS		
INSERTO		
DC <i>flgK_{RS}</i> -1	<i>flgK</i> Δ300 (720-1020bp) clonado en <i>HindIII/EcoRI</i> de pRK415, Tet ^r	Este trabajo
DC <i>flgK_{RS}</i> -2	<i>flgK</i> Δ300 (1020-1320bp) clonado en <i>HindIII/EcoRI</i> de pRK415, Tet ^r	Este trabajo
DC <i>flgK_{RS}</i> -3	<i>flgK</i> Δ300 (1320-1620bp) clonado en <i>HindIII/EcoRI</i> de pRK415, Tet ^r	Este trabajo
DC <i>flgK_{RS}</i> -4	<i>flgK</i> Δ300 (1620-1920bp) clonado en <i>HindIII/EcoRI</i> de pRK415, Tet ^r	Este trabajo
DC <i>flgK_{RS}</i> -5	<i>flgK</i> Δ300 (1920-2220bp) clonado en <i>HindIII/EcoRI</i> de pRK415, Tet ^r	Este trabajo
DC <i>flgK_{RS}</i> -6	<i>flgK</i> Δ300 (2220-2520bp) clonado en <i>HindIII/EcoRI</i> de pRK415, Tet ^r	Este trabajo
DC <i>flgK_{RS}</i> -7	<i>flgK</i> Δ300 (2520-2820bp) clonado en <i>HindIII/EcoRI</i> de pRK415, Tet ^r	Este trabajo
DC <i>flgK_{RS}</i> -8	<i>flgK</i> Δ300 (2820-3120bp) clonado en <i>HindIII/EcoRI</i> de pRK415, Tet ^r	Este trabajo
DC <i>flgK_{RS}</i> -9	<i>flgK</i> Δ300 (3120-3320bp) clonado en <i>HindIII/EcoRI</i> de pRK415, Tet ^r	Este trabajo
DC <i>flgK_{RS}</i> -10	<i>flgK</i> Δ300 (3420-3720bp) clonado en <i>HindIII/EcoRI</i> de pRK415, Tet ^r	Este trabajo
<i>flgK_{RS}</i> WT	<i>flgK_{WT}</i> 4,092 bps amplificado de pBG 506B, clonado en <i>HindIII/EcoRI</i> de pRK415, Tet ^r	Este trabajo
Δ2.6K	<i>flgK</i> Δ2.6kb, clonado en los sitios <i>HindIII/EcoRI</i> de pRK415, Tet ^r	Este trabajo
MutD	830pbs río arriba de <i>flgK_{RS}</i> amplificado de pBG 506B, clonado en los sitios <i>Sall/Smal</i> de pTZ19R, Ap ^r	Este trabajo
Mut2	750pbs de <i>flgK</i> amplificado de pBG 506B, clonado en los sitios <i>EcoRI/Smal</i> de pTZ19R, Ap ^r	Este trabajo
MutD/2	750pbs de Mut2, subclonado en los sitios <i>Clal/Smal</i> de MutD, Ap ^r	Este trabajo
CMutD/2	<i>MutD/2</i> , 1.58kbs derivado de MutD/2 subclonado en los sitios <i>Smal/ Sall</i> de pJQ200mp18 Gm ^r	Este trabajo
OvrFlgK	<i>flgK_{WT}</i> 4,092pbs clonado en los sitios <i>KpnI/HindIII</i> de pQE-30, His ₆ Tag	Este trabajo
pTZ19R	Vector de clonación, Ap ^r ; derivado de pUC	Pharmacia
pRK415	Vector de conjugación, derivado de pRK404; <i>lacZ mob+</i> ; Tc ^r	(Keen, Tamaki <i>et al.</i> 1988)
pJQ200mp18	Vector suicida, Gm ^r	(Quandt y Hynes 1993)
pBG506A	5.9 kbs de WS8-N subclonado en sitio <i>Sall</i> de pTZ19R, Ap ^r	(Gonzalez-Pedrajo <i>et al.</i> 2002)
pQE-30	Vector de sobre expresión ; Apr N-terminal His ₆ tag	Qiagen

Diseción molecular del gen *flgK_{RS}*.

Las remociones seriales de 300pbs a lo largo de la región no homóloga de *flgK_{RS}* se realizaron empleando la técnica de “Single Overlap Extension-PCR” (SOEing) como se describe previamente en [Horton, et al., 1989](#); [Horton, et al., 1990](#) y [Warrens et al., 1997](#). Estos protocolos se modificaron para optimizar las reacciones al emplear DNA de alto contenido de CG, que caracteriza a genomas como el de *R. sphaeroides*. El principio básico de ésta técnica involucra la amplificación inicial de dos fragmentos de DNA, donde uno o dos de los oligonucleótidos incorpora la mutación deseada. Los fragmentos amplificados poseen una región de superposición en el extremo 5'. Ambos segmentos amplificados son purificados para remover los oligonucleótidos originales y mezclados proporcionalmente para ser empleados como templados en una segunda reacción de PCR, utilizando los oligonucleótidos distales WTL1 y WLT2 (ver tabla 1.3). Los oligonucleótidos (Sigma Genosys) complementarios en los extremos 5' y 3' de *flgK_{RS}* (WTL1 y WLT2) fueron diseñados para amplificar los fragmentos que flanquean la remoción y son además empleados como templados para la reacción de superposición (SOEing).

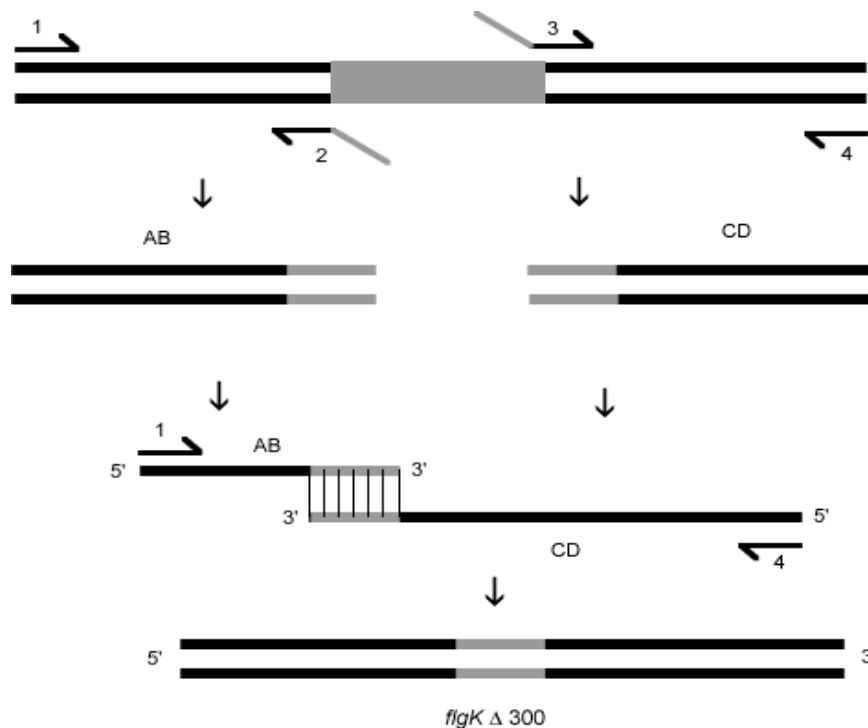


Fig 13.0-III:

Mutagénesis por Single overlap extension PCR.

El principio de esta técnica involucra la amplificación de dos fragmentos de ADN, donde uno de ellos incorpora la mutación. Ambos fragmentos poseen extremos 3' que se pueden sobrelapar. Los segmentos iniciales son purificados para remover los cebadores originales y se mezclan en una segunda reacción de amplificación, empleando los oligonucleótidos de los extremos (1 y 4). Figura modificada de [McPherson y Möller, PCR the Basics from background to bench Bios Publisher, 2000](#).

Las reacciones de amplificación de los fragmentos 5' se realizaron empleando los siguientes pares de oligonucleótidos: WTL1 y SOE1 a SOE10Rv. Por otro lado los oligonucleótidos SOE1 a SOE10Fw y WTL2 se utilizaron para amplificar los fragmentos 3' correspondientes. Con el objetivo de obtener las lesiones seriales *flgK*Δ300 pbs, los segmentos amplificados fueron purificados y mezclados en una proporción equimolar y utilizados como templados para una segunda amplificación empleando los oligonucleótidos WTL1 y WTL2. Cada una de las reacciones se realizó en un termociclador de gradiente PTC-200 (MJ Research). Para cada reacción de superposición (SOEing), la temperatura de "alineamiento" (T_m°), fue determinada empleando la siguiente ecuación (Quartin y Wetmur, 1989), con el fin de establecer un rango de gradiente de temperaturas en el paso de "alineamiento":

$$T_m = [T^\circ \text{DH/DH}^\circ - \text{DG}^\circ + \text{RT} \ln C] + 16.6 \log [\text{SALT}/1.0 + 0.7 (\text{SALT})] - 269.3$$

La temperatura predicha con ésta ecuación, se utilizó como un punto medio de referencia, con una diferencia aproximada de 20°C entre la mínima y máxima temperatura. Dos sistemas de amplificación (Roche Long Template Roche, Pfu-turbo y Native Pfu Stratagene) se utilizaron para optimizar la cantidad de los amplicones en cada paso de la mutagenesis. La amplificación de los segmentos flanqueantes se realizó de acuerdo a la composición básica de la siguiente reacción: 10% DMSO (Sigma), 10% amortiguador de reacción 10X, (Native Pfu, o Pfu Turbo Stratagene, o Expand Roche buffer 1), 50-100ng templado plasmídico (pTZ19 *flgK_{RS}*), 0.1mM dNTP's, 2ml de cada uno de los oligonucleótidos correspondientes (ver tabla 1.2 para la secuencia de los oligonucleótidos y tabla 1.3 para la concentración) 0.75µl Expand (Roche) o 2.5U Native Pfu o Pfu Turbo (Stratagene) aforado a un volumen de 50µl (para la amplificación de los segmentos 5' y 3') o 250µl para determinar la " T_m° " (dividida en 12 reacciones de 20µl). El programa de amplificación empleado para la síntesis de los segmentos flanqueantes fue: 94°C, 2'; 94°C-30"; (T_m° correspondiente) 45" y 68°C hasta 5'. 17-20 ciclos.

Las reacciones de superposición (SOEing) se realizaron utilizando una composición y programa de amplificación similar al descrito antes, pero utilizando la Roche Expand Long Template System exclusivamente y combinando en una proporción equimolar, la concentración de los productos de la reacción inicial (segmentos flanqueantes).

Las construcciones de las lesiones correspondientes DC*flgK_{RS}*-1 a DC*flgK_{RS}*-10 (ver tabla 1.0), fueron secuenciadas para confirmar la presencia de la lesión deseada. Los productos derivados de la reacción de superposición, fueron subclonados en los sitios *Xba*I y *Hind*III de pRK415 (Keen *et al.*, 1988) para su posterior conjugación en la cepa DC1 (Davis, *et al.*, 1988).

Tabla 1.2 oligonucleótidos.

OLIGONUCLEOTIDOS	SECUENCIA	FUENTE
FwmutD	5'-ACGCGTCGACCCCGCGCCGCCCGTGGCCAGGGTGGTG-3'	Este trabajo
RvmutD	5'-TCCCCCGGG ATCGATGGCGATGTCGAGGATGGACAA-3'	Este trabajo
Fwmut2	5'-CCGGAATTC ATCGATACCCTCCTGAACGCGCTGTGA-3'	Este trabajo
Rvmut2	5'-TCCCCCGGGCCCGTCAGGGTGAAGCGCACCGTG-3'	Este trabajo
WTL1	5'-CCCAAGCTTTTGTCCATCCTCGACATCGCCCGTT-3'	Este trabajo
WTL2	5'-CCGGAATTCTCACAGCGCGTTCAGGAGGGTTTC-3'	Este trabajo
Ovr1	5'-ACATGCATGCTTCATCCTCGACATCGCCCGTT-3'	Este trabajo
Ovr2	5'-CCCAAGCTTTCACAGCGCGTTCAGGAGGGTTTC-3'	Este trabajo
SOE1Rv	5'-GTCGAAGGCCACCACCGACGTCCCCTCGAGCAGCAG-3'	Este trabajo
SOE1Fw	5'-CTGCTGCTCGAGGGGACGTCCGGTGGTGGCCTTCGAC-3'	Este trabajo
SOE2Rv	5'-CACGAACGTCGCCTGCGCCGCGCCCGTGCCTCCG-3'	Este trabajo
SOE2Fw	5'-CGGGGCACGGGCGGCGCGGCGCAGGCGACGTTCTGTG-3'	Este trabajo
SOE3Rv	5'-CCCGGCATTCAGCGCCGCCGACCCCGCATTGCCGCT-3'	Este trabajo
SOE3Fw	5'-AGCGGCAATGCGGGGTGCGGCGCGCTGAATGCCGGG-3'	Este trabajo
SOE4Rv	5'-CAGCGTCGAGGCATCGTAGGCCAGAGTGGCCGGGTC-3'	Este trabajo
SOE4Fw	5'-GACCCGCCACTCTGGCCTACGATGCCTCGACGCTG-3'	Este trabajo
SOE5Rv	5'-GCCGTCGGCGGGGACCGCGCCCGGCAGGAAGCC-3'	Este trabajo
SOE5Fw	5'-CCGGGCGCGGTCCCCGCCGACGGCACGCTCACG-3'	Este trabajo
SOE6Rv	5'-GAAGCGCGCGCTGTGCGCCGCCTCGATCGTGACGCC-3'	Este trabajo
SOE6Fw	5'-GGCGTCACGATCGAGGCGGCCGACAGCGCGCGCTTC-3'	Este trabajo
SOE7Rv	5'-CGCCGAGGCCACGCCGGCCGTGCCCGACAAGGTGAG-3'	Este trabajo
SOE7Fw	5'-CTCACCTTGTGCGGGCACGGCCGGCGTGGCCTCGGGC-3'	Este trabajo
SOE8Rv	5'-CGAGACCGGTGCGTCCGCCCGTCCGCTCACGCCCGC-3'	Este trabajo
SOE8Fw	5'-GCGGGCGTGAGCGACGGGGCCGACGCACCGGTCTCG-3'	Este trabajo
SOE9Rv	5'-GACGGGCGCGCCGGTGGTCCGCCAGTCCGAAGGC-3'	Este trabajo
SOE9Fw	5'-GCCTTCGGACTGGCGGCGACCACCGCGCGCCCGTC-3'	Este trabajo
SOE10Rv	5'-GGCGAGCGTGCCCGTCAGGGAGGTGAGGTCCAGCGC-3'	Este trabajo
SOE10Fw	5'-GCGTGGTCCCTCACCTCCCTGACGGGCACGCTCGCC-3'	Este trabajo
(Fw, sentido, Rv, antisentido*)		

Tabla 1.3 Temperaturas de reacción de productos de PCR-SOEing

PRODUCTO	SEGMENTO	Tm°/ CONCENTRACION (reacción: 50µl)	Tm°/ SOEing
SOE-1	COOH	68.8°-69°/100pmol	67° / 0.4 pmol/µl
	NH2	83°/100pmol	
SOE-2	COOH	60° /10pmol	64.5-65° /0.4pmol/
	NH2	61.1° (+), 62.3(-), 68.4° (+), 70.9° (-) /100pmol	
SOE-3	COOH	66.1° /10 pmol	66.3° /0.4pmol/µl
	NH2	65° / 10pmol	
SOE-4	COOH	70.6°/ 0.4pmol	85.3° /0.4pmol/µl
	NH2	73.5° /0.4pmol	
SOE-5	COOH	70° / 10pmol	68° /10pmol
	NH2	70° / 10pmol	
SOE-6	COOH	69.8° / 10pmol	65.8°/10pmol
	NH2	69.8° / 10pmol	
SOE-7	COOH	64° / 10pmol	69.8°/10pmol
	NH2	64° / 10pmol	
SOE-8	COOH	69.8 / 10pmol	65.8°/10pmol
	NH2	69.8 / 10pmol	
SOE-9	COOH	58°, 58.6°, 60.1°, 61.8°, 64.6°, 72.1° /10pmol	64.6°/10pmol
	NH2	64.6°/10pmol	
SOE-10	COOH	60.1°, 61.8°, /10pmol	61.8°, /10pmol
	NH2	58.6° /10pmol	

13.1 Clonación, sobre-expresión y purificación de HAP1 Rs (His6)

La secuencia silvestre del gen *flgK_{RS}* fue amplificada por PCR desde el plásmido pBG506A (Gonzalez-Pedrajo *et al.*, 2002), utilizando los oligonucleótidos Ovr1 y Ovr2. El producto de PCR fue subclonado en los sitios *KpnI* y *HindIII* del plásmido de sobre-expresión pQE-30 (Qiagen). La cepa M15/pREP4 (Qiagen) fue transformada con la construcción resultante OvrFlgK (M15pREP4)/pQE-30 *flgK_{RS}*WT). Un cultivo de 250ml de medio LB fue inoculado con 2ml de un precultivo crecido por 16hrs (LB) en presencia de ampicilina (200mg/ml). Las células fueron crecidas a 37°C en agitación vigorosa (250rpm), hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 (DO₆₀₀). En ese punto, fue agregado isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) en una concentración final de 0.1mM y el crecimiento se mantuvo durante 2hrs a 25°C en agitación vigorosa (250rpm), posteriormente las células se cosecharon por centrifugación (11,000g/5min). El paquete celular fue resuspendido en 5ml de amortiguador de sonicación (50mM NaH₂PO₄, NaCl 500mM, 5mM imidazol, 100mM PMSF). La suspensión de células fue lisada por sonicación (Branson) e inmediatamente los detritos celulares removidos por centrifugación (15,000rpm/15min). El sobrenadante clarificado se recuperó y se incubó con 600ml de resina Ni-NTA – Agarosa (Qiagen) durante 2hrs a 4°C en agitación moderada. La resina cargada fue empacada en una columna de polipropileno y se lavó con 20 volúmenes de solución amortiguadora de lavado (50mM NaH₂PO₄, NaCl 500mM, 20mM imidazol, 10% glicerol). HAP1-his₆ fue eluida en dos volúmenes con solución amortiguadora de elución (50mM NaH₂PO₄, NaCl 500mM, 150mM imidazol, 10% glicerol). La elución recuperada fue concentrada por centrifugación (1216g/ 20min a 4°C) empleando un filtro Amicon de 30 kDa (Millipore, Bedford MA). 50μl de muestra de cada una de las eluciones: primer eluado, lavado 1-20mM imidazol, lavado 2-20mM imidazol y elución 150mM imidazol fueron precipitadas con el método de MetOH-Cloroformo (Wessel & Flugge 1984). La pastilla de proteína precipitada fue resuspendida en 10μl de solución amortiguadora SDS- Laemli y posteriormente cargada en un gel de acrilamida 12.5% SDS-PAGE, según Laemli 1970. Las proteínas del perfil de elución separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Trans Blot©, de 2mm (BioRad), empleando una cámara de transferencia semiseca (Hoefer). Un ensayo de inmunolocalización tipo Western blot se realizó con la membrana que contenía las proteínas transferidas, empleando un anticuerpo anti-histidinas (India-His, Pearce), diluido 1:10,000 y revelado por quimioluminiscencia (HRPcoupled ECL-Amersham-Pharmacia).

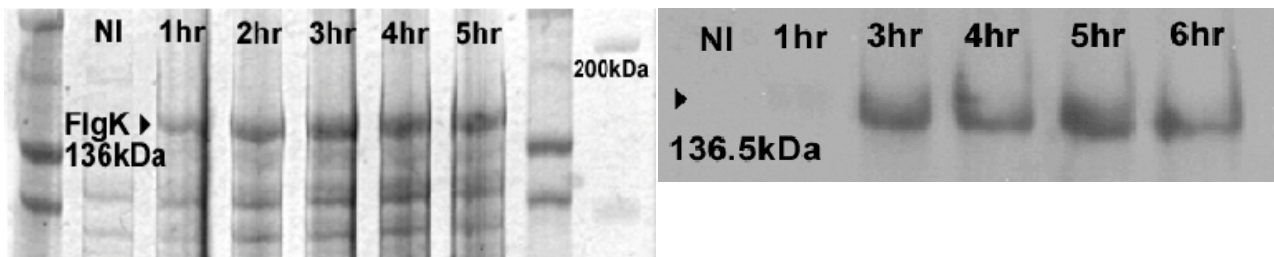


Fig 13.1-I:

A

B

Sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante HAP1R_S(His₆)

Panel A: SDS-PAGE 12%, tinción de Coomassie: JM109, pQE-30 *flgK*-WT inducido durante 5 hrs, (0.1mM IPTG). No existe un incremento en el producto inducido en relación al tiempo de inducción, Después de 3hr, la síntesis de la proteína aparece constante (Panel B).

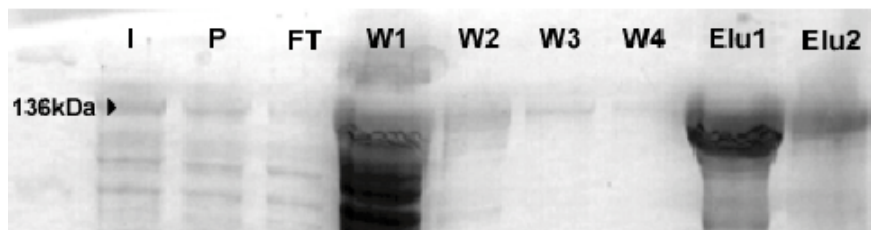


Fig 13.1-II:

SDS-PAGE 12% Tinción de Coomassie: La resina Ni-NTA-agarose cargada con el extracto de JM109, pQE-30 *flgK*-WT se lavó con 20 volúmenes de amortiguador de lisis y 20mM imidazol; las fracciones de los lavados se colectaron en grupos de 5 vols., y se precipitaron con MetOH- cloroformo. La proteína HAP1R_S(His₆), se eluyó con dos vols. de amortiguador y 150mM imidazol. El primer eluado contiene la mayoría del producto protéico de interés

13.2 Purificación por filtración en gel de la proteína recombinante HAP1R_S(His₆)

La elución de la proteína HAP1R_S(His₆) se sometió a un paso extra de purificación por exclusión molecular. Se empacó en una columna de cromatografía EconoColumn® (BioRad) acoplada a un colector de fracciones FC203B (Gilson) y a un lector óptico UV-1 optic unit (Pharmacia LKB) con 80 ml de Sephacryl-200 (Amersham Pharmacia). El perfil de elución se graficó a través de un graficador Pharmacia- LKB REC 101, previamente calibrado utilizando una estándar de PBS/BSA100mg/ml para ajustar el rango de absorción/transmitancia a 280nm. La columna empacada fue lavada repetidamente con 20 volúmenes de agua destilada y filtrada (0.22mM/Millipore); posteriormente se equilibró con solución amortiguadora de corrida: 500mM NaCl, 50mM NaH₂PO₄, 5% glicerol. A la muestra concentrada (elución de la columna de Ni-NTA-Agarosa) se le agregó 25% de glicerol y se colocó en la columna para su separación por gravedad. Un embudo con solución amortiguadora de corrida (500mM NaCl, 50mM NaH₂PO₄, 5% glicerol) se acopló a la columna para incrementar el flujo de la fase móvil. Se colectaron cincuenta fracciones de 2ml, y se realizó un perfil de elución empleando una celda de cuarzo de 1cm. Las fracciones se leyeron en un espectrofotómetro UV160U Shimadzu (Tokyo), ajustado a 280nm, con el objetivo de incrementar la resolución del pico correspondiente a las fracciones que contenían la proteína recombinante purificada.

De las fracciones con mayor absorbancia (16 y 17) se tomaron alícuotas de 100ml y se precipitaron por el método de MetOH / cloroformo (Wessel & Flugge 1984). Las muestras precipitadas se re-suspendieron en 15 ml de solución amortiguadora de carga SDS-PAGE y se corrieron en un gel 12.5% PAGE-SDS, según Laemli 1970 para corroborar la pureza de las muestras.

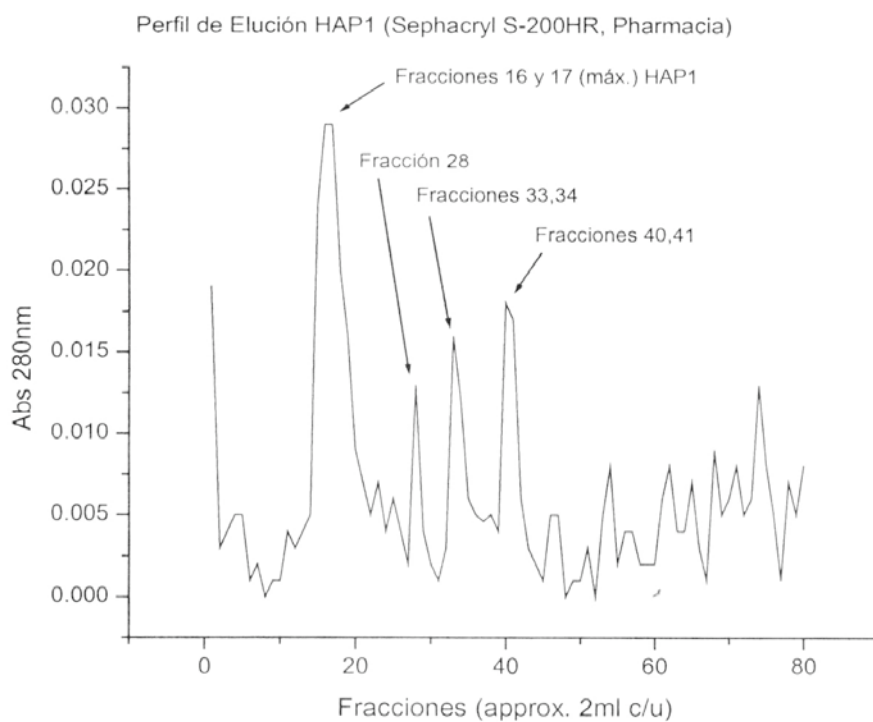


Fig 13.2-I:

Perfil de elución de la filtración por gel (Sephacryl-200HR, Pharmacia) de la proteína HAP1_{R5}(His₆). El pico mayor corresponde a las fracciones 16 y 17, con los valores de mayor absorbancia (280nm).

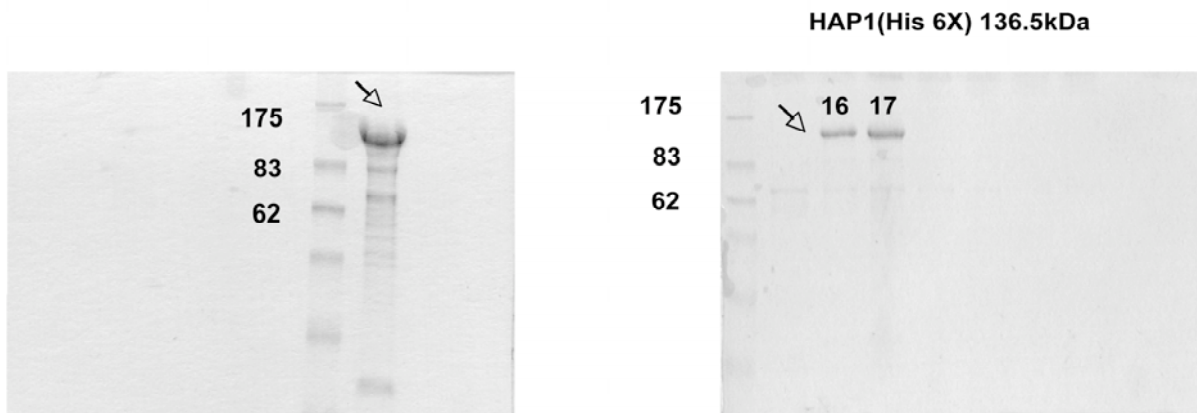


Fig 13.2-I:

Gel de 12.5% SDS-PAGE, tinción de Coomassie. Panel A: Se corrieron 50uL de la proteína HAP1_{Rs}(His₆) concentrada en un Amicon (30 kD), antes de ingresar a la columna de filtración en gel. Panel B, las fracciones 16 y 17 colectadas de la columna de Sephacryl-200, poseen la mayor absorbancia a 280nm.

13.3 Generación de anticuerpos α -HAP1_{Rs}(His₆) de conejo

Con el objetivo de localizar a la proteína HAP1_{Rs} en ensayos de secreción o en otros experimentos, se generaron anticuerpos α -HAP1_{Rs}, empleando la proteína recombinante HAP1_{Rs}(His₆) purificada por filtración molecular, como antígeno para generar anticuerpos policlonales. Las fracciones 16 y 17 resultante de la columna de filtración por Sephacryl-200 (Amersham Pharmacia) se cuantificaron a través de un ensayo espectrofotométrico según [Lowry et al., 1951](#). Se determinó un total de 37mg para ambas fracciones. Anticuerpos policlonales α -HAP1_{Rs} fueron generados de acuerdo con métodos estandarizados descritos en [Harlow 1988](#). La siguiente metodología resume brevemente el procedimiento realizado

Preparación del antígeno

Las fracciones 16 y 17 se mezclaron y se concentraron en 500ml empleando un filtro Amicon de 30kD (Millipore, Bedford MA). La solución de proteína recombinante HAP1_{Rs}(His₆) se dializó en una membrana de 25kD en PBS pH 7.0. La solución final se mezcló con 500ml de adyuvante completo de Freund y se homogenizó por 30min.

Recolección de suero preinmune y suero inmune.

Se emplearon dos conejos machos de 2kg (cepa Nueva Zelandia) para la producción de anticuerpos. Entre 10 y 15ml de suero preinmune se obtuvo de sangrados de la vena marginal de la oreja. Los sangrados se incubaron a 37°C por 1hr y para permitir la formación del coágulo, y posteriormente se recuperaron los componentes solubles y se centrifugaron a 11,000g/4°C durante 5min. El suero colectado se congeló a -70°C hasta su uso.

Inmunización de los conejos

Los conejos fueron inmunizados vía intramuscular con 1ml del homogenado 37mg Hap1_{rs}(His₆)/Adyuvante completo de Freund (1:1). Se realizó una segunda inmunización con intervalo de dos semanas. La última inmunización se realizó con la misma concentración de proteína HAP1_{rs}(His₆)/adyuvante incompleto de Freund (1:1). El sangrado de los conejos se realizó después de tres semanas desde la segunda inmunización. El antisuero se separó en alícuotas de 500µl y congeló a -70°C hasta su uso posterior.

13.4 Análisis de secreción e inmunolocalización HAP1_{Rs}

Se crecieron cultivos heterotróficos de las cepas DC*flgK_{Rs}*-1 a DC*flgK_{Rs}*-10, la cepa Δ2.6K, la cepa complementante (DC1+*flgK_{Rs}*WT), WS8 y DC1 (WS8-Δ*flgK_{Rs}*), en las siguientes condiciones: 10ml de medio Sistro, ácido nicotínico, tiamina-HCL, biotina; las cepas exconjugantes se adicionaron con tetraciclina 1mg/ml y se incubaron a 200rpm, 30°C, durante 16hr. Se tomaron licuotas de 1ml del cultivo de células en suspensión y se centrifugaron a 1,700 x g durante 1 min. El paquete celular se resuspendió en 500µl de amortiguador de carga SDS-PAGE. Un gel SDS-PAGE 10% se cargó con 10 µl. Los sobrenadantes resultantes se precipitaron por medio de MetOH/cloroformo (Wessel & Flugge 1984). Las pastillas de las proteínas precipitadas fueron secadas por evaporación al vacío y resuspendidas en 50µl de amortiguador SDS-PAGE, un gel SDS-PAGE 10% se cargó con 10 µl.

Una vez corridas las proteínas en SDS-PAGE según Laemmli 1970, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa Trans Blot®, de 2mm (BioRad), empleando una cámara de transferencia semiseca (Hoefer). La membrana con las proteínas transferidas se incubó con el antisuero α-HAP1_{Rs} en una dilución 1:10,000 durante 1hr. La membrana se lavó con 5 volúmenes de solución amortiguadora TTBS, y posteriormente se incubó con un anticuerpo secundario anti conejo acoplado a una peroxidasa de rábano (Amersham-Pharmacia), a una dilución 1:10,000 por 1hr y se reveló por quimio-luminisencia (HRPcoupled ECL-Amersham-Pharmacia).

13.5 Microscopía electrónica de transmisión

Se crecieron cultivos heterotróficos de las cepas DC*flgK_{Rs}*-1 a DC*flgK_{Rs}*-10, la cepa Δ2.6K, la cepa complementante (DC1+*flgK_{Rs}*WT), WS8 y DC1 (WS8-Δ*flgK_{Rs}*), en las siguientes condiciones: 10ml de medio Sistro, ácido nicotínico, tiamina-HCL, biotina; las cepas exconjugantes se adicionaron con tetraciclina 1mg/ml, 200 rpm, 30°C, hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0.5. Se tomaron alícuotas de 1ml del cultivo de células en suspensión y se centrifugaron a 16,000 x g, 4°C durante 1

min. El paquete celular se lavó con 2 volúmenes de amortiguador HEPES 10mM pH 7.0 y finalmente se resuspendió en 100 μ l de amortiguador HEPES 10mM pH 7.0. 10 μ l de la suspensión celular se colocaron en rejillas de microscopía (Forvam©) recubiertas de carbón, previamente ionizadas. Se utilizó una solución de acetato de uranilo al 1% para contrastar negativamente las muestras de las rejillas, después de 15 min. de secado la muestras se observaron a 120 KV en un microscopio electrónico de transmisión JEOL1200EXII (JEOL-Ltd., Tokyo, Japón).

13.6 Ensayos de motilidad

Se crecieron cultivos heterotróficos de las cepas DC*flgK_{RS}*-1 a DC*flgK_{RS}*-10, la cepa Δ 2.6K, la cepa complementante (DC1+*flgK_{RS}*WT), WS8 y DC1 (WS8- Δ *flgK_{RS}*), en las siguientes condiciones: 10ml de medio Sistrom, ácido nicotínico, tiamina-HCL, biotina; las cepas exconjugantes se adicionaron con tetraciclina 1mg/ml, los cultivos se mantuvieron en agitación a 200 rpm y 30°C, hasta alcanzar la fase estacionaria. Se tomaron alícuotas de 2ml del cultivo de células en suspensión y se colocaron en la superficie de cajas de cultivos celulares de 12 pozos (Constar-Corning) vaciando en cada pozo 4ml de medio Sistrom sin caseína-aminoácidos, solución de vitaminas y distintas concentraciones de agar (0.18, 0.19, 0.2, 0.22, 0.24, 0.26, 0.28 y 0.3%) n=6 para cada concentración. Se realizó un duplicado en paralelo con las mismas condiciones de cultivo, pero adicionado con Ficoll 400 (Sigma) en una concentración final de 1.25mg/ml. Ambos grupos de cajas se incubaron en condiciones aeróbicas a 30°C en la oscuridad. El desempeño de nado en “enjambre de células” (swarming) se determinó por la capacidad de las células de moverse concéntricamente desde el punto de inoculación después de 48hr de incubación. Los diámetros se determinaron a partir de fotografías digitales (1.4 Mega pixeles) que fueron procesadas empleando Carnoy 2.0v (Schols, P. & E. Smets. 2001. Carnoy: analysis software for LM, SEM and TEM images. Leuven: distribuido por los autores. <http://www.carnoy.org>). Las mediciones de los diámetros se transfirieron al programa Prism 4.1v, para su análisis estadístico.

13.7 Análisis de velocidad de nado y rastreo del patrón de nado.

Se crecieron cultivos heterotróficos de las cepas DC*flgK_{RS}*-1 a DC*flgK_{RS}*-10, la cepa Δ 2.6K, la cepa complementante (DC1+*flgK_{RS}*WT), WS8 y DC1 (WS8- Δ *flgK_{RS}*), en las siguientes condiciones: 10ml de medio Sistrom, ácido nicotínico, tiamina-HCL, biotina; las cepas exconjugantes se adicionaron con tetraciclina 1mg/ml, los cultivos se mantuvieron en agitación vigorosa 200 rpm a 30°C, hasta alcanzar una D.O₆₀₀ entre 0.9-1.0. Se tomaron alícuotas de 2ml del cultivo de células en suspensión y se observaron en un microscopio de campo oscuro de alta intensidad (Olympus BH2). Cada uno de los cultivos se filmaron empleando una videocámara digital CV-S3200 (JAI Corp. Japón). La señal de video se capturó en una videocámara digital DCR-TRV340 Handycam Hi-8 (SONY Corp.). Segmentos de 5 seg. de video se transfirieron al programa de edición de video: Imovie 6.0.3v. (Apple Computers). Los fragmentos de video elegidos (5 seg.) se comprimieron en un rango

de 15 cuadros/s y se almacenaron en formato .mov de (Quicktime 7.1.3v). Se grabaron y comprimieron archivos de video para las referencias de escala, empleando un porta objetos graduado para calibrar las imágenes (Graticules Ltd. Tonbridge, UK). Cinco archivos de video para cada cepa fueron analizados empleando la aplicación de rastreo manual (manual tracking plug-in) del programa ImageJ 1.3.2v (Fabrice Cordelières, Institut Curie, Orsay; Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2008). Las mediciones de las velocidades instantáneas se transfirieron al programa Prism 4.1v, para su análisis estadístico. La velocidad promedio analizada es el resultado de diez mediciones independientes por cultivo de cada cepa. Se hicieron tres repeticiones de cada cultivo. La frecuencia de paro se calculó como el numero de paros encontrados en un intervalo de 5 seg.

14.0 Resultados

Aislamiento y caracterización de la mutante DC1 ($\Delta flgK_{Rs}$).

Antecedentes experimentales.

Previamente se había observado que una mutación por interrupción en el alelo codificante para HAP1_{Rs} (*flgK*) generaba células incapaces de sintetizar el filamento flagelar e incapaces de moverse en agar semisólido 0.3% ,La cepa con la lesión (*flgK::aadA*) se aisló interrumpiendo el alelo de *flgK_{Rs}* en un sitio único *ClaI* ubicado a 1731pbs del inicio de la secuencia del gen *flgK_{Rs}* (D. Castillo tesis de licenciatura 2003), empleando un cassette no polar (*aadA*) que confiere resistencia a espectinomomicina (Metcalf y Wanner, 1993). Adicionalmente se aisló una cepa nula de *flgK_{Rs}* (DC1) a partir de la mutante *flgK::aadA*, como se describe en los materiales y métodos. Esta última mutante muestra un fenotipo Fla⁻. El fenotipo Fla⁺ se restableció al complementarse con el alelo silvestre por medio de una construcción en trans (pRK415+*flgK_{Rs}*WT). En contraste no se observó complementación al introducir en la cepas mutantes *flgK::aadA* y DC1 ($\Delta flgK_{Rs}$) la construcción Δ 2.6K que carece de la región central de 860aa. Con el objetivo de comprender la participación de la región central no conservada de 860aa de HAP1_{Rs} se generaron remociones seriales de 300pbs en la región central de *flgK_{Rs}*. En la figura **14.0-IA** se muestra un esquema de los segmentos removidos para cada una de las 10 mutantes (DC*flgK_{Rs}*-1 a 10) obtenidas por Single Overlap Extension PCR (ver materiales y métodos para más detalles). Los sobrenadantes de las diez cepas mutantes se precipitaron con el método de MetOH-cloroformo (Wessel y Flugge 1984). El material precipitado y extractos celulares fueron analizados para localizar las proteínas mutantes HAP1_{Rs} por medio de inmunolocalización tipo Western-blot. La figura **14.0-I** muestra la localización de HAP1_{Rs} revelado por medio de anticuerpos policlonales α -HAP1_{Rs} en la cepa silvestre WS8, la mutante complementada DC1+ *flgK_{Rs}*WT, y 9 de las 10 mutantes DC*flgK_{Rs}* mutantes (DC*flgK_{Rs}*-2 a 10). La masa molecular aparente esperada de 123kDa fue observada para las HAP1_{Rs} expresadas por 9 de las mutantes. En contraste con la masa molecular expresada por el alelo silvestre de 136kDa.

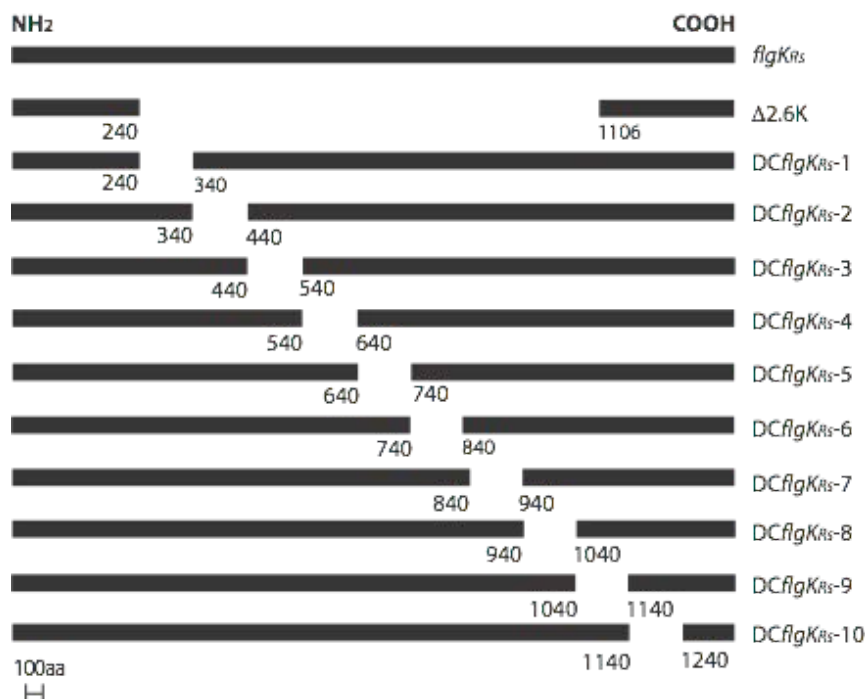


Fig 14.0-IA se muestra un esquema de los segmentos removidos para cada una de las 10 mutantes (*DCflgK_{RS}-1* a 10) obtenidas por Single Overlap Extension PCR. Barra 100 aminoácidos.

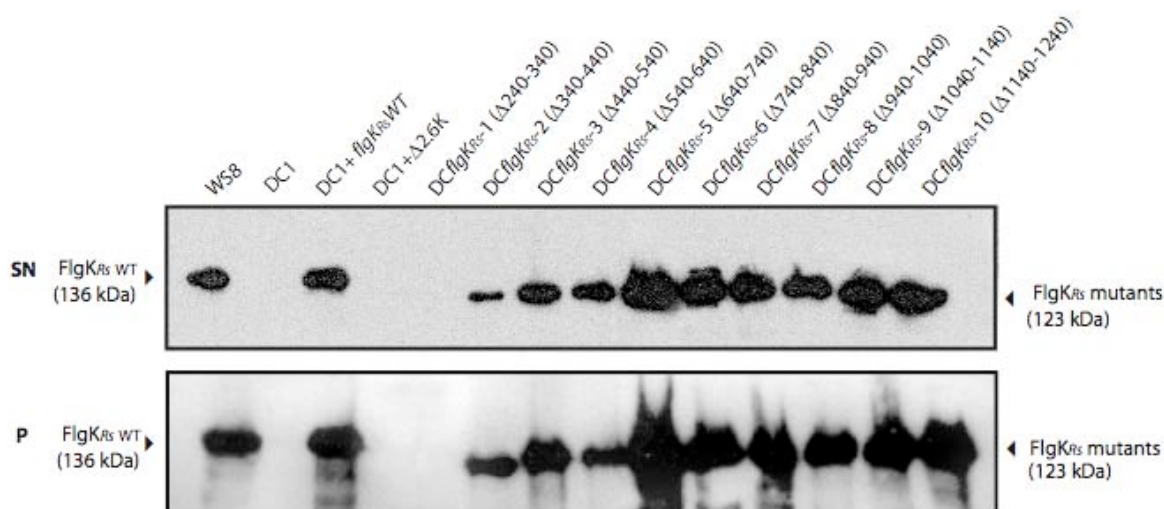


Fig14.0-I:

SDS-PAGE 10%, tinción de Coomassie. Los geles fueron cargados con muestras fracciones de los sobrenadantes (SN) y extractos celulares (P) de pastillas celulares centrifugadas de cultivos en suspensión. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos anti-HAP1_{RS}, (1.10,000), como se describe en materiales y métodos. Figura tomada de [Castillo et al., 2009](#).

La presencia de estructuras de gancho-filamento de cada una de estas cepas fue confirmada por microscopía electrónica de transmisión. La figura **14.0-II (a y b)** muestra a la cepa complementada al igual que las nueve mutantes (*DCflgK_{RS}-2* a *10*) que ensamblan una estructura gancho-filamento similar a que se encuentra en la cepa Silvestre WS8. Cabe notar que los residuos 240-340 (*DCflgK_{RS}-1*) parecen ser críticos para la estabilidad de HAP1_{RS} debido a que la remoción de esta región no permite su inmunodetección por anticuerpos α -HAP1_{RS} en ninguna de las fracciones celulares o en las fracciones de los sobrenadantes extracelulares.

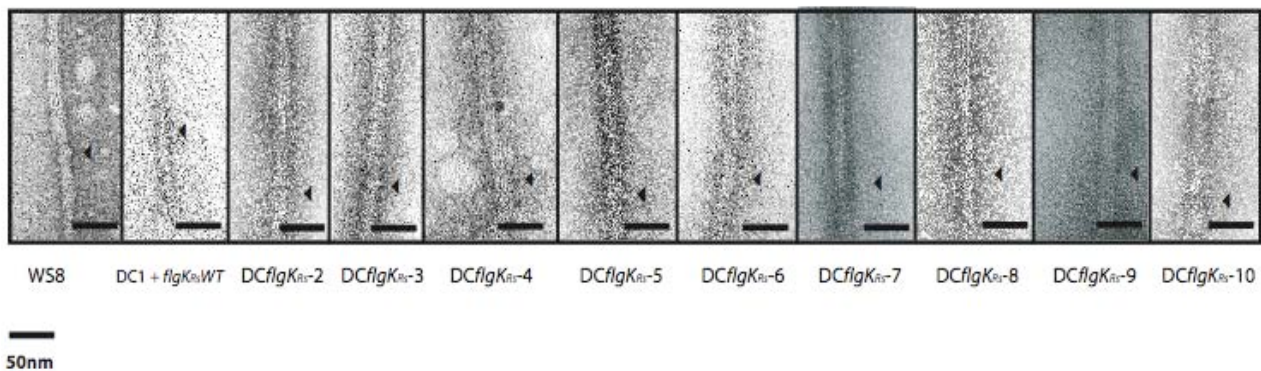


Fig 14.0-II a:

Micrografías electrónicas de transmisión. Los filamentos aislados de las mutantes *DCflgK_{RS}* fueron teñidos con una solución 1% de acetato de uranilo, y se observaron a 100kV. en un microscopio electrónico de transmisión JEOL-JEM-1200EXII. Barra 50nm. No se aprecian diferencias significativas en la estructura de la interfase del gancho y el filamento de las mutantes *DCflgK_{RS}* y los controles. Figura tomada de [Castillo *et al.*, 2009](#).

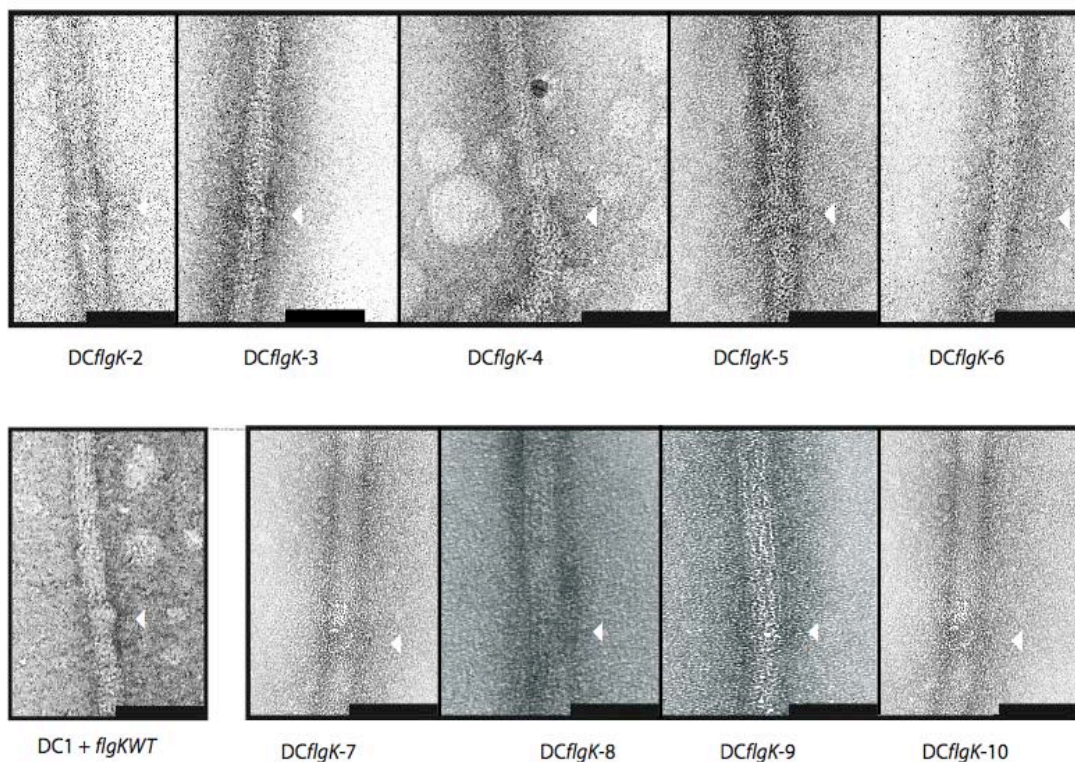


Fig 14.0-II b

14.1 Análisis funcional de los alelos $flgK_{Rs}\Delta_{300}$

Se analizaron las velocidades y patrón de nado en medio líquido de las células silvestres WS8, la cepa complementante ($DC1+flgK_{Rs}WT$), y nueve mutantes $DCflgK_{Rs}$ que ensamblan la estructura gancho-filamento. Las células WS8 nadan a una velocidad promedio de $59.6 \mu\text{m/s}$, mientras que las células de la mutante complementada ($DC1+flgK_{Rs}WT$), nadan a una velocidad promedio de $30.7 \mu\text{m/s}$ (ver Tabla 1.4). La diferencia de velocidades entre estas cepas control, entre la cepa WS8 y la complementante, se puede deber al alto número de copias de $HAP1_{Rs}$ que posee el vector de complementación. Esto podría alterar la fisiología de células e influir en el número de transcritos disponibles. La tabla 1.4 muestran que solo siete de las nueve mutantes $DCflgK_{Rs}$ capaces de ensamblar la interfase gancho-filamento, pueden nadar en medio líquido.

En comparación con la cepa silvestre WS8, se detectó que todas las mutantes móviles muestran un decremento en su velocidad. Un primer grupo de mutantes que incluyen $DCflgK_{Rs}-3$ y $DCflgK_{Rs}-8$ muestran una velocidad promedio de $30.4\mu\text{m/s}$ y $30.2 \mu\text{m/s}$ respectivamente. Las mutantes $DCflgK_{Rs}-4$, $DCflgK_{Rs}-9$ and $DCflgK_{Rs}-10$ conforman el segundo grupo, que muestran una velocidad promedio de $16.8 \mu\text{m/s}$, $22.7\mu\text{m/s}$ and $27.7 \mu\text{m/s}$ respectivamente. Finalmente un tercer grupo incluye a $DCflgK_{Rs}-2$ y $DCflgK_{Rs}-7$ que es incapaz de nadar a pesar de ensamblar filamento. Adicionalmente se analizaron los patrones de nado por microscopía de campo oscuro de alta intensidad, la mayoría de las mutantes mostraron patrones curvos y con un mayor número de eventos de reorientación y/o paro. Este patrón se denominó “tembloroso”. Las mutantes muestran una frecuencia de paro de entre 1.6 a 3.6 paros/seg., calculados a partir de los fragmentos de 5 seg. de video. Esto contrasta con las trayectorias y frecuencias de paro de la cepa silvestre y la cepa complementante que oscilan entre 0.45 a 0.48 paros/seg. En la Fig 14.1-I a y b se muestran los patrones de nado representativos de las cepas silvestre WS8, la mutante complementada ($DC1+flgK_{Rs}WT$), así como siete de las mutantes $DCflgK_{Rs}$ que son capaces de nadar en medio líquido. La determinación de las velocidades y patrones de nado se describen ampliamente en la sección de materiales y métodos.

Tabla 1.4 Velocidades de nado y patrones de nado

CEPAS	VELOCIDADES DE NADO ($\mu\text{m/s}$)	FENOTIPO (FLA)	PATRÓN DE NADO
WS8-N	59.6 \pm 2.8	+	Normal
DC1	-	-	-
DC1 + flgK _{RS} WT	30.7 \pm 5.1	+	Normal
Δ 2.6K (Δ 856)	-	-	-
DCflgK _{RS} -1	-	-	-
DCflgK _{RS} -2	-	+	-
DCflgK _{RS} -3	30.4 \pm 7.3	+	curvo/temblososo
DCflgK _{RS} -4	16.8 \pm 1.7	+	"rizado", muy curvo / temblososo
DCflgK _{RS} -5	24.4 \pm 5.9	+	curvo/temblososo
DCflgK _{RS} -6	19.5 \pm 4.2	+	curvo/temblososo
DCflgK _{RS} -7	-	+	-
DCflgK _{RS} -8	30.2 \pm 3.2	+	ligeramente curvo/temblososo
DCflgK _{RS} -9	22.7 \pm 6.4	+	ligeramente curvo/temblososo
DCflgK _{RS} -10	27.7 \pm 0.5	+	ligeramente curvo

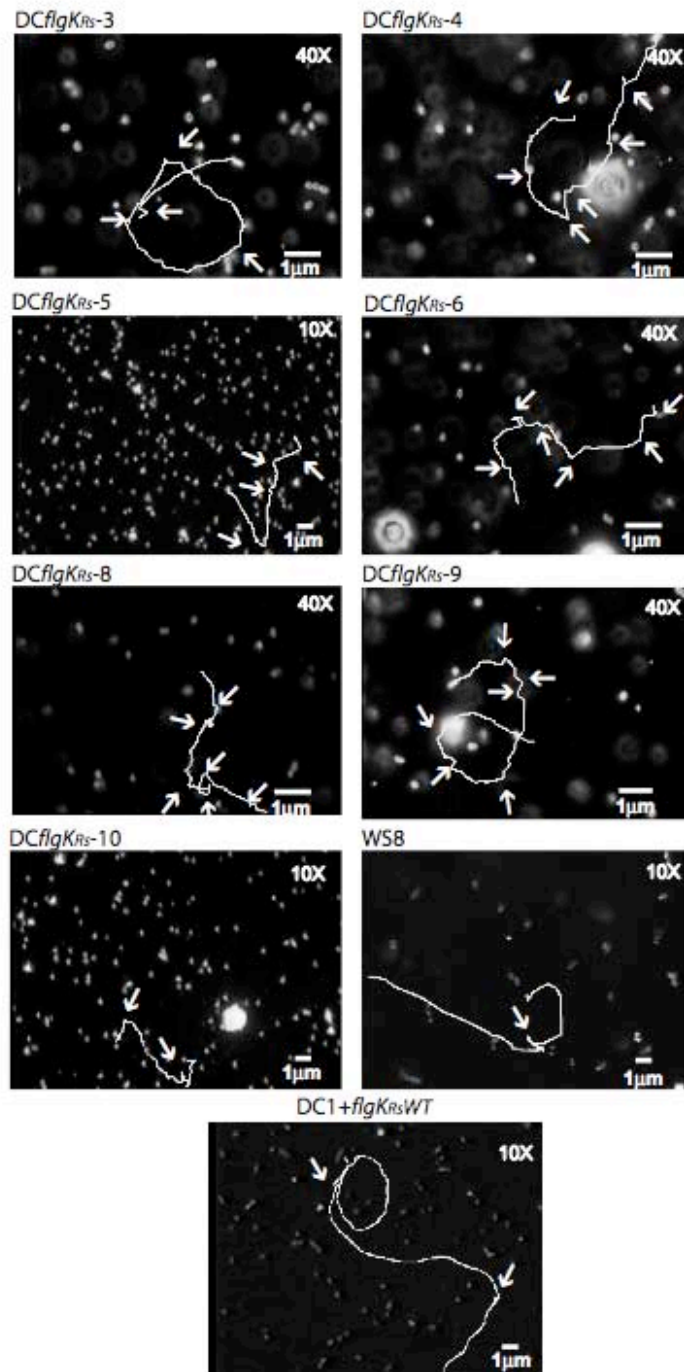


Fig 14.1-Ia:

Trayectorias y patrón de nado de varias mutantes *DCflgK_{RS}* y cepas control, Imágenes de video capturadas a través de un microscopio de campo oscuro. Se analizaron secuencias de 5seg de video digital, mediante la aplicación de rastreo manual (“manual tracking”) de Imagen 1.3.2v. Diferentes magnificaciones se utilizaron para seguir la trayectoria más largas o rápidas. Las flechas indican el numero de paros con reorientación en el intervalo de tiempo analizado.

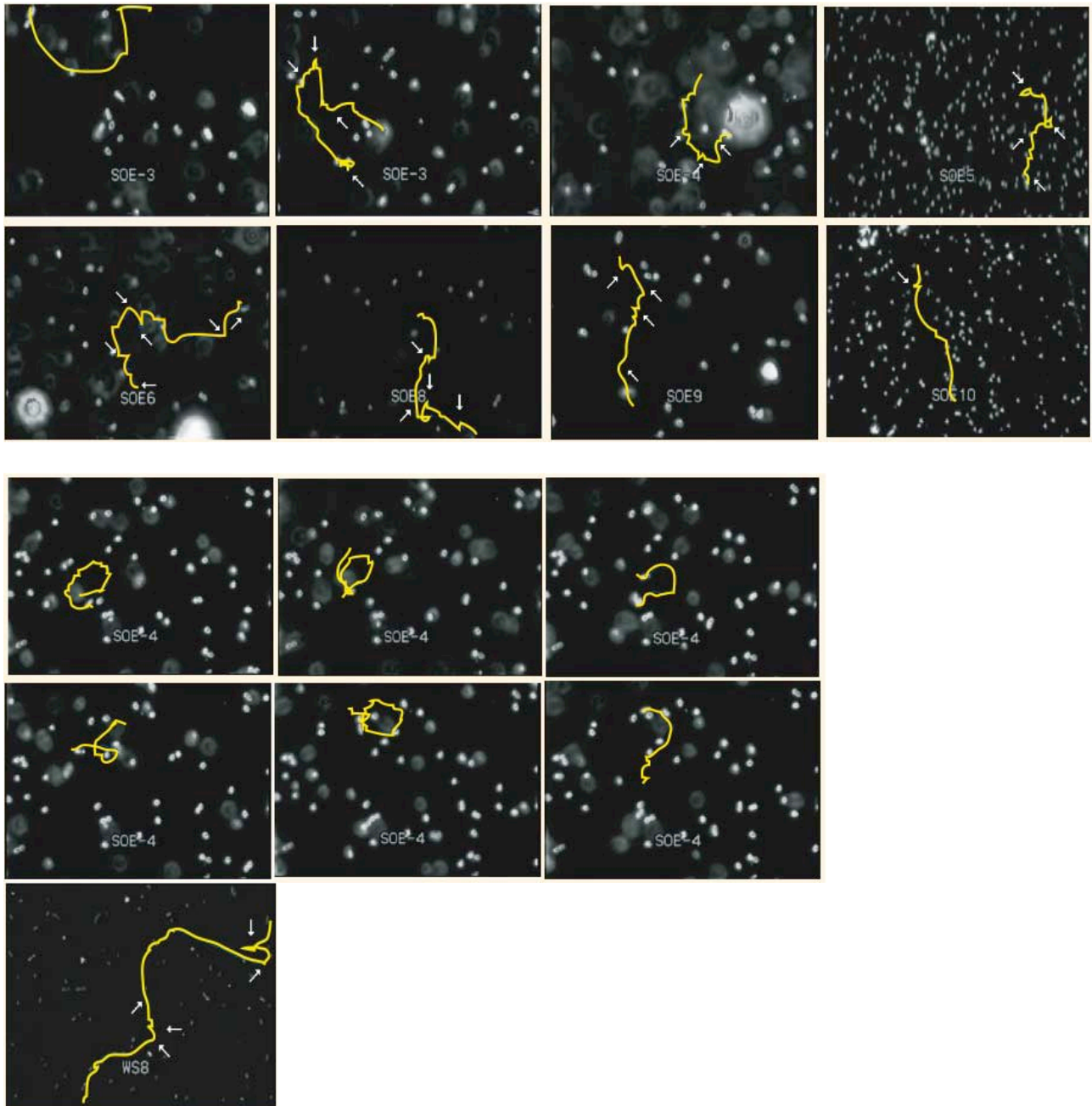


Fig 14.1-Ib:

Trayectorias y patrón de nado de varias mutantes $DCflgK_{Rs}$ y WS8. En los paneles superiores se muestran las cepas que presentan un nado con trayectorias “temblorosas”: $DCflgK_{Rs}$ -3, 5, 6, 8, 9 y 10. En los paneles inferiores se muestra el patrón de nado de la cepa $DCflgK_{Rs}$ -4 que se comporta preferentemente en trayectorias circulares. La trayectoria de nado de WS8 (cepa silvestre), se muestra al costado de la segunda serie. Las flechas indican eventos de paro y reorientación.

Debido a que no todas las mutantes que sintetizan estructuras gancho-filamento son capaces de nadar en medio líquidos, se analizó el nado en superficies semisólidas o “swarming” (nado en enjambre) de nueve mutantes *DCflgK_{RS}*. Se prepararon placas de agar semisólido en presencia y ausencia de Ficoll 400 (1.25 mg/ml), incrementando su concentración de 0.18 a 0.3%. Bajo estas condiciones las cepas mutantes también se pueden agrupar en tres categorías: La cepa silvestre WS8 y la cepa complementada (*DC1+flgK_{RS}WT*) se utilizaron como controles. El primer grupo incluye *DCflgK_{RS}-4*, *DCflgK_{RS}-5*, y *DCflgK_{RS}-10*. Estas cepas muestran un decremento lineal en la capacidad de “swarming” mientras aumenta la concentración de agar, independientemente de la presencia de Ficoll 400. La **Fig 14.1-II** muestra el desempeño de nado en superficies semisólidas de las mutantes que despliegan los comportamientos de nado más sesgados o anómalos en comparación a los encontrados en los controles en la cepa Silvestre WS8 o en la cepa *DC1+flgK_{RS}WT*.

El segundo grupo incluye a las mutantes *DCflgK_{RS}-2*, *DCflgK_{RS}-6* y *DCflgK_{RS}-8* que mejoran moderadamente su capacidad de nado en presencia de Ficoll 400. El último grupo incluye a las mutantes *DCflgK_{RS}-3*, *DCflgK_{RS}-7* y *DCflgK_{RS}-9* que muestran un incremento sustancial en su capacidad de nado en presencia de Ficoll 400. El efecto más dramático se observó para *DCflgK_{RS}-7*. Esta cepa forma un anillo de nado más reducido en cualquiera de las concentraciones probadas, correlaciona con el hecho que es incapaz de moverse en medios líquidos (ver [tabla 1.4](#) y **Fig 14.1-II**). Adicionalmente *DCflgK_{RS}-3* y *DCflgK_{RS}-9* mostraron un anillo de nado más grande en la concentración más baja probada 0.18%. Cabe notar que en las condiciones de 0.22% de agar y presencia de Ficoll 400, están también asociado con el mayor diámetro de nado observado para *DCflgK_{RS}-7*. A 0.19% de agar, las capacidades de nado para *DCflgK_{RS}-3* y *DCflgK_{RS}-9* caen abruptamente. En contraste con los máximos observados para estas cepas donde mejor se desempeñan (0.18% y 0.20% agar), que podrían representar las mejores condiciones de “humedabilidad” que permiten el nado en estas cepas. ([Wang et al., 2005](#); [Chen, et al., 2007](#)). Otra posibilidad que podría explicar la expansión en el anillo de nado a bajas concentraciones de agar (0.18%) puede ser que, en las mutantes las propiedades mecánicas del filamento están comprometidas y se podría esperar que concentraciones bajas de agar representaran condiciones menos astringentes y más favorables para el nado. De acuerdo con esta idea, se ha reportado que las mutantes con sustituciones puntuales en HAP3_{St} (FlgL), son capaces de desplazarse en concentraciones de agar del 0.16% pero no en 0.28% ([Fahrner, et al., 1994](#)).

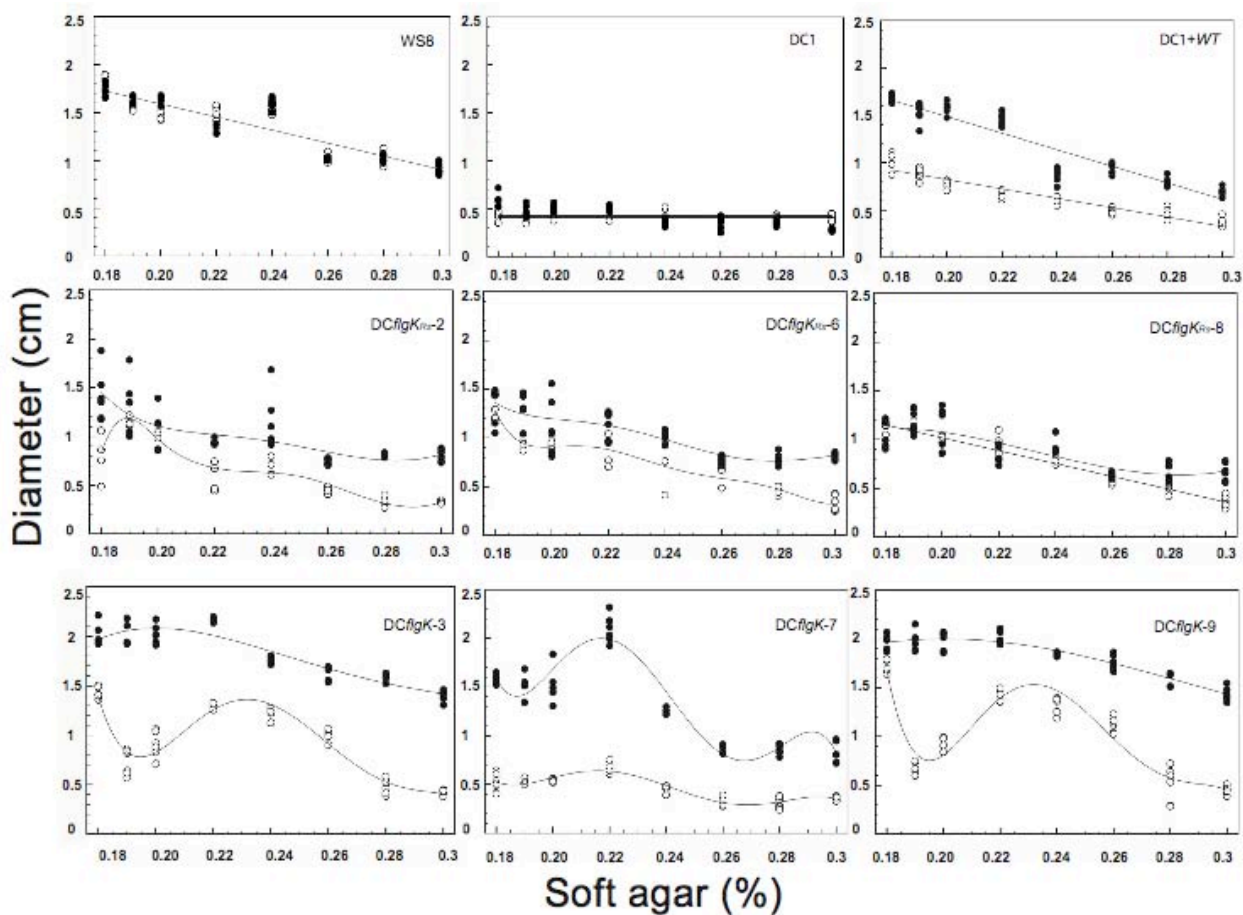


Fig 14.1-II

Desempeño del nado en superficies semisólidas de varias mutantes *DCflgK_{RS}* y controles, en placas de agar suave en presencia y ausencia de Ficoll 400 (1.25mg/ml). El diámetro de nado de cada mutante se registró en cada una de las condiciones probadas (n=6). Círculos abiertos: agar, círculos cerrados: agar + Ficoll 400, (ver materiales y métodos). El diámetro de nado para la WS8 decrece linealmente de 0.18 a 0.3% de agar ± Ficoll 400. WS8 tiene un diámetro promedio de 1.79 ± 0.049 cm para 0.18% y 0.9 ± 0.004 cm en agar 0.3%, cuando se adiciona Ficoll 400: 1.77 ± 0.026 cm y de 0.92 ± 0.02 cm, respectivamente. Para DC1 (agar suave), los diámetros promedios fueron: 0.42 ± 0.007 cm para 0.18% y 0.39 ± 0.008 en 0.3%, respectivamente; en presencia de Ficoll 400 los diámetros fueron: 0.58 ± 0.025 y 0.27 ± 0.0008 para 0.18% y 0.3%. Para la mutante DC1 + *flgK_{WT}* (agar suave), los diámetros fueron: 1.02 ± 0.044 cm en 0.18% y 0.37 ± 0.011 en 0.3%; al agregar Ficoll, los diámetros fueron de 1.67 ± 0.007 cm y 0.69 ± 0.01 cm, respectivamente. (Gráficas realizadas en Plot 0.997; Figura tomada de [Castillo et al., 2009](#)).

15.0 Discusión

15.1 Características generales de la región central de HAP1_{RS}

HAP1_{RS} muestra una importante similitud con los extremos N- y C-terminales de proteínas HAP1 de varias especies bacterianas, solo un número limitado de especies bacterianas poseen una proteína HAP1 tan grande. Algunas cepas de *R. sphaeroides* también muestran un alto grado de identidad con la proteína descrita en este trabajo: HAP1_{RS} 2.4.1 (99% identidad), HAP1_{RS} ATCC17029 (98% identidad), HAP1_{RS} ATCC17028 (71% identidad). También se encontró otras especies de α -proteobacterias que poseen proteínas HAP1 similares en longitud pero con un menor grado de similitud con HAP1_{RS} como son : *Roseovarius* sp. TM 1035 (41% identidad), *Loktanella vesfoldensis* SKA53 (32% identidad) y *Octadecabacter antarcticus* 307 (31% identidad).

Las mayores diferencias entre estas secuencias ocurren en la región central de HAP1_{RS}. Una búsqueda por medio de BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de la región central de HAP1_{RS} que incluye los residuos 640 a 880 (correspondiente a las secuencias removidas en las mutantes DCflgK_{RS}-5 y DCflgK_{RS}-6) muestra que estos segmentos son similares a regiones centrales variables de varias flagelinas: *Shewanella* sp. MR-4 (38% identidad), *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707 (35% identidad), *Verminephobacter eisenie* EF01-2 (34%), *R. sphaeroides* ATCC 17025 (34% identidad), *Marinobacter aquaeolei* VT8 (33% identidad), FliC-B *Shewanella benthica* KT99, (33% identidad), *Azoarcus* sp. BH72 (32% identidad), *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (32% identidad), *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* AAC00-1 (31% identidad) y *Marinobacter algicola* DG893 (30% identidad). Una característica interesante de FliC de *Acidovorax avenae* es que esta proteína se encuentra asociada a mecanismos de invasividad en algunas gramíneas de importancia económica, entre ellas el arroz, trigo, avena y algunos cítricos. (Takakura *et al.*, 2008). Debido a que la región central de HAP1_{RS} muestra una similitud significativa con flagelinas de múltiples especies de microorganismos, es posible que algunas características estructurales de la flagelina puedan estar compartidas con la región central de HAP1_{RS}.

15.2 Análisis estructural de HAP1_{RS}

La estructura tridimensional de la flagelina de *S. typhimurium* (PDB 1UCU) muestra cuatro dominios globulares característicos denominados: D0, D1, D2 (con subdominios D2a y D2b) y el dominio D3 (Mimori, Yamashita *et al.*, 1995). D0 forma el núcleo interior del filamento, D1 forma el núcleo exterior los dominios D2 y D3 se proyectan en forma de picaporte sobre la superficie del filamento (Samatey, Imada *et al.*, 2000; Samatey, Imada *et al.*, 2001). D3 es el dominio en donde la mayoría de las secuencias centrales se encuentran localizadas (Mimori-Kiyosue, Yamashita *et al.*, 1998). D0 y los extremos N- y C- terminales de D1 se encuentran altamente conservadas en varias especies bacterianas. Dichos extremos están involucrados en la exportación de las subunidades flagelares y durante el ensamblaje del filamento. (Aizawa, *et al.*, 1990; Mimori-Kiyosue, *et al.*, 1997; Yonekura, *et al.*, 2000; Yonekura, *et al.*, 2002; Gal, *et al.*, 2006). Estudios con las flagelinas de diferentes bacterias, sugieren que las secuencias centrales (D3), no son esenciales para el ensamblaje de la estructura del filamento (Kuwajima 1988; Scharf *et al.*, 2001); sin embargo la región central es importante para la motilidad, como el análisis de diferentes mutantes en la flagelina de *S. typhimurium* ha demostrado previamente: reducciones variables y diferentes diámetros de nado se observaron en distintas mutantes donde se removieron varios residuos hidrofóbicos de los dominios D2 y D3 (Malapaka, *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el segmento de 640aa a 880aa de la región central de HAP1_{RS} comparte con la región central de la flagelina (FliC_{St}) la propiedad de no ser esencial para el ensamblaje del filamento pero sí afecta su la motilidad.

15.3 Organización modular de HAP1_{RS}

Las peculiaridades estructurales de la región central de HAP1_{RS} no sólo se encuentran en su tamaño sino en su arreglo interno, la búsqueda de repeticiones internas en HAP1_{RS} se realizó utilizando SMART (Schultz, Milpetz *et al.*, 1998) (Simple Modular Architecture Research Tool <http://smart.embl-heidelberg.de/>). Con este algoritmo se detectó que una secuencia ubicada entre los residuos 1047 a 1109, es similar a una ubicada en el extremo N-terminal entre los residuos 959 a 1021. Utilizando estos motivos se realizó una búsqueda en BLAST y se encontró que otra región de HAP1_{RS} (residuos 203 a 264) también son similares a los segmentos descritos anteriormente. Esto podría sugerir que esta secuencia pudo haberse insertado repetitivamente o duplicado, dando origen el dominio interno del linaje de HAP1_{RS}.



Fig 15.3-I:

Esquema de la organización modular de HAP1_{RS}. El análisis de arquitectura de dominios a través de SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), pudo identificar en HAP1_{RS}, segmentos con motivos característicos de familias de proteínas (Pfam), repeticiones (RPT) y homologías no tan evidentes con otras proteínas axiales de flagelo: Los extremos N y C de la proteína (cajas grises), muestran una similitud con otras proteínas HAP's y componentes del eje: (4 a 34, valor e:1.2e-05 y 1324-1362, valor e: 4.08-15). La caja marrón (69 a 334) posee una estructura similar a el cristal de la proteína HAP1 de *Salmonella typhimurium* (valor e: 3.0 e-10). Las cajas grises pequeñas señalan un arreglo similar a las flagelinas: 511 a 564, (valor e: 1.10e-07), 693 a 740 (valor e: 1.50e-08) y 745 a 802 (valor e: 1.60e-08). Las cajas azules representan secuencias repetidas: 959 a 1021 (valor e:3.91e-07) y 1047 a 1109 (valor e: 3.91e-07).

15.4 Características estructurales y funcionales del dominio central de HAP1_{RS}.

Al introducir la construcción DC*flgK_{RS}*-1, en la cepa DC1 (Δ *flgK_{RS}*) el fenotipo encontrado es Fla⁻, incapaz de nadar. Este fenotipo puede explicarse ya que la construcción carece de los residuos 240-340, la cual genera un producto inestable propenso a la degradación. El uso de anticuerpos policlonales a-HAP1_{RS} falló en detectar la presencia del producto correspondiente expresado desde DC*flgK_{RS}*-1, en las fracciones probadas (e.g. extractos celulares totales y sobrenadante precipitados con metanol-cloroformo). Las velocidades de nado que se obtuvieron por rastreo de las células en las mutantes DC*flgK_{RS}* revelaron que algunas de las mutantes fueron capaces de nadar tan bien como el control, mientras que otras muestran velocidades de nado variables. En particular las cepas DC*flgK_{RS}*-2 y DC*flgK_{RS}*-7 son incapaces de nadar en medios líquidos. El resto de las mutantes muestran velocidades promedio de nado de entre 16.8 y 30.4 μ m/s así como trayectorias que varían en patrón y frecuencia de paro. Esta variabilidad en la respuesta podría reflejar la capacidad de cada mutante en controlar la tracción ejercida sobre la interfase gancho-filamento de *R. sphaeroides* generada por la rotación del motor. En trabajos anteriores con bacterias entéricas se ha identificado que mutaciones puntuales en HAP3_{St} (Arg168Cys) alteran la capacidad del filamento en controlar las transiciones mecánicas durante la rotación (Fahrner, et al., 1994). En el caso de HAP1_{RS}, la modulación de la transmisión de la torca podría estar coordinada por varios segmentos con propiedades mecánicas igualmente puntuales. De acuerdo con los resultados obtenidos, es posible que las características funcionales de HAP1_{RS} se distribuyen de manera modular a lo largo del estrecho estudiado. La habilidad de nadar en medios semisólidos (“swarming”) también se caracterizó en presencia de Ficoll 400. Este polisacárido fue seleccionado debido a que podría incrementar la estabilidad de HAP1_{RS}, ya que se ha reportado con anterioridad que puede incrementar la “agregación molecular”, que también tiene un efecto positivo en la estabilidad de algunas proteínas mutantes (Stagg, et al., 2007). Adicionalmente puede contribuir a estabilizar a HAP1_{RS} durante la rotación flagelar. Las mutantes que incrementaron su habilidad de nado en medio semisólido en presencia de Ficoll 400 son DC*flgK_{RS}*-3, DC*flgK_{RS}*-7 y DC*flgK_{RS}*-9. Es posible que en estos casos los segmentos 440 a 540, 840 a 940, y 1040 a 1140, pudieran tener un profundo efecto en la estabilidad de HAP1_{RS} durante la rotación flagelar, que podría ser compensado con la presencia del Ficoll 400. En contraparte, otras mutantes no se ven afectadas severamente en esta modalidad de nado (DC*flgK_{RS}*-5, 8 y 9). En este caso los segmentos 640 a 740, 940 a 1040 y 1040 a 1140 afectan el desempeño de HAP1_{RS} en menor grado.

15.5 Origen de la organización modular de HAP1_{Rs}.

La región de 640-880 aminoácidos podría representar un segmento e inserción de una posible flagelina de origen gama que pudo adquirirse por transferencia horizontal. Como se observa en la **Fig 15.5-I**, el modelamiento *in silico* (Robetta, <http://robetta.bakerlab.org/>) de HAP1_{Rs}, muestra que dicha región mantiene una organización estructural muy similar a los dominios D1, D2 y D3 más expuestos y variables de la flagelina de *S. typhimurium*, constituidos principalmente por aminoácidos hidrofóbicos (ver **Fig15.5-I**), cuyo papel aparentemente, está relacionado con la capacidad de moverse en medios más densos (Malapaka *et al.*, 2007).

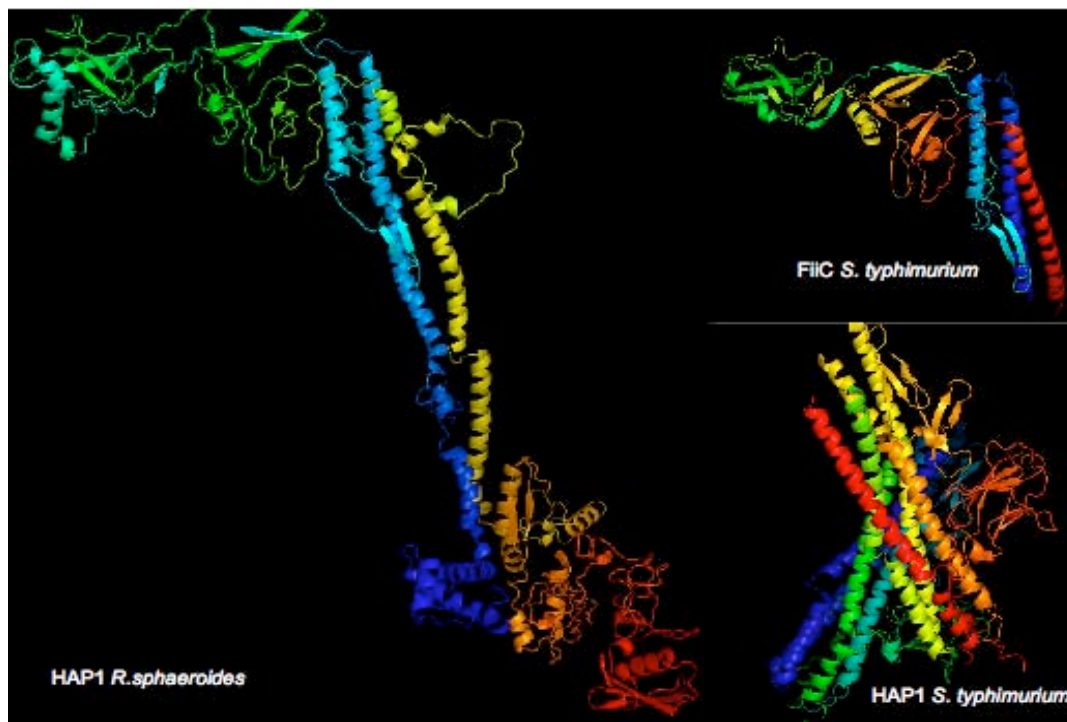
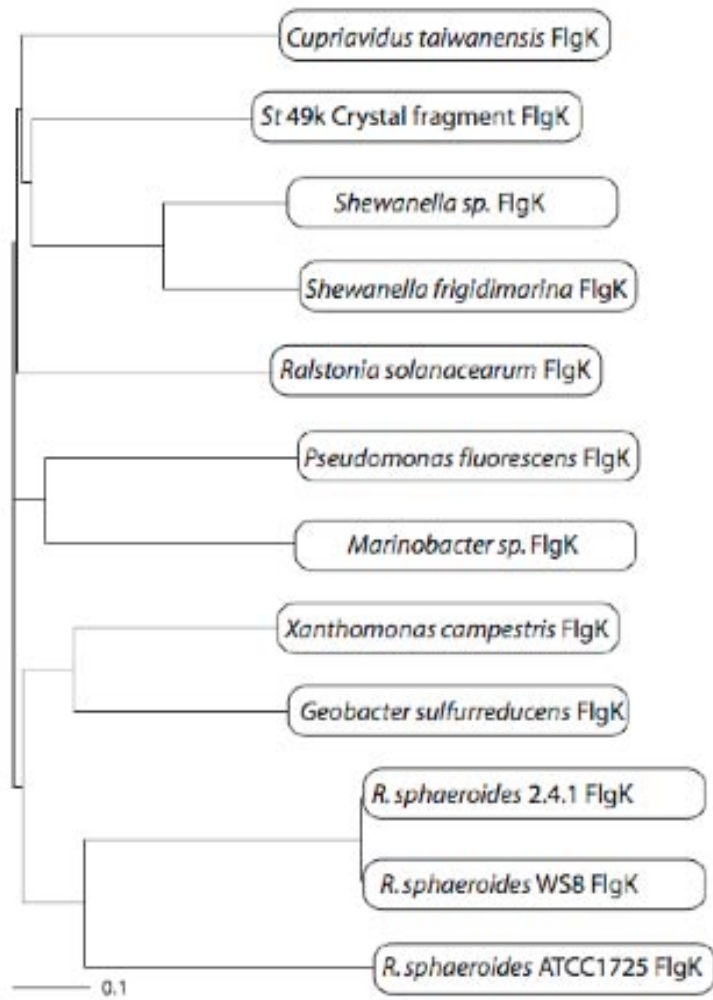


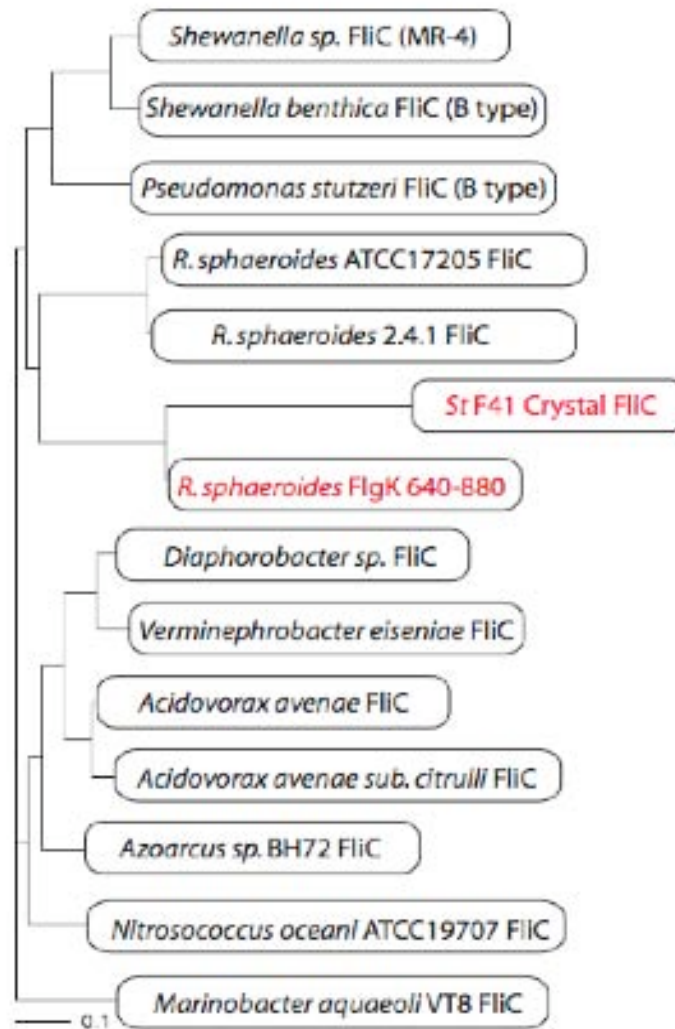
Fig15.5-I:

Modelo de HAP1_{Rs} construido mediante Robetta, <http://robetta.bakerlab.org/>. El modelo de la posible estructura cristalográfica de ésta proteína tiene una estructura muy similar con el cristal de FliC *St*. Los segmentos que se identificaron en HAP1_{Rs} mediante el análisis de arquitectura de dominios, siguen que la organización estructural de los segmentos centrales de HAP1_{Rs}, pueden tener un plegamiento similar al encontrado en los dominios D1, D2 y D3 de la flagelina de *Salmonella typhimurium*.

En el linaje de las Roseobacterias existen por lo menos cuatro géneros donde se han reportado secuencias de HAP1 con un tamaño y organización similar: *Roseobacter sp.*, *Loktanella vestfoldensis*, *Octadecobacter antarcticus* y por supuesto *Rhodobacter sphaeroides*. Los habitats de estos géneros también se encuentra estrechamente asociados a ambientes marinos y/o acuáticos salinos, lo que hace probable que la historia biogeográfica de estas especies se encuentre ligada a condiciones cambiantes tanto en la disponibilidad de nutrientes como en las condiciones que deben sortear para encontrarlos. Por lo tanto, es posible que compartan múltiples rasgos funcionales en sus mecanismos de motilidad, ya que hay muchas bacterias marinas como *Silicibacter sp.*, que poseen genes flagelares estructurales con una organización muy similar a *R.sphaeroides* (R. Belas, comunicación personal). Recientemente se ha demostrado que *R.sphaeroides* posee un a copia funcional de genes flagelares, que bajo ciertas condiciones son capaces de expresarse. El origen de este juego de genes proviene del grupo de las α -proteobacterias a diferencia del juego flagelar que usualmente se expresa sin dificultad en condiciones estándar de laboratorio, cuyo origen es de γ -proteobacterias (Poggio *et al.*, 2007). La posible inserción encontrada en la secuencia de *flgKRs* abre la posibilidad de que el genoma de estos microorganismos es mucho más dinámico y posiblemente se han expuesto a intercambio genético con mucha más frecuencia y han incorporado con relativa facilidad múltiples genes. La posible inserción de una flagelina en *flgKRs*, sugeriría la posibilidad en encontrar otros eventos de integración de proteínas estructurales en otros genes de *R. sphaeroides*. Como se observa en la **Fig. 15.5-II**, el análisis filogenético (distancia) de la secuencia interna de 640-880aa, agrupa a este segmento con otras flagelinas de *S. typhimurium* (γ -proteobacteria). Sin embargo a nivel de la secuencia primaria de HAP1_{Rs}, ha sido difícil identificar las posibles secuencias de inserción que evidenciarían los mecanismos de integración de DNA externo dentro de genes de *Rhodobacter sphaeroides*.



A



B

Fig. 15.5-II

Análisis filogenético de distancia. Se realizó un alineamiento múltiple mediante CLUSTAL-W, entre HAP1_{RS}, el segmento 640-880aa de HAP1_{RS} y varias secuencias de otras HAP-1 y flagelinas de diferentes especies. La matriz del alineamiento se utilizó para realizar un análisis filogenético de distancia mediante PHYLIP 3.68v (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). La matriz de distancia y los dendrogramas se visualizó y editó en TreeViewX (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>). En el panel A se muestra el dendrograma de distancia entre HAP1_{RS} (*R. sphaeroides* WS8 FlgK) y otras proteínas HAP1, donde se agrupa entre otras *Rhodobacters*. En el panel B el segmento de 640-880aa de HAP1_{RS}, se agrupa la secuencia del cristal F41 de la flagelina de *S. typhimurium*.

15.6 Proteínas axiales y su posible evolución

Aparentemente las proteínas del gancho (FlgE) y las cuatro proteínas del eje (FlgB,C,F y G) son duplicaciones de una proteína axial ancestral. (Pallen *et al.*, 2005; Liu y Ochman, 2007), algunas de las características que correlacionan la estructura y función se han descrito en trabajos anteriores (Homma *et al.*, 1990; Homma *et al.*, 1990; Samatey *et al.*, 2000, 2001, 2004).

Si bien la filogenia se espera que correlacione bien entre la similitud de secuencia, en este punto es algo debatible ya que los componentes axiales adyacentes poseen una relativa similitud en su función estructural y secuencia. Es posible que las proteínas adaptadoras como FlgG, (entre el eje y el gancho) FlgK, y L (entre el gancho y el filamento), se originaron posteriormente a la duplicación o diferenciación de componentes mayores como el gancho y filamento, debido a que a partir de que tales proteínas comenzaron a especializarse en funciones particulares, el desacoplamiento entre las subunidades sería algo problemático que limitaría la diversificación de funciones.

Sin embargo la duplicación y modificación de un ancestro de origen a partir del gancho y flagelina podría haber desencadenado la generación de otras proteínas adaptadores que permitiera la conexión y diversificación de los diferentes segmentos. Este mecanismo de ultra especialización o “subfuncionalidad” proteica (Lynch *et al.*, 2001) podría explicar la diversificación de otras proteínas axiales, como el gancho, las proteínas asociadas al gancho (HAP’s) y otras proteínas requeridas durante la biogénesis flagelar como FlgD (chaperona del gancho), HAP2 (proteína de coronación y chaperona axial de las flagelinas). Del mismo modo ocurre con el número de proteínas que existen en el eje (FlgB, C y F), pero quizás tengan alguna relación con puntos de control durante el ensamblaje, entre ellos el de acoplar a los anillos L y P. Así mismo tampoco se conoce con claridad como se determinó el tamaño de cada una de los segmentos funcionales (e.g. gancho y filamento), y por que hay tan pocas subunidades de proteínas adaptadoras HAP1 y HAP3 (aproximadamente 12 monómeros por vuelta) en comparación a las estructuras mayores como el gancho y filamento, éste último compuesto de 30 a 60, 000 subunidades. Todos estos componentes se encuentran altamente conservados en muchos linajes bacterianos, posiblemente debido a la dependencia de sus interacciones. En sistemas homólogos, como en los sistemas de virulencia, que utilizan el sistema de exportación tipo III, no existen proteínas homólogas al eje, (Blocker *et al.*, 2003); a pesar de ello el Pili, comparte similitud con otras proteínas axiales (Aizawa, 2001; Blocker *et al.*, 2003; Cordes *et al.*, 2003), por lo tanto el ensamblaje de los anillos L y P podría ser una innovación reciente. Otras proteínas axiales como FliE, que funciona como un adaptador entre los componentes basales de el eje (FlgB) y FliF (del anillo M-S), probablemente aparecieron recientemente, quizás a partir de la adquisición de la motilidad, favoreciendo la interacción entre simetrías diferentes entre FliF y el eje. FliE (11kDa) se exporta a través del sistema de secreción tipo III y no por la vía Sec, lo que podría sugerir que el ancestro de FliE era parte de un “proto-eje”.

La proteína de coronación del gancho (FlgD) probablemente se originó como un duplicado de una proteína de coronación del eje (FlgJ) de la misma forma como se generó la divergencia entre las HAP's; sin embargo en la jerarquía de ensamblaje FlgD está mucho más distante a la secreción que FlgJ. En bacterias entéricas FlgJ posee un dominio de muramidasa en el extremo C-terminal además del dominio de interacción con proteínas distales del eje, ubicado en su extremo N-terminal. Este dominio de muramidasa posee homología con otras muramidosas y probablemente se adicionó para dar velocidad al ensamblaje del flagelo. Posiblemente sea una incorporación reciente, debido a que la actividad de muramidasa no es absolutamente necesaria para el ensamblaje del flagelo, debido a que la estructura naciente del eje puede por probabilidad encontrar un hueco adecuado en la capa de peptidoglicanos (Hirano *et al.*, 2001). Recientemente se ha identificado que algunas bacterias no poseen el dominio de muramidasa incorporado a FlgJ. Como es el caso de las Gram-positivas (Hirano *et al.*, 2001) y en *Rhodobacter sphaeroides* (de la Mora *et al.*, 2007).

15.7 Propiedades hidrodinámicas de las HAP's : ¿moduladores del estrés mecánico?

Existen muy pocas aproximaciones hidromecánicas que puedan caracterizar la función del flagelo y particularmente de HAP1 así como de HAP3, de forma dinámica. Las HAP's tienen múltiples funciones en diferentes estadios de la biogénesis flagelar. La primera de ellas y la más evidente es la de generar una conexión entre diferentes tipos de proteínas axiales (gancho y filamento). Otra función, es la de transmitir la torca (o fuerza de arrastre) hacia el extremo distal del filamento, y de modular el estrés mecánico generado por los cambios en la dirección de rotación (sea la inversión del sentido de rotación como en los modelos de *S. typhimurium* o en el freno de *R. sphaeroides*) o en las transiciones morfológicas del filamento. En las diversas especies donde se ha caracterizado el flagelo, se pueden encontrar divergencias en los mecanismos de desplazamiento. El papel que debe jugar las HAPs puede ser el de funcionar como un soporte mecánico para la transición conformacional de las subunidades de flagelina que se ensamblan en su extremo distal.

15.8 Función de las HAP's en el desempeño mecánico del filamento

En mutantes de *flgL* (*S. typhimurim*) que codifica para HAP3 donde hay una sustitución puntual de una cisteína por una arginina en la posición 168, afecta la movilidad, debido a que el filamento sufre de transformaciones dramáticas en el arreglo de sus subunidades. Estos cambios son inducidos por la torsión generada por la rotación del filamento (Fahrner *et al.*, 1994). Esto implica que una de las funciones de las HAP's es la de mantener estable la forma de la estructura del filamento bajo una carga de torsión que posiblemente dependa en parte de las proteínas a la que el filamento está anclado en su base.

Bajo diferentes condiciones de salinidad, pH, temperatura, solventes y cargas eléctricas, entre otras, el filamento sufre cambios en su estructura cuaternaria (Shah *et al.*, 2000; Scharf 2002). Los protofilamentos de una cierta forma tienen una torsión característica, (el ángulo en relación al eje helicoidal), una torsión negativa genera un filamento siniestro (transición L) mientras que la orientación contraria genera un filamento diestro (transición R) (Namba y Vondervitz 1989, Samatey *et al.*, 2001). La predicción a partir de este modelo, es que aplicando una torsión en un sentido positivo (R) o negativo (L) el filamento debe adquirir una conformación o quiralidad en el sentido de la aplicación de la fuerza. Ya que el filamento debe someterse a un intenso movimiento, los cambios conformacionales que experimenta no deben de ser los suficientemente dramáticos como para perder su arreglo hidrodinámico o romper la estructura. La función de las HAP's no sólo sería crítica durante el ensamblaje del filamento sino también para proveer una base rígida al filamento, permitiendo una cierta movilidad de las subunidades del gancho; esto implicaría una deformación elástica a nivel de estas proteínas (Fahrner *et al.*, 1994). El eje y el gancho parecen ser capaces de mantener una unión sin la asistencia de otras proteínas. Sin embargo parece que este principio no se puede aplicar entre las proteínas del gancho y el filamento. La razón de esta diferencia no es clara, considerando que la unión del eje y el gancho debe de soportar una torsión y carga lateral en apariencia mayor que la unión entre el gancho y el filamento. (Onhishi *et al.*, 1994). A partir de los antecedentes de la biogénesis flagelar, FlgD es una proteína de coronación que se encuentra en el extremo distal del gancho en formación y su papel es análogo al de FliD (HAP2), durante la fase de elongación del filamento. Aparentemente la sustitución de FlgD por HAP1 (FlgK) y HAP3 (FlgL) se debe a que la función de las HAP's es incompatible con la realizada por FlgD.

15.9 Dinámica de las transiciones polimórficas del filamento

A la clasificación que existe de patrones de flagelación en bacterias: monotricos (un solo flagelo), peritricos (múltiples flagelos en toda la superficie celular), lofotricos (varios flagelos en un polo celular), anfitricos (múltiples flagelos en ambos polos); hay que agregar la que Leifson en 1960, desarrolló como una clasificación morfológica para setenta distintos tipos de filamentos flagelares caracterizados hasta entonces, que se pueden agrupar en siete tipos: “normal”, “curvo”, “enrollado”, “semi enrollado”, de “corta amplitud”, “recto” y “ondulante”. A pesar que conocía que el flagelo es un filamento helicoidal, no poseía los medios para identificar su amplitud y longitud de onda. En los 70's Shimada *et al.* pudieron determinar, empleando microscopía de campo oscuro, que en realidad la forma helicoidal de los filamentos “normales” tiene una orientación izquierda (L) y los filamentos curvos una derecha (R). Hotani en 1982 observó que los filamentos con una orientación helicoidal izquierda (L) pueden alternar con dos estados de orientación derecha : semi enrollados o rizados. Cuando los filamentos de *S. typhimurium* eran fijados por un extremo en un portaobjetos y eran sometidos a un flujo constante con una velocidad de 1mm/s (aproximadamente una longitud de onda por segundo) con una solución de metilcelulosa, los flagelos mostraban transformaciones quirales periódicas a lo largo del filamento. El filamento con una helicidad hacia la izquierda desarrollaba un dominio en su extremo distal que se orientaba hacia la derecha. Una vez que una fracción significativa de la hélice se encuentra en un estado, el extremo distal retornaba a su orientación izquierda mientras que el dominio en orientación derecha se desplazaba hacia el

extremo basal desapareciendo una vez alcanzado su extremo. Estos experimentos clásicos sobre la torsión del filamento demostraron que en el flagelo de *Salmonella typhimurium* las transiciones de flagelina en estado “L” o en estado “R” (Vonderviszt *et al.*, 2001, Samatey *et al.*, 2001) las precede un cambio en la dirección de la rotación y una carga torsional que es transmitida a lo largo del filamento de forma periódica (Coombs *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005). Otras evidencias más recientes han logrado determinar que las transiciones observadas por Hotani poseen una secuencia más compleja y podrían ser características de cada especie, o del tipo de flagelina con la que se ensamble:

Las dos formas helicoidales son inter-convertibles manipulando diferentes condiciones ambientales como cargas eléctricas, pH, salinidad, etc. (Armitage y Macnab 1987; Armitage *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 2000, Scharf 2002). Las transiciones polimórficas se pueden determinar observando la periodicidad de su onda, la amplitud y la dirección que la hélice adquiere (Kudo *et al.*, 1990). A partir de estos parámetros se generaron dos modelos que predicen algunos de los comportamientos hidrodinámicos de los filamentos flagelares: el modelo de Asakura (1970) y el modelo de Calladine (1975). Ambos modelos consideran la “torsión” (τ , no se confundan con torca) y curvatura (κ) de un “tubo” con 11 protofilamentos para predecir el comportamiento del flagelo. A partir de estos parámetros y con la comparación de las flagelinas bacterianas se ha planteado una reclasificación funcional (Fujii *et al.*, 2008): los flagelos peritricos de *E. coli*, *Erwinia carotovora*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, y *Enterococcus faecalis* pertenecen a la familia “I” con transiciones de “normal” > “enrollado” > “curvo”.

En *Idiomarina loihiensis*, *Pseudomonas aeuriginosa*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas axopodis*, *Vibrio parahemolyticus* (polares), *Bradyrhizobium japonicum* (polares) y *Azospirillum brasilense* (polares), se clasifican en la familia “II” con transiciones : “semi normal” > “enrollado” > “semienrollado” > “curvo”.

Vibrio parahemolyticus (laterales), *Bradyrhizobium japonicum* (laterales) y *Azospirillum brasilense* (laterales) se clasifican en la familia “III” con transiciones “normal”/ “seminormal” > “curvo”.

Sinorhizobium meliloti, *Rhodobacter sphaeroides*, *Caulobacter crescentus* son una excepción debido a que presentan variaciones particulares. *S. meliloti* tiene un amplio repertorio: “normal” > “semi normal” > “semi enrollado” > “enrollado” > “curvo”; mientras que *R. sphaeroides*: “enrollado” > “L-curvo” o con curvatura izquierda > y “curvo”, mientras que *Caulobacter* solo posee un conformación “curva”.

El análisis de las secuencias de las flagelinas de estas bacterias no señala nada concluyente respecto a la composición de los aminoácidos que podrían estar involucrados en determinar las transiciones del filamento; sin embargo es evidente que a reserva de algunas excepciones, las familias (I, II y III) se agrupan en divisiones taxonómicas I: γ -proteobacterias; II: γ -proteobacterias y α -proteobacterias; III: α -proteobacterias. Así mismo las flagelinas de la familia III, conservan poca similitud con las familias I y II, sobretudo en sus segmentos terminales. Esto podría implicar que el origen de los ge-

nes flagelares, a pesar de ser monofilético, posee “firmas” estructurales y funcionales características de cada división. En la caracterización filogenética de los flagelos bacterianos de *R. sphaeroides* (Poggio *et al.*, 2007), el origen de las copias flagelares es de α y γ -proteobacterias. Esta confluencia en el uso de diferentes tipos de sistemas flagelares no es mera coincidencia ya que existen varios linajes bacteriales que emplean sistemas flagelares alternativos (McCarter, 2004). La pregunta que surge de estas evidencias es : ¿Qué mecanismos existen para la integración y regulación de estos flagelos?, ¿Existe algún nivel de compatibilidad genética y fisiológica para el uso de un sistema flagelar u otro?. Posiblemente HAP1_{RS} sea un ejemplo de esas “firmas” peculiares de la familia III en esta nueva clasificación que se propone.

Estudios recientes han revelado los detalles estructurales subyacentes en las estructuras cristalinas de la flagelina y el gancho; dependiendo de su helicidad (Samatey *et al.*, 2001, 2004), la fuerza de torsión o torque (momento de torsión o par motor) distribuida o localizada puede generar un cambio conformacional en el filamento. Durante el nado los motores flagelares de algunas bacterias como en el caso de *S. typhimurium* cambian de dirección episódicamente, la fuerza resultante del motor, puede inducir transformaciones entre estos estados. De la misma forma un flagelo en movimiento sometido a una corriente puede sufrir esos cambios (Hotani 1982, Wolgemuth *et al.*, 2000; Goldstein *et al.*, 2000). Simulaciones computacionales de dinámicas moleculares, empleando los modelos atómicos del gancho y el filamento, sugieren que las transiciones conformacionales que se observan en el filamento a partir de un estado relajado (con simetría “L”), hacia un estado super helicoidal (“R”) y viceversa, dependen de la aplicación del torque en el dominio D0 y D1. Dichas transiciones muestran histéresis mecánica, lo que sugiere que las transiciones deben ocurrir en dos pasos: El primer paso involucra la torsión del filamento manteniendo parcialmente la curvatura de su estado inicial, manteniendo un número constante de interacciones torsionales entre las subunidades, como una respuesta geométrica a la fuerza, lo que permite saturar a la región de transición de un momento inercial que se relaja lentamente en un estado meta estable (régimen plástico) que modifica la dirección de la torsión al sentido opuesto (Kitao *et al.*, 2006).

Para comprender algunos de los procesos fundamentales subyacentes al fenómeno de torsión, deben considerarse numerosas variables y restricciones para el diseño de un modelo físico, entre estas el desempeño de la elasticidad del material del filamento en un fluido, la viscosidad (η), y la frecuencia de rotación en uno de sus extremos (ω_0), (Ver Fig 15.9-I).

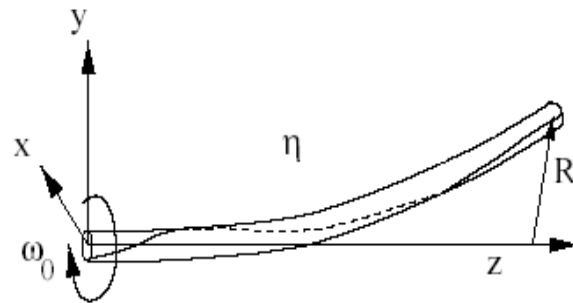


Fig 15.9-I

Un filamento elástico rota sobre su propio eje (z) que se encuentra rodeado por un fluido con una viscosidad η (Tomado de [Wogelmuth et al., 2000](#))

Este modelo relativamente sencillo pretende estudiar tres procesos: la inyección de la torsión en el extremo en rotación, la difusión de la torsión y retorcimiento. Métodos analíticos y numéricos revelan dos dinámicas de movimiento: el retorcimiento, en el cual un eje recto pero torcido rota sobre si mismo, y el otro modelo de remolino, en el cual en el eje se comporta como un diferencial sobre su mismo eje de rotación de forma estacionaria, (Ver **Fig 15.9-II:**)

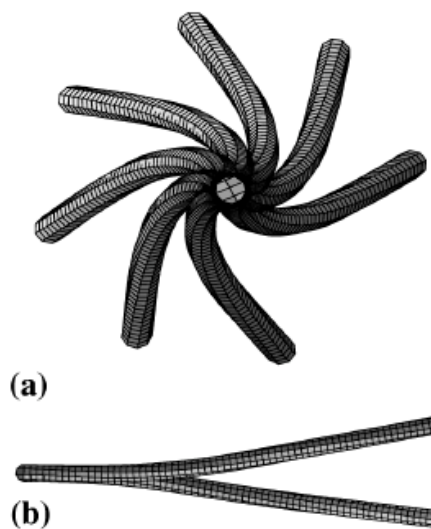
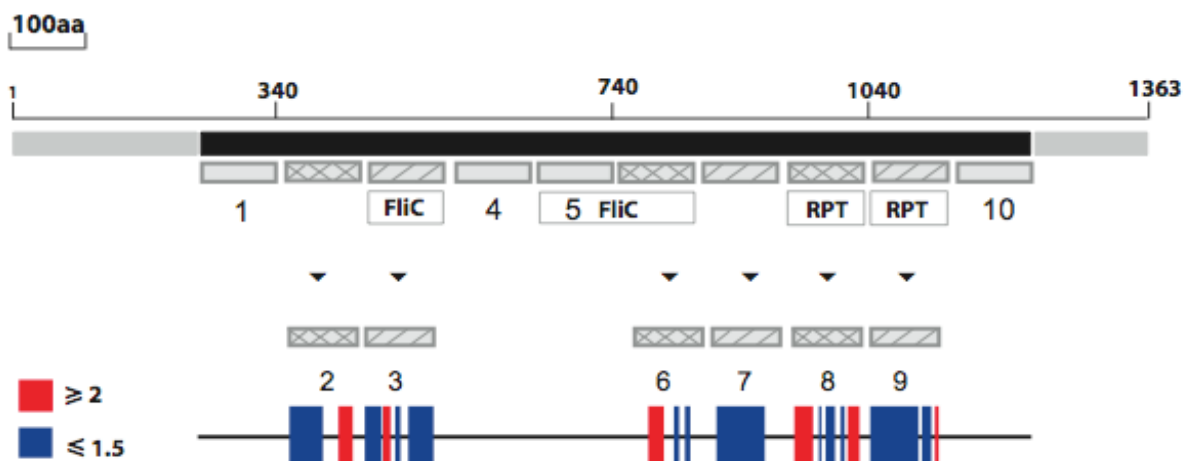


Fig 15.9-II

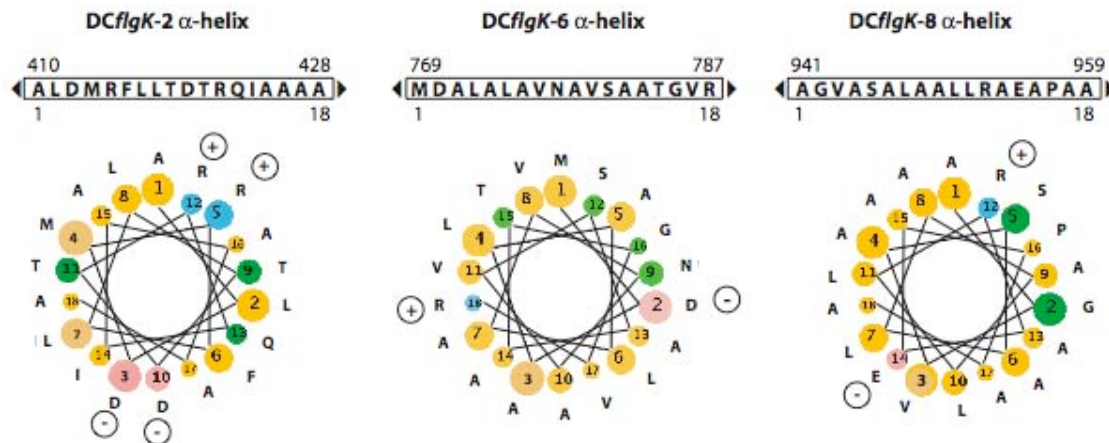
Representación del modelo de “remolino” en el inciso (a) se tiene una perspectiva del filamento desde su eje, en determinados estados de su de desplazamiento. En el inciso (b) se tiene una perspectiva lateral en dos fases de su movimiento.

Para ejemplificar claramente este fenómeno imaginemos una cuerda que está sujeta en un extremo a un motor. Cuando el motor se activa, la dirección de rotación de la cuerda es la misma que la dirección de rotación del motor. A lo largo de la cuerda se genera una fuerza de torsión que modifica el sentido del tejido de la cuerda, generando una curvatura con una helicidad determinada a lo largo de la cuerda (el ángulo generado a partir de una línea imaginaria perpendicular al motor) y con una longitud de onda particular.

Cuando el motor cambia de dirección, la fuerza de torsión cambia el sentido de su vector, es decir, la magnitud puede ser equivalente pero modifica su dirección, cuando esta fuerza de torsión es transmitida a lo largo de la cuerda, la curvatura generada cambia de dirección, de modo de la fuerza de torque transmitida inicialmente en una dirección, se opone a la generada en la nueva orientación, (Ver **Fig 15.9-II**). Considerando estas variables cabe hacerse algunas preguntas: ¿Qué fuerzas son necesarias para lograr esas transiciones y donde se localizan en HAP1_{RS}?, ¿Las diferencias estructurales en la organización del flagelo procarionte en diferentes especies (Fujii *et al.*, 2008), determinan su desempeño hidrodinámico?, ¿Qué papel juegan los diferentes módulos de HAP1_{RS} en el mantenimiento de la estructura del filamento bajo diferentes condiciones de estrés mecánico?. Aparentemente los residuos hidrofóbicos ubicados en los segmentos 440 a 540, 840 a 940, y 1040 a 1140 de HAP1_{RS}, podrían estar relacionados en contender con fuerzas torcionales que permitan modular la carga que se transmite desde el motor, ya que las remociones correspondientes a los segmentos poseen un arreglo anfipático intercalado entre regiones hidrofóbicas/hidrofílicas. (**Fig 15.9-III**) Sin embargo aun no se posee información estructural que permita correlacionar si el arreglo espacial de estos segmentos tengan una participación en la compresibilidad o elasticidad de las subunidades de la interfase.



A



B

Fig 15.9-III

Perfil de hidropatía del segmento central de HAP1Rs.

Se realizó un análisis de la hidropatía del segmento central de HAP1Rs., empleando los parámetros de Kyte y Doolittle (1982), En el panel A se muestran los segmentos analizados de 100 en 100 aminoácidos y su correspondencia con la arquitectura de dominio encontrada para cada segmento: FliC (flagelina), RPT (repeticiones). Los segmentos con una hidropatía promedio mayor o igual a 2 (hidrofóbicos) se marcaron en rojo y los segmentos con una hidropatía promedio menor o igual a 1.5 (hidrofílicos) se marcaron con azul. El análisis de hidropatía se realizó por medio de ExPasy (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>). En el panel B se muestra una proyección de hélices hidrofóbicas que se identificaron en los segmentos 410-428, 769-787 y 941-959. Estas hélices hidrofóbicas quizás están involucradas en apuntalar con mayor rigidez a la estructura cuaternaria de la interfase de HAP1Rs.

La secuencia en las transiciones polimórficas observadas *in vivo*: normal-semi enrollados-rizados-normal (Turner *et al.*, 2000) para flagelos de *E. coli* marcados con fluoróforos, es típica de un solo flagelo durante un ciclo de rotación, paro y reorientación. Considerando el modelo propuesto por Wogelmuth *et al.*, 2000, faltaría incorporar al modelo las transiciones torsionales del filamento. Cabe señalar que estos dos modelos consideran que el filamento debe estar sujetado a una base o ángulo w_0 a partir de donde la fuerza de arrastre o torque es transmitida hacia el resto del filamento (Coombs *et al.*, 2002). Este ángulo de anclaje podría ser la interfase de las HAP's. Un modelo más refinado podría considerar que existen cambios en la configuración de dicha interfase, de la misma forma como los que ocurren a nivel de la flagelina en el filamento. Sin embargo es posible que el reducido número de copias de HAP's que se han encontrado en la interfase y algunas de sus características físico químicas, no le permita exhibir una mayor elasticidad; por lo que es posible que la fuerza requerida para la manifestación de las transiciones mecánicas del filamento sería amortiguada desde su base por una estructura más rígida o con transiciones más discretas.

La estructura cristalina de HAP1 en *S. typhimurium* revela que esta proteína posee un plegamiento dominado por α -hélices, lo que la hace en esencia una proteína más rígida (K. Imada, comunicación personal). La reconstrucción por criomicroscopía, revela que la transición gancho-filamento en *S. typhimurium* forma un “embudo” que permite la transición entre un gancho curvo a un filamento “recto” (F. Makino, comunicación personal). El gancho de *Salmonella* posee un plegamiento principalmente conformado de hojas- β y el arreglo de sus subunidades que lo hacen curvo y con mayor flexibilidad y capacidad torsional (Samatey *et al.*, 2004; K. Namba, comunicación personal). En el caso de *R. sphaeroides* las transiciones conformacionales del filamento podrían estar moduladas por algunos segmentos de HAP1_{RS}, que “amortiguaran” el régimen elástico entre estados de torsión/relajación durante la transmisión de la torsión al filamento, modulando los estados tensionales que probablemente ocurren de manera diferente en el gancho y el filamento respectivamente ya que manifiestan un polimorfismo enrollado en los estados de paro y helicoidal en el nado (Armitage y Macnab 1987; Armitage *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 2000). La eliminación de un segmento de 12 prolinas en el extremo N terminal de la proteína del gancho (FlgE) de *R. sphaeroides* genera ganchos curvos y con un patrón de nado anormal y zigzagueante (T. Ballado *et al.*, 2001), muy similar al encontrado en muchas mutantes de HAP1_{RS} del presente trabajo. Las prolinas se han asociado a la rigidez de algunas proteínas (Tian *et al.*, 1998), lo que podría implicar que muchos de los aminoácidos de los segmentos de HAP1_{RS} que fueron removidos, compartan características de rigidez/flexibilidad.

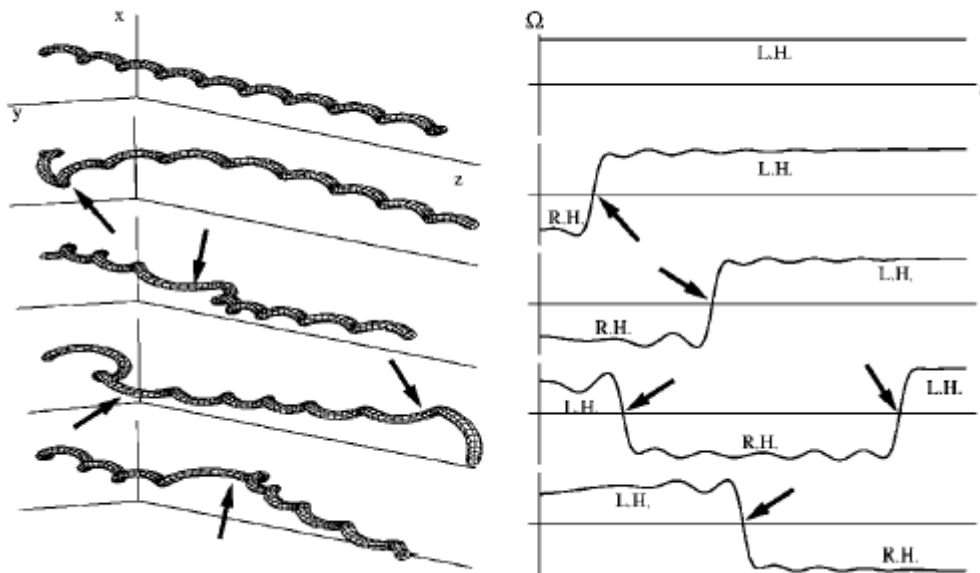


Fig 15.9-IV:

Gráfico que muestra los cambios en la configuración del flagelo durante las transiciones polimórficas, sometidas a un flujo equivalente a su velocidad crítica. ($U = 10\text{mm/s}$) correspondientes a una tasa de torsión (Ω) Tiempos de la corrida de arriba hacia abajo (t_{0s} , $t_{1.7s}$), las flechas indican el sitio donde ocurre la transición de los filamentos a lo largo de su eje. Tomado de [Coombs et al., 2002](#).

La región central de $HAP1_{RS}$ de 860 aa, posee un arreglo modular compuesto por un bloque similar a otras proteínas axiales, dos segmentos similares a varias flagelinas y dos secuencias con repeticiones. A excepción del segmento de 240-340aa el resto de los segmentos en la región variable de $HAP1_{RS}$ no son importantes para la exportación y el ensamblaje. La participación de los segmentos centrales de $HAP1_{RS}$ removidos en las mutantes *DCflgK-4*, 5, 6 y 8 es importante para el desempeño del nado en medios líquidos, ya que modifica su patrón y velocidad de desplazamiento. En el presente trabajo no fue posible determinar el patrón helicoidal ni la secuencia de transiciones polimórficas de los filamentos funcionales, pero es posible que las velocidades registradas revelen que las transiciones polimórficas habituales que se han observado para los filamentos flagelares de *R. sphaeroides* ([Armitage y Macnab 1987](#)), se encuentren alteradas e incidan en la velocidad de nado promedio. Es posible que en cada episodio de arranque, aceleración y paro de las trayectorias de nado observadas, existan diferencias en la duración y magnitud en comparación a la cepa silvestre, sin embargo estas observaciones son materia de análisis posterior. El segmento de 640 a 880aa de $HAP1_{RS}$ posee una similitud con otras flagelinas, en particular a los dominios D1 y D2 que contienen regiones hidrofóbicas (hojas- β) mas flexibles.

La participación de este “módulo de flagelina” es importante para modular el desempeño del nado en superficies semisólidas y responden de manera diferencial a concentraciones crecientes y/o adicionadas con espesantes de alto peso molecular (Ficoll 400, 0.025mg/ml), lo que puede sugerir que las características modulares de HAP1 se encuentran asociadas a controlar diferentes etapas de la deformación mecánica (histéresis) que se propone ocurre durante la torsión del flagelo bacteriano (Kitao *et al.*, 2006). Al tener *R. sphaeroides* un flagelo recto, la incorporación de una interfase mas flexible entre dos estructuras rígidas, probablemente permita controlar mejor la transmisión de la torca hacia el eje de rotación del filamento y es probable que los segmentos removidos en las mutantes DC*flgK*-3, 7 y 9 tengan una participación importante en la estabilidad del filamento durante la rotación.

16.0 Conclusiones

La región central de HAP1_{RS} de 860 aa, posee un arreglo modular compuesto por un bloque similar a otras proteínas axiales, dos segmentos similares a varias flagelinas y dos secuencias con repeticiones. A excepción del segmento de 240-340aa el resto de los segmentos en la región variable de HAP1_{RS} no son importantes para la exportación y el ensamblaje. La participación de los segmentos centrales de HAP1_{RS} removidos en las mutantes DC*flgK*-4, 5, 6 y 8 es importante para el desempeño del nado en medios líquidos, ya que modifica su patrón y velocidad de desplazamiento. En el presente trabajo no fue posible determinar el patrón helicoidal ni la secuencia de transiciones polimórficas de los filamentos funcionales, pero es posible que las velocidades registradas revelen que las transiciones polimórficas habituales que se han observado para los filamentos flagelares de *R. sphaeroides* (Armitage y Macnab 1987), se encuentren alteradas e incidan en la velocidad de nado promedio. Es posible que en cada episodio de arranque, aceleración y paro de las trayectorias de nado observadas, existan diferencias en la duración y magnitud en comparación a la cepa silvestre, sin embargo estas observaciones son materia de análisis posterior. El segmento de 640 a 880aa de HAP1_{RS} posee una similitud con otras flagelinas, en particular a los dominios D1 y D2 que contienen regiones hidrofóbicas (hojas-β) mas flexibles. La participación de este “módulo de flagelina” es importante para modular el desempeño del nado en superficies semisólidas y responden de manera diferencial a concentraciones crecientes y/o adicionadas con espesantes de alto peso molecular (Ficoll 400, 0.025mg/ml), lo que puede sugerir que las características modulares de HAP1 se encuentran asociadas a controlar diferentes etapas de la deformación mecánica (histéresis) que se propone ocurre durante la torsión del flagelo bacteriano (Kitao *et al.*, 2006). Al tener *R. sphaeroides* un flagelo recto, la incorporación de una interfase mas flexible entre dos estructuras rígidas, probablemente permita controlar mejor la transmisión de la torca hacia el eje de rotación del filamento y es probable que los segmentos removidos en las mutantes DC*flgK*-3, 7 y 9 tengan una participación importante en la estabilidad del filamento durante la rotación.

La participación de este “módulo de flagelina” es importante para modular el desempeño del nado en superficies semisólidas y responden de manera diferencial a concentraciones crecientes y/o adicionadas con espesantes de alto peso molecular (Ficoll 400, 0.025mg/ml), lo que puede sugerir que las características modulares de HAP1 se encuentran asociadas a controlar diferentes etapas de la deformación mecánica (histéresis) que se propone ocurre durante la torsión del flagelo bacteriano (Kitao *et al.*, 2006). Al tener *R. sphaeroides* un flagelo recto, la incorporación de una interfase mas flexible entre dos estructuras rígidas, probablemente permita controlar mejor la transmisión de la torca hacia el eje de rotación del filamento y es probable que los segmentos removidos en las mutantes DC*flgK*-3, 7 y 9 tengan una participación importante en la estabilidad del filamento durante la rotación.

16.0 Conclusiones

La región central de HAP1_{RS} de 860 aa, posee un arreglo modular compuesto por un bloque similar a otras proteínas axiales, dos segmentos similares a varias flagelinas y dos secuencias con repeticiones. A excepción del segmento de 240-340aa el resto de los segmentos en la región variable de HAP1_{RS} no son importantes para la exportación y el ensamblaje. La participación de los segmentos centrales de HAP1_{RS} removidos en las mutantes DC*flgK*-4, 5, 6 y 8 es importante para el desempeño del nado en medios líquidos, ya que modifica su patrón y velocidad de desplazamiento. En el presente trabajo no fue posible determinar el patrón helicoidal ni la secuencia de transiciones polimórficas de los filamentos funcionales, pero es posible que las velocidades registradas revelen que las transiciones polimórficas habituales que se han observado para los filamentos flagelares de *R. sphaeroides* (Armitage y Macnab 1987), se encuentren alteradas e incidan en la velocidad de nado promedio. Es posible que en cada episodio de arranque, aceleración y paro de las trayectorias de nado observadas, existan diferencias en la duración y magnitud en comparación a la cepa silvestre, sin embargo estas observaciones son materia de análisis posterior. El segmento de 640 a 880aa de HAP1_{RS} posee una similitud con otras flagelinas, en particular a los dominios D1 y D2 que contienen regiones hidrofóbicas (hojas- β) mas flexibles. La participación de este “módulo de flagelina” es importante para modular el desempeño del nado en superficies semisólidas y responden de manera diferencial a concentraciones crecientes y/o adicionadas con espesantes de alto peso molecular (Ficoll 400, 0.025mg/ml), lo que puede sugerir que las características modulares de HAP1 se encuentran asociadas a controlar diferentes etapas de la deformación mecánica (histéresis) que se propone ocurre durante la torsión del flagelo bacteriano (Kitao *et al.*, 2006). Al tener *R. sphaeroides* un flagelo recto, la incorporación de una interfase mas flexible entre dos estructuras rígidas, probablemente permita controlar mejor la transmisión de la torca hacia el eje de rotación del filamento y es probable que los segmentos removidos en las mutantes DC*flgK*-3, 7 y 9 tengan una participación importante en la estabilidad del filamento durante la rotación.

17.0 Perspectivas

Hasta ahora no se conoce cual es la capacidad o “carga” del flagelo de *R. sphaeroides*, así como la potencia con la que se transmite el arrastre o “guía” hace el resto de su eje, por lo que hace a las mutantes de HAP1_{Rs}, potenciales candidatas para estudiar las transiciones polimórficas de su filamento. Tampoco se sabe como se regula la biogénesis al nivel de la interfase de las HAP's así como el origen de su peculiar tamaño. Falta por estudiar el origen del segmento de 640-880aa. Existen muchas preguntas abiertas, que pueden dan continuidad a ésta investigación, entre ellas:

¿Qué mecanismos de inserción pudieron haberse involucrados en la adquisición del módulo de flagelina en el centro de FlgK?, ¿Transposición?, ¿recombinación sitio específica?, ¿transducción?, ¿Qué procesos de selección pudieron haber ocurrido para favorecer el mantenimiento de esta posible inserción?. ¿Qué estructuras de la flagelina ancestral han sufrido mutaciones al incorporarse en la secuencia de *flgKRs*? ¿Qué tipo de mutaciones, puntuales? ¿Sinónimas? ¿No-sinónimas?, ¿Qué sucedería si se eliminará selectivamente la región similar a la flagelina?, ¿Se generaría un producto funcional? ¿mantendría su plegamiento independiente?, ¿Si se intercambiara la flagelina de una cepa silvestre en *S. typhimurium* por el segmento de 640-880aa encontrado en la secuencia de HAP1_{Rs}, este sería funcional?, ¿Qué adaptaciones mecánicas tuvieron que ocurrir para permitir que la organización del filamento mantuviera su estabilidad?, ¿Cómo es la interacción con HAP3 durante el ensamblaje?, ¿Qué interacciones mecánicas comparte HAP1_{Rs} con HAP3 y con las flagelinas?, ¿Qué propiedades mecánicas podría regular HAP1_{Rs} durante las transiciones polimórficas del filamento de *Rs*? ¿Qué otras transiciones polimórficas podrían estar involucradas en la estabilidad y rigidez de la interfase?, ¿Qué mecanismos están involucrados en la exportación de HAP1?, ¿Qué chaperonas modulan su plegamiento?. Debido a que no se han identificado en el genoma de *R. sphaeroides* los genes homólogos a *flgN* y *fliT*, codificantes para chaperonas de HAP1 y HAP3 encontradas en *S. typhimurium*. También surgen las siguientes interrogantes: ¿Cómo se organizan los dominios de reconocimiento con otras proteínas axiales?, ¿Cuál es la estequiometría de HAP1_{Rs}? ¿Posee diferentes mecanismos de ensamblaje?. ¿El modelo *in silico* de esta proteína obtenido mediante servidor Robetta (www.bakerlab.com), es fiel a su estructura cristalina real?.

18.0 Bibliografía

- Adam, G. (1977). "Model of the bacterial flagellar motor: response to varying viscous load." J Mechanochem Cell Motil **4**(4): 235-53.
- Adams, D. G. and P. S. Duggan (2008). "Cyanobacteria-bryophyte symbioses." J Exp Bot **59**(5): 1047-58.
- Adler, J. (1976). "Chemotaxis in bacteria." J Supramol Struct **4**(3): 305-17.
- Aizawa, S. I. (1996). "Flagellar assembly in Salmonella typhimurium." Mol Microbiol **19**(1): 1-5.
- Aizawa, S. I. (2001). "Bacterial flagella and type III secretion systems." FEMS Microbiol Lett **202**(2): 157-64.
- Aizawa, S. I., G. E. Dean, et al. (1985). "Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of Salmonella typhimurium." J Bacteriol **161**(3): 836-49.
- Aizawa, S. I. and T. Kubori (1998). "Bacterial flagellation and cell division." Genes Cells **3**(10): 625-34.
- Aizawa, S. I., F. Vonderviszt, et al. (1990). "Termini of Salmonella flagellin are disordered and become organized upon polymerization into flagellar filament." J Mol Biol **211**(4): 673-7.
- Akiba, T., H. Yoshimura, et al. (1991). "Monolayer crystallization of flagellar L-P rings by sequential addition and depletion of lipid." Science **252**(5012): 1544-6.

Aldridge, P., J. Gnerer, et al. (2006). "Transcriptional and translational control of the Salmonella fliC gene." J Bacteriol **188**(12): 4487-96.

Aldridge, P. and K. T. Hughes (2001). "How and when are substrates selected for type III secretion?" Trends Microbiol **9**(5): 209-14.

Aldridge, P. and K. T. Hughes (2002). "Regulation of flagellar assembly." Curr Opin Microbiol **5**(2): 160-5.

Andersen-Nissen, E., K. D. Smith, et al. (2005). "Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(26): 9247-52.

Arfaoui, I., V. Bermudez, et al. (2006). "Surface enhanced second harmonic generation from macrocycle, catenane, and rotaxane thin films: experiments and theory." J Phys Chem B **110**(15): 7648-52.

Armitage, J. P. (1999). "Bacterial tactic responses." Adv Microb Physiol **41**: 229-89.

Armitage, J. P. and R. M. Macnab (1987). "Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of Rhodobacter sphaeroides." J Bacteriol **169**(2): 514-8.

Asakura, S. (1970). "Polymerization of flagellin and polymorphism of flagella". Adv. Biophys. **1**, 99-155.

Atsumi, T. (2001). "An ultrasonic motor model for bacterial flagellar motors." J Theor Biol **213**(1): 31-51.

Atsumi, T., Y. Maekawa, et al. (1996). "Effect of viscosity on swimming by the lateral and polar flagella of Vibrio alginolyticus." J Bacteriol **178**(16): 5024-6.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K., (1987) Current protocols in molecular biology. Wiley, New York

Ballado, T., L. Camarena, et al. (2001). "The hook gene (flgE) is expressed from the flgBCDEF operon in Rhodobacter sphaeroides: study of an flgE mutant." J Bacteriol **183**(5): 1680-7.

Bardy, S. L., J. Eichler, et al. (2003). "Archaeal signal peptides--a comparative survey at the genome level." Protein Sci **12**(9): 1833-43.

Bardy, S. L. and K. F. Jarrell (2003). "Cleavage of preflagellins by an aspartic acid signal peptidase is essential for flagellation in the archaeon Methanococcus voltae." Mol Microbiol **50**(4): 1339-47.

- Bardy, S. L., T. Mori, et al. (2002). "Identification and localization of flagellins FlaA and FlaB3 within flagella of *Methanococcus voltae*." J Bacteriol **184**(19): 5223-33.
- Belas, R., I. B. Zhulin, et al. (2008). "Bacterial signaling and motility: sure bets." J Bacteriol **190**(6): 1849-56.
- Ben Shir, I., S. Sasmal, et al. (2008). "Repulsive interaction can be a key design element of molecular rotary motors." J Org Chem **73**(22): 8772-9.
- Bennett, J. C., J. Thomas, et al. (2001). "Substrate complexes and domain organization of the *Salmonella* flagellar export chaperones FlgN and FliT." Mol Microbiol **39**(3): 781-91.
- Berg HC, Anderson RA., Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. Nature. 1973 Oct **19**;245(5425):380-2.
- Berg, H. C. and L. Turner (1993). "Torque generated by the flagellar motor of *Escherichia coli*." Biophys J **65**(5): 2201-16.
- Berg, H. C. (1995). "Torque generation by the flagellar rotary motor." Biophys J **68**(4 Suppl): 163S-166S; discussion 166S-167S.
- Berg, H. C. (2000). "Constraints on models for the flagellar rotary motor." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **355**(1396): 491-501.
- Berg, H. C. (2003). "The rotary motor of bacterial flagella." Annu Rev Biochem **72**: 19-54.
- Berg, H. C. (2005). "Swarming motility: it better be wet." Curr Biol **15**(15): R599-600.
- Berg, H. C. (2008). "Bacterial flagellar motor." Curr Biol **18**(16): R689-91.
- Bergman, M. A., L. A. Cummings, et al. (2005). "CD4+-T-cell responses generated during murine *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection are directed towards multiple epitopes within the natural antigen FliC." Infect Immun **73**(11): 7226-35.
- Blair, D. F. and H. C. Berg (1990). "The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor." Cell **60**(3): 439-49.
- Blair, D. F., D. Y. Kim, et al. (1991). "Mutant MotB proteins in *Escherichia coli*." J Bacteriol **173**(13): 4049-55.

- Blair, K. M., L. Turner, et al. (2008). "A molecular clutch disables flagella in the *Bacillus subtilis* biofilm." Science **320**(5883): 1636-8.
- Blat, Y., B. Gillespie, et al. (1998). "Regulation of phosphatase activity in bacterial chemotaxis." J Mol Biol **284**(4): 1191-9.
- Blocker, A., K. Komoriya, et al. (2003). "Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3027-30.
- Borkovich, K. A. and M. I. Simon (1990). "The dynamics of protein phosphorylation in bacterial chemotaxis." Cell **63**(6): 1339-48.
- Braun, T. F., L. Q. Al-Mawsawi, et al. (2004). "Arrangement of core membrane segments in the MotA/MotB proton-channel complex of *Escherichia coli*." Biochemistry **43**(1): 35-45.
- Braun, T. F., M. K. Khubbar, et al. (2005). "Flavobacterium johnsoniae gliding motility genes identified by mariner mutagenesis." J Bacteriol **187**(20): 6943-52.
- Braun, T. F. and M. J. McBride (2005). "Flavobacterium johnsoniae GldJ is a lipoprotein that is required for gliding motility." J Bacteriol **187**(8): 2628-37.
- Braun, T. F., S. Poulson, et al. (1999). "Function of proline residues of MotA in torque generation by the flagellar motor of *Escherichia coli*." J Bacteriol **181**(11): 3542-51.
- Bray, D., M. D. Levin, et al. (1998). "Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity." Nature **393**(6680): 85-8.
- Bren, A. and M. Eisenbach (1998). "The N terminus of the flagellar switch protein, FliM, is the binding domain for the chemotactic response regulator, CheY." J Mol Biol **278**(3): 507-14.
- Bren, A. and M. Eisenbach (2001). "Changing the direction of flagellar rotation in bacteria by modulating the ratio between the rotational states of the switch protein FliM." J Mol Biol **312**(4): 699-709.
- Bren, A., M. Welch, et al. (1996). "Signal termination in bacterial chemotaxis: CheZ mediates dephosphorylation of free rather than switch-bound CheY." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(19): 10090-3.
- Burrows, L. L. (2005). "Weapons of mass retraction." Mol Microbiol **57**(4): 878-88.
- Calladine, C. R. (1975). "Construction of bacterial flagella". Nature, 255, 121–124.

Castillo, D. J., T. Ballado, et al. (2009). "Functional analysis of a large non-conserved region of FlgK (HAP1) from *Rhodobacter sphaeroides*." Antonie Van Leeuwenhoek **95**(1): 77-90.

Che, Y. S., S. Nakamura, et al. (2008). "Suppressor analysis of the MotB(D33E) mutation to probe bacterial flagellar motor dynamics coupled with proton translocation." J Bacteriol **190**(20): 6660-7.

Chen, B. G., L. Turner, et al. (2007). "The wetting agent required for swarming in *Salmonella enterica* serovar typhimurium is not a surfactant." J Bacteriol **189**(23): 8750-3.

Chiang, P., M. Habash, et al. (2005). "Disparate subcellular localization patterns of *Pseudomonas aeruginosa* Type IV pilus ATPases involved in twitching motility." J Bacteriol **187**(3): 829-39.

Chilcott, G. S. and K. T. Hughes (1998). "The type III secretion determinants of the flagellar anti-transcription factor, FlgM, extend from the amino-terminus into the anti-sigma28 domain." Mol Microbiol **30**(5): 1029-40.

Cohen-Krausz, S. and S. Trachtenberg (2008). "The flagellar filament structure of the extreme acidothermophile *Sulfolobus shibatae* B12 suggests that archaeobacterial flagella have a unique and common symmetry and design." J Mol Biol **375**(4): 1113-24.

Coombs, D., G. Huber, et al. (2002). "Periodic chirality transformations propagating on bacterial flagella." Phys Rev Lett **89**(11): 118102.

Cordeliers F., Institut Curie, Orsay, Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2008

Cordes, F. S., K. Komoriya, et al. (2003). "Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*." J Biol Chem **278**(19): 17103-7.

Craig, L., M. E. Pique, et al. (2004). "Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity." Nat Rev Microbiol **2**(5): 363-78.

Crowther, L. J., R. P. Anantha, et al. (2004). "The inner membrane subassembly of the enteropathogenic *Escherichia coli* bundle-forming pilus machine." Mol Microbiol **52**(1): 67-79.

DasSarma, S., P. Arora, et al. (1994). "Wild-type gas vesicle formation requires at least ten genes in the *gvp* gene cluster of *Halobacterium halobium* plasmid pNRC100." J Bacteriol **176**(24): 7646-52.

- Davis, J., T. J. Donohue, et al. (1988). "Construction, characterization, and complementation of a Puf- mutant of *Rhodobacter sphaeroides*." J Bacteriol **170**(1): 320-9.
- de la Mora, J., T. Ballado, et al. (2007). "The flagellar muramidase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*." J Bacteriol **189**(22): 7998-8004.
- Dean, G. E., S. I. Aizawa, et al. (1983). "flaAII (motC, cheV) of *Salmonella typhimurium* is a structural gene involved in energization and switching of the flagellar motor." J Bacteriol **154**(1): 84-91.
- del Campo, A. M., T. Ballado, et al. (2007). "Chemotactic control of the two flagellar systems of *Rhodobacter sphaeroides* is mediated by different sets of CheY and FliM proteins." J Bacteriol **189**(22): 8397-401.
- DePamphilis, M. L. and J. Adler (1971). "Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **105**(1): 384-95.
- DeRosier, D. J. (1998). "The turn of the screw: the bacterial flagellar motor." Cell **93**(1): 17-20.
- Dioszeghy, Z., P. Zavodszky, et al. (2004). "Stabilization of flagellar filaments by HAP2 capping." FEBS Lett **568**(1-3): 105-9.
- Donato, G. M. and T. H. Kawula (1998). "Enhanced binding of altered H-NS protein to flagellar rotor protein FliG causes increased flagellar rotational speed and hypermotility in *Escherichia coli*." J Biol Chem **273**(37): 24030-6.

- Dreyfus, G., A. W. Williams, et al. (1993). "Genetic and biochemical analysis of *Salmonella typhimurium* FliI, a flagellar protein related to the catalytic subunit of the F0F1 ATPase and to virulence proteins of mammalian and plant pathogens." J Bacteriol **175**(10): 3131-8.
- Duggan, P. S., P. Gottardello, et al. (2007). "Molecular analysis of genes in *Nostoc punctiforme* involved in pilus biogenesis and plant infection." J Bacteriol **189**(12): 4547-51.
- Eichelberg, K. and J. E. Galan (2000). "The flagellar sigma factor FliA (sigma(28)) regulates the expression of *Salmonella* genes associated with the centisome 63 type III secretion system." Infect Immun **68**(5): 2735-43.
- Eisenbach, M. (2007). "A hitchhiker's guide through advances and conceptual changes in chemotaxis." J Cell Physiol **213**(3): 574-80.
- Faguy, D. M. and K. F. Jarrell (1999). "A twisted tale: the origin and evolution of motility and chemotaxis in prokaryotes." Microbiology **145** (Pt 2): 279-81.
- Fahrner, K. A., S. M. Block, et al. (1994). "A mutant hook-associated protein (HAP3) facilitates torsionally induced transformations of the flagellar filament of *Escherichia coli*." J Mol Biol **238**(2): 173-86.
- Fahrner, K. A., W. S. Ryu, et al. (2003). "Biomechanics: bacterial flagellar switching under load." Nature **423**(6943): 938.
- Fan, F. and R. M. Macnab (1996). "Enzymatic characterization of FliI. An ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*." J Biol Chem **271**(50): 31981-8.
- Ferre, A., J. De La Mora, et al. (2004). "Biochemical study of multiple CheY response regulators of the chemotactic pathway of *Rhodobacter sphaeroides*." J Bacteriol **186**(15): 5172-7.
- Ferris, H. U., Y. Furukawa, et al. (2005). "FlhB regulates ordered export of flagellar components via autocleavage mechanism." J Biol Chem **280**(50): 41236-42.
- Fouts, D. E., E. F. Mongodin, et al. (2005). "Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple campylobacter species." PLoS Biol **3**(1): e15.
- Fujii, M., S. Shibata, et al. (2008). "Polar, peritrichous, and lateral flagella belong to three distinguishable flagellar families." J Mol Biol **379**(2): 273-83.
- Furukawa, Y., K. Imada, et al. (2002). "Interactions between bacterial flagellar axial proteins in their monomeric state in solution." J Mol Biol **318**(3): 889-900.

Furuta, T., F. A. Samatey, et al. (2007). "Gap compression/extension mechanism of bacterial flagellar hook as the molecular universal joint." J Struct Biol **157**(3): 481-90.

Goldstein, R. E., A. Goriely, et al. (2000). "Bistable helices." Phys Rev Lett **84**(7): 1631-4.

Gonzalez-Pedrajo, B., T. Ballado, et al. (1997). "Structural and genetic analysis of a mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 deficient in hook length control." J Bacteriol **179**(21): 6581-8.

Gonzalez-Pedrajo, B., J. de la Mora, et al. (2002). "Characterization of the *flgG* operon of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 and its role in flagellum biosynthesis." Biochim Biophys Acta **1579**(1): 55-63.

Gonzalez-Pedrajo, B., T. Minamino, et al. (2006). "Interactions between C ring proteins and export apparatus components: a possible mechanism for facilitating type III protein export." Mol Microbiol **60**(4): 984-98.

Guerry, P., R. A. Alm, et al. (1991). "Role of two flagellin genes in *Campylobacter* motility." J Bacteriol **173**(15): 4757-64.

Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York

Hasselbring, B. M. and D. C. Krause (2007). "Proteins P24 and P41 function in the regulation of terminal-organelle development and gliding motility in *Mycoplasma pneumoniae*." J Bacteriol **189**(20): 7442-9.

Hasselbring, B. M. and D. C. Krause (2007). "Cytoskeletal protein P41 is required to anchor the terminal organelle of the wall-less prokaryote *Mycoplasma pneumoniae*." Mol Microbiol **63**(1): 44-53.

Hawn, T. R., A. Verbon, et al. (2003). "A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease." J Exp Med **198**(10): 1563-72.

Hendrixson, D. R. (2006). "A phase-variable mechanism controlling the *Campylobacter jejuni* FlgR response regulator influences commensalism." Mol Microbiol **61**(6): 1646-59.

Hendrixson, D. R. and V. J. DiRita (2003). "Transcription of sigma54-dependent but not sigma28-dependent flagellar genes in *Campylobacter jejuni* is associated with formation of the flagellar secretory apparatus." Mol Microbiol **50**(2): 687-702.

Hirano, T., T. Minamino, et al. (2001). "The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase." J Mol Biol **312**(2): 359-69.

- Hirano, T., T. Minamino, et al. (2003). "Substrate specificity classes and the recognition signal for Salmonella type III flagellar export." J Bacteriol **185**(8): 2485-92.
- Hirano, T., S. Shibata, et al. (2005). "N-terminal signal region of FliK is dispensable for length control of the flagellar hook." Mol Microbiol **56**(2): 346-60.
- Hirano, T., S. Yamaguchi, et al. (1994). "Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in Salmonella typhimurium." J Bacteriol **176**(17): 5439-49.
- Hizukuri, Y., S. Kojima, et al. (2008). "Systematic Cys mutagenesis of FlgI, the flagellar P-ring component of Escherichia coli." Microbiology **154**(Pt 3): 810-7.
- Hizukuri, Y., T. Yakushi, et al. (2006). "Role of the intramolecular disulfide bond in FlgI, the flagellar P-ring component of Escherichia coli." J Bacteriol **188**(12): 4190-7.
- Homma, M., S. Aizawa, et al. (1987). "Identification of the M-ring protein of the flagellar motor of Salmonella typhimurium." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7483-7.
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene **77**:51–59
- Homma, M., D. J. DeRosier, et al. (1990). "Flagellar hook and hook-associated proteins of Salmonella typhimurium and their relationship to other axial components of the flagellum." J Mol Biol **213**(4): 819-32.
- Homma, M., H. Fujita, et al. (1984). "Excretion of unassembled flagellin by Salmonella typhimurium mutants deficient in hook-associated proteins." J Bacteriol **159**(3): 1056-9.
- Homma, M. and T. Iino (1985). "Excretion of unassembled hook-associated proteins by Salmonella typhimurium." J Bacteriol **164**(3): 1370-2.
- Homma, M. and T. Iino (1985). "Locations of hook-associated proteins in flagellar structures of Salmonella typhimurium." J Bacteriol **162**(1): 183-9.
- Homma, M., T. Iino, et al. (1986). "In vitro reconstitution of flagellar filaments onto hooks of filamentless mutants of Salmonella typhimurium by addition of hook-associated proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(16): 6169-73.
- Homma, M., T. Iino, et al. (1988). "Identification and characterization of the products of six region III flagellar genes (flaAII.3 through flaQII) of Salmonella typhimurium." J Bacteriol **170**(5): 2221-8.
- Homma, M., Y. Komeda, et al. (1987). "The flaFIX gene product of Salmonella typhimurium."

rium is a flagellar basal body component with a signal peptide for export." J Bacteriol **169**(4): 1493-8.

Homma, M., K. Kutsukake, et al. (1990). "FlgB, FlgC, FlgF and FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*." J Mol Biol **211**(2): 465-77.

Homma, M., K. Kutsukake, et al. (1985). "Structural genes for flagellar hook-associated proteins in *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **163**(2): 464-71.

Homma, M., K. Kutsukake, et al. (1984). "Hook-associated proteins essential for flagellar filament formation in *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **157**(1): 100-8.

Homma, M., K. Ohnishi, et al. (1987). "Identification of flagellar hook and basal body gene products (FlaFV, FlaFVI, FlaFVII and FlaFVIII) in *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **169**(8): 3617-24.

Homma, M., H. Oota, et al. (1996). "Chemotactic responses to an attractant and a repellent by the polar and lateral flagellar systems of *Vibrio alginolyticus*." Microbiology **142** (Pt **10**): 2777-83.

Honda, S., H. Uedaira, et al. (1999). "Folding energetics of a multidomain protein, flagellin." J Mol Biol **293**(3): 719-32.

Hotani, H. (1982). "Micro-video study of moving bacterial flagellar filaments. III. Cyclic transformation induced by mechanical force." J Mol Biol **156**(4): 791-806.

Horton, R. M. (1995). "PCR-mediated recombination and mutagenesis. SOEing together tailor-made genes." Mol Biotechnol **3**(2): 93-9.

Horton, R. M. (1997). "In vitro recombination and mutagenesis of DNA. SOEing together tailor-made genes." Methods Mol Biol **67**: 141-9.

Horton, R. M., Z. L. Cai, et al. (1990). "Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction." Biotechniques **8**(5): 528-35.

Hughes, K. T. and K. Mathee (1998). "The anti-sigma factors." Annu Rev Microbiol **52**: 231-86.

Ikeda, J. S., C. K. Schmitt, et al. (2001). "Flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contributes to virulence in the murine typhoid infection model but does not influence *Salmonella*-induced enteropathogenesis." Infect Immun **69**(5): 3021-30.

Ikeda, K., J. A. Brown, et al. (2003). "Rib72, a conserved protein associated with the ribbon

compartment of flagellar A-microtubules and potentially involved in the linkage between outer doublet microtubules." J Biol Chem **278**(9): 7725-34.

Ikeda, T., S. Asakura, et al. (1985). "'Cap" on the tip of Salmonella flagella." J Mol Biol **184**(4): 735-7.

Ikeda, T., S. Asakura, et al. (1989). "Total reconstitution of Salmonella flagellar filaments from hook and purified flagellin and hook-associated proteins in vitro." J Mol Biol **209**(1): 109-14.

Ikeda, T., R. Kamiya, et al. (1983). "Excretion of flagellin by a short-flagella mutant of Salmonella typhimurium." J Bacteriol **153**(1): 506-10.

Ikeda, T., K. Oosawa, et al. (1996). "Self-assembly of the filament capping protein, FliD, of bacterial flagella into an annular structure." J Mol Biol **259**(4): 679-86.

Imada, K., F. Vonderviszt, et al. (1998). "Assembly characteristics of flagellar cap protein HAP2 of Salmonella: decamer and pentamer in the pH-sensitive equilibrium." J Mol Biol **277**(4): 883-91.

Jarrell, K. F. and M. J. McBride (2008). "The surprisingly diverse ways that prokaryotes move." Nat Rev Microbiol **6**(6): 466-76.

- Jakovljevic, V., S. Leonardy, et al. (2008). "PilB and PilT are ATPases acting antagonistically in type IV pilus function in *Myxococcus xanthus*." J Bacteriol **190**(7): 2411-21.
- Jones, C. J. and S. Aizawa (1991). "The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and function." Adv Microb Physiol **32**: 109-72.
- Jones, C. J., M. Homma, et al. (1989). "L-, P-, and M-ring proteins of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*: gene sequences and deduced protein sequences." J Bacteriol **171**(7): 3890-900.
- Jones, C. J., R. M. Macnab, et al. (1990). "Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*." J Mol Biol **212**(2): 377-87.
- Kagawa, H., S. I. Aizawa, et al. (1979). "Isolation and characterization of bacterial flagellar hook proteins from salmonellae and *Escherichia coli*." J Bacteriol **138**(1): 235-40.
- Khan, I. H., T. S. Reese, et al. (1992). "The cytoplasmic component of the bacterial flagellar motor." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 5956-60.
- Kanto, S., H. Okino, et al. (1991). "Amino acids responsible for flagellar shape are distributed in terminal regions of flagellin." J Mol Biol **219**(3): 471-80.
- Karavolos, M. H., D. M. Bulmer, et al. (2008). "LuxS affects flagellar phase variation independently of quorum sensing in *Salmonella enterica* serovar typhimurium." J Bacteriol **190**(2): 769-71.
- Karlinsey, J. E., S. Tanaka, et al. (2000). "Completion of the hook-basal body complex of the *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and fliC transcription." Mol Microbiol **37**(5): 1220-31.
- Katayama, E., T. Shiraishi, et al. (1996). "Geometry of the flagellar motor in the cytoplasmic membrane of *Salmonella typhimurium* as determined by stereo-photogrammetry of quick-freeze deep-etch replica images." J Mol Biol **255**(3): 458-75.
- Kato, S., S. Aizawa, et al. (1982). "Reconstruction in vitro of the flagellar polyhook from *Salmonella*." J Mol Biol **161**(4): 551-60.
- Kawagishi, I., M. Imagawa, et al. (1996). "The sodium-driven polar flagellar motor of marine *Vibrio* as the mechanosensor that regulates lateral flagellar expression." Mol Microbiol **20**(4): 693-9.
- Kawagishi, I., Y. Maekawa, et al. (1995). "Isolation of the polar and lateral flagellum-defective mutants in *Vibrio alginolyticus* and identification of their flagellar driving energy sources." J Bacteriol **177**(17): 5158-60.

- Keen, N. T., S. Tamaki, et al. (1988). "Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria." Gene **70**(1): 191-7.
- Kehry, M. R., T. G. Doak, et al. (1984). "Stimulus-induced changes in methylesterase activity during chemotaxis in *Escherichia coli*." J Biol Chem **259**(19): 11828-35.
- Khan, S., M. Meister, et al. (1985). "Constraints on flagellar rotation." J Mol Biol **184**(4): 645-56.
- Kim, C., M. Jackson, et al. (2001). "Determinants of chemotactic signal amplification in *Escherichia coli*." J Mol Biol **307**(1): 119-35.
- Kim, E. A., M. Price-Carter, et al. (2008). "Membrane segment organization in the stator complex of the flagellar motor: implications for proton flow and proton-induced conformational change." Biochemistry **47**(43): 11332-9.
- Kim, M., J. C. Bird, et al. (2003). "A macroscopic scale model of bacterial flagellar bundling." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15481-5.
- Kim, M. and T. R. Powers (2005). "Deformation of a helical filament by flow and electric or magnetic fields." Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys **71**(2 Pt 1): 021914.
- Kirby, J. R., C. J. Kristich, et al. (2001). "CheC is related to the family of flagellar switch proteins and acts independently from CheD to control chemotaxis in *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **42**(3): 573-85.
- Kitao, A., K. Yonekura, et al. (2006). "Switch interactions control energy frustration and multiple flagellar filament structures." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(13): 4894-9.
- Kleutsch, B., and P. Lauger. 1990. Coupling of proton flow and rotation in the bacterial flagellar motor: stochastic simulation of a microscopic model. Eur. Biophys. J. 18:175-191.
- Komeda Y. and Iino T. Regulation of expression of the flagellin gene (*hag*) in *Escherichia coli* K-12: analysis of *hag-lac* gene fusions. J Bacteriol.; **139**(3): 721–729.

- Koretke, K. K., A. N. Lupas, et al. (2000). "Evolution of two-component signal transduction." Mol Biol Evol **17**(12): 1956-70.
- Kutsukake, K. (1994). "Excretion of the anti-sigma factor through a flagellar substructure couples flagellar gene expression with flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*." Mol Gen Genet **243**(6): 605-12.
- Kubori, T., N. Shimamoto, et al. (1992). "Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*." J Mol Biol **226**(2): 433-46.
- Kutsukake, K., Y. Ohya, et al. (1990). "Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **172**(2): 741-7.
- Kudo, S., Y. Magariyama, et al. (1990). "Abrupt changes in flagellar rotation observed by laser dark-field microscopy." Nature **346**(6285): 677-80.
- Kunkel, T. A. and D. A. Erie (2005). "DNA mismatch repair." Annu Rev Biochem **74**: 681-710.
- Kurner, J., A. S. Frangakis, et al. (2005). "Cryo-electron tomography reveals the cytoskeletal structure of *Spiroplasma melliferum*." Science **307**(5708): 436-8.
- Kuwajima, G. (1988). "Construction of a minimum-size functional flagellin of *Escherichia coli*." J Bacteriol **170**(7): 3305-9.
- Kyte J, Doolittle RF. (1982)., "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein". J Mol Biol. May 5;157(1):105-32.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Leifson, E. (1960). *Atlas of Bacterial Flagellation*. Academic Press, New York. 603–620.
- Leigh, D. A., M. A. Morales, et al. (2005). "Patterning through controlled submolecular motion: rotaxane-based switches and logic gates that function in solution and polymer films." Angew Chem Int Ed Engl **44**(20): 3062-7.
- Leigh, D. A., A. Venturini, et al. (2004). "The mechanism of formation of amide-based interlocked compounds: prediction of a new rotaxane-forming motif." Chemistry **10**(20): 4960-9.
- Liu, H., Y. Kang, et al. (2001). "Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system." Microbiology **147**(Pt 12): 3215-29.

Liu, J., M. J. McBride, et al. (2007). "Cell surface filaments of the gliding bacterium *Flavobacterium johnsoniae* revealed by cryo-electron tomography." J Bacteriol **189**(20): 7503-6.

Liu, R. and H. Ochman (2007). "Origins of flagellar gene operons and secondary flagellar systems." J Bacteriol **189**(19): 7098-104.

Lloyd, S. A. and D. F. Blair (1997). "Charged residues of the rotor protein FliG essential for torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*." J Mol Biol **266**(4): 733-44.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.

Lynch, M., M. O'Hely, et al. (2001). "The probability of preservation of a newly arisen gene duplicate." Genetics **159**(4): 1789-804.

Macnab, R. M. (2003). "How bacteria assemble flagella." Annu Rev Microbiol **57**: 77-100.

Macnab, R. M. (2004). "Type III flagellar protein export and flagellar assembly." Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 207-17.

Macnab, R. M. and J. S. Parkinson (1991). "Genetic analysis of the bacterial flagellum." Trends Genet **7**(6): 196-200.

Macnab, R. M. and S. Aizawa (1984). "Bacterial motility and the bacterial flagellar motor." Annu Rev Biophys Bioeng **13**: 51-83.

McPherson y Möller, *PCR the Basics from background to bench* Bios publisher 2000

McQuiston, J. R., P. I. Fields, et al. (2008). "Do *Salmonella* carry spare tyres?" Trends Microbiol **16**(4): 142-8.

Magariyama, Y., S. Sugiyama, et al. (2001). "Bacterial swimming speed and rotation rate of bundled flagella." FEMS Microbiol Lett **199**(1): 125-9.

Maki, S., F. Vonderviszt, et al. (1998). "Plugging interactions of HAP2 pentamer into the distal end of flagellar filament revealed by electron microscopy." J Mol Biol **277**(4): 771-7.

Makishima, S., K. Komoriya, et al. (2001). "Length of the flagellar hook and the capacity of the type III export apparatus." Science **291**(5512): 2411-3.

- Malapaka, R. R., L. O. Adebayo, et al. (2007). "A deletion variant study of the functional role of the Salmonella flagellin hypervariable domain region in motility." J Mol Biol **365**(4): 1102-16.
- Malakooti, J., B. Ely, et al. (1994). "Molecular characterization, nucleotide sequence, and expression of the fliO, fliP, fliQ, and fliR genes of Escherichia coli." J Bacteriol **176**(1): 189-97.
- Manson, M. D., P. Tedesco, et al. (1977). "A protonmotive force drives bacterial flagella." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(7): 3060-4.
- Marinus, M. G. and N. R. Morris (1975). "Pleiotropic effects of a DNA adenine methylation mutation (dam-3) in Escherichia coli K12." Mutat Res **28**(1): 15-26.
- Mathews MA, Tang HL, Blair DF., (1998) "Domain analysis of the FliM protein of Escherichia coli". J Bacteriol;**180**(21):5580-90.
- Mattick, J. S. (2002). "Type IV pili and twitching motility." Annu Rev Microbiol **56**: 289-314.
- McBride, M. J. (2001). "Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces." Annu Rev Microbiol **55**: 49-75.
- McCarter, L. L. (1994). "MotX, the channel component of the sodium-type flagellar motor." J Bacteriol **176**(19): 5988-98.
- McCarter, L. L. (2004). "Dual flagellar systems enable motility under different circumstances." J Mol Microbiol Biotechnol **7**(1-2): 18-29.
- McEvoy, M. M., A. Bren, et al. (1999). "Identification of the binding interfaces on CheY for two of its targets, the phosphatase CheZ and the flagellar switch protein fliM." J Mol Biol **289**(5): 1423-33.

Meister, M., S. R. Caplan, et al. (1989). "Dynamics of a tightly coupled mechanism for flagellar rotation. Bacterial motility, chemiosmotic coupling, protonmotive force." Biophys J **55**(5): 905-14.

Meister, M., G. Lowe, et al. (1987). "The proton flux through the bacterial flagellar motor." Cell **49**(5): 643-50.

Merz, A. J. and M. So (2000). "Interactions of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 423-57.

Metcalf, W. W. and B. L. Wanner (1993). "Construction of new beta-glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement." Gene **129**(1): 17-25.

Mignot, T., J. W. Shaevitz, et al. (2007). "Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility." Science **315**(5813): 853-6.

Mimori, Y., I. Yamashita, et al. (1995). "The structure of the R-type straight flagellar filament of Salmonella at 9 Å resolution by electron cryomicroscopy." J Mol Biol **249**(1): 69-87.

Mimori-Kiyosue, Y., F. Vonderviszt, et al. (1997). "Locations of terminal segments of flagellin in the filament structure and their roles in polymerization and polymorphism." J Mol Biol **270**(2): 222-37.

Mimori-Kiyosue, Y., F. Vonderviszt, et al. (1996). "Direct interaction of flagellin termini essential for polymorphic ability of flagellar filament." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15108-13.

Mimori-Kiyosue, Y., I. Yamashita, et al. (1998). "Role of the outermost subdomain of Salmonella flagellin in the filament structure revealed by electron cryomicroscopy." J Mol Biol **284**(2): 521-30.

Minamino, T., K. Imada, et al. (2008). "Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly." Mol Biosyst **4**(11): 1105-15.

Minamino, T., H. Doi, et al. (1999). "Substrate specificity switching of the flagellum-specific export apparatus during flagellar morphogenesis in Salmonella typhimurium." Bio-sci Biotechnol Biochem **63**(7): 1301-3.

Minamino, T., B. Gonzalez-Pedrajo, et al. (1999). "FliK, the protein responsible for flagellar hook length control in Salmonella, is exported during hook assembly." Mol Microbiol **34**(2): 295-304.

Minamino, T. and R. M. Macnab (1999). "Components of the Salmonella flagellar export apparatus and classification of export substrates." J Bacteriol **181**(5): 1388-94.

Miyata, M. (2005). "[Gliding motility of mycoplasmas, a novel mechanism of biological motility]." Tanpakushitsu Kakusan Koso **50**(3): 239-45.

Miyata, M. (2008). "Centipede and inchworm models to explain Mycoplasma gliding." Trends Microbiol **16**(1): 6-12.

Montrone, M., M. Eisenbach, et al. (1998). "Regulation of switching frequency and bias of the bacterial flagellar motor by CheY and fumarate." J Bacteriol **180**(13): 3375-80.

Morgan, D. G. and D. DeRosier (1992). "Processing images of helical structures: a new twist." Ultramicroscopy **46**(1-4): 263-85.

Morgan, D. G., R. M. Macnab, et al. (1993). "Domain organization of the subunit of the Salmonella typhimurium flagellar hook." J Mol Biol **229**(1): 79-84.

Morgan, D. G., C. Owen, et al. (1995). "Structure of bacterial flagellar filaments at 11 Å resolution: packing of the alpha-helices." J Mol Biol **249**(1): 88-110.

Moriya, N., T. Minamino, et al. (2006). "The type III flagellar export specificity switch is dependent on FliK ruler and a molecular clock." J Mol Biol **359**(2): 466-77.

Mullin, D. A., N. Ohta, et al. (2001). "Organization, expression, and function of Caulobacter crescentus genes needed for assembly and function of the flagellar hook." Mol Genet Genomics **265**(3): 445-54.

Muramoto, K. and R. M. Macnab (1998). "Deletion analysis of MotA and MotB, components of the force-generating unit in the flagellar motor of Salmonella." Mol Microbiol **29**(5): 1191-202.

Muramoto, K., S. Makishima, et al. (1999). "Effect of hook subunit concentration on assembly and control of length of the flagellar hook of Salmonella." J Bacteriol **181**(18): 5808-13.

Muramoto, K., S. Makishima, et al. (1998). "Effect of cellular level of FliK on flagellar hook and filament assembly in Salmonella typhimurium." J Mol Biol **277**(4): 871-82.

Namba, K., I. Yamashita, et al. (1989). "Structure of the core and central channel of bacterial flagella." Nature **342**(6250): 648-54.

Namba, K., K. Yonekura, et al. (2001). "[Understanding the mechanisms of self-assembly and sub A precision switch of the bacterial flagellum based on its molecular structure]." Tanpakushitsu Kakusan Koso **46**(11 Suppl): 1568-76.

- Nambu, T., T. Minamino, et al. (1999). "Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **181**(5): 1555-61.
- Nelson, S. S., S. Bollampalli, et al. (2008). "SprB is a cell surface component of the *Flavobacterium johnsoniae* gliding motility machinery." J Bacteriol **190**(8): 2851-7.
- Nutsch, T., D. Oesterhelt, et al. (2005). "A quantitative model of the switch cycle of an archaeal flagellar motor and its sensory control." Biophys J **89**(4): 2307-23.
- Offner, S., U. Ziese, et al. (1998). "Structural characteristics of halobacterial gas vesicles." Microbiology **144** (Pt 5): 1331-42.
- Ohnishi, K., Y. Ohto, et al. (1994). "FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **176**(8): 2272-81.
- Ohnishi, K., M. Homma, et al. (1987). "Formation of flagella lacking outer rings by flaM, flaU, and flaY mutants of *Escherichia coli*." J Bacteriol **169**(4): 1485-8.
- Oosawa, K., T. Ueno, et al. (1994). "Overproduction of the bacterial flagellar switch proteins and their interactions with the MS ring complex in vitro." J Bacteriol **176**(12): 3683-91.
- Orsi, R. H., Q. Sun, et al. (2008). "Genome-wide analyses reveal lineage specific contributions of positive selection and recombination to the evolution of *Listeria monocytogenes*." BMC Evol Biol **8**: 233.
- Pallen, M. J., S. A. Beatson, et al. (2005). "Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type-III secretion systems: a Darwinian perspective." FEMS Microbiol Rev **29**(2): 201-29.
- Pallen, M. J., C. W. Penn, et al. (2005). "Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era." Trends Microbiol **13**(4): 143-9.
- Parkhill, J., B. W. Wren, et al. (2000). "The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences." Nature **403**(6770): 665-8.
- Paulick, A., A. Koerdt, et al. (2009). "Two different stator systems drive a single polar flagellum in *Shewanella oneidensis* MR-1." Mol Microbiol **71**(4): 836-50.
- Poggio, S., C. Abreu-Goodger, et al. (2007). "A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*." J Bacteriol **189**(8): 3208-16.

- Poggio, S., A. Osorio, et al. (2001). "The N terminus of FliM is essential to promote flagellar rotation in *Rhodobacter sphaeroides*." J Bacteriol **183**(10): 3142-8.
- Porter, S. L., G. H. Wadhams, et al. (2006). "The CheYs of *Rhodobacter sphaeroides*." J Biol Chem **281**(43): 32694-704.
- Priefer, U. B., R. Simon, et al. (1985). "Extension of the host range of *Escherichia coli* vectors by incorporation of RSF1010 replication and mobilization functions." J Bacteriol **163**(1): 324-30.
- Quandt, J. and M. F. Hynes (1993). "Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria." Gene **127**(1): 15-21.
- Quartin, R. & Wetmur, J. (1989) Biochemistry **28**, 1040-1047.
- Reichert, M. and H. Stark (2005). "Synchronization of rotating helices by hydrodynamic interactions." Eur Phys J E Soft Matter **17**(4): 493-500.
- Romagnoli, S., H. L. Packer, et al. (2002). "Tactic responses to oxygen in the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* WS8N." J Bacteriol **184**(20): 5590-8.
- Roujeinikova, A. (2008). "Crystal structure of the cell wall anchor domain of MotB, a stator component of the bacterial flagellar motor: implications for peptidoglycan recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(30): 10348-53.
- Saijo-Hamano, Y., N. Uchida, et al. (2004). "In vitro characterization of FlgB, FlgC, FlgF, FlgG, and FliE, flagellar basal body proteins of *Salmonella*." J Mol Biol **339**(2): 423-35.
- Samatey, F. A., K. Imada, et al. (2001). "Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling." Nature **410**(6826): 331-7.
- Samatey, F. A., K. Imada, et al. (2000). "Crystallization of the F41 fragment of flagellin and data collection from extremely thin crystals." J Struct Biol **132**(2): 106-11.
- Samatey, F. A., H. Matsunami, et al. (2004). "Crystallization of a core fragment of the flagellar hook protein FlgE." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**(Pt 11): 2078-80.
- Samuel, A. D., J. D. Petersen, et al. (2001). "Envelope structure of *Synechococcus* sp. WH8113, a nonflagellated swimming cyanobacterium." BMC Microbiol **1**: 4.
- Satyshur, K. A., G. A. Worzalla, et al. (2007). "Crystal structures of the pilus retraction motor PilT suggest large domain movements and subunit cooperation drive motility." Structure **15**(3): 363-76.

Scharf, B. (2002). "Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments of *Rhizobium lupini* H13-3: flagellar rotation and pH-induced polymorphic transitions." J Bacteriol **184**(21): 5979-86.

Scharf, B. E., K. A. Fahrner, et al. (1998). "Control of direction of flagellar rotation in bacterial chemotaxis." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 201-6.

Schols, P. & E. Smets. 2001. Carnoy: analysis software for LM, SEM and TEM images <http://www.carnoy.org>

Schultz, J., F. Milpetz, et al. (1998). "SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 5857-64.

Shah, D. S., T. Pehinec, et al. (2000). "The flagellar filament of *Rhodobacter sphaeroides*: pH-induced polymorphic transitions and analysis of the *fliC* gene." J Bacteriol **182**(18): 5218-24.

Shaikh, T. R., D. R. Thomas, et al. (2005). "A partial atomic structure for the flagellar hook of *Salmonella typhimurium*." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(4): 1023-8.

Shibata, S., N. Takahashi, et al. (2007). "FliK regulates flagellar hook length as an internal ruler." Mol Microbiol **64**(5): 1404-15.

- Shimada, K., Kamiya, R. & Asakura, S. (1975). "Lefthanded to right-handed helix conversion in Salmonella flagella". Nature, 254, 332–334
- Shimizu, T. S., N. Le Novere, et al. (2000). "Molecular model of a lattice of signalling proteins involved in bacterial chemotaxis." Nat Cell Biol 2(11): 792-6.
- Shimizu, T. S., N. Delalez, et al. (2006). "Monitoring bacterial chemotaxis by using bioluminescence resonance energy transfer: absence of feedback from the flagellar motors." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(7): 2093-7.
- Skerker, J.M. and Berg, H.C. Direct observation of extension and retraction of type IV pili. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 6901-6904 (2001).
- Silva-Herzog, E. and G. Dreyfus (1999). "Interaction of FliI, a component of the flagellar export apparatus, with flagellin and hook protein." Biochim Biophys Acta **1431**(2): 374-83.
- Silverman, M. and M. Simon (1974). "Positioning flagellar genes in Escherichia coli by deletion analysis." J Bacteriol **117**(1): 73-9.
- Simon, R. (1984). "High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-Mob transposon." Mol Gen Genet **196**(3): 413-20.
- Sistrom, W. R. (1962). "Observations on the relationship between the formation of photopigments and the synthesis of protein in Rhodospseudomonas spheroides." J Gen Microbiol **28**: 599-605.
- Smith, K. D., E. Andersen-Nissen, et al. (2003). "Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility." Nat Immunol **4**(12): 1247-53.
- Sockett RE, Foster JCA, Armitage JP (1990) "Molecular biology of the Rhodobacter sphaeroides flagellum". FEMSSymp **53**:473–479
- Sogaard-Andersen, L. (2004). "Cell polarity, intercellular signalling and morphogenetic cell movements in Myxococcus xanthus." Curr Opin Microbiol **7**(6): 587-93.
- Sosinsky, G. E., N. R. Francis, et al. (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 U S A **89**(11): 4801-5.
- Sosinsky, G. E., N. R. Francis, et al. (1992). "Substructure of the flagellar basal body of Salmonella typhimurium." J Mol Biol **223**(1): 171-84.

Sowa, Y., H. Hotta, et al. (2003). "Torque-speed relationship of the Na⁺-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*." J Mol Biol **327**(5): 1043-51.

Sowa, Y., A. D. Rowe, et al. (2005). "Direct observation of steps in rotation of the bacterial flagellar motor." Nature **437**(7060): 916-9.

Stagg, L., S. Q. Zhang, et al. (2007). "Molecular crowding enhances native structure and stability of alpha/beta protein flavodoxin." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(48): 18976-81.

Stevens, J. M., E. E. Galyov, et al. (2006). "Actin-dependent movement of bacterial pathogens." Nat Rev Microbiol **4**(2): 91-101.

Suzuki, T. and T. Iino (1981). "Role of the flaR gene in flagellar hook formation in *Salmonella* spp." J Bacteriol **148**(3): 973-9.

Suzuki, H., K. Yonekura, et al. (1998). "A structural feature in the central channel of the bacterial flagellar FliF ring complex is implicated in type III protein export." J Struct Biol **124**(2-3): 104-14.

Takakura, Y., F. S. Che, et al. (2008). "Expression of a bacterial flagellin gene triggers plant immune responses and confers disease resistance in transgenic rice plants." Mol Plant Pathol **9**(4): 525-9.

Terashima, H., H. Fukuoka, et al. (2006). "The *Vibrio* motor proteins, MotX and MotY, are associated with the basal body of Na-driven flagella and required for stator formation." Mol Microbiol **62**(4): 1170-80.

Terashima, H., R. Yoshizumi, et al. (2008). "Cell-free synthesis of the torque-generating membrane proteins, PomA and PomB, of the Na⁺-driven flagellar motor in *Vibrio alginolyticus*." J Biochem.

Tian, H., L. Yu, et al. (1998). "Flexibility of the neck region of the rieske iron-sulfur protein is functionally important in the cytochrome bc₁ complex." J Biol Chem **273**(43): 27953-9.

Togashi, F., S. Yamaguchi, et al. (1997). "An extreme clockwise switch bias mutation in fliG of *Salmonella typhimurium* and its suppression by slow-motile mutations in motA and motB." J Bacteriol **179**(9): 2994-3003.

Trachtenberg, S. (2004). "Shaping and moving a spiroplasma." J Mol Microbiol Biotechnol **7**(1-2): 78-87.

Trachtenberg, S. (2006). "The cytoskeleton of spiroplasma: a complex linear motor." J Mol Microbiol Biotechnol **11**(3-5): 265-83.

Trachtenberg, S. and S. Cohen-Krausz (2006). "The archaeobacterial flagellar filament: a bacterial propeller with a pilus-like structure." J Mol Microbiol Biotechnol **11**(3-5): 208-20.

Trachtenberg, S., D. Fishelov, et al. (2003). "Bacterial flagellar microhydrodynamics: Laminar flow over complex flagellar filaments, analog archimedean screws and cylinders, and its perturbations." Biophys J **85**(3): 1345-57.

Trachtenberg, S. and R. Gilad (2001). "A bacterial linear motor: cellular and molecular organization of the contractile cytoskeleton of the helical bacterium *Spiroplasma melliferum* BC3." Mol Microbiol **41**(4): 827-48.

Trachtenberg, S., R. Gilad, et al. (2003). "The bacterial linear motor of *Spiroplasma melliferum* BC3: from single molecules to swimming cells." Mol Microbiol **47**(3): 671-97.

Turner, L., S. R. Caplan, et al. (1996). "Temperature-induced switching of the bacterial flagellar motor." Biophys J **71**(4): 2227-33.

Turner, L., W. S. Ryu, et al. (2000). "Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments." J Bacteriol **182**(10): 2793-801.

Turner, L., A. D. Samuel, et al. (1999). "Temperature dependence of switching of the bacterial flagellar motor by the protein CheY(13DK106YW)." Biophys J **77**(1): 597-603.

Uedaira, H., H. Morii, et al. (1999). "Domain organization of flagellar hook protein from *Salmonella typhimurium*." FEBS Lett **445**(1): 126-30.

Ueno, T., K. Oosawa, et al. (1994). "Domain structures of the MS ring component protein (FliF) of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*." J Mol Biol **236**(2): 546-55.

Uenoyama, A. and M. Miyata (2005). "Identification of a 123-kilodalton protein (Gli123) involved in machinery for gliding motility of *Mycoplasma mobile*." J Bacteriol **187**(16): 5578-84.

Varga, J. J., V. Nguyen, et al. (2006). "Type IV pili-dependent gliding motility in the Gram-positive pathogen *Clostridium perfringens* and other *Clostridia*." Mol Microbiol **62**(3): 680-94.

Vegh, B. M., P. Gal, et al. (2006). "Localization of the flagellum-specific secretion signal in *Salmonella* flagellin." Biochem Biophys Res Commun **345**(1): 93-8.

Vonderviszt, F., S. Aizawa, et al. (1991). "Role of the disordered terminal regions of flagellin in filament formation and stability." J Mol Biol **221**(4): 1461-74.

- Vonderviszt, F., K. Imada, et al. (1998). "Mechanism of self-association and filament capping by flagellar HAP2." J Mol Biol **284**(5): 1399-416.
- Vonderviszt, F., M. Sonoyama, et al. (1992). "Conformational adaptability of the terminal regions of flagellin." Biophys J **63**(6): 1672-7.
- Vonderviszt, F., P. Zavodszky, et al. (1995). "Structural organization and assembly of flagellar hook protein from *Salmonella typhimurium*." J Mol Biol **251**(4): 520-32.
- Walsby, A. E. and P. G. Dunton (2006). "Gas vesicles in actinomycetes?" Trends Microbiol **14**(3): 99-100.
- Wang, Q., A. Suzuki, et al. (2005). "Sensing wetness: a new role for the bacterial flagellum." Embo J **24**(11): 2034-42.
- Warrens, A. N., M. D. Jones, et al. (1997). "Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest." Gene **186**(1): 29-35.
- Waterbury, J. B., J. M. Willey, et al. (1985). "A Cyanobacterium Capable of Swimming Motility." Science **230**(4721): 74-76.
- Wessel, D. and U. I. Flugge (1984). "A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids." Anal Biochem **138**(1): 141-3.
- West, M. A. and G. Dreyfus (1997). "Isolation and ultrastructural study of the flagellar basal body complex from *Rhodobacter sphaeroides* WS8 (wild type) and a polyhook mutant PG." Biochem Biophys Res Commun **238**(3): 733-7.
- Wolfe, A. J., M. P. Conley, et al. (1988). "Acetyladenylyate plays a role in controlling the direction of flagellar rotation." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(18): 6711-5.
- Wolfe, A. J., M. P. Conley, et al. (1987). "Reconstitution of signaling in bacterial chemotaxis." J Bacteriol **169**(5): 1878-85.
- Wolgemuth, C. W. and N. W. Charon (2005). "The kinky propulsion of *Spiroplasma*." Cell **122**(6): 827-8.
- Wolgemuth, C. W., T. R. Powers, et al. (2000). "Twirling and whirling: viscous dynamics of rotating elastic filaments." Phys Rev Lett **84**(7): 1623-6.
- Wosten, M. M., J. A. Wagenaar, et al. (2004). "The FlgS/FlgR two-component signal transduction system regulates the fla regulon in *Campylobacter jejuni*." J Biol Chem **279**(16): 16214-22.

- Wu, H. and P. M. Fives-Taylor (2001). "Molecular strategies for fimbrial expression and assembly." Crit Rev Oral Biol Med **12**(2): 101-15.
- Wu, S. S., J. Wu, et al. (1997). "The *Myxococcus xanthus* pilT locus is required for social gliding motility although pili are still produced." Mol Microbiol **23**(1): 109-21.
- Xing, J., F. Bai, et al. (2006). "Torque-speed relationship of the bacterial flagellar motor." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(5): 1260-5.
- Yamashita, I., K. Hasegawa, et al. (1998). "Structure and switching of bacterial flagellar filaments studied by X-ray fiber diffraction." Nat Struct Biol **5**(2): 125-32.
- Yamashita, I., F. Vonderviszt, et al. (1995). "Radial mass analysis of the flagellar filament of *Salmonella*: implications for the subunit folding." J Mol Biol **253**(4): 547-58.
- Yamashita, I., F. Vonderviszt, et al. (1991). "Preparing well-oriented sols of straight bacterial flagellar filaments for X-ray fiber diffraction." J Mol Biol **217**(2): 293-302.
- Yakushi, T., J. Yang, et al. (2006). "Roles of charged residues of rotor and stator in flagellar rotation: comparative study using H⁺-driven and Na⁺-driven motors in *Escherichia coli*." J Bacteriol **188**(4): 1466-72.
- Yonekura, K., S. Maki, et al. (2000). "The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly." Science **290**(5499): 2148-52.
- Yonekura, K., S. Maki-Yonekura, et al. (2001). "Structure analysis of the flagellar cap-filament complex by electron cryomicroscopy and single-particle image analysis." J Struct Biol **133**(2-3): 246-53.
- Yonekura, K., S. Maki-Yonekura, et al. (2001). "Structure analysis of the flagellar cap-filament complex by electron cryomicroscopy and single-particle image analysis." J Struct Biol **133**(2-3): 246-53.
- Yonekura, K., S. Maki-Yonekura, et al. (2002). "Growth mechanism of the bacterial flagellar filament." Res Microbiol **153**(4): 191-7.
- Yonekura, K., S. Maki-Yonekura, et al. (2003). "Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy." Nature **424**(6949): 643-50.
- Yonekura, K., S. Maki-Yonekura, et al. (2004). "[Electron cryomicroscopy of the bacterial flagellar nanomachine]." Tanpakushitsu Kakusan Koso **49**(4): 534-42.

Yonekura, K., S. Maki-Yonekura, et al. (2005). "Building the atomic model for the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy and image analysis." Structure **13**(3): 407-12.

Yonekura, K., T. Yakushi, et al. (2006). "Electron cryomicroscopic visualization of PomA/B stator units of the sodium-driven flagellar motor in liposomes." J Mol Biol **357**(1): 73-81.

Zhou, J. and D. F. Blair (1997). "Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for torque generation in the bacterial flagellar motor." J Mol Biol **273**(2): 428-39.

Zhou, J., S. A. Lloyd, et al. (1998). "Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6436-41.

Zhou, J., L. L. Sharp, et al. (1998). "Function of protonatable residues in the flagellar motor of Escherichia coli: a critical role for Asp 32 of MotB." J Bacteriol **180**(10): 2729-35.

Zhulin, I. B. (2001). "The superfamily of chemotaxis transducers: from physiology to genomics and back." Adv Microb Physiol **45**: 157-98.

19.0 Artículo

El Artículo anexo es el resultado de la presente investigación, publicado en Enero de 2009, en la revista: “**Antonie van Leeuwenhoek**, International Journal of General and Molecular Microbiology”

Functional analysis of a large non-conserved region of FlgK (HAP1) from *Rhodobacter sphaeroides*

David J. Castillo · Teresa Ballado · Laura Camarena ·
Georges Dreyfus

Received: 3 July 2008 / Accepted: 14 October 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract The single subpolar flagellum of *Rhodobacter sphaeroides* shows an enlarged hook-filament junction. One of the two proteins that compose this section of the filament is HAP1_{RS} (FlgK_{RS}) it contains a central non-conserved region of 860 amino acids that makes this protein about three times larger than its homologue in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. We investigated the role of this central portion of the unusually large HAP1 protein of *R. sphaeroides* by monitoring the effects of serial deletions in *flgK_{RS}*, the gene encoding HAP1_{RS}, on swimming and swarming. Two deletion mutants did not assemble functional flagella, two were paralyzed and five exhibited reduced free-swimming speeds. Some mutants produced unusual swarming patterns on soft agar without or with Ficoll 400. A segment of approximately 200-aa of the central region of HAP1_{RS} that aligns with the variable region of the flagellin sequence from other γ - and β -proteobacteria was also found. Therefore, it is possible that the

origin of this large central domain of HAP1_{RS} could be associated with an event of horizontal transfer and subsequent duplications and/or insertions.

Keywords *Rhodobacter sphaeroides* · Bacterial flagellum · Hook-filament junction · HAP1_{RS} · Motility

Introduction

Rhodobacter sphaeroides, a purple non-sulfur photosynthetic bacterium, contains a single subpolar flagellum (fla1) that was possibly acquired by horizontal transfer and coexists with an endogenous flagellar system (fla2) that is not expressed under laboratory conditions (Poggio et al. 2007). The bacterial flagellum is a complex macromolecular structure that propels the cell by means of a rotary motor.

This organelle consists of three protein substructures: the basal body complex, the hook, and the filament. For review see Macnab (2003), Porter et al. (2008). The assembly and function of the flagellum is the result of the concerted expression of more than 50 genes, which are tightly regulated in a strict hierarchical manner (Aldridge and Hughes 2002; Poggio et al. 2005). Rotation of the flagellum in some bacteria proceeds both clockwise and counterclockwise (cw/ccw) and in others it works on a start/stop mode, always controlled by the chemosensory system.

D. J. Castillo · T. Ballado · G. Dreyfus (✉)
Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-243 Cd. Universitaria, 04510 Mexico, DF, Mexico
e-mail: gdreyfus@ifc.unam.mx

L. Camarena
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico, DF, Mexico

In enteric bacteria, the hook and the filament have mechanically distinct characteristics; the former is flexible and the latter is rather rigid with a large radius of curvature (Namba and Vonderviszt 1997). The hook is considered to act as a universal joint that can transmit torque to the filament in a wide range of directions. The filament performs as a rigid propeller that changes helical handedness due to the twisting force applied at the base of the flagellum. Similarly, the structural organization of the hook and the filament also seem to be different from one another. While β -sheet domains appear to be essential in the determination of the hook structure (Vonderviszt et al. 1995; Uedaira et al. 1999; Samatey et al. 2004), α -helical interactions govern the formation of the filament structure (Mimori et al. 1995; Morgan et al. 1995; Yamashita et al. 1995). These two helical structures are linked together by means of a very short segment that shows a thinner appearance on electron micrographs. Two of the three hook associated proteins (HAP1 and HAP3) form this junction (Ikeda et al. 1987).

The deduced stoichiometry for the two HAP proteins renders two turns of a one-start helix. Four turns form a segment of about 10 nm in length (Ikeda et al. 1987). This short helix is important in determining the correct polymorphic shape of the filament when thrust is applied at the base of the flagellum preventing that polymorphic changes in the hook are transmitted to the filament (Fahrner et al. 1994). In addition, it may also serve to reduce structural differences between the central core parts of the hook and the filament.

In *Rhodobacter sphaeroides* HAP1 (HAP1_{RS}) is about three times larger than its homologue in *S. enterica* serovar Typhimurium (González-Pedrajo et al. 2002). Both terminal domains in HAP1_{RS} are well conserved. This protein includes a unique central region of (860-aa) that is not widely distributed among other microorganisms. Besides, the flagellar region in which this protein must be localized appears as a thick ring under the electron microscope (West and Dreyfus 1997; Kobayashi et al. 2003).

In this work we investigated the role of this central portion of the unusually large HAP1_{RS} by monitoring the effects of serial deletions in *flgK*_{RS}, on swimming and swarming. Two deletion mutants did not assemble functional flagella, two were paralyzed and five exhibited reduced free-swimming speeds. Some mutants produced unusual swarming patterns on soft agar without or with Ficoll 400.

Materials and methods

Strains, plasmids, and oligonucleotides

Table 1 shows the bacterial strains, plasmids, and oligonucleotides used in this work.

Media and growth conditions

Cell cultures of *R. sphaeroides* were grown aerobically in liquid Sistro's medium (Sistro 1962) at 30°C under vigorous agitation. Motility plates were prepared using different agar concentrations: 0.18, 0.19, 0.2, 0.22, 0.24, 0.26, 0.28, and 0.3%. Where indicated, plates were added with Ficoll 400 (Sigma, St Louis, MO USA) at a concentration of 1.25 mg/ml. This polysaccharide might increase the stability of HAP1_{RS} since it is known that agents that increase the molecular crowding also have a positive effect on the structural stability of some proteins (Stagg et al. 2007). When required the following antibiotics were added at the concentrations indicated, nalidixic acid, 20 µg/ml, spectinomycin 50 µg/ml, tetracycline 1 µg/ml. Strains of *Escherichia coli* were grown in Luria-Bertani medium (Ausubel et al. 1987). When needed, antibiotics were added at the following concentrations: spectinomycin, 50 µg/ml, gentamycin, 30 µg/ml, ampicillin, 200 µg/ml, tetracycline, 25 µg/ml, and kanamycin 25 µg/ml. Standard molecular biology techniques were used for the isolation and purification of chromosomal DNA from *R. sphaeroides* WS8-N (Ausubel et al. 1987). Plasmid DNA and PCR fragments were purified with the QIAprep Spin and QIAquick PCR kits, respectively (QIAGEN GmbH).

DC1 (WS8- Δ *flgK*_{RS}) strain isolation

We had previously obtained a mutation in *flgK*_{RS} by inserting in a unique *Cla*I restriction site the *aadA* gene, which confers resistance to spectinomycin (Metcalfe and Wanner 1993). In order to obtain a null *flgK*_{RS} mutant, a pair of oligonucleotides (FwmutD and RvmutD) were used to amplify an 830 bp segment upstream *flgK*_{RS}, including an intergenic region of 107 bp located between a possible sigma 28 promoter region and the start codon of *flgK*_{RS}. A second pair of oligonucleotides, Fwmut2 and Rvmut2 were used to amplify 750 bp that include the last 18 bp and stop

Table 1 Bacterial strains, plasmids and oligonucleotides used in this study

Strains, plasmids and oligonucleotides	Relevant characteristics	Source or reference
Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
M15	<i>thi</i> ⁻ , <i>lac</i> ⁻ , <i>ara</i> ⁺ , <i>gal</i> ⁺ , <i>mtl</i> ⁻ , F ⁻ , <i>recA</i> ⁺ , <i>uvr</i> ⁺ , <i>lon</i> ⁺ .; pREP4/Kan ^r	Qiagen
JM103	<i>hsdR4</i> Δ(<i>lac-pro</i>) F' <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q Z ΔM15	Ausubel et al. (1987)
S17-1	<i>recA endA thi hsdR RP4-2 Tc::My::Tn7, Tp^R Sm^R</i>	Simon et al. (1983)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>		
WS8-N	Wild-type strain, spontaneous Nal ^r	Sockett et al. (1990)
DC1	WS8-N derivative; Δ <i>flgK</i> allelic reversion	This study
Plasmids		
DC <i>flgK</i> _{RS-1}	<i>flgK</i> Δ300 (720–1,020 bp) cloned into <i>HindIII/EcoRI</i> sites of pRK415, Tet ^r	This study
DC <i>flgK</i> _{RS-2}	<i>flgK</i> Δ300 (1,020–1,320 bp) cloned into <i>HindIII/EcoRI</i> sites of pRK415, Tet ^r	This study
DC <i>flgK</i> _{RS-3}	<i>flgK</i> Δ300 (1,320–1,620 bp) cloned into <i>HindIII/EcoRI</i> sites of pRK415, Tet ^r	This study
DC <i>flgK</i> _{RS-4}	<i>flgK</i> Δ300 (1,620–1,920 bp) cloned into <i>HindIII/EcoRI</i> sites of pRK415, Tet ^r	This study
DC <i>flgK</i> _{RS-5}	<i>flgK</i> Δ300 (1,920–2,220 bp) cloned into <i>HindIII/EcoRI</i> sites of pRK415, Tet ^r	This study
DC <i>flgK</i> _{RS-6}	<i>flgK</i> Δ300 (2,220–2,520 bp) cloned into <i>HindIII/EcoRI</i> sites of pRK415, Tet ^r	This study
DC <i>flgK</i> _{RS-7}	<i>flgK</i> Δ300 (2,520–2,820 bp) cloned into <i>HindIII/EcoRI</i> sites of pRK415, Tet ^r	This study
DC <i>flgK</i> _{RS-8}	<i>flgK</i> Δ300 (2,820–3,120 bp) cloned into <i>HindIII/EcoRI</i> sites of pRK415, Tet ^r	This study
DC <i>flgK</i> _{RS-9}	<i>flgK</i> Δ300 (3,120–3,320 bp) cloned into <i>HindIII/EcoRI</i> sites of pRK415, Tet ^r	This study
DC <i>flgK</i> _{RS-10}	<i>flgK</i> Δ300 (3,420–3,720 bp) cloned into <i>HindIII/EcoRI</i> sites of pRK415, Tet ^r	This study
<i>flgK</i> _{RS} WT	<i>flgK</i> _{WT} 4,092 bp from pBG506B, cloned into <i>HindIII/EcoRI</i> sites of pRK415, Tet ^r	This study
Δ2.6 K	<i>flgK</i> Δ2.6 kb, cloned into <i>HindIII/EcoRI</i> sites of pRK415, Tet ^r	This study
MutD	830 bp upstream <i>flgK</i> from pBG506B, cloned into <i>SalI/SmaI</i> sites of pTZ19R, Ap ^r	This study
Mut2	750 bp of <i>flgK</i> from pBG506B, cloned into <i>EcoRI/SmaI</i> sites of pTZ19R, Ap ^r	This study
MutD/2	750 bp from Mut2, subcloned into <i>ClaI/SmaI</i> sites of MutD, Ap ^r	This study
CMutD/2	<i>MutD/2</i> , 1.58 kb from MutD/2 subcloned into <i>SmaI/SalI</i> sites of pJQ200mp18 Gm ^r	This study
OvrFlgK	<i>flgK</i> _{WT} 4,092 bp cloned into <i>KpnI/HindIII</i> sites of pQE-30, His ₆ Tag	This study
pTZ19R	Cloning vector, Ap ^r ; pUC derivative	Pharmacia
pRK415	pRK404 derivative; <i>lacZ mob</i> ⁺ ; <i>Tc</i> ^r	Keen et al. (1988)
pJQ200mp18	Mobilizable suicide vector, Gm ^r	Quandt and Hynes (1993)
pBG506A	5.9 kb from WS8-N subcloned into <i>SalI</i> sites of pTZ19R, Ap ^r	González-Pedrajo et al. (2002)
pQE-30	Expression vector; Ap ^r N-terminal His ₆ tag	Qiagen

Table 1 continued

Strains, plasmids and oligonucleotides	Relevant characteristics	Source or reference
Oligonucleotides		
FwmutD	5'-ACGCGTCGACCCCGCGCCGCCCGTGCCAGGGTGGTG-3'	This study
RvmutD	5'-TCCCCGGG ATCGATGGCGATGTCGAGGATGGACAA-3'	This study
Fwmut2	5'-CCGGAATTC ATCGATACCCTCCTGAACGCGCTGTGA-3'	This study
Rvmut2	5'-TCCCCGGGCCCCGTCAGGGTGAAGCGCACCGTG-3'	This study
WTL1	5'-CCCAAGCTTTTGTCCATCCTCGACATCGCCCGTT-3'	This study
WTL2	5'-CCGGAATTCACAGCGGTTTCAGGAGGGTTTC-3'	This study
Ovr1	5'-ACATGCATGCTTCATCCTCGACATCGCCCGTT-3'	This study
Ovr2	5'-CCCAAGCTTTCACAGCGGTTTCAGGAGGGTTTC-3'	This study
SOE1Rv	5'-GTCGAAGGCCACCACCGACGTCCCTCGAGCAGCAG-3'	This study
SOE1Fw	5'-CTGCTGCTCGAGGGGACGTCGGTGGTGGCCTTCGAC-3'	This study
SOE2Rv	5'-CACGAACGTCGCCTGCGCCGCGCCCGTGCCCG-3'	This study
SOE2Fw	5'-CGGGGACGCGGCGCGGCGCAGGCGACGTTCTGTG-3'	This study
SOE3Rv	5'-CCCGGCATTCAGCGCCGCGACCCCGCATTGCCGCT-3'	This study
SOE3Fw	5'-AGCGGCAATGCGGGGTCGCGGCGCTGAATGCCGGG-3'	This study
SOE4Rv	5'-CAGCGTCGAGGCATCGTAGGCCAGAGTGGCCGGGTC-3'	This study
SOE4Fw	5'-GACCCGCCACTCTGGCCTACGATGCCTCGACGCTG-3'	This study
SOE5Rv	5'-GCCGTGCGCGGGGACCGCGCCCGGCAGGAAGCC-3'	This study
SOE5Fw	5'-CCGGGCGCGGTCCCCCGCGACGGCACGCTCACG-3'	This study
SOE6Rv	5'-GAAGCGCGCGCTGTCGGCCGCTCGATCGTGACGCC-3'	This study
SOE6Fw	5'-GGCGTCACGATCGAGGCGGCCGACAGCGCGCGCTTC-3'	This study
SOE7Rv	5'-CGCCGAGGCCACGCCGCGCGTGCCTCGACAAGGTGAG-3'	This study
SOE7Fw	5'-CTCACCTTGTGCGGCACGGCCGCGTGGCCTCGGCG-3'	This study
SOE8Rv	5'-CGAGACCGGTGCGTCGGCCCCGTCGCTCACGCCCGC-3'	This study
SOE8Fw	5'-GCGGGCGTGAGCGACGGGGCCGACGCACCGGTCTCG-3'	This study
SOE9Rv	5'-GACGGGCGCGCCGGTGGTCGCCGCCAGTCCGAAGGC-3'	This study
SOE9Fw	5'-GCCTTCGACTGGCGGCGACCACCGCGCGCCCGTC-3'	This study
SOE10Rv	5'-GGCGAGCGTGCCCGTCAGGGAGGTGAGGTCCAGCGC-3'	This study
SOE10Fw	5'-GCGCTGGTCTCACCTCCCTGACGGGCACGCTCGCC-3'	This study

Fw, forward; Rv, reverse

codon of *flgK_{RS}* as well as the first half of *flgL_{RS}*. The PCR products were cloned into the suicide vector pJQ200mp18 (Quandt and Hynes 1993) which was introduced into WS8 *flgK_{RS}::aadA* strain for allelic replacement by diparental conjugation using S17-1 strain as described previously (Davis et al. 1988).

Genetic dissection of *flgK_{RS}*

Sequential deletions of 300 bp were constructed using the Single Overlap Extension-PCR (SOE) technique as described previously (Ho et al. 1989; Horton et al. 1989, 1990; Warrens et al. 1997). Oligonucleotides

(Sigma Genosys) matching 5' and 3' ends of *flgK_{RS}* (WTL1 and WTL2) were designed to amplify the deletion flanking fragments and used as well for overlapping reactions. Initial amplification of 5' independent DNA fragments was performed using the following oligonucleotide pairs: WTL1 and SOE1 to SOE10Rv. On the other hand, SOE1 to SOE10Fw and WTL2 were used to amplify the corresponding 3' DNA fragments. The amplified segments were purified and mixed at an equimolar ratio and used as templates for a second PCR amplification with primers WTL1 and WTL2 in order to obtain the 300 bp deletion products. PCR reactions were carried

out on a PTC-200 gradient thermocycler (MJ Research). Two different DNA polymerases (Expand Long Template Roche, Pfu-turbo and native Pfu Stratagene) were used in order to obtain maximum yields. PCR products DC*flgK_{RS}*-1 to DC*flgK_{RS}*-10 were sequenced in order to confirm the presence of the desired deletion. The resulting SOE products were subcloned into pRK415 for diparental conjugation into *R. sphaeroides* DC1 (Davis et al. 1988).

Overexpression and purification of HAP1

Wild type *flgK_{RS}* was amplified from pBG506A by PCR using oligonucleotides Ovr1 and Ovr2. The PCR product was subcloned in pQE-30 (Qiagen). Strain M15 (pREP4) was transformed with the resulting construction. Cells (M15pREP4/pQE-30 *flgK_{RS}*WT) were grown at 37°C to an optical density of 0.5 (OD₆₀₀). At this point, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added at a final concentration of 0.1 mM, and cell growth was continued for 2 h at 25°C after which the cells were harvested and sonicated. Cell debris, were removed by centrifugation. The supernatant was incubated with nickel-Sephacryl beads for 2 h and washed several times with 20 mM imidazole. The protein was eluted with 150 mM imidazole and concentrated by centrifugation using a 30 kDa Amicon filter (Millipore, Bedford MA, USA). The concentrated sample was further purified by molecular sieve filtration using a Sephacryl-200 filtration column (Pharmacia). The collected fractions were analyzed for protein purity using the methods described by Lowry et al. (1951) and Laemmli (1970) respectively. Polyclonal anti-HAP1_{RS} antibodies were raised in rabbits according to standard procedures (Harlow and Lane 1988). Two male New Zealand rabbits were inoculated two times with Freund's complete adjuvant. The inoculation volume was 1 ml containing 37 μg of pure HAP1_{RS} in 500 μl of PBS + 500 μl of Freund's complete adjuvant. Inoculations were separated by 2-week intervals. Bleeding of the rabbits was performed after 3 weeks had passed from the second inoculation. Antisera were frozen at -70°C until used.

HAP1 secretion analysis

Heterotrophic cultures of the mutant strains DC*flgK_{RS}*-1 to DC*flgK_{RS}*-10, Δ2.6 K strain,

complemented strain (DC1 + *flgK_{RS}*WT), WS8 and DC1 (WS8-Δ*flgK_{RS}*), were grown overnight at 30°C in 10 ml of Siström's medium. Cell suspension (1 ml aliquots) were taken from cultures and centrifuged at 1,700g for 1 min. Cell pellets were suspended in 500 μl of SDS-PAGE loading buffer and the SDS-PAGE gel loaded with 10 μl. The resulting supernatants were precipitated with MetOH/chloroform as described elsewhere (Wessel and Flugge 1984). Subsequently, the protein pellets of the supernatants were dried by vacuum evaporation and resuspended in 50 μl of SDS-PAGE loading buffer. After SDS-PAGE, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes and incubated with a 1:10000 solution of anti-HAP1_{RS} antiserum for 1 h and developed by using Super Signal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce).

Motility assays

A 2 μl sample of a stationary phase culture was placed on the surface of swarm plates. Soft agar plates (0.18, 0.19, 0.2, 0.22, 0.24, 0.26, 0.28, and 0.3%) were supplemented when indicated, with Ficoll 400 (Sigma) at a concentration of 1.25 mg/ml and incubated aerobically in the dark at 30°C. Swarming ability was determined as the capability of bacteria to move concentrically away from the inoculation point after 48 h of incubation.

Swimming speed and tracking analysis

Cell cultures of DC*flgK_{RS}*-1 to DC*flgK_{RS}*-10, WS8, DC1, and DC1 + *flgK_{RS}*WT (10 ml) were grown in Siström's medium under heterotrophic conditions at 30°C to an optical density of 0.9–1.0 (OD₆₀₀). Aliquots (2 μl) were taken for observation in a high intensity dark field microscope (Olympus BH2) and filmed using a CV-S3200 digital camera (JAI Corp., Japan) and recorded with a DCR-TRV340 Handycam Hi-8 digital camcorder (SONY Corp.). Clips of 5 s were transferred using Imovie 6.0.3v. (Apple Computers). The chosen clips were compressed into 15 frames/s and saved as a mov format (Quicktime 7.1.3v). The video files were recorded and compressed as previously described for scale calibration using a calibrated slide rule (Graticules Ltd, Tonbridge, UK). Five files of each strain were analyzed using the manual tracking plug-in of ImageJ 1.3.2v

(Fabrice Cordeliers, Institut Curie, Orsay, Rasband, WS., ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997–2008). Velocity data sheets were transferred into Prism 4.1v for statistic analysis. The average swimming speed was determined from ten independent measurements per culture of each mutant strain and the culture repeated three times.

Electron microscopy

Electron microscopy images were obtained from negatively stained preparations on coated-carbon grids. Cultures were grown for 16 h under heterotrophic conditions centrifuged and washed with 10 mM HEPES buffer (pH 7.0). A drop of washed cells was placed over a grid and stained using a 1% uranyl acetate solution for 10 min, dried at room temperature and observed at 120 KV with a JEM-1200EXII JEOL electron microscope (JEOL Ltd, Japan).

Results

Isolation and characterization of mutant *flgK_{RS}*

A strain carrying a lesion in *flgK_{RS}* was isolated substituting most of the coding region of *flgK_{RS}* with a non-polar cassette that encodes the *aadA* gene (Metcalf and Wanner 1993). In addition, we isolated a non-marked deletion of *flgK_{RS}* as described in “Materials and methods”. This last strain was called DC1 and it showed a Fla[−] phenotype. The Fla⁺ phenotype was restored after complementation with the complete *flgK_{RS}WT* gene cloned in pRK415. In contrast, no complementation was observed when the plasmid carried *flgK_{RS}* lacking the central region of 860aa (Δ 2.6 K).

Analysis of the central region of *flgK_{RS}*

A schematic representation of the conserved N- and C-termini of HAP1 proteins from various bacterial species is shown in Fig. 1a. The N-terminal region of HAP1_{RS} includes a striped region that showed a much lower similarity with the same region of other homologous proteins. It also should be noted that the N-terminal region of several axial flagellar proteins, (FlgC, FlgG, and FlgE) also aligns with

HAP1_{RS}. A certain degree of similarity within the N- and C-termini of HAP1_{RS} was found with other axial components such as FlgC, FlgG (rod), and FlgE (hook) from various microorganisms including enterics and several proteobacteria (Homma et al. 1990a, b).

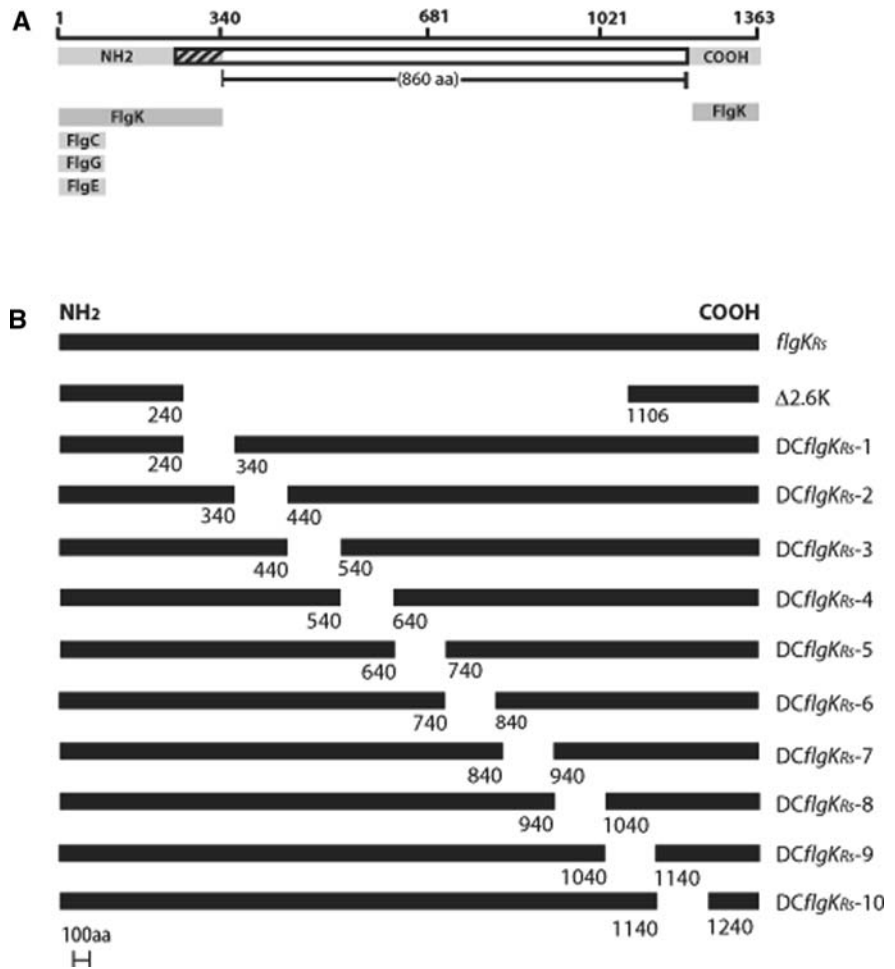
In order to understand the role of the large non-conserved intervening region present in HAP1_{RS}, scanning deletions of 300 bp were constructed over the central region of *flgK_{RS}*. Fig. 1b, shows schematically the deleted sections for each of the ten mutants (DC*flgK_{RS}*-1 to 10) obtained by the Single Overlap Extension method (see “Materials and methods” for details).

Cell supernatants and cell extracts of the ten DC*flgK_{RS}* mutants were incubated in the presence of a mixture of methanol/ethanol, the precipitated material was analyzed for the presence of HAP1_{RS} by western-blot. Fig. 2a shows the presence of HAP1_{RS} revealed by anti-FlgK polyclonal antibodies in the wild type strain WS8, the complemented mutant DC1 + *flgK_{RS}WT*, and nine of the ten DC*flgK_{RS}* mutants (DC*flgK_{RS}*-2 to 10). The expected apparent molecular mass of 123 kDa was observed for HAP1_{RS} expressed by the nine mutants. In contrast, wild-type HAP1_{RS}, shows a slightly higher molecular mass of 136 kDa. It should be noted that residues 240–340 (DC*flgK_{RS}*-1) seem to be critical for the stability of HAP1_{RS} given that the deletion of this region did not allow the detection of HAP1_{RS} in either the soluble or the cellular fraction. The presence of hook-filament structures in all these strains was confirmed by electron microscopy. Fig. 2b shows that the complemented strain as well as nine mutants (DC*flgK_{RS}*-2 to 10) assemble a hook-filament structure similar to that of the wild-type WS8 and complemented strains.

Functional analysis of the *flgK_{RS}Δ₃₀₀* alleles

We analyzed the swimming speed and behavior of the wild-type WS8 cells, the complemented mutant (DC1 + *flgK_{RS}WT*), and the nine DC*flgK_{RS}* mutants that assemble a hook-filament in liquid media. Initially, we determined that under our experimental conditions, WS8 cells display average swimming speed of 59.6 μ m/s, whereas the complemented mutant (DC1 + *flgK_{RS}WT*) showed an average swimming speed of 30.7 μ m/s (Table 2). The lower swimming speed of this control strain compared to

Fig. 1 Schematic representation of HAP1_{RS} with the corresponding serial deletions. **a** Structural organization of HAP1_{RS}. According to a BLAST search using HAP1_{RS} as a query the N- and C-termini are well conserved and show homology with various flagellar axial proteins represented as *grey bars*. **b** Schematic representation of the HAP1_{RS} protein and sequential deletions carried out by Single Overlap Extension PCR of the inner non-conserved segment. Serial deletions of 100-aa, were performed using homologous sense and antisense primers. *Solid lines* represent the flanking regions for each of the constructs listed in Table 1 (length in aa)



wild-type cells could be due to the higher copy number of HAP1_{RS} that the vector produces. Possibly altering the physiology of the cell.

Table 2 also shows that only seven of the nine DCflgKR₅ mutants that assemble a hook-filament in liquid media were able to swim. When compared with WS8, it was detected that all the mutants consistently develop lower swimming speeds. A first group of mutant strains that include DCflgKR₅-3 and DCflgKR₅-8 show swimming velocities of 30.4 and 30.2 μm/s, respectively. Mutant strains DCflgKR₅-4, DCflgKR₅-9, and DCflgKR₅-10 conform a second group, which displayed swimming speed values showed swimming velocities of 16.8, 22.7, and 27.7 μm/s, respectively. And a third group that includes DCflgKR₅-2 and DCflgKR₅-7 were unable to swim regardless of the presence of a structured flagellum.

In addition to the determination of swimming speed we analyzed the swimming pattern by high

intensity dark field microscopy and most of the mutants showed a curved, “shaky” pattern with many tumbling events. The mutant strains show stop frequencies that range between 1.6 and 3.6 stop events/s. This contrasts with the normal trajectory and tumbling frequency of the wild type WS8 and complemented strains which show stop frequencies ranging between 0.45 and 0.48 stop events/s. Fig. 3 shows representative samples of the swimming trajectories of wild-type WS8 cells, the complemented strain (DC1 + flgKR₅WT), as well as the seven DCflgKR₅ mutants that were able to swim in liquid media. Cell tracking and determination of swimming speeds were carried out as described in “Materials and methods”.

Given that not all the mutants that express hook-filament structures were able to swim in liquid media, we analyzed the swarming capacity in semi-solid agar plates, of the nine DCflgKR₅ mutants. Agar

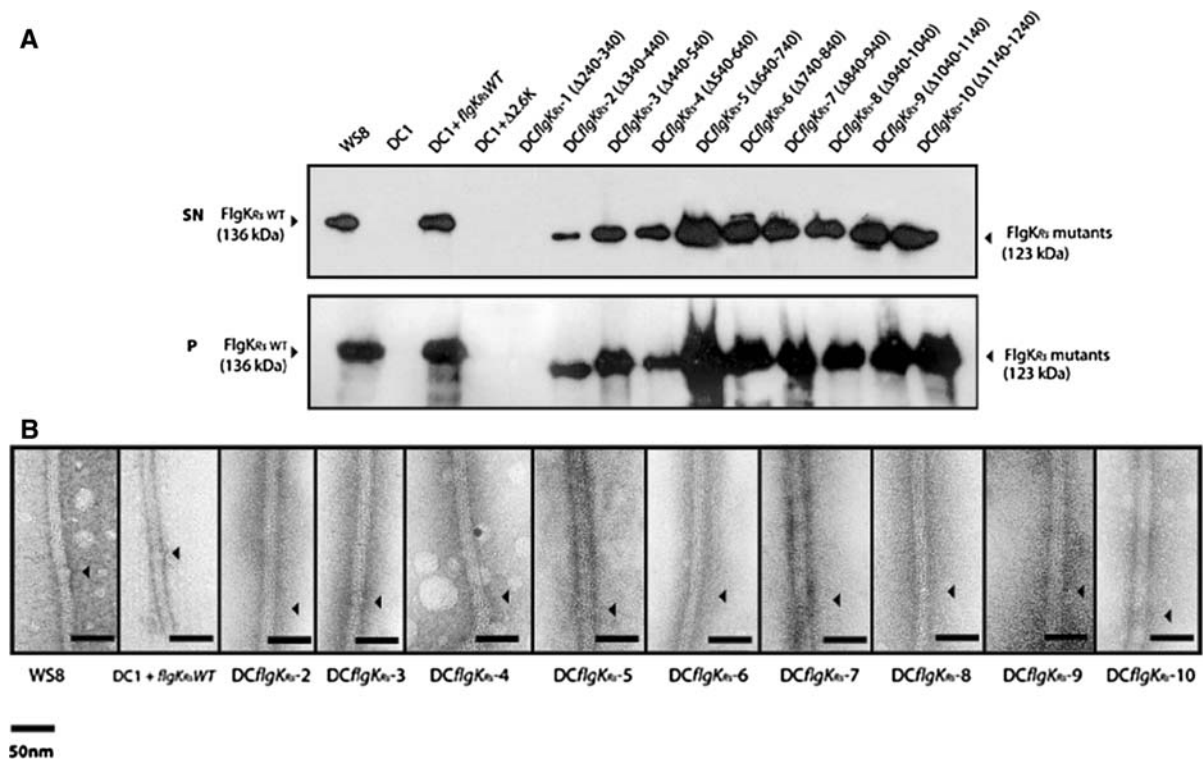


Fig. 2 Western blot, and filament structure of control and various DC*flgK_{RS}* mutant strains. **a** Western-blot analysis, SDS-PAGE 10% gels were loaded with the supernatant (SN) from centrifuged cell cultures and with the pellets (P) of the centrifuged cell cultures as indicated under “Materials and methods”. The separated proteins were transferred to nitrocellulose sheets and incubated with anti-HAP1_{RS} antibodies

(1:10000) as described under “Materials and methods”. **b** Electron micrographs of hook-filament structures of control and DC*flgK_{RS}* mutant strains were obtained as described in “Materials and methods”. Samples were observed with a JEOL JEM-1200EXII electron microscope *bar* 50 nm. *Arrow* indicates hook-filament junction. No evident morphological differences could be observed among the mutant and WT strain

concentration in either the absence or presence of Ficoll 400 (1.25 mg/ml) was increased from 0.18 to 0.3%. Under these conditions the mutant strains can also be grouped into three categories according to their swarming performance. WS8 and the complemented (DC1 + *flgK_{RS}* WT) strain were used as controls. The first group includes DC*flgK_{RS}*-4, DC*flgK_{RS}*-5, and DC*flgK_{RS}*-10, these strains showed linear decrease of the swarming capacity as agar concentration was increased regardless of the presence of Ficoll (data not shown). Fig. 4 shows the swarming performance of mutants that displayed the most biased or anomalous swarming behavior as compared to the WS8 wild type or DC1 + *flgK_{RS}* WT. The second group includes mutants DC*flgK_{RS}*-2, DC*flgK_{RS}*-6, and DC*flgK_{RS}*-8 that improved their swarming capacity moderately in the presence of

Ficoll (Fig. 4). The last group includes DC*flgK_{RS}*-3, DC*flgK_{RS}*-7, and DC*flgK_{RS}*-9 showed a substantial increase in swarming diameter in the presence of Ficoll. The most dramatic effect was observed for DC*flgK_{RS}*-7. This strain formed a reduced swarm ring at any of the agar concentrations tested, in agreement with the fact that it was unable to swim in liquid medium (see Table 2).

In addition, DC*flgK_{RS}*-3 and DC*flgK_{RS}*-9 showed a larger expansion of the swarm ring at the lowest agar concentration of 0.18%. It should also be noticed that 0.22% agar in the presence of Ficoll is the condition where the largest swarm diameter for DC*flgK_{RS}*-7 was observed. We have no explanation for the marked drop in swarming ability at 0.19% agar observed for DC*flgK_{RS}*-3 and DC*flgK_{RS}*-9, but we can suggest that 0.18 and 0.22% agar could represent the best

Table 2 Average swimming speeds, Fla phenotype and swimming patterns of WS8 wild-type strain and HAP1_{RS} (DCflgK_{RS}-1 to 10) mutants

The reported values are the average and standard deviation of measurements of ten cells of three independent cultures

Strain	Average swimming speed (μm/s)	Phenotype (Fla)	Swimming pattern
WS8-N	59.6 ± 2.8	+	Normal
DC1	–	–	–
DC1 + flgK _{RS} WT	30.7 ± 5.1	+	Normal
Δ2.6 K (Δ 856)	–	–	–
DCflgK _{RS} -1 (Δ240–340)	–	–	–
DCflgK _{RS} -2 (Δ340–440)	–	+	–
DCflgK _{RS} -3 (Δ440–540)	30.4 ± 7.3	+	Curved, shaky
DCflgK _{RS} -4 (Δ540–640)	16.8 ± 1.7	+	Highly curved, shaky
DCflgK _{RS} -5 (Δ640–740)	24.4 ± 5.9	+	Curved, shaky
DCflgK _{RS} -6 (Δ740–840)	19.5 ± 4.2	+	Curved, shaky
DCflgK _{RS} -7 (Δ840–940)	–	+	–
DCflgK _{RS} -8 (Δ940–1,040)	30.2 ± 3.2	+	Slightly curved, shaky
DCflgK _{RS} -9 (Δ1,040–1,140)	22.7 ± 6.4	+	Slightly curved, shaky
DCflgK _{RS} -10 (Δ1,140–1,240)	27.7±0.5	+	Slightly curved

condition of wetness that allows swarming of these strains (Wang et al. 2005; Chen et al. 2007). Another possibility to explain the expansion of the swarming ring at low agar concentrations (0.18%) could be for instance: if the mechanical properties of the flagellar filament were compromised it could be expected that at the lowest agar concentration, a favorable and less stringent condition for swarming could be achieved. In agreement with this notion, it has been reported that mutants carrying point substitutions in HAP3_{St} (FlgL) are able to form swarm rings at an agar concentration of 0.16% but not at 0.28% (Fahrner et al. 1994).

Discussion

General features of the central region of HAP1_{RS}

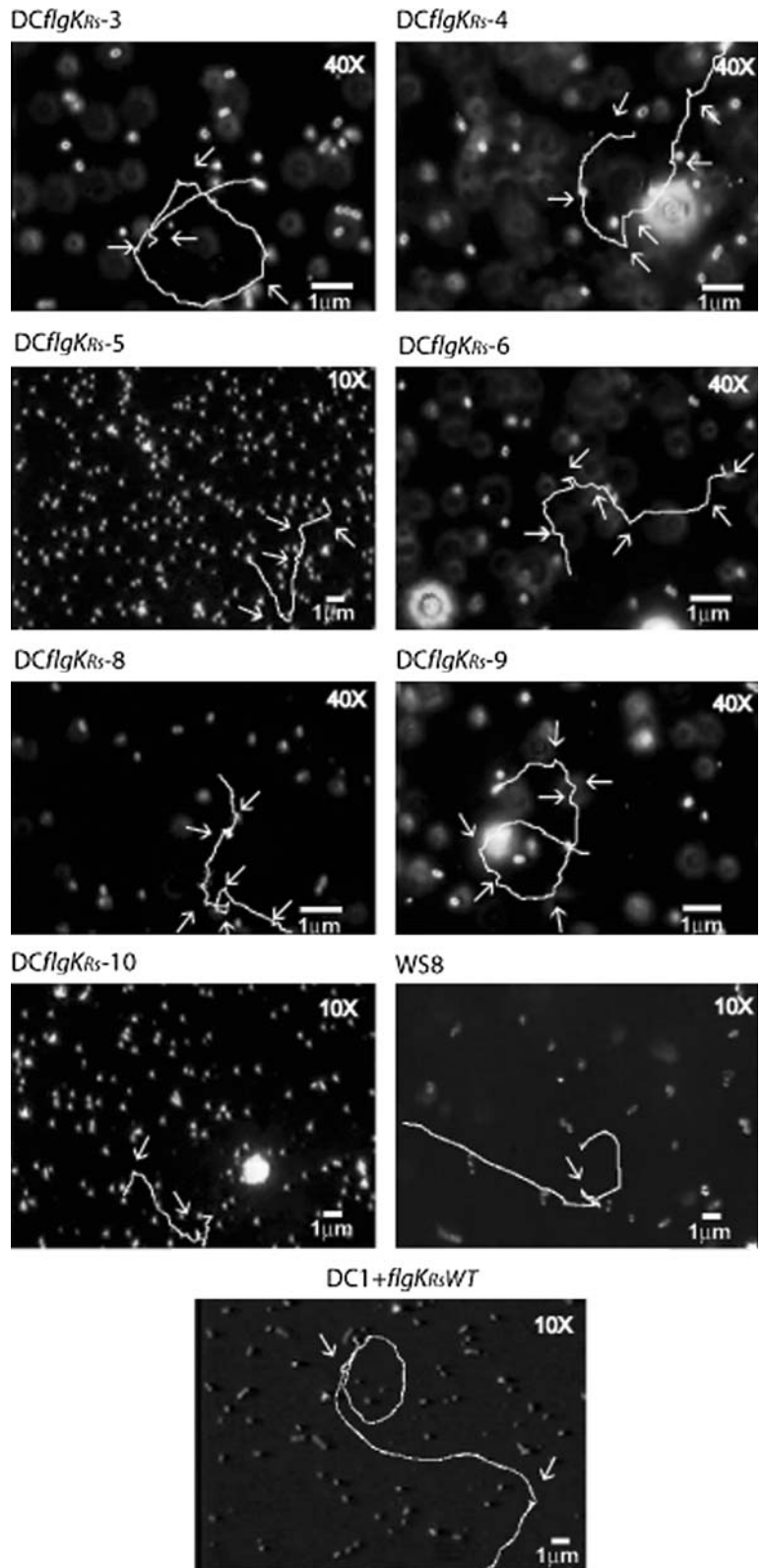
Even though HAP1_{RS} shows important similarity at the N- and C-termini with HAP1 proteins from various bacterial species, only a limited number of bacterial species possess such a long HAP1 protein. Some *R. sphaeroides* strains also show a high degree of similarity with the protein described in this work. These other HAP1_{RS} counterparts are: HAP1_{RS} 2.4.1 (99% identity), HAP1_{RS} ATCC17029 (98% identity), HAP1_{RS} ATCC17028 (71% identity). We have detected three other α-proteobacteria that possess HAP1 proteins similar in length but with a lower

degree of similarity to the one described in this work: *Roseovarius* sp. TM 1035 (41% identity), *Loktanel-la vesfoldensis* SKA53 (32% identity), and *Octadecabacter antarcticus* 307 (31% identity). The major differences between these sequences occur within the central region of HAP1.

A careful amino acid alignment of the central sequence of HAP1_{RS} comprising residues 640–880 (which runs from the start of DCflgK_{RS}-5 to the mid region of DCflgK_{RS}-9), overlaps with the central variable sequences of flagellin from: *Shewanella* sp. MR-4 (38% identity), *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707 (35% identity), *Verminephobacter eisenie* EF01-2 (34%), *R. sphaeroides* ATCC 17025 (34% identity), *Marinobacter aquaeolei* VT8 (33% identity), FliC-B *Shewanella benthica* KT99, (33% identity), *Azoarcus* sp. BH72 (32% identity), *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (32% identity), *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* AAC00-1 (31% identity) and *Marinobacter algicola* DG893 (30% identity).

Given that the central domain of HAP1_{RS} shows significant similarity with flagellins from multiple species of microorganisms we believe that some structural features from flagellin could be shared with the central domain of HAP1_{RS}. The 3D structure of *S. enterica* serovar Typhimurium flagellin (PDB 1UCU) shows four characteristic globular domains, termed D0, D1, D2, (with subdomains D2a and D2b), and D3 (Mimori et al. 1995). D0 forms the inner core of the

Fig. 3 Swimming pattern and trajectories of various *DCflgK_{RS}* mutants and control strains. Swimming was carried out in liquid media and cell tracking was performed as described in “Materials and methods”. Each video sequence lasts 5 s in all cases and were analyzed using the manual tracking plug-in of ImageJ 1.3.2v. Different field magnifications were used in order to follow cells displaying faster and longer trajectories. *Arrows* indicate tumbling events. Tracks are individual samples of several observations of each mutant



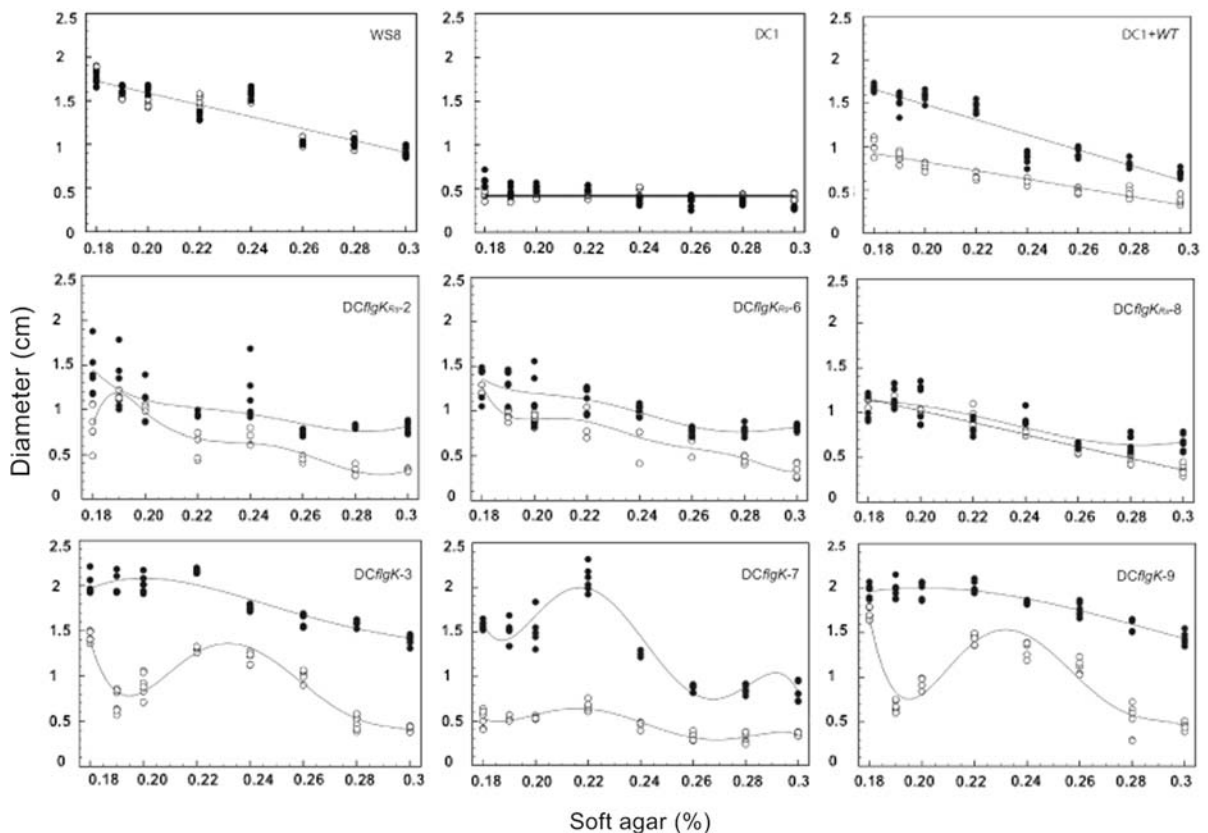


Fig. 4 Swarming performance of various *DCflgK_{RS}* mutants on soft agar plates in the absence or presence of Ficol 400. Freshly prepared agar plates were inoculated with 2 μ l of cell cultures of control and mutant strains and incubated 48 h at 30°C. Swarming diameter of each mutant was recorded for each of the soft agar concentrations ($n = 6$). Plain soft agar (*open circles*) soft agar + Ficol 400 (*closed circles*). The swarming diameter for WS8 decreases linearly from 0.18 to 0.3% agar \pm Ficol 400. WS8 has an average diameter of 1.79 ± 0.049 cm for 0.18% and 0.9 ± 0.004 cm for 0.3%

filament, D1 forms the outer core, and domains D2 and D3 form a knob-like projection on the filament surface (Samatey et al. 2000, 2001). The D3 domain is where most of the variable central sequences are located (Mimori-Kiyosue et al. 1998). D0 and the N- and C-termini of D1 are highly conserved in various bacterial species, and could also be involved in assembly and export (Aizawa et al. 1990; Mimori-Kiyosue et al. 1997; Yonekura et al. 2000, 2002; Gal et al. 2006). Studies on flagellin from different bacteria, suggest that the central sequences (D3) are apparently not essential for the assembly of the

agar, when supplemented with Ficol 400 1.77 ± 0.026 cm and 0.92 ± 0.02 cm, respectively. For DC1 in soft agar, average diameters were: 0.42 ± 0.007 cm for 0.18% and 0.39 ± 0.008 for 0.3%, respectively. In the presence of Ficol 400 the diameters were 0.58 ± 0.025 and 0.27 ± 0.0008 for 0.18% and 0.3%. For DC1 + WT in soft agar, the average swimming diameters were: 1.02 ± 0.044 cm for 0.18% and 0.37 ± 0.011 for 0.3%. When Ficol 400 was added, diameters were: 1.67 ± 0.007 cm and 0.69 ± 0.01 cm, respectively

filament structure (Kuwajima 1988; Scharf et al. 2001); however, the central region is important for motility as the analysis of different flagellin mutants has shown: varying reductions in swimming speed and swarming diameters were observed in several mutants where various residues in D2 and D3 were deleted (Malapaka et al. 2007). Our results indicate that the central region of HAP1_{RS} (640–880 aa) shares this property with the central region of flagellin, i.e., is not essential for flagellar assembly but it affects motility.

The peculiarity of the central sequence in HAP1_{RS} rests not only in its size but also in its internal

arrangement. The search for internal repeats in HAP1_{RS} was carried out using SMART (Schultz et al. 1998) (Simple Modular Architecture Research Tool <http://smart.embl-heidelberg.de/>). With this algorithm we detected that the sequence stretch that runs from residue 1,047 to 1,109, matches with a N-terminal proximal segment running from residue 959 to 1,021. Using these motifs in a BLAST query, we found that another region of HAP1_{RS} (that runs from 203 to 264) is similar to these segments. This could suggest that a sequence was inserted repetitively or duplicated along the inner domain of HAP1_{RS} of this bacterial lineage.

Structural and functional features of the central sequence of HAP1

Complementation of a Δ *flgK_{RS}* strain with DC*flgK_{RS}*-1 renders non-motile cells, which are in fact Fla⁻. This phenotype could be explained if HAP1_{RS} lacking residues 240–340, becomes particularly unstable and prone to degradation. The use of polyclonal antibodies and the inability to detect HAP1_{RS} by immunoblotting from the two fractions tested (i.e., total cell extract and culture supernatant precipitated with methanol) make this possibility the most likely to explain this phenotype.

Swimming speeds obtained by cell tracking of the DC*flgK_{RS}* mutants revealed that some of the strains were unable to swim while others showed variable swimming speeds. In particular DC*flgK_{RS}*-2 and DC*flgK_{RS}*-7 were unable to swim in liquid media. The rest of the mutants showed swimming speeds that ranged from 16.8 to 30.4 μ m/s as well as trajectories that varied in pattern and frequency of tumbling events. This could reflect the variability of the ability of the mutant HAP1_{RS} proteins to handle the load exerted by motor rotation.

The swarming ability of these mutants was also characterized in agar plates in the presence or absence of Ficoll. This reagent was chosen given that this polysaccharide might increase the stability of HAP1_{RS} since it is known that agents that increase the molecular crowding also have a positive effect on the structural stability of some proteins (Stagg et al. 2007). In addition, it could also contribute to stabilize HAP1_{RS} during flagellar rotation. Mutants that improved their swarming ability in the presence of Ficoll are DC*flgK_{RS}*-3, DC*flgK_{RS}*-7, and DC*flgK_{RS}*-9.

We presume that in these cases, the lack of segments 440–540, 840–940, and 1,040–1,140, should have a profound effect on the stability of HAP1_{RS} during flagellar rotation that is compensated by the presence of Ficoll. On the other hand, other mutants are able to swim and are not severely affected in their swarming ability (like DC*flgK_{RS}*-5, 8, and 9) in this case the lack of the segments 640–740, 940–1,040, and 1,040–1,140 affect HAP1_{RS} in a lesser degree.

Acknowledgments We thank Bertha González-Pedrajo, Diego González-Halphen and Dimitris Georgellis for helpful discussions. Aurora Osorio and Javier de la Mora for technical assistance and the IFC Molecular Biology Unit for DNA sequencing and the microscopy unit for the electron micrographs. D.C. and this study, were supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (176586, 47172/A-1) and DGAPA/UNAM (IN213408).

References

- Aizawa SI, Vonderviszt F, Ishima R, Akasaka K (1990) Termini of Salmonella flagellin are disordered and become organized upon polymerization into flagellar filament. *J Mol Biol* 211:673–677
- Aldridge P, Hughes KT (2002) Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* 5:160–165
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1987) *Current protocols in molecular biology*. Wiley, New York
- Chen BG, Turner L, Berg HC (2007) The wetting agent required for swarming in *Salmonella enterica* serovar typhimurium is not a surfactant. *J Bacteriol* 189:8750–8753
- Davis J, Donohue TJ, Kaplan S (1988) Construction, characterization, and complementation of a Puf-mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 170:320–329
- Fahrner KA, Block SM, Krishnaswamy S, Parkinson JS, Berg HC (1994) A mutant hook-associated protein (HAP3) facilitates torsionally induced transformations of the flagellar filament of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 238:173–186
- Gal P, Vegh B, Zavodszky P, Vonderviszt F (2006) Export signals. *Nat Biotechnol* 24:900–901 author reply 901–902
- González-Pedrajo B, De la Mora J, Ballado T, Camarena L, Dreyfus G (2002) Characterization of the flgG operon of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 and its role in flagellum biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1579:55–63
- Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51–59
- Homma M, DeRosier DJ, Macnab RM (1990a) Flagellar hook and hook-associated proteins of *Salmonella typhimurium* and their relationship to other axial components of the flagellum. *J Mol Biol* 213:819–832

- Homma M, Kutsukake K, Hasebe M, Iino T, Macnab RM (1990b) FlgB, FlgC, FlgF and FlgG A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* 211:465–477
- Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77:61–68
- Horton RM, Cai ZL, Ho SN, Pease LR (1990) Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 8:528–535
- Ikeda T, Homma M, Iino T, Asakura S, Kamiya R (1987) Localization and stoichiometry of hook-associated proteins within *Salmonella typhimurium* flagella. *J Bacteriol* 169:1168–1173
- Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Trollinger D (1988) Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* 70:191–197
- Kobayashi K, Saitoh T, Shah DS, Ohnishi K, Goodfellow IG, Sockett RE, Aizawa SI (2003) Purification and characterization of the flagellar basal body of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 185:5295–5300
- Kuwajima G (1988) Construction of a minimum-size functional flagellin of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170:3305–3309
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Macnab RM (2003) How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* 57:77–100
- Malapaka RR, Adebayo LO, Tripp BC (2007) A deletion variant study of the functional role of the Salmonella flagellin hypervariable domain region in motility. *J Mol Biol* 365:1102–1116
- Metcalf WW, Wanner BL (1993) Construction of new beta-glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement. *Gene* 129(1):17–25
- Mimori Y, Yamashita I, Murata K, Fujiyoshi Y, Yonekura K, Toyoshima C, Namba K (1995) The structure of the R-type straight flagellar filament of Salmonella at 9 Å resolution by electron cryomicroscopy. *J Mol Biol* 249:69–87
- Mimori-Kiyosue Y, Vonderviszt F, Namba K (1997) Locations of terminal segments of flagellin in the filament structure and their roles in polymerization and polymorphism. *J Mol Biol* 270:222–237
- Mimori-Kiyosue Y, Yamashita I, Fujiyoshi Y, Yamaguchi S, Namba K (1998) Role of the outermost subdomain of Salmonella flagellin in the filament structure revealed by electron cryomicroscopy. *J Mol Biol* 284:521–530
- Morgan DG, Owen C, Melanson LA, DeRosier DJ (1995) Structure of bacterial flagellar filaments at 11 Å resolution: packing of the alpha-helices. *J Mol Biol* 249:88–110
- Namba K, Vonderviszt F (1997) Molecular architecture of bacterial flagellum. *Q Rev Biophys* 30:1–65
- Poggio S, Osorio A, Dreyfus G, Camarena L (2005) The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins. *Mol Microbiol* 58:969–983
- Poggio S, Abreu-Goodger C, Fabela S, Osorio A, Dreyfus G, Vinuesa P, Camarena L (2007) A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 189:3208–3216
- Porter SL, Wadhams GH, Armitage JP (2008) *Rhodobacter sphaeroides*: complexity in chemotactic signalling. *Trends Microbiol* 16:251–260
- Quandt J, Hynes MF (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* 127:15–21
- Samatey FA, Imada K, Vonderviszt F, Shirakihara Y, Namba K (2000) Crystallization of the F41 fragment of flagellin and data collection from extremely thin crystals. *J Struct Biol* 132:106–111
- Samatey FA, Imada K, Nagashima S, Vonderviszt F, Kumasaka T, Yamamoto M, Namba K (2001) Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature* 410:331–337
- Samatey FA, Matsunami H, Imada K, Nagashima S, Shaikh TR, Thomas DR, Chen JZ, Derossier DJ, Kitao A, Namba K (2004) Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. *Nature* 431:1062–1068
- Scharf B, Schuster-Wolff-Buhring H, Rachel R, Schmitt R (2001) Mutational analysis of the *Rhizobium lupini* H13-3 and *Sinorhizobium meliloti* flagellin genes: importance of flagellin A for flagellar filament structure and transcriptional regulation. *J Bacteriol* 183:5334–5342
- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5857–5864
- Simon R, Priefer U, Pühler A (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1:37–45
- Sistrom WR (1962) The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J Gen Microbiol* 28:607–616
- Sockette RE, Foster JCA, Armitage JP (1990) Molecular biology of the *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. *FEMS Symp* 53:473–479
- Stagg L, Zhang SQ, Cheung MS, Wittung-Stafshede P (2007) Molecular crowding enhances native structure and stability of alpha/beta protein flavodoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18976–18981
- Uedaira H, Morii H, Ishimura M, Taniguchi H, Namba K, Vonderviszt F (1999) Domain organization of flagellar hook protein from *Salmonella typhimurium*. *FEBS Lett* 445:126–130
- Vonderviszt F, Zavodszky P, Ishimura M, Uedaira H, Namba K (1995) Structural organization and assembly of flagellar hook protein from *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* 251:520–532
- Wang Q, Suzuki A, Mariconda S, Porwollik S, Harshey RM (2005) Sensing wetness: a new role for the bacterial flagellum. *EMBO J* 24:2034–2042
- Warrens AN, Jones MD, Lechler RI (1997) Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an

- improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. *Gene* 186:29–35
- Wessel D, Flugge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138:141–143
- West MA, Dreyfus G (1997) Isolation and ultrastructural study of the flagellar basal body complex from *Rhodobacter sphaeroides* WS8 (wild type) and a polyhook mutant PG. *Biochem Biophys Res Commun* 238:733–737
- Yamashita I, Vonderviszt F, Mimori Y, Suzuki H, Oosawa K, Namba K (1995) Radial mass analysis of the flagellar filament of *Salmonella*: implications for the subunit folding. *J Mol Biol* 253:547–558
- Yonekura K, Maki S, Morgan DG, DeRosier DJ, Vonderviszt F, Imada K, Namba K (2000) The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science* 290:2148–2152
- Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K (2002) Growth mechanism of the bacterial flagellar filament. *Res Microbiol* 153:191–197