



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO
Ciencias Biomédicas

Instituto de Fisiología Celular
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

PAPEL DE LAS PROTEÍNAS FlgJ Y ORF_{MUR}
EN LA BIOGÉNESIS FLAGELAR DE
RHODOBACTER SPHAEROIDES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

FRANCISCO JAVIER DE LA MORA BRAVO

Director de Tesis: Dr. GEORGES DREYFUS CORTÉS

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, D.F. ENERO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Al Dr. Georges Dreyfus Cortés por la dirección de este trabajo.

Al comité tutorial: Dra. Laura Camarena Mejía y Dra. Bertha González Pedrajo, por la constante asesoría prestada a este proyecto.

A los miembros del jurado, Dr. Armando Gómez Puyou, Dr. Roberto Coria Ortega, Dr. Luis Servín González, Dr. José Luis Puente García y Dra. Rosa Laura Camarena Mejía por la revisión de esta tesis.

A la QFB Teresa Ballado Nava por la invaluable e inmejorable ayuda técnica brindada para la elaboración de este trabajo.

A los miembros de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular; Dra. Laura Ongay, Biol. Guadalupe Códiz y Biol. Minerva Mora, por su ayuda con la secuenciación de ADN y síntesis de oligonucleótidos utilizados en esta tesis.

A los miembros de la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular; Dra. Araceli Patrón, Med. Cir. Rodolfo Paredes y Biol. Rosa María Picaso, por la preparación de las muestras para microscopía electrónica.

A todos los miembros de la Unidad de computo del Instituto del Instituto de Fisiología Celular: en particular: Biol. Gerardo Coello, M. en C. Ana María Escalante, Ing. Juan Manuel Barbosa, Ing. Ivette Rosas, y LCC. Sergio Rojas por su ayuda durante la elaboración de este trabajo.

A la Unidad del taller de mantenimiento del Instituto de Fisiología Celular; Ing. Aurey Galván e Ing. Manuel Ortíz por su ayuda en la reparación y mantenimiento de equipos usados en este trabajo.

Al Bioterio del Instituto de Fisiología Celular en particular al MVZ. Héctor Malagón y a la MVZ. Claudia Rivera.

A la Biblioteca del Instituto de Fisiología Celular en particular a la M. en C. Sandra Moncada.

A CONACyT y PAPIIT (UNAM) quienes con los donativos 47172 y IN213408 respectivamente, apoyaron la elaboración de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Es, sin duda es grato agradecer a mis padres, por todo el incondicional esfuerzo que han puesto, y aún lo siguen haciendo, en mi formación y educación por lo que no bastan estas breves líneas para mostrarles mi gratitud y amor por su esfuerzo ante las vicisitudes enfrentadas por ellos, ambos sabemos que fueron muchas y lo han hecho exitosamente, muestra de ellos es que logre pesar de mi, seguir estudiando y preparándome. Agradezco a mi Hermano, un ejemplo para mí de esfuerzo y solidaridad, gracias por contar con su apoyo durante todos estos años de agradable coexistencia y claro por los boletos gratuitos para el cine, sin los cuales no me hubiera distraído en momentos complicados durante el doctorado.

Ha sido un placer haber estudiado en la Universidad Nacional Autónoma de México, un espacio que modificó mi vida y abrió puertas que no sabía que existían. A todos sus maestros y compañeros los cuales me enseñaron formal e informalmente, muchas gracias y también a todos los mexicanos que contribuyen con sus impuestos para la subsistencia de esta universidad y la mía créanme que intento que los dineros sean empleados de la mejor forma posible y espero seguir contribuyendo en la formación de personas preparadas y criticas para mejorar a mi queridísimo México.

Quiero darle las gracias al Dr. Georges Dreyfus, gracias a él me inicie en este camino de la biología, hace ya 13 años tuvo la confianza de contratarme, si saber yo nada de la ciencia biológicas, él me mostró la maravillas de la naturaleza y particularmente de las bacterias. Y posteriormente me dio la oportunidad de realizar este doctorado, sin su total apoyo no hubiera sido posible hacer y concluir esta aventura, gracias por todos los consejos y discusiones, enriquecedoras para mi formación.

A mi querida amiga Bertha muchas gracias, también hace 13 años, espero no delatar tu edad con estas fechas; nos conocimos y trabajamos juntos, gracias por todas tus enseñanzas, por todos sus tiempos para platicar, discutir el proyecto, bromear y compartir momentos absolutamente agradables.

Gracias a mi compañera y amiga de trabajo; Tere, mejor conocida como Teresita, de ella si no voy a decir hace cuanto tiempo la conozco, pero a lo largo de los años me ha ofrecido su amistad, me enseñó, y aún lo hace, muchísimas cosas, entre ellas el orden tan molesto pero necesario, gracias. Si quieren saber algo del DNA y como trabajar con él pregúntele a Tere. Tere gracias, esas donitas que en tiempos de apremio durante el doctorado, fueron material suficiente para seguir adelante.

Mi memoria no me es tan fiel como antes, y me abandona de vez en cuando; quiero agradecerle a los miembros del laboratorio del Dr. Dreyfus: a Eugenia Silva, mi primigenia maestra en las artes de los lowrys, las columnas y demás triquiñulas bioquímicas. A Hilario y ahora a Bernardo que con sus solícitas ayudas contribuyen a mantener el laboratorio funcionando en óptimas condiciones. A mis compañeros y amigos del lab, pasados y presentes, con los cuales he pasado la mayoría del tiempo en el lab, hemos compartido anécdotas, comentarios, chismes, horóscopos y soluciones a nuestros problemas científicos, todo este ambiente hace que nuestra labor sea más gratificante, gracias Ana, ahora excelente estudiante de doctorado, quien además nos mantiene al tanto de lo que sucede en la farándula nacional e internacional, Yael un compañero eficaz y presto para ayudar, mucha suerte y ánimo con lo que sigue. A otros estudiantes que han pasado y están en laboratorio, Axelle, Mark, Raquelito, Daniela, Karen, Meztli, Manuel, Aldo, David, Aura y la recién llegada Tamara

Gracias a los Drs. Diego González Halphen, Heliodoro Celis, Dimitris Georgellis, Laura Camarena, Bertha González, Antonio Peña y Adolfo García Sainz, por sus no pocas ayudas y también a los miembros de sus laboratorios por su generosidad cuando se hizo necesaria.

A mis compañeros técnicos académicos en particular a Jorge Ramírez que me enseñó a usar un montón de equipos, y en especial a Silvia Escobedo.

A mi amigos y compañeros de otros laboratorios, antiguos y presentes; Arianne Atteia y Robert van Lis, Sebastián Poggio, a Luchis, Patricia Casas, a mi estimable amigo Bernardo Franco, muchas gracias y que todo salga bien carnal, y muy especialmente a Marisela Olgún por las interminables pláticas de café, gracias por tus críticas implacables, tu estupendo buen humor y los gratos espacios que compartimos.

Gracias a los miembros del instituto que contribuyen a que este lugar funcione adecuadamente en particular a la Lupita y Domi por su siempre rápida ayuda y a Sara por su auxilio con todo los papeles requeridos durante el doctorado.

Los nombres que deban de estar aquí y no están, sólo es porque escapan a mi limitada capacidad de retención al momento de escribir estos agradecimientos y al breve espacio de estas hojas, pero deseo darles las gracias a todos aquellos que contribuyeron a que este placentero viaje llegara a su fin en buenos términos.

ÍNDICE

Resumen	2
Summary	3
Introducción	4-40
La movilidad bacteriana	4-5
Flagelo eubacteriano	5-6
La estructura flagelar	6-15
Biogénesis flagelar	16-20
Regulación genética del flagelo	20-22
Quimiotaxis	22-27
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	27-28
La estructura flagelar de <i>R. sphaeroides</i>	28-29
Biogénesis flagelar y regulación genética de <i>R. sphaeroides</i>	29-31
Quimiotaxis en <i>R. sphaeroides</i>	31-32
La capa de peptidoglicano	32-33
Estructura de la capa de peptidoglicano	33-34
Propiedades biofísicas de la capa de peptidoglicano	34-35
Biosíntesis de la capa de peptidoglicano	35-36
Hidrolasas de la capa de peptidoglicano	36-37
Transglicosilasas líticas	37-39
Planteamiento del problema	39-40
Hipótesis y Objetivos	41
Materiales y Métodos	42-53
Resultados	54-69
Identificación de RSP_0072	54-61
Genes homólogos a FlgJ y RSP_0072	61
Aislamiento de una mutante en el gen RSP_0072	61-62
Secreción de FliC	63
Caracterización de SltF (RSP_0072)	63-66
Caracterización de una mutante de <i>flgJ</i>	66-67
Purificación de FlgJ	67-68
Interacción entre SltF y FlgJ	68-69
Discusión	70-80
Identificación de RSP_0072	70-72
Origen de RSP_0072	72-74
Ablación de RSP_0072 (<i>sltF</i>)	74-76
La proteína SltF	76-78
La proteína FlgJ	78-80
Conclusiones y perspectivas	81
Bibliografía	82-103
Artículo	

RESUMEN

El flagelo bacteriano es el organelo mediante el cual un microorganismo se desplaza hacia ambientes más favorables. El flagelo consta de varias subestructuras: el cuerpo basal, el gancho y el filamento, este último desplaza a la bacteria mediante su rotación, la cual es controlada por un motor embebido en la membrana citoplásmica. El flagelo es un complejo multiproteico, constituido por más de veinte distintas proteínas y por miles de subunidades, su formación es controlada a nivel transcripcional, postranscripcional, traduccional y postraduccional. El ensamblaje procede desde el interior hasta el exterior de la célula. En la biogénesis intervienen diversas proteínas que contribuyen al ensamblaje. Entre ellas se encuentra la proteína FlgJ que auxilia en la formación del eje flagelar, un constituyente del cuerpo basal, y degrada la capa de peptidoglicano para que el eje continúe con su formación.

Rhodobacter sphaeroides es una α -proteobacteria capaz de crecer bajo diversas condiciones y posee un flagelo localizado subpolarmente. *R. sphaeroides* cuenta con una FlgJ que carece de la capacidad hidrolizar a la capa de peptidoglicano. Una mutante de *flgJ* mostró que no es capaz de formar flagelo. En el presente trabajo se identificó que el marco de lectura abierto RSP_0072, que se encuentra en una región flagelar, codifica para una enzima que es capaz de degradar la capa de peptidoglicano, una ablación de RSP_0072 dio como resultado una cepa no móvil, que carece de filamento. El fenotipo silvestre se recuperó con la complementación en *trans* del gen silvestre.

RSP_0072 codifica para una transglicosilasa lítica, un tipo particular de hidrolasa de la capa de peptidoglicano. La proteína purificada RSP_0072 mostró actividad de hidrólisis de la capa de peptidoglicano. En contraste una mutación de los residuos de glutámico 57 y 83 dio como resultado la inactividad hidrolítica de RSP_0072. Sin embargo, la complementación de una mutante de RSP_0072 con estas mutantes puntuales resultó en parcial y total restablecimiento de la movilidad, respectivamente.

Ensayos de interacción *in vitro* sugieren que FlgJ y RSP_0072 interactúan. Se propone que el producto de RSP_0072 es una muramidasa flagelo específica que es exportada hacia el periplasma por la vía de secreción SEC y mientras interactúa con FlgJ corta la capa de peptidoglicano para que el eje pueda atravesar y continuar con la formación del flagelo.

SUMMARY

The bacterial flagellum is an organelle that allows bacteria to move in response to attractants or repellants. The flagellum consists of three substructures: the basal body, the hook, and the filament, which acts as a helical propeller that is driven by a rotatory motor embedded in the cytoplasmic membrane. The flagellum is a heteromultimeric complex, composed of more than 20 different proteins and by thousands of subunits. The flagellar assembly is regulated at transcriptional, post-transcriptional, translational and post-translational levels. The assembly proceeds from inside to cell exterior. During flagellar biogenesis several proteins contribute to the assembly process. One of these proteins is the FlgJ, which participates as a scaffolding protein in flagellar rod formation. Another function of FlgJ is to degrade the peptidoglycan layer to facilitate rod penetration through the cell wall.

Rhodobacter sphaeroides is a α -proteobacterium that can grow under several conditions and has a single sub-polar flagellum. *R. sphaeroides* has a FlgJ protein that lacks the ability to degrade the peptidoglycan layer. A *flgJ* mutant is defective in synthesizing flagella. In this work we have characterized an open reading frame RSP_0072, which is located within the flagellar region. The deletion of RSP_0072 yields a non-motile phenotype and bacteria lack flagella. RSP_0072 codes for a protein with homology to enzymes with peptidoglycan-hydrolyzing activity. RSP_0072 mutant was complemented with the wild-type gene and motility was recovered to levels similar to those of wild-type cells.

The protein encoded by RSP_0072 is similar to one type of muramidase also known as soluble lytic transglycosylase which is a particular type of peptidoglycan hydrolyzing enzyme. The purified wild type protein RSP_0072 showed peptidoglycan hydrolyzing activity; in contrast, no activity was observed when the residues E57 or E83 were replaced by alanine (E); however the complementation with those two mutant versions of RSP_0072 results in partial and complete recovery of motility, respectively.

In vitro interaction assays suggest a specific interaction between FlgJ and RSP_0072. We propose that the product of RSP_0072 is a flagellar muramidase exported to the periplasm via the Sec pathway, where it interacts with FlgJ to open a localized gap in the peptidoglycan layer for the subsequent penetration of the nascent flagellar rod structure.

INTRODUCCIÓN

L a m o v i l i d a d b a c t e r i a n a

La evolución proporciona a los organismos herramientas para su supervivencia, desde las bacterias hasta los mamíferos. La capacidad de nadar está ampliamente distribuida en el reino procarionte [1], permite a los microorganismos trasladarse y colonizar diversos hábitats, desde las ventilas hipertérmicas de los océanos, hasta la mucosa gástrica o la placa dental humana [2].

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos para desplazarse de forma dirigida en medios líquidos o superficies semisólidas. Una extensa variedad de especies bacterianas se mueven por medio de un orgánulo¹ llamado **flagelo** que sobresale de la célula bacteriana y mediante la rotación controlada de este propulsor, el microorganismo puede orientarse hacia ambientes benéficos y alejarse de condiciones desfavorables [3].

La movilidad no está restringida al uso del flagelo, diversas bacterias poseen un organelo llamado pili² tipo IV [4], al igual que el flagelo, es un apéndice que se extiende hacia el exterior de la célula, forma un filamento de una longitud de 10 μm que se adhiere por su extremo a una superficie, posteriormente los pili pierden temporalmente su adherencia sobre la superficie y se contraen, en seguida se extienden de nuevo y el ciclo se repite, dando como resultado un desplazamiento espasmódico [5]. Este tipo de movimiento es denominado de contracción (*twitching motility*, movimiento por contracciones) [4].

Otro movimiento sobre superficies es el desplazamiento (*gliding motility*) [6], que a diferencia del *twitching*, es un movimiento suave sobre la superficie; involucra complejos organelos que se encuentran distribuidos a través del cuerpo celular o localizados en un polo de la bacteria [6]. Estos complejos multiproteicos funcionan como adhesivos sobre la superficie [7], que al igual que el movimiento por contracción, se extienden y contraen desplazando al cuerpo celular, en un desplazamiento que asemeja al de una oruga o un ciempiés [8].

Adicionalmente existen formas pasivas de movimiento, éstas involucran la secreción de surfactantes sobre la superficie que permiten a grupos de células deslizarse pasivamente desde el centro del crecimiento celular [9]. Y recientemente se descubrió que algunas bacterias acuáticas fotosintéticas forman estructuras intracelulares cilíndricas huecas llenas de gases que le dan a la

¹ Orgánulo es la acepción en español del término en inglés *organelle*, sin embargo en español se usa comúnmente la palabra organelo por lo que se usará de esta forma en la tesis. Real diccionario de la lengua española y diccionario del uso del español María Moliner.

² Plural de pilus que significa pelo.

célula la capacidad de flotabilidad [10], y se sugirió que estos cilindros permiten a la célula moverse para alcanzar zonas de intensidad de luz adecuada, o en el caso de bacterias aeróbicas, regiones más oxigenadas [11].

Flagelo eubacteriano

El flagelo bacteriano es una maquinaria macromolecular, constituido por más de veinte proteínas diferentes. Entre las bacterias existen diferentes patrones flagelares tanto en número como en localización celular (**figura 1**). Hay bacterias monoflageladas, con localización específica, como *Caulobacter crescentus* que lo presenta en uno de sus polos, este patrón de flagelación es llamado monotrico, también hay bacterias con varios flagelos en un polo, patrón lofotrico, o en ambos polos, un patrón anfitrico, como *Bartonella bacilliformis* y *Rhodospirillum rubrum* respectivamente. Además existen bacterias con flagelos distribuidos alrededor del cuerpo celular, Tal es el caso de *Escherichia coli*, este patrón es denominado peritrico.

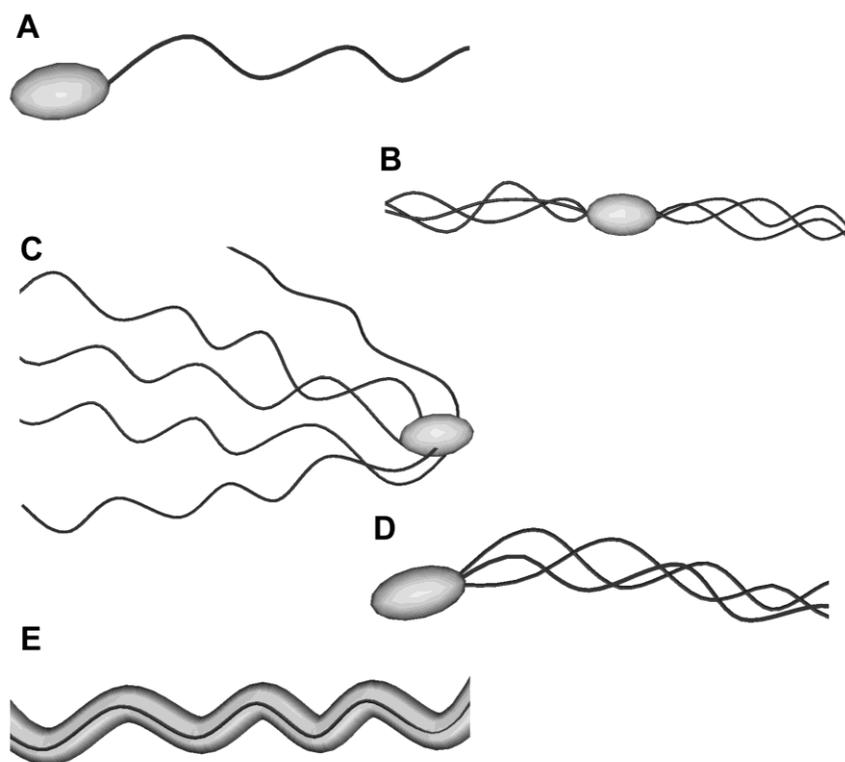


Figura 1. Esquema de diferentes patrones flagelares. A) Monotrico, B) Anfitrico, C) Peritrico, D) Lofotrico y F) Flagelo periplásmico.

El flagelo de las bacterias *Gram*-positivas y *Gram*-negativas es esencialmente idéntico, excepto que el flagelo de las *Gram*-negativas se extiende a través de la membrana externa, ausente en *Gram*-positivas. También se encontró que la bacteria gástrica *Helicobacter pylori* [12] y la marina *Vibrio shilonii* [13] poseen flagelos recubiertos por una membrana, posiblemente una extensión de la

membrana externa. Y bacterias como *Treponema primitia* [14] y *Borrelia burgdorferi* [15] presentan flagelos que no sobresalen del cuerpo celular, estos flagelos residen en la región periplásmica, entre las membranas citoplasmática y externa.

La movilidad flagelar permite a las bacterias acceder a lugares propicios para su crecimiento y competir exitosamente con otros microorganismos, como la bacteria *Geobacter metallireducens*, capaz de reducir óxido de Hierro III, [16] *G. metallireducens* se orienta hacia espacios con sedimentos donde abundan compuestos aceptores de electrones.

Para establecer relaciones simbióticas la bacteria marina *Vibrio fischeri* coloniza un órgano del calamar *Euprymna scolopes*, llamado órgano de luz [17]. La bacteria llega al órgano de luz a través del movimiento flagelar, en esta cavidad las bacterias producen una serie de compuestos bioluminiscentes. La emisión de luz ofrece protección nocturna al calamar, mientras la bacteria recibe nutrientes provenientes de la superficie epitelial de dicho órgano [18]. Mutantes paralizadas no móviles de *V. fischeri* son incapaces de colonizar al calamar [19]. Algunas bacterias son aptas para establecer relaciones simbióticas con plantas leguminosas, *Rhizobium meliloti* y *Bradyrhizobium japonicum* son bacterias que asimilan nitrógeno atmosférico (N_2) y colonizan a plantas como la alfalfa (*Medicago sativa*) [20] y la soja (*Glycine max*) [21] respectivamente. El nitrógeno asimilado es convertido por las bacterias en amonio (NH_4^+) y transferido a las plantas, donde sirve de sustrato en la síntesis de aminoácidos. Se demostró que una mutante no móvil de *R. meliloti* no logra establecer la relación simbiótica [22], sin embargo mutantes no móviles de *B. japonicum* si establecen la relación simbiótica [23].

Por otra parte se encontró que la movilidad flagelar en microorganismos patógenos es un factor esencial para la colonización del organismo huésped. Tal es el caso de las bacterias *H. pylori* [24] y *Pseudomonas aeruginosa* [25] que infectan el tracto gastrointestinal y alveolar humano respectivamente. Mutantes no móviles de estas bacterias no logran colonizar estos órganos y disminuyen su virulencia [26] [27]. La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* es un patógeno de plantas dicotiledóneas, esta bacteria causa en la planta una descontrolada división celular y la formación de tumores, se descubrió que la movilidad de la bacteria es necesaria para lograr infectar exitosamente a la planta [28].

L a e s t r u c t u r a f l a g e l a r

El flagelo es una compleja estructura bacteriana, constituido por componentes citosólicos, periplásmicos, membranales y extracelulares. Una parte importante del estudio flagelar ha sido realizado en las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, por lo que parte de esta introducción está basada en los datos obtenidos en estos microorganismos; sin

embargo cada vez hay más reportes de bacterias con sistemas flagelares que difieren de lo observado en *E. coli* y *S. enterica* [29].

Filamento

Canónicamente el flagelo es dividido en tres partes principales: el filamento, gancho y cuerpo basal (figura 2A). El filamento es el componente extracelular mayoritario del flagelo, su longitud es aproximadamente de 15 μ m y un diámetro de tan sólo 20 nm, está constituido por entre 20,000 a 30,000 unidades de una proteína llamada flagelina (FliC).

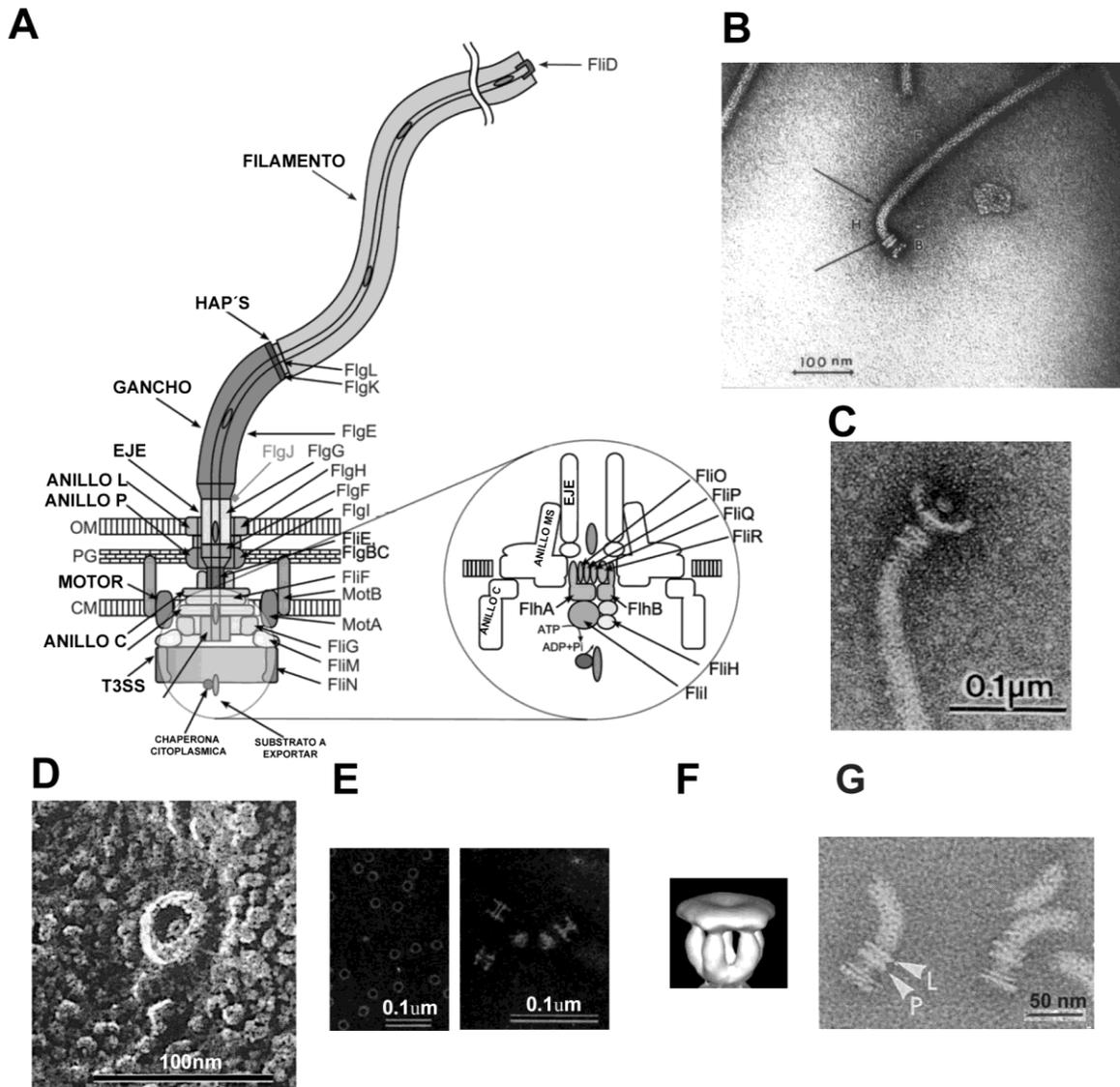


Figura 2. A) Esquema del flagelo bacteriano [30], B) Microscopía electrónica del flagelo de *S. enterica*, que muestra el filamento, el gancho y el cuerpo basal [31], C) Microscopía electrónica del flagelo, donde se aprecia el anillo C [32], D) Microscopía electrónica del anillo C en la parte central se aprecia posiblemente el aparato de exportación [33], E) Microscopía electrónica de los anillos L y P [34], F) Reconstrucción del homopentámero de FliD [35] y G) Microscopía electrónica donde se señalan los anillos L y P [36].

Las unidades de flagelina se arreglan longitudinalmente en forma de hélice de 5.5 subunidades por vuelta (**figura 3A**) [37]. Se puede observar que el filamento está conformado por once de estas hélices [37], también llamadas protofilamentos. Vistos al microscopio electrónico lucen como fibras que forman una estructura cilíndrica con una simetría helicoidal [38]. Cada uno de estos protofilamentos puede adoptar dos distintas conformaciones llamadas L o R (*Left*, izquierda ó *Right* derecha) [39]. Las dos conformaciones son ligeramente diferentes, medidas de difracción de rayos X, muestran que la distancia entre las unidades de cada protofilamento es de 52.7 Å y 51.9 Å [40] [41] para las conformaciones L y R respectivamente. Esta diferencia de tan sólo 0.8 Å afecta las interacciones laterales con otros protofilamentos. Cuando los 11 protofilamentos se encuentran en la misma conformación se produce un filamento macromolecular recto, y cuando hay mezclas de ambos tipos de protofilamentos se producen hélices macromoleculares (**figura 3B**) [42]. Las cuales sirven de propulsor y es donde se genera el trabajo hidrodinámico sobre el medio acuoso que resulta en un impulso de la bacteria.

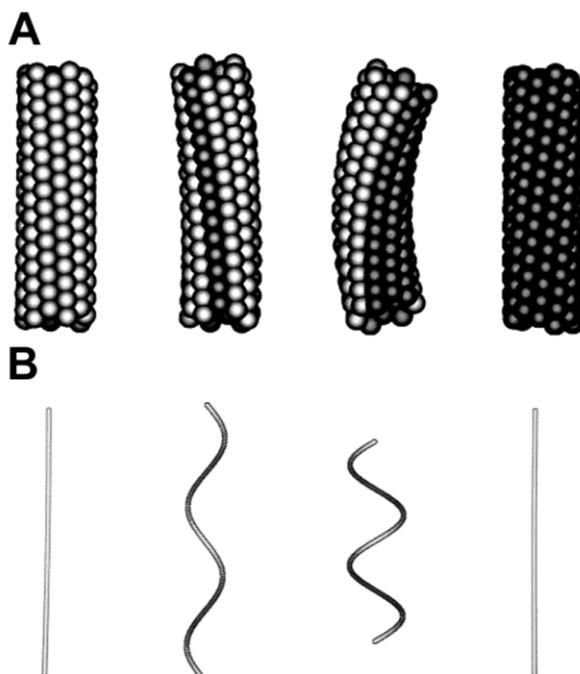


Figura 3. A) Esquema de filamento formado por once protofilamentos B) Esquema de la hélice macromolecular que se forma por la mezcla diferentes tipos de protofilamentos. En los extremos están filamentos formados por una sólo tipo de protofilamento L y R respectivamente, en la parte central hay filamentos que poseen ambos protofilamentos [43].

Los modelos sugieren que tan sólo es necesario que dos protofilamentos estén en la conformación R y nueve en la L para obtener un filamento funcional [42]. La habilidad del filamento para asumir diversas morfologías es llamada polimorfismo, estos cambios morfológicos son consecuencia del cambio de dirección de rotación del flagelo (ver más adelante). Pero también cambios en el flujo del solvente a través del filamento [44], el pH [45], la fuerza iónica [46] y sustituciones de un sólo residuo de FliC producen cambios morfológicos en el filamento [47].

En la flagelina los extremos amino y carboxilo terminal están bien conservados entre diferentes especies, mientras la región central es variable. FliC posee cuatro dominios estructurales [48], experimentos de resonancia magnética nuclear de FliC revelaron que los extremos amino y carboxilo son regiones parcialmente desordenadas y con alta movilidad [49]. Estudios de proteólisis de FliC indicaron que estas regiones son importantes para la formación y estabilización del filamento [50]. Recientemente se encontró que los filamentos del flagelo de la bacteria *Campylobacter jejuni* están constituidos por 7 protofilamentos [51] a diferencia de los 11 protofilamentos encontrados en *E. coli*.

G a n c h o y p r o t e í n a s a s o c i a d a s a l g a n c h o

El gancho está compuesto por alrededor de 130 copias de la proteína llamada FlgE [52], la cual es la segunda proteína más abundante que forma el flagelo. Las subunidades de FlgE se encuentran arregladas de forma helicoidal y forman una estructura que posee una longitud de 55 +/- 6 nm [53]. El gancho conecta al filamento y al cuerpo basal (**figura 2 A y B**). Es una estructura flexible que permite transmitir la torca del motor flagelar, que se encuentra en la base del flagelo, hacia el filamento. El gancho, al igual que el filamento, muestra polimorfismo y puede también ser descrito como una fibra tubular constituida de 11 protofilamentos [54]. Tiene una simetría helicoidal de 5.5 unidades por vuelta [54], pero a diferencia del filamento, el empaquetamiento de las subunidades del gancho forma un segmento de una hélice macroscópica con una amplitud y una frecuencia más pequeñas que el filamento [55]. Es decir una curvatura mayor. FlgE, como FliC, posee cuatro dominios denominados D0, D1 D2 y D3 [55]. La curvatura del gancho provoca que los protofilamentos del gancho que se encuentran en la parte interna de la curva estén mucho más cercanos entre sí que los del exterior de la curva, esto sugiere que hay mayores cambios conformacionales dinámicos, en comparación al filamento, para mantener su forma mientras rota [56]. Las distancias entre los dominios de los protofilamentos del gancho son comprimidas de 6 a 8 Å cuando se encuentran en la parte interna del gancho y extendidas de 11 a 13 Å cuando están en el exterior [55].

Las diferencias estructurales y mecánicas entre el filamento y el gancho hacen incompatible su unión directa, por lo que son necesarias dos proteínas accesorias, las llamadas proteínas asociadas al gancho 1 y 3 ó HAP1 (FlgK) y HAP3 (FlgL) (***Hook Associated Proteins***).

HAP1 y HAP3 sirven como adaptadoras estructurales y mecánicas entre el gancho y el filamento [57]. Se encontró que la estequiometría de cada HAP es de 11 unidades [52]. La HAP1 se une directamente con el gancho y posteriormente la HAP3 sirve de unión entre la HAP1 y el filamento [57]. Estudios de mutagénesis de cualquiera de ellas provoca que el filamento no logre ensamblarse, lo cual revela su importancia [58].

Otra proteína HAP es FliD o HAP2; justo antes de que inicie la polimerización del filamento FliD forma una cubierta sobre las proteínas HAP1 y HAP3 [57]. La cubierta está formada por un homopentámero de FliD [59] (**figura 2F**), su función es favorecer la polimerización del filamento y su ausencia conduce a que los monómeros de flagelina escapen hacia el espacio extracelular [60]. Mutaciones en *fliD* provocan que los filamentos no polimericen [61]. (FliD)₅ permanece asociada durante el crecimiento del filamento. El pentámero de FliD interactúa con el dominio D0 de FliC, esta interacción estabiliza el complejo cubierta-filamento y forma una cavidad al final del filamento del tamaño de una subunidad de flagelina [35]. Se propuso que en esta cavidad se permite el plegamiento de una sola subunidad de FliC, que es insertada en el filamento en crecimiento [35]. Esta inserción fuerza a la cubierta a moverse hacia otra posición energéticamente estable. En esta nueva posición se crea otra cavidad para la siguiente inserción y así continuar con el ciclo. El movimiento de la cubierta resulta en una rotación de 6.5° por cada subunidad, lo que equivale a 55 subunidades de flagelina por vuelta del pentámero de FliD [35].

C u e r p o b a s a l

El cuerpo basal es un complejo que inicia en el citoplasma y continúa hasta el espacio extracelular; atraviesa la membrana interna, la capa de peptidoglicano o pared celular y la membrana externa. Está constituido por alrededor de siete subestructuras (**figura 2A y G**), la primera de ellas es denominada anillo C, tiene forma de campana o taza invertida (**figura 2C**) y se encuentra localizada en la cara citoplásmica de la membrana interna [62]. Está formada por tres proteínas; FliG, FliM y FliN [63]. Se estimó el número de copias de FliG en 26 [64], para FliM se sugirió que hay 34 copias [65] y se aislaron complejos de FliM:FliN con una relación estequiométrica de 1:4, por lo se estimó que hay aproximadamente 136 copias de FliN [66].

Estudios genéticos y bioquímicos sugieren la función de cada una de estas proteínas; FliG está involucrada directamente con la rotación del flagelo [67] mediante la interacción con las proteínas MotA [68] y FliF [69] [70] (ver más adelante). FliM tiene ,principalmente, la función de servir como la proteína que comunica la señal para cambiar el sentido de la rotación del flagelo entre clockwise (CW) y counterclockwise (CCW) [71] [72] (ver más adelante). Se propuso que FliN participa en el cambio de la rotación flagelar [73] y recientemente se descubrió que FliN interactúa con FliH, un componente del sistema de secreción flagelar, por lo que se sugirió que contribuye a la exportación de los substratos flagelares [74].

Otra estructura del cuerpo basal es el anillo MS (**M**embrane **S**upramembrane), el cual está formado por aproximadamente 26 subunidades de FliF [75] [76]. El anillo MS se encuentra inmerso en la membrana interna y sobresale hacia el espacio periplásmico y citoplásmico, el cual interactúa directamente con el anillo C, particularmente con FliG [77].

Sobre el anillo MS se localiza el eje flagelar, está formado por cinco proteínas: FliE, FlgB, FlgC, FlgF y FlgG [78] [79] que forman una estructura cilíndrica de 25 nm de longitud que atraviesa a la capa de peptidoglicano y a la membrana externa [80]. El eje transmite la fuerza de rotación del anillo MS hacia al gancho. Estudios bioquímicos sugirieron que hay entre 5 o 6 copias de FlgB, flgC y FlgF [52], 9 copias de FliE, [79] y para FlgG se estimó que hay 26 copias [52]. Se sugirió que el eje puede poseer una simetría radial o anular en la base y una simetría helicoidal en su parte más distal. Ya que el anillo MS es simétrico, mientras que el gancho, que se une directamente al eje, tiene una simetría helicoidal.

Otras dos estructuras del cuerpo basal son los anillos P y L (nombrados así por su localización: **P**eptidoglicano y **L**ipopolisacárido) formados por las proteínas FlgI y FlgH respectivamente [81]. 26 copias de cada proteína forman cada anillo y se integran alrededor del eje (**figura 2F**) [52] como un forro que mantiene la integridad del eje mientras rota.

M o t o r f l a g e l a r

Otra estructura importante del flagelo es el motor flagelar, está formado por las proteínas MotA y MotB [82], la ausencia de cualquiera de ellas da lugar a un motor paralizado. Las cepas que muestran este fenotipo se denominan Mot⁻ [83]. MotA y MotB que poseen 4 y 1 cruces transmembranales respectivamente [84] [85], forman un heterohexámero constituido por 4 copias de MotA y 2 copias de MotB (MotA₄MotB₂) [86] y se estimó que hay de 8 a 11 de estos complejos alrededor del flagelo (**figura 4A**) [87]. Cada heterohexámero inmerso en la membrana interna forma dos canales transmembranales por los cuales se sugirió que pasan protones (H⁺) de forma vectorial [88], los cuales suministran la energía necesaria para la rotación del flagelo (**figura 4B y C**).

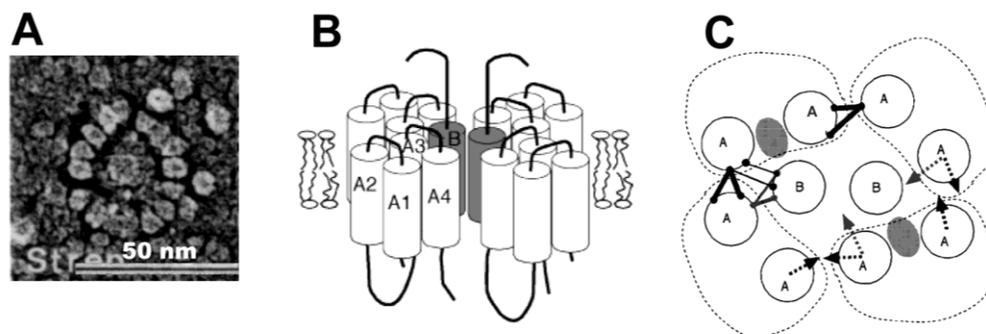


Figura 4. A) Fotografía del complejo MotA₄MotB₂ obtenido por criomicroscopía electrónica [82], B) Esquema del complejo MotA₄MotB₂ inmerso en la membrana interna y C) Vista superior del complejo MotA₄MotB₂, se propuso que se forman dos canales, marcados en gris, por donde ingresan los H⁺ [88].

En microorganismos alcalófilos o marinos como *Bacillus subtilis* o *Vibrio alginolyticus* se identificaron homólogos a MotA y MotB, llamados PomA y PomB [89] que funcionan con iones Na⁺. Recientemente se encontró que *Bacillus clausii* posee los homólogos: MotP y MotS que funcionan con ambos iones (H⁺ y Na⁺) en función del pH del medio [90]. Y en el 2009, se encontró que *Shewanella oneidensis* posee homólogos a MotAB y PomAB y utiliza un complejo u otro en función de la concentración de Na⁺ [91].

El motor flagelar convierte la energía química en trabajo mecánico. MotB posee un residuo de aspártico crítico para la rotación [92] (Asp32 en *E. coli*), que se sugirió interactúa con los protones que son transportados [92]. La unión de los protones a MotB induce cambios conformacionales en MotA que modifican la interacción entre dos residuos cargados en el dominio citoplásmico de MotA con cinco residuos cargados del dominio carboxilo terminal de FliG. La interacción entre estos residuos posiblemente genera un trabajo sobre los anillos MS y C [93] [94] [68] que tiene como consecuencia la rotación de estos anillos. Los cuales transmiten este torque a través del eje y el gancho hacia el filamento. El cual realiza el trabajo mecánico sobre el medio para impulsar a la bacteria.

Entre los varios modelos que se han propuesto para explicar el mecanismo de rotación flagelar, el modelo que invoca un cambio conformacional de las proteínas del motor tiene algunas evidencias experimentales a su favor [95] [96]. En este modelo el ión en tránsito a través del canal MotA₄MotB₂ interactúa con el residuo conservado Asp32 de MotB y provoca un cambio conformacional en MotA que ulteriormente provoca un cambio conformacional en FliG que desencadena interacciones electrostáticas de largo alcance ó interacciones estéricas de corto alcance sobre el anillo MS [97]. La interacción genera una fuerza posiblemente perpendicular al eje de rotación flagelar, que tiene como consecuencia la transmisión de la fuerza (momento de fuerza o torca) para la rotación del resto de la estructura. Cabe mencionar que la velocidad de rotación del flagelo varía entre especies, En *E. coli*. de 15,000 rpm y hasta 100,000 rpm en *Vibrio alginolyticus* [98].

A p a r a t o d e e x p o r t a c i ó n

La mayoría de las proteínas que forman el flagelo son extracelulares, por lo que deben ser llevadas más allá de la membrana citoplásmica. Para ser exportadas la bacteria usa un mecanismo de secreción que es parte de una familia de sistemas de secreción tipo III (T3SS, ***Type 3 Secretion System***). También usados para secretar factores de virulencia de bacterias patógenas de animales y plantas [99].

El T3SS flagelar es un complejo proteico, se encuentra anclado a la membrana interna y estudios de microscopía electrónica sugieren que se ubica en la cara citoplásmica del anillo MS, dentro del anillo C [33] (**figura 2D**). Este sistema exporta 14 diferentes proteínas [100]; las proteínas del eje (FliE, FlgB, FlgC, FlgG y FlgF), la proteína ensambladora del eje (FlgJ), el gancho (FlgE), la proteína ensambladora del gancho (FlgD), las proteínas asociadas al gancho (FlgK y FlgL), filamento (FliC), la proteína ensambladora del filamento (FliD) y las proteínas regulatorias FliK y FlgM (ver biogénesis flagelar).

El T3SS flagelar forma un angosto canal con un diámetro aproximado de 2.5 nm [101], lo que significa que las proteínas translocadas deben de ser probablemente exportadas en un estado desplegado o parcialmente plegado. El sistema de secreción consta de al menos 9 componentes [100], 6 de los cuales son proteínas integrales de membrana (FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ y FliR) y las otras tres proteínas son componentes solubles (FliH, FliI y FliJ). Un estimado conservador de la estequiometría del complejo membranal podría ser el siguiente : $(FlhA)_2(FlhB)_2(FliO)(FliP)_4(FliQ)(FliR)$ [102], con un peso de alrededor de 380 KDa. Hay evidencia de interacción entre los componentes citoplásmicos (FliH, FliI y FliJ) con los dominios solubles de las proteínas membranales FlhA y FlhB [103]. Se sugirió que la parte citoplásmica del complejo selecciona los substratos de exportación [104].

Los componentes solubles del T3SS han sido ampliamente caracterizados. FliI es una ATPasa y muestra significativas similitudes con las subunidad β de la F_0F_1 ATPsintasa [105]. Mutaciones en el sitio catalítico de FliI resultaron en un fenotipo que no es capaz de ensamblar el flagelo [106], lo cual llevó a sugerir que la energía de hidrólisis de ATP (***Adenosine TriPhosphate***) suministra la fuerza para la exportación [106]. Sin embargo recientes análisis genéticos sugieren que FliI no es indispensable para el proceso de exportación, sirve únicamente para hacer el proceso de exportación más eficiente [107] [108]. Es la diferencia de concentración de protones (H^+) entre el interior y el exterior de la célula o fuerza protón motriz (PMF, ***Proton Motor Force***), la que conduce la exportación de las proteínas flagelares a través del T3SS [107]. También se demostró que FliI es capaz de asociarse a la membrana interna y puede ser inducida a formar un homohéxamero en presencia de ATP o de vesículas de fosfolípidos [109].

FliH es un regulador negativo de la actividad de ATPasa de FliI, forma un homodímero que se une a FliI para formar el heterotrímero (FliH)₂FliI, [110] y también se encontró que FliH es capaz de interactuar con FliN, que es una de las proteínas que forman el anillo C [74].

FliJ es el otro componente soluble del T3SS, mutantes en *fliJ* son incapaces de ensamblar el flagelo [100]. Se encontró que FliJ interactúa con FliM [74], FlhA [111] [112], se une a FliH [103] y con menor afinidad a FliI [113]. Se vio que FliJ se requiere para la exportación de las proteínas del eje, la del gancho y de las proteínas asociadas al gancho [114]. FliJ posee características similares a las proteínas llamadas chaperonas; poseen un bajo peso molecular, un punto isoeléctrico ácido y un alto contenido de α hélices en un arreglo de hélices entrelazadas (*coiled-coil*) en su amino terminal. También se observó que evita la agregación de las proteínas FliE y FlgG [114], por lo que se propuso a FliJ como una chaperona general.

Los resultados bioquímicos y genéticos sugirieron un mecanismo en el cual FliH₂FliI se une únicamente al complejo chaperona-substrato. Este complejo presenta al substrato de exportación al complejo de exportación membranal, y posiblemente, por medio de la hidrólisis de ATP el substrato es entregado al sistema de exportación. En tales condiciones FliJ libera al heterotrímero FliH-FliI para reiniciar el ciclo de exportación [115]. Sin embargo otros autores han encontrado que FliJ no se une directamente al substrato, sino que chaperonas específicas flagelares (FlgN, FliT y FliS, ver más adelante) se unen al substrato y son éstas las que se presentan en el aparato de exportación membranal. Una vez liberado el substrato FliJ secuestra a las chaperonas FlgN y FliT, esto garantiza una alta concentración de estas chaperonas para que el ciclo continúe de forma más eficiente [116].

FlhA es una proteína de 75 KDa con ocho cruces transmembranales, experimentos de supresión intergénica sugieren que FlhA interactúa con el anillo MS [117]. Y se identificó que el extremo carboxilo terminal interactúa con los componentes solubles del sistema de secreción [104]. Sin embargo su función precisa permanece aún por elucidarse.

FlhB es una proteína de 42 KDa posee cuatro cruces transmembranales y su dominio soluble participa en el proceso de selección de los substratos de exportación [118], que son divididos en substratos tipo eje-gancho (FlgB, FlgC FlgG FlgF FliE, FlgJ FlgE ,FlgD y FliK) y substratos tipo filamento (FlgK, FlgL FliC y FliD) [100]. FlhB recibe una señal, a través de la proteína FliK, que indica que el gancho alcanzó su longitud correcta (ver biogénesis flagelar) y ocurre el cambio de especificidad de substrato tipo eje-gancho a tipo filamento [119]. El cambio de especificidad está relacionado con un corte autoproteolítico de FlhB entre los residuos asparagina (N) 269 y prolina (P) 270 [120]. La mutación N269A suprime el corte de FlhB y el cambio de especificidad, produciéndose células no móviles con ganchos de una longitud más grande (fenotipo llamado poligancho) [121]. La coexpresión de los dos productos de corte de FlhB aun es capaz de restablecer la movilidad en un

50% de la población [119]. Lo cual sugiere que el estado no procesado no es indispensable para la movilidad.

Los otros componentes membranales del aparato de exportación (FliO, FliP, FliQ y FliR) varían considerablemente en tamaño, topología y extensión de sus dominios solubles, son relativamente pequeños entre 10 a 29 KDa, poseen entre uno y seis dominios transmembranales y sus regiones citoplásmicas son pequeñas [122]. Pero su función aún está por aclararse.

C h a p e r o n a s f l a g e l a r e s

El aparato de secreción requiere, para su óptimo funcionamiento, de la presencia de chaperonas flagelares específicas. FlgN, FliT y FliS, son proteínas citoplásmicas de bajo peso molecular (entre 10 y 15 KDa), poseen un punto isoeléctrico ácido y forman hélices anfipáticas [123] que posiblemente interactúan con las proteínas a ser secretadas [124]. Se sugirió que las funciones de estas moléculas es la de prevenir la interacción inespecífica de los substratos que serán exportados y la de presentarlos ante el T3SS flagelar [124].

FlgN y FliT son proteínas de 16.5 KDa y 14 KDa respectivamente, FlgN interactúa con FlgK y FlgL (HAP1 y HAP3) [124], y FliT con FliD (HAP2). Mutaciones en el carboxilo terminal de las HAP's previenen la interacción con las chaperonas [124]. Lo que sugiere que esta región, importante para la oligomerización de HAP1 y HAP3, también lo es para la unión a FlgN y FliT. Mutaciones en *flgN* y *fliT* disminuyen el número de estructuras flagelares que poseen filamentos [125] [126].

FliS es una proteína de 15 KDa, actúa como chaperona específica de la flagelina (FliC) facilitando su exportación [127]. FliS es predominantemente una proteína helicoidal (un contenido de 95% de α -hélices) [127]. Recientemente se obtuvo la estructura cristalográfica de FliS de *Aquifex aeolicus* [128] y se encontró que adopta un plegamiento distinto al de otras chaperonas que participan en sistemas secreción tipo III, como los asociados a virulencia [128].

FliS inhibe la polimerización de FliC *in vitro* [127]. Al igual que las HAP's la región carboxilo terminal de FliC es esencial para la unión a FliS [129], la estructura cristalográfica de FliS con el fragmento carboxilo terminal de FliC confirmó esta interacción [128]. Finalmente se cuantificó la interacción entre FliS y FliC por medio de titulación calorimetría isotérmica y se logró concluir que FliS se une a FliC en una estequiometría de 1:1 [130]. Además experimentos de desnaturalización térmica sugieren que FliS no funciona como un elemento que impida el plegamiento de FliC, al contrario, FliS facilita la formación de estructura secundaria del tipo α en FliC [130].

Biogénesis flagelar

En un trabajo seminal que apareció en 1992 [131]; a través de la generación de mutantes, el aislamiento de estructuras flagelares de estas mutantes y su análisis por medio de microscopía electrónica, se logró dilucidar gran parte de la morfogénesis flagelar de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

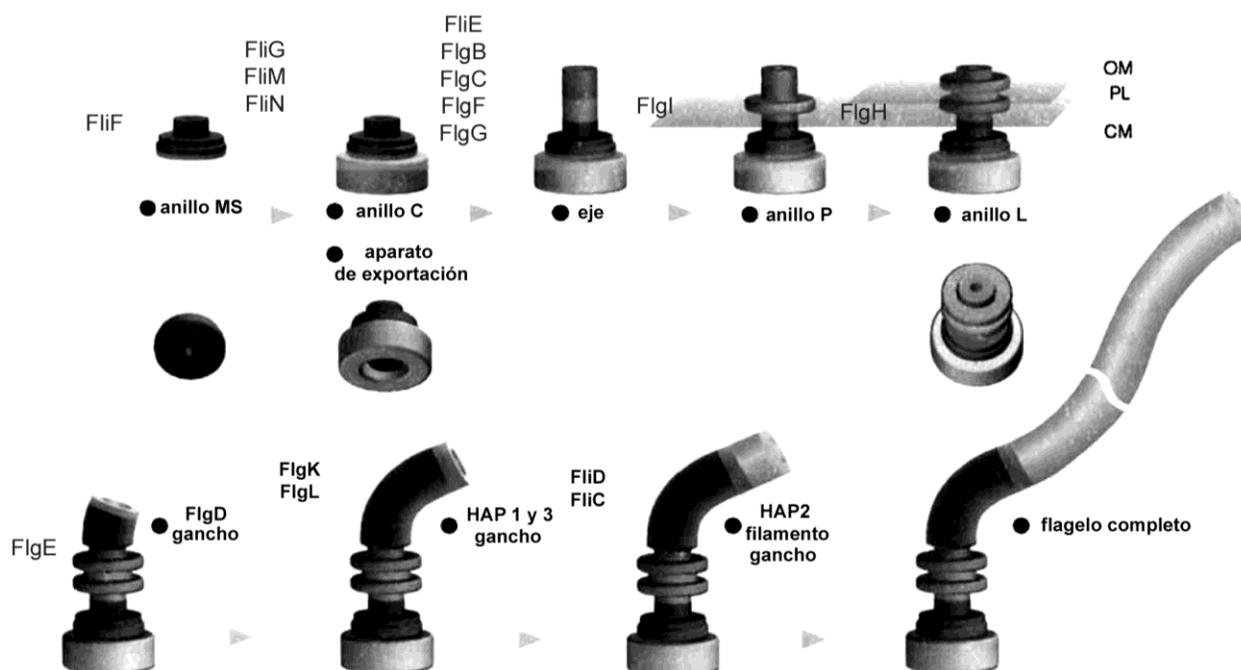


Figura 5. Esquema de la vía morfogenética flagelar, la biogénesis sólo procede una vez que la estructura anterior es ensamblada. La biogénesis inicia en el citoplasma y termina en la parte extracelular [132].

La formación del flagelo inicia con el ensamble del anillo MS (**figura 5**), las subunidades de la proteína FliF se insertan en la membrana interna y forman dicha estructura [75]. La formación de este anillo procede en ausencia de cualquier otro componente flagelar, sin embargo un reporte reciente reveló que la proteína PflI de *Caulobacter crescentus* tiene la función de localizar al anillo MS [133]. En otro estudio con la proteína flagelar FliH de *Pseudomonas putida*, reveló que mutantes en *fliH* son incapaces de controlar la localización y número de flagelos [134], pero una mutante de *fliH* de *Rhodobacter sphaeroides* no se vio afectada la posición y número de flagelos (comunicación personal de la Dra. Laura Camarena). Por lo que aún se desconocen los mecanismos precisos de localización del anillo MS.

Resultados de supresión intergénica sugieren que FliA, un componente del aparato de exportación flagelar, interactúa con FliF [117], y estudios con mutantes sensibles a temperatura concluyeron que FliP y FliR, otros dos componentes del 3TSS flagelar, interactúan con el anillo MS [135]. Estos resultados sugieren que el aparato de secreción puede ser la siguiente estructura en colocarse debajo de la cara citoplásmica del anillo MS. Posteriormente se ensambla el anillo C,

constituido por las proteínas FliG, FliM y FliN. La interacción de FliF con FliG parece sugerir que FliG es incorporada al anillo C y posteriormente FliM y FliN que dependen de la presencia de FliG [77] [136].

El ensamblaje del motor flagelar en una arquitectura de cuatro copias de MotA por dos de MotB, puede ser insertado en cualquier etapa de la formación del flagelo; pero dada su interacción con el FliG y la regulación de la expresión de *motAB*, la incorporación del motor ocurre después de la formación del anillo C [137].

Una vez que el aparato de exportación está constituido se forma el eje flagelar. La ausencia de cualquiera de las proteínas del eje (FliE, FlgB, FlgC FlgF y FlgG) detiene la formación del flagelo [131]. Cuando se aislaron cuerpos basales se encontró a la proteína FliE [79]. Por lo que se sugirió que FliE es la primera proteína que forma el eje flagelar [102]. Se encontró que es necesaria para la exportación de las otras proteínas del eje [100]. Y se especuló que interactúa con el anillo MS provocando una transición de la simetría anular del anillo MS a una helicoidal que posee el resto de los componentes axiales que forman el flagelo [102]. FlgB interactúa fuertemente con FliE y mutaciones supresoras de *fliE* se encontraron en *flgB* [138], lo que sugiere que es la segunda proteína en ser ensamblada. Posteriormente se incorporan las proteínas FlgC y FlgF, en un orden aún no determinado. Una mutación puntual en *fliF* da lugar a la formación de estructuras flagelares que contienen filamento-gancho y una región próxima al gancho se identificó como FlgG [139], lo cual sugirió que ésta es la última proteína en formar el eje flagelar. Recientemente se demostró que FlgG es capaz de polimerizar continuamente. Una mutante puntual en *flgG* dio como resultado una estructura llamada polieje de alrededor de 80 nm [80], que es la longitud normal del eje-gancho en el cuerpo basal silvestre. Además en ausencia de FliK esta mutante forma poliejes de hasta 1µm (1000 nm.) [80], sugiriendo algún tipo de control de la longitud del eje por parte de FliK. Esta mutante polieje posee múltiples anillos P y no es capaz de atravesar la membrana externa, por lo que la penetración de la membrana externa debe estar acoplada al apropiado término del crecimiento del eje [80].

Para que las proteínas del eje (FliE, FlgB, FlgC FlgF y FlgG) formen la estructura tubular es necesaria la presencia de la proteína FlgJ. Una ablación de *flgJ* detiene la biogénesis flagelar [131], FlgJ es exportada por el T3SS flagelar [140], y es llamada una proteína ensambladora o cubierta del eje, por la analogía con la proteína FliD que corona al filamento. Pero a diferencia de FliD, FlgJ no forma parte estructural del flagelo [141]. FlgJ interactúa con las proteínas del eje por lo que se sugirió que promueve el correcto plegamiento de las subunidades del eje [141] y es probable que las interacciones específicas entre las subunidades promuevan el correcto orden de ensamblaje [78].

Además el carboxilo terminal de FlgJ de *Salmonella enterica* y otras γ -enterobacterias, poseen un dominio capaz de hidrolizar la capa de peptidoglicano [140] [142]. Por lo que se cree que FlgJ actúa de forma bifuncional; ayuda al plegamiento de las subunidades del eje y digiere localmente la

capa de peptidoglicano para permitir el paso del eje en formación [141]. Una vez terminada su función FlgJ es liberada al periplasma, es posiblemente sustituida por la proteína FlgD, con la cual se observó que interactúa [140] [141].

Para que el eje penetre la membrana externa se requiere que a su alrededor se formen los anillos P y L [80], formados por las proteínas FlgI y FlgH respectivamente. A diferencia de las demás proteínas flagelares que atraviesan la membrana citoplásmica por medio del T3SS, FlgH y FlgI se exportan a través de la vía general de secreción bacteriana tipo SEC [143]. Los anillos se forman sólo en presencia del eje, además el ensamblaje del anillo P requiere de la proteína FlgA, que también es exportada por la vía SEC [144] y que se sugirió funciona como una chaperona [145]. También se requiere la formación de un puente disulfuro en FlgI, mediada por el sistema Dsb [146], que si bien no es necesario para el ensamblaje del anillo P es importante para proteger a FlgI en contra de la degradación [147]. El anillo P interactúa fuertemente con el anillo L, forman un complejo de anillos L-P que permanece estable en presencia de agentes desnaturizantes tal como urea a una concentración de 7.5 M [34] (**figura 2E**). Es posible que FlgI interactúe con FlgG, y con la capa de peptidoglicano [148]. Y se especuló que pueda interactuar con la proteína MotB [148]. Todo en su conjunto hace de los anillos L y P un forro, no rotatorio, del eje que mantiene la integridad estructural del flagelo mientras rota [149].

A continuación del eje y los anillos L y P comienza a formarse el gancho. Las subunidades de FlgE son exportadas por el T3SS flagelar [100], para su formación requiere de la proteína FlgD [150], ésta es funcionalmente análoga a las proteínas FliD (HAP2) y FlgJ. FlgD permite el correcto ensamblaje de las subunidades que forman al gancho [150].

Cuando el gancho alcanza su longitud correcta, el 3TTS flagelar debe de cambiar de especificidad de sustratos tipo eje-gancho hacia sustratos tipo filamento [100]. El modelo por el cual la célula determina cuándo el gancho llega a una longitud específica y debe cambiar de sustratos de exportación, aún se encuentra inacabado. Se encontró que cepas mutantes que producen un fenotipo de poliganchos, ganchos más grandes a lo normal y sin filamento, fueron encontradas en *fliK* [151], lo cual sugiere que FliK interviene en el control de la longitud del gancho y en el cambio de especificidad de sustratos. Por contraste la sobreexpresión de FliK produce ganchos ligeramente más cortos [152]. Se encontró que mutaciones supresoras extragénicas de *fliK* fueron localizadas en *flhB* [53] [153], estas segundas mutantes son poliganchos-filamento es decir que son capaces de cambiar de especificidad, lo cual sugiere que FlhB está involucrada primariamente en el cambio de sustratos de exportación, pero no en la longitud del gancho.

Se encontró que FliK y FlhB interactúan directamente [154], más allá de la interacción de un sustrato tipo eje-gancho (FliK) con el 3TSS flagelar (FlhB). Diversos estudios mostraron que el carboxilo terminal de FliK interactúa con el carboxilo terminal de FlhB [154] [155], posiblemente esta

interacción induce un cambio conformacional en el carboxilo terminal de FlhB que promueve el cambio en la especificidad de sustratos. Hay que recordar que FlhB sufre un corte autoproteolítico independientemente de la interacción con FliK, pero necesario para transmitir la señal de cambio de especificidad. También se demostró que los últimos 35 residuos del carboxilo y el amino terminal de FliK modulan la interacción con el carboxilo de FlhB [154]. Posteriormente se encontró que una proteína FliK, que no es capaz de secretarse por el 3TSS flagelar, complementa a una mutante nula de *fliK* [156], lo que sugiere que FliK interactúa con FlhB sin necesidad de ser secretada. Esto sugiere que existe una barrera que previene la interacción prematura entre FliK y FlhB que evitaría la formación del gancho, la barrera se identificó como la proteína RfIK [157] [158]. Anclada a la membrana citoplásmica a través de un dominio transmembranal ubicado su carboxilo terminal [159], se sugirió que RfIK funciona como un freno o tapón para prevenir el cambio de especificidad de sustratos antes que se haya completado el ensamblaje del cuerpo basal [159]. Sin embargo el mecanismo de acción de RfIK está aún en discusión.

Estos resultados han llevado a tres diferentes modelos que describen como se controla la longitud del gancho y concomitantemente como se da el cambio de especificidad en los sustratos de exportación.

El modelo de la taza llena [160] está basado en mutantes del anillo C (*fliM* *fliN* y *fliG*) que tienen ganchos más cortos [160]. Se propuso que los monómeros de FlgE se acumulan dentro de la cavidad creada por el anillo C hasta llenarla, una vez llena, son exportadas en bloque y el anillo C se “vacía”, FliK es exportada y al interactuar con FlhB conduce al cambio de especificidad hacia los sustratos tipo filamento.

El modelo de la regla molecular [161] sugiere que durante la formación del gancho el amino terminal de FliK interactúa continuamente con las subunidades del gancho y la tapa del gancho (FlgE y FlgD). Cuando el gancho alcanza los 55 nm de longitud, el carboxilo terminal de FliK se encuentra en una posición y orientación apropiada para interactuar FlhB y cambia la especificidad de sustratos. Este modelo está basado en experimentos con YscP, un homólogo de FliK del sistema de secreción tipo III de virulencia de *Yersinia enterocolitica* [162], inserciones y ablaciones en *yscP* resultaron en estructuras de aguja, estructuras similares al gancho, más largas o más cortas respectivamente [163].

El modelo más reciente llamado reloj molecular [164], sugiere que con el inicio de la polimerización del gancho comienza una cuenta regresiva, se propuso que el reloj es el corte autoproteolítico de FlhB, que sucede en un promedio de siete minutos (medido como una vida media) [120] después de la síntesis de FlhB y de su ensamblaje en el 3TSS flagelar. Esto tiene como resultado que las subunidades de FlgE se ensamblen, dentro de estos siete minutos, FliK ahora interactúa con FlhB proteolizado promoviendo un cambio conformacional que induce el cambio de especificidad.

Una vez que el gancho llegó a su tamaño normal y ocurre el cambio de especificidad de substratos hacia los del tipo filamento, se exportan las proteínas FlgK, FlgL, FliD y FliC entonces la proteína ensambladora del gancho, FlgD, es sustituida por HAP1 (FlgK) y HAP3 (FlgL) [150]. Cabe mencionar que hasta ahora no se ha encontrado una proteína ensambladora de las HAP1 y 3.

Posteriormente sobre el complejo HAP1-HAP3, se inserta HAP2 (FliD) que conduce la polimerización de las subunidades de FliC para formar al filamento [60]. La longitud del filamento parece estar regulada por su propia velocidad de difusión al ser exportadas las unidades de FliC [165]. Se observó que la rapidez de crecimiento decrece exponencialmente con su longitud y alcanza una velocidad máxima de 0.55 μm por min. [166]. De estos resultados se estimó que se requieren 0.05 segundos para ensamblar una subunidad de FliC [166].

Regulación genética del flagelo

La biosíntesis del flagelo es un proceso que tiene un alto costo energético para la bacteria, se estimó que un 2% de la energía total de la célula se emplea en la síntesis del flagelo [167]. Por lo que se requiere un estricto control en la expresión de los genes flagelares. En muchas bacterias los genes flagelares se encuentran agrupados de forma contigua en el cromosoma. El regulón flagelar de *Salmonella enterica* incluye alrededor de 60 genes [168], agrupados en tres regiones del cromosoma, están organizados en 15 operones [169] [170], que son expresados jerárquicamente, basados en tres clases de promotores regulados temporalmente en coordinación con el ensamblaje del flagelo (**figura 6**).

Esta jerarquía está bien conservada entre bacterias *Gram*-negativas con flagelos peritricos. En bacterias como *C. crescentus* el regulón flagelar está íntimamente acoplado al ciclo celular [171] y bacterias como *P. aeruginosa* [172] y *R. sphaeroides* poseen cuatro clases jerárquicas (ver regulación flagelar de *R. sphaeroides*).

En *S. enterica* la parte más alta de la regulación se encuentra el llamado operón maestro *flhDC* [170], que es definido como de clase I. Controla de forma absoluta la decisión de producir flagelo y es necesario para la expresión de cualquier otro gen flagelar. Este operón, contiene al menos seis diferentes inicios de transcripción [173], codifica para las proteínas FlhD y FlhC [174] que forman el complejo heterohexamérico, (FlhD)₄(FlhC)₂ [175]. Funciona como un activador transcripcional que promueve la transcripción de genes flagelares que poseen un promotor dependiente del factor transcripcional σ^{70} (sigma 70) [174]. Estos genes son llamados de clase II. Pero también el complejo FlhDC funciona como un autorepresor transcripcional de *flhDC* [176].

La expresión del operón *flhDC* es controlada por numerosas señales ambientales como temperatura [177], osmolaridad [178], pH [179] y también a través de proteínas reguladoras globales como H-NS [180] y del complejo activador catabólico, CAP-cAMP (***Catabolic Activator Protein-cyclic***

Adenosine MonoPhosphate) [181]. En presencia de altas concentraciones de D-glucosa, la concentración de cAMP en la célula es baja y CAP no es capaz de activar la transcripción de *flhDC*, pero cuando se forma el complejo CAP-cAMP, éste activa la transcripción del promotor *flhDC* [182]. Por otra parte H-NS, que participa en la organización cromosomal, regula positivamente la biosíntesis flagelar, reprimiendo un represor de la transcripción del operón *flhDC*. Adicionalmente se encontró que la proteína CsrA, una proteína que se une a RNA, controla la expresión de *flhDC* a nivel postranscripcional [183].

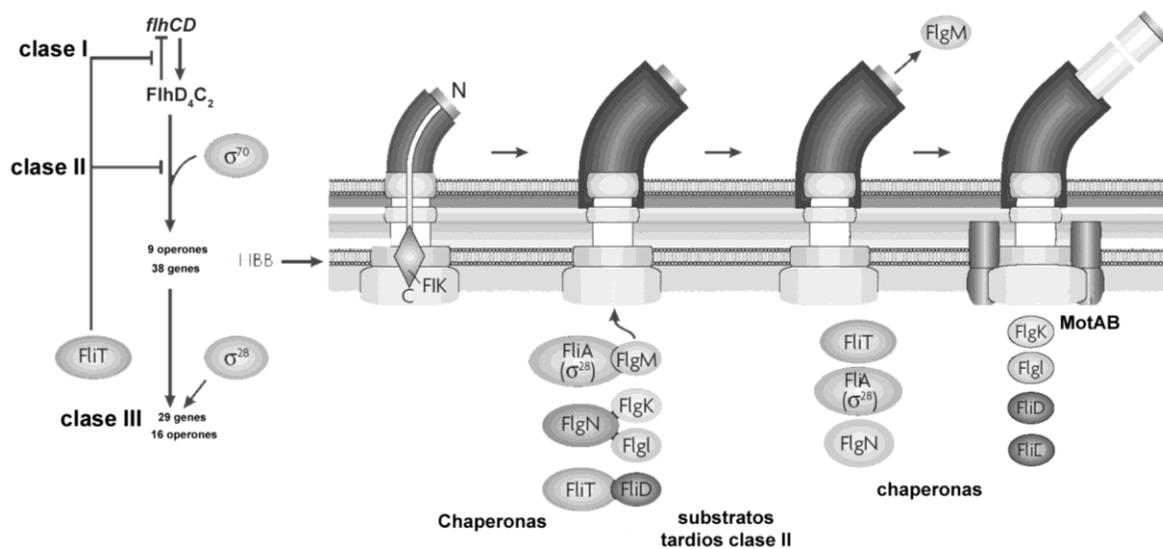


Figura 6. Esquema de la regulación genética acoplada al ensamblaje flagelar en *E. coli*. La expresión del regulón flagelar comienza con la expresión de operón *flhCD* que es llamado de clase I [184].

Los genes flagelares clase II codifican para las proteínas que forman y ensamblan el cuerpo basal y el gancho [170], adicionalmente también son transcritos los genes regulatorios *fliA* y *flgM*. El gen *fliA* codifica para un factor transcripcional flagelo específico llamado σ^{28} , que promueve la transcripción de los genes la clase III [185]. Mientras *flgM* codifica para un factor anti- σ^{28} [186] que se une a σ^{28} previniendo o disociando a la RNA polimerasa- σ^{28} , para que éste no active la transcripción de los genes clase III [187] [188] [189]. Cuando el cuerpo basal y el gancho están correctamente ensamblados, el T3SS flagelar cambia de especificidad de los substratos de exportación de los de tipo eje-gancho a tipo filamento, entre los que se encuentra FlgM, que es exportado al medio extracelular [190] [144] y así libera de la inhibición a FliA. Sin embargo se encontró que FliA facilita la secreción de FlgM, lo que sugiere una función dual de FliA, como chaperona de FlgM y como factor transcripcional de la clase III flagelar [191].

Las chaperonas FlgN y FliT, también poseen funciones reguladoras en la expresión flagelar. FlgN incrementa la traducción de FlgM [192] y FliT inhibe la transcripción de genes clase II y promueve la transcripción del operón *flhDC* a través de la inhibición del complejo (FlhD)₄(FlhC)₂ [193].

Los genes Clase III codifican para las proteínas FlgK, FlgL, FliD (HAP's) y para FliC [170], así como para las proteínas que forman el motor flagelar MotAB y las involucradas en la quimiotaxis [170] (proteínas Che, ver quimiotaxis).

Q u i m i o t a x i s

Hacia finales del siglo XIX el fisiólogo alemán Wilhelm Pfeffer y otros biólogos establecieron que las bacterias se movían en respuesta a cambios en la temperatura (termotaxis), luz (fototaxis), salinidad (osmotaxis) y oxígeno (aerotaxis) así como a metabolitos específicos (**quimiotaxis**). Sin embargo, no fue sino hasta la década de 1960 cuando se comenzaron a elucidar los mecanismos moleculares de la taxis bacteriana, específicamente de la quimiotaxis. Adler estableció que *E. coli* se mueve preferencialmente hacia una mayor concentración de aminoácidos (ácido aspártico, serina y treonina) y carbohidratos (glucosa y galactosa) [194]. Mostró que estas moléculas son detectadas por la bacteria, sin ser internalizadas, a través de quimiorreceptores en la superficie de la célula [195].

Sin embargo la rotación flagelar *per se*, no le confiere una ventaja adaptativa a la bacteria, es el control de la rotación lo que provoca el movimiento direccionado del microorganismo. *E. coli* - una bacteria con flagelos peritricos - rota sus flagelos en dirección contraria al de las manecillas de un reloj (CCW, **C**ounter**C**lock**W**ise), con referencia al observador que mira la parte distal de flagelo (el pentámero de FliD). Lo cual causa que los flagelos se asocien formando una trenza, capaz de impulsar a la bacteria en cierta dirección (**figura 7A**) [196]. Cuando algunos de los flagelos cambian la dirección de rotación al sentido de las manecillas del reloj (CW, **C**lock**W**ise), la trenza se deshace y cada filamento hace un trabajo en diferentes direcciones, lo que provoca que la célula sea reorientada (**figura 7B**) [196] hasta que de nuevo cambie la rotación de los flagelos hacia CCW y continúe nadando [197].

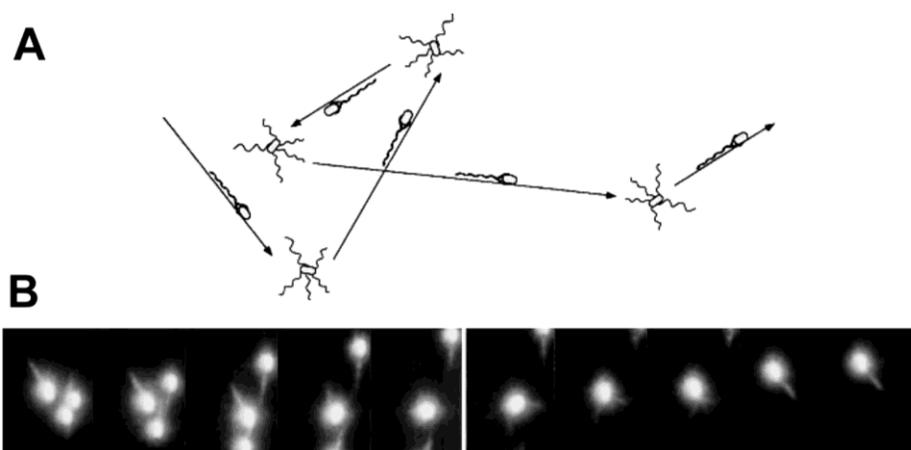


Figura 7. A) Diagrama esquemático del patrón de nado de *E. coli*, cuando la célula se reorienta la trenza que forman los flagelos se deshace y se forma durante el nado direccionado y B) Fotografías secuenciales de *E. coli*, obtenidas por microscopía de campo oscuro, donde se observan los flagelos formando una trenza [43].

En ambientes homogéneos (las concentraciones de los componentes del ambiente son isotrópicas), la bacteria nada y cambia de dirección de rotación aproximadamente una vez cada segundo [197]. En ambientes no homogéneos la frecuencia de cambio de dirección es controlada por estímulos positivos o negativos externos que son censados por la bacteria para dar lugar a un movimiento vectorial. La tendencia a cambiar de dirección de rotación, detener la rotación, como en el caso de *R. sphaeroides*, o disminuir la velocidad de rotación del flagelo (*Sinorhizobium meliloti*) [198], siempre depende de la regulación de un sistema quimiosensor.

La **quimiotaxis** bacteriana, se define como el movimiento hacia regiones que contienen altas concentraciones de nutrientes o bajas concentraciones de compuestos tóxicos [199]. Es llevada a cabo por un complejo sistema de transducción de señales que inicia en el espacio periplásmico. Los quimiorreceptores transmiten la señal hacia el interior de la célula. Mediante la interacción de seis proteínas citoplásmicas denominadas CheA, CheW, CheZ, CheR, CheB y CheY (del inglés **Chemotaxis**), transmiten la señal hasta el motor flagelar. Este proceso involucra reacciones de fosforilación, metilación y sus reacciones inversas, que modulan las frecuencias de cambio de rotación del flagelo entre CCW y CW.

Las señales quimiotácticas son detectadas por proteínas transmembranales, llamadas quimiorreceptores [200]. Se encuentran en la membrana interna, poseen un dominio periplásmico sensorial a través del cual interactúan con la molécula quimiotáctica, un dominio transmembranal, formado por dos alfa hélices y un dominio citoplásmico compuesto de tres subdominios: I) dominio HAMP (**H**istidine kinase **A**denylyl cyclases, **M**ethyl **B**inding proteins **P**hosphatases) que está en un amplio grupo de proteínas involucradas en señalización celular [201] y posee dos hélices anfipáticas [202], II) un dominio de metilación o adaptación que consiste de dos alfa hélices que poseen de cuatro a seis residuos de glutamato que pueden ser reversiblemente metilados por la proteínas CheR y CheB respectivamente [203]. Aunque algunos de estos residuos son originalmente codificados como glutaminas y posteriormente convertidos a glutamatos por desamidación por parte de CheB [204]. Debido a esta modificación postraduccional los quimiorreceptores también son genéricamente llamados MCP's (por **M**ethyl-**a**cccepting **C**hemotaxis **P**roteins) y III) un dominio de señalización, que interactúa con las proteínas CheW y CheA [205], las cuales transfieren la señal hacia el flagelo por medio de la proteína CheY (ver adelante).

En *E. coli* se identificaron cinco quimiorreceptores: Tsr, Tar, Tap, Trg, y Aer [206] [207]. Tsr responde a serina, alanina, glicina y aminoisobutirato, Tar responde a aspartato y glutamato, funciona también como receptor secundario para maltosa y para los repelentes inorgánicos cobalto y níquel, Tap para dipéptidos, Trg para ribosa y galactosa [208] y Aer responde a cambios en los niveles de oxígeno y no posee el dominio periplásmico sensorial, posee un dominio de unión FAD (**F**lavin

Adenine Dinucleotide) que puede ser oxidado por el oxígeno o detectar el estado redox de la célula mediante la interacción con algún componente de la cadena de transporte de electrones [209].

Los quimiorreceptores se unen directamente a sus quimioefectores o por medio de proteínas periplásmicas que se unen al efector y posteriormente al quimiorreceptor. Como la proteína de unión a maltosa MBP, que tras su unión con la maltosa se une al receptor Tar [210].

Además de estos cinco quimiorreceptores encontrados en *E. coli*, se identificaron por homología a nivel de secuencia otros posibles genes quimiorreceptores en diversos microorganismos que van de uno sólo en *Mesorhizobium loti* hasta más de 60 en *Magnetospirillum magnetotacticum*. [211]. Esto posiblemente refleja la capacidad de respuesta particular ante diferentes nichos que ocupa cada microorganismo.

Datos cristalográficos y bioquímicos [212] [213] mostraron que los quimiorreceptores están formados casi exclusivamente por estructuras helicoidales que forman trímeros de dímeros [214] [215], que se agrupan principalmente en los polos de la célula formando extensos arreglos [216]. Se encontró que los quimiorreceptores en diversos géneros bacterianos forman redes hexagonales con un trímero en cada vértice o lado de la red [217] [218] (BLAST X)³. Se sugirió que este agrupamiento polar de los quimiorreceptores en la bacteria, integra y amplifica la señal para censar los diversos gradientes químicos de manera más efectiva [219] [214] [220].

Estudios con el receptor de aspartato de *E. coli* mostraron que la unión de una molécula de aspartato a uno de los dos sitios de unión del dímero de MCP's, causa un cambio conformacional que evita la unión al otro sitio. Concomitantemente la unión del ligando, provoca cambios en la interacción entre las hélices transmembranales de los quimiorreceptores, induciendo un movimiento tipo pistón de una de las hélices con respecto a la otra y cambios en la orientación de este dímero con respecto al plano de la membrana [221]. Se sugirió que este cambio conformacional, inducido por el ligando, es el origen de la propagación de la señalización a través de la membrana [222].

CheW es una proteína que interactúa con el dominio de señalización de la MCP y con CheA [223]. Es esencial para la transducción de la señal quimiotáctica, y se sugirió que CheW funciona como adaptadora para transmitir las señales generadas por la MCP hacia CheA.

CheA es una proteína capaz de autofosforilarse y funcionalmente activa como dímero [224]. CheA posee cinco dominios llamados P1-5. El dominio P1 pertenece a una familia de proteínas que funcionan como intermediarios en la transferencia de grupos fosforilos provenientes de ATP (*Adenosine TriPhosphate*), hacia un grupo de proteínasceptoras de fosfato conocidas como reguladoras de respuesta, que en la vía de señalización quimiotáctica es la proteína CheY. El dominio P1 de CheA es fosforilado en el N3 del grupo imidazol de un residuo de histidina invariablemente

³ BLAST X (*Bacterial Locomotion And Signal Transduction*) décima reunión internacional celebrada en enero del 2009 en Cuernavaca Morelos donde se discuten temas de movimiento y transducción de señales en sistemas bacterianos.

conservado [225]. El Dominio P2 es un dominio de unión a CheY [226]. Al unirse P2 con CheY se transfiere el grupo fosfato del dominio P1 hacia CheY [227]. El dominio P3 es el dominio de dimerización de CheA [228]. Y junto con el dominio P4 constituyen el dominio de unión para ATP [229]. Una vez que el ATP se une al dominio P4, éste transfiere el γ -fosfato del ATP a la histidina conservada del dominio P1 del otro monómero de CheA, una reacción de *trans*-autofosforilación. El último dominio de CheA es el P5 que es homólogo a CheW [228], por lo que P5 se une a CheW sirviendo como un dominio que media la unión a los quimiorreceptores. Sin embargo, también se mostró que CheA se puede unir directamente a una MCP [230].

Así las MCP's, CheW y CheA forman un complejo oligomérico de señalización [231]. Cuando el atrayente se une a una MCP se transmite una señal, probablemente mediada por múltiples cambios conformacionales en la MCP y CheW, que da como resultado que la autofosforilación del dímero de CheA es inhibida. Por el contrario una disminución de la unión del atrayente en el quimiorreceptor activa la autofosforilación de CheA con la subsecuente fosforilación de CheY.

CheY es una proteína monomérica soluble, [232] se une al dominio P2 de CheA y es fosforilada en un residuo de aspartato altamente conservado [226]. Fosfo-CheY disminuye su afinidad por CheA pero incrementa su afinidad por FliM [233] [234], situada en el anillo C del flagelo. P-CheY se une a FliM y compite con FliG en un sitio de unión en la región central de FliM, lo que desplaza el carboxilo terminal de FliG, lo cual posiblemente modula la interacción entre FliG y MotA que conduce a un cambio en la dirección de rotación de CCW a CW que a su vez causa que la célula se reoriente [235].

Pero no todas las respuestas quimiotácticas son mediadas a través de MCP's. *E. coli*, y posiblemente otras bacterias, muestra respuesta quimiotáctica hacia carbohidratos transportados al interior de la célula por medio del sistema de fosfotransferencia o PTS (**PhosphoTransferase System**) [236]. Un componente del PTS es la enzima I (EI) que es fosforilada por fosfoenolpiruvato, EI-P transfiere el grupo fosforilo al complejo EII, que consiste de enzimas y permeasas específicas de carbohidratos, EII-P transfiere el grupo fosfato a los carbohidratos (ej. glucosa a glucosa-6-fosfato) para que puedan ser metabolizados. Cuando hay altas concentraciones de carbohidratos el transporte aumenta y la concentración de EI-P disminuye por la rápida transferencia de fosfato a EII. EI interactúa con CheA [237] [238] y evita la autofosforilación de esta última con lo que se reduce la concentración de P-CheY y se prolonga la rotación del flagelo en dirección CCW.

El sistema quimiotáctico debe constantemente adaptarse a las cambiantes condiciones ambientales. La adaptación es el proceso de recuperación de un comportamiento estimulado **aun** cuando el estímulo está presente. En *E. coli* hay al menos dos posibles mecanismos de adaptación; el primero es llevado a cabo por dos proteínas: CheR y CheB.

El dominio de señalización de una MCP contiene de 4 a 6 residuos de glutamato susceptibles a ser metilados (-CH₃). CheR es una metil transferasa, metila estos residuos a partir de la S-adenosil metionina que se encuentra en el citoplasma [239]. CheR está constitutivamente activa, sin embargo el incremento en la concentración de atrayente aumenta la metilación por parte de CheR. La metilación de las MCP's provoca la autofosforilación de CheA, con ello aumenta la probabilidad de la rotación flagelar en sentido CW, con la consecuente reorientación de la célula (adaptación a un estímulo negativo).

Por otra parte la proteína CheB posee dos dominios, el amino terminal es completamente homólogo a CheY y es fosforilado por CheA [240] y el carboxilo terminal es un dominio de metil esterasa (desmetilación) que es estimulado por la fosforilación del dominio amino terminal [241]. P-CheB desmetila los residuos esterificados de glutamato (por parte de CheR) de las MCP's, lo que induce la inhibición de la autofosforilación de CheA y lleva a aumentar la probabilidad de la rotación del flagelo en dirección CCW o de nado direccionado (adaptación a un estímulo positivo).

Un segundo mecanismo de adaptación recae en la proteína citoplásmica CheZ [242], que es un activador alostérico de la desfosforilación de CheY incrementándola cien veces [243]. CheZ puede formar complejos con CheW [244] y con una forma trunca de CheA (llamada cheA_s) [245]. CheA_s es expresada desde un sitio alternativo de traducción a niveles similares a CheA completa [246]. La mayoría de CheZ se une a CheA_s y provoca un retraso temporal en la activación de CheZ, que conduce a que primero P-CheY interactúe con FliM y provoque el cambio de rotación hacia CW y posteriormente sea desfosforilada por CheZ (**figura 8**).

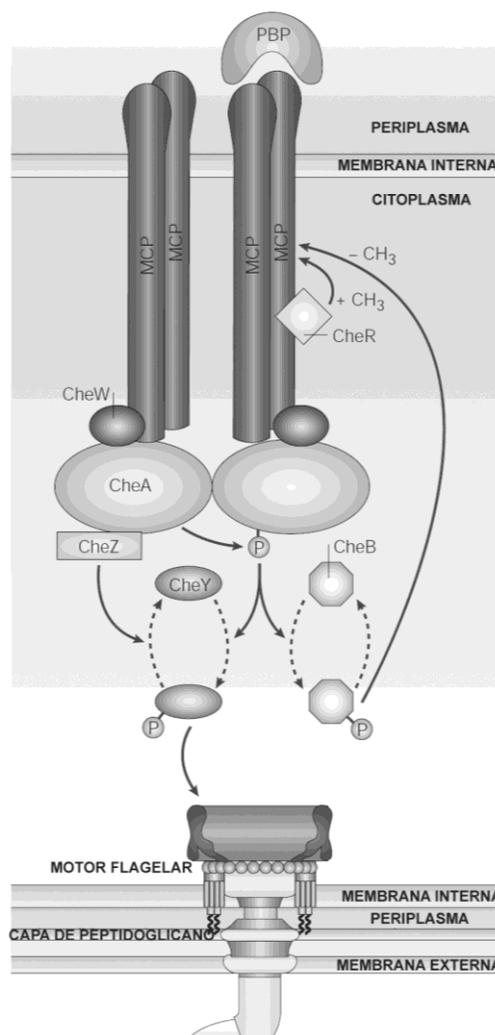


Figura 8. Esquema del sistema quimiosensor de *E. coli*, el cual está acoplado al motor flagelar para impulsar a la bacteria, PBP representa a la proteína de unión a maltosa o al quimioefector. El atrayente o repelente es censado por las MCP, que transmite una señal hacia el citoplasma a través de proteínas CheW, CheA y CheY, ésta última interactúa con el motor flagelar para cambiar la dirección de rotación del flagelo [199].

Rhodobacter sphaeroides

R. sphaeroides es una eubacteria fotosintética (**figura 9A**) que pertenece al grupo α -3 de las proteobacterias [247]. A este grupo pertenecen géneros tan diversos como *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Caulobacter*, *Brucella* y *Rickettsia*. *R. sphaeroides* es un organismo de vida libre con una gran diversidad metabólica [248]. Es capaz de crecer aeróbicamente, anaeróbicamente en presencia de luz o anaeróbicamente en la oscuridad, en presencia de aceptores externos de electrones tal como el dimetilsulfóxido. Y en caso de que lo requiera puede fijar nitrógeno atmosférico [249].

Bajo condiciones anaeróbicas con luz o en oscuridad *R. sphaeroides* sintetiza un extenso sistema de membranas intracitoplásmicas, (ICM **Intra**Cytoplasmic **M**embrane) que surgen como una

serie de invaginaciones de la membrana citoplásmica [250]. Las ICM son los sitios donde reside el aparato fotosintético de esta bacteria y pueden alcanzar hasta un 40% del peso celular seco total [250]. Por lo que *R. sphaeroides* es empleada como modelo de estudio de la fotosíntesis bacteriana [251].

R. sphaeroides posee un genoma distribuido en dos cromosomas circulares (cromosoma I, 3.11Mb y cromosoma II 0.9Mb) y cinco plásmidos endógenos, el contenido de G+C de su DNA es de alrededor de 65% [252].

L a e s t r u c t u r a f l a g e l a r d e R . s p h a e r o i d e s

En 1967 se publicó un estudio de la estructura del flagelo en bacterias fotosintéticas. Se aislaron y analizaron por microscopía electrónica flagelos aislados de *Rhospirillum rubrum*, una bacteria filogenéticamente cercana a *R. sphaeroides* [253]. Sin embargo, no fue hasta 1987 que se publicó un trabajo sobre la movilidad en *R. sphaeroides* que estableció que posee un único flagelo de localización subpolar [254] y que rota en el sentido CW. Posteriormente fueron aisladas mutantes que rotan en dirección CCW [255]. En este trabajo también se encontró que cuando la bacteria se reorienta, la hélice que forma el filamento sufre un cambio polimórfico, adopta una conformación de una corta longitud de onda y una larga amplitud, que trae como consecuencia que el flagelo se enrolle hacia el cuerpo celular. Más tarde se encontró que bajo esta forma el flagelo sigue rotando lentamente y contribuye a la reorientación de la célula [256].

Previo a la secuenciación del genoma de *R. sphaeroides*, el grupo de Armitage, Sockett y principalmente nuestro grupo de trabajo (Dreyfus y Camarena) identificaron a la mayoría de los genes involucrados en la formación y estructura del flagelo de esta bacteria [257] [258] [259]. Nuestro grupo de trabajo aisló por primera vez cuerpos basales intactos y encontró que la interfase entre el filamento y el gancho, constituida por las proteínas HAP1 y HAP3, es más ancha que en *S. enterica* [260] [261] (**figura 9B**). Se encontró que la proteína FlgK posee una región central de 860 residuos que carece de homología con cualquier otra FlgK [259]. Posteriormente se encontró que mutantes con ablaciones de hasta 100 residuos de esta región aún son capaces de ensamblar el filamento, pero algunas de estas regiones podrían ser importantes en la correcta transmisión de la fuerza de rotación flagelar [262].

En 2001 se encontró que la proteína del gancho (FlgE) de *R. sphaeroides*, que posee una forma recta contrario al gancho curvo observado en *S. enterica*, tiene una región rica en prolinas cerca del amino terminal y es responsable de producir ganchos con una forma recta [263]. Lo que sugiere que ganchos rectos pueden ser necesarios para el correcto funcionamiento flagelar en bacterias monoflageladas.

En 1994 se encontró que *R. sphaeroides* posee un motor flagelar dependiente de protones [264] y un año más tarde fueron identificados los genes homólogos *motA* [265] y *motB* [266]. Se mostró que MotA_{RS} forma un motor híbrido con PomB en *Vibrio alginolyticus*, que funciona con el ión Na⁺, sin embargo MotB_{RS} no es funcional con PomA_{Va} [267]. En este mismo estudio se encontró que proteínas quiméricas de MotB_{RS} y PomB_{Va} fueron funcionales. Recientemente se encontró que una quimera de la proteína FliG de *R. sphaeroides* y de *E. coli* es funcional en una cepa de *E. coli* que tiene una ablación en *fliG* [268].

Con la secuenciación del genoma de *R. sphaeroides* se encontró un grupo adicional de genes flagelares (Fla2) [252]. Inicialmente se sugirió que estos eran genes inactivos y producto de duplicación génica [269]. Sin embargo, recientemente se demostró que bajo circunstancias específicas mutantes no flageladas (*fla1*⁻) de *R. sphaeroides* son capaces de expresar este segundo grupo de genes flagelares y generar múltiples flagelos polares. También se mostró que el sistema flagelar Fla1 se adquirió por transferencia horizontal de una ancestral γ -proteobacteria y que el sistema Fla2 es endógeno de *R. sphaeroides* [270]. Ambos sistemas de genes flagelares coexisten y aún no se comprende cómo se regula la expresión del sistema endógeno.

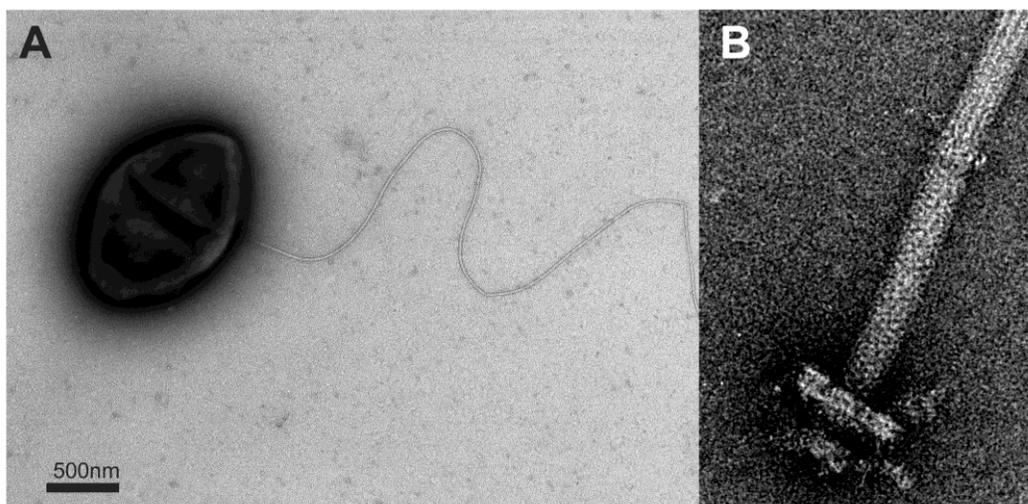


Figura 9. A) Microscopía electrónica de *R. sphaeroides* en la que se muestra su flagelo y B) Microscopía electrónica del flagelo de *R. sphaeroides* donde se observa el cuerpo basal, el gancho, interfase gancho-filamento y el filamento (fotografías obtenidas en nuestro laboratorio).

Biogénesis flagelar y regulación genética del flagelo de R. sphaeroides

El análisis de diversas mutantes de *R. sphaeroides* sugiere que, en términos generales, la biogénesis flagelar del sistema Fla1 procede de igual manera que en el caso de *E. coli* [131]. Sin embargo hay algunas diferencias sutiles; una población de mutantes por ablación de *fliM* de *R.*

génicos que forman los componentes del aparato de exportación [274] y de otro activador transcripcional llamado FleT. Posteriormente FleQ y FleT forman un heteromultímero que activa la transcripción, también dependiente de σ^{54} , de los componentes estructurales del cuerpo basal y del gancho, así como de sus proteínas ensambladoras [276]. Además dentro de esta categoría de genes se transcriben dos genes: *fliA*, un factor sigma alternativo llamado σ^{28} que activa la transcripción de los genes que codifican para las proteínas del filamento y de unión gancho-filamento, FliC, FlgK y FlgL, respectivamente, a los genes que codifican para las proteínas quimiotácticas y a las que forman el motor flagelar. El otro gen es *flgM* que codifica para un factor anti- σ^{28} que inhibe la actividad de FliA y/o desestabiliza el complejo $E\sigma^{28}$ hasta que se complete el cuerpo basal del flagelo (**figura 10**). Cabe hacer notar que todavía no se conoce nada de la biogénesis o regulación genética del sistema flagelar 2.

Quimiotaxis en Rhodobacter sphaeroides

En la década de los 50's Clayton realizó un extenso estudio en fototaxis y quimiotaxis en la bacteria fotosintética *R. rubrum* [277]. Por otra parte *R. sphaeroides* presenta respuestas tácticas a una amplia gama de estímulos incluyendo ácidos orgánicos como propionato y acetato [278], azúcares [279], aminoácidos [280] [281], iones inorgánicos [278], oxígeno (aerotaxis) [282] y luz (fototaxis) [283] [284] [285]. Y no han sido identificadas moléculas repelentes; pero se encontró una respuesta repelente a la luz azul y una posterior respuesta adaptativa caracterizada por la liberación de metanol producido posiblemente por la desmetilación de un receptor. Aunque aún no ha sido identificado este receptor [286].

Además de que *R. sphaeroides* rota su flagelo solo en dirección CW para nadar direccionadamente (*E. coli* lo hace en dirección CCW) y sólo detiene su rotación para reorientarse (*E. coli* lo rota CW). *R. sphaeroides*, como otras bacterias, es capaz de aumentar su velocidad (acelerar) de nado hasta en un 25% [287], este fenómeno es conocido como quimiocinesis [288] y se observó al añadir ácidos orgánicos y iones como K^+ y Rb^+ . Este incremento en la velocidad es independiente del gradiente electroquímico o del cambio en la tasa de transporte de electrones y a diferencia de la quimiotaxis no existe el fenómeno de adaptación. Las células nadan a mayor velocidad mientras esté presente el quimioatrayente [289].

En contraste al sistema quimiotáctico de *E. coli*, *R. sphaeroides* posee un sistema quimiosensor más complejo. *R. sphaeroides* posee múltiples genes quimiotácticos; 13 *mcP*'s. 4 *cheW*'s, 4 *cheA*'s, 6 *cheY*'s, 2 *cheB*'s, 3 *cheR*'s, una copia de *cheD* y *cheX* y no se ha encontrado al homólogo del gen *cheZ*. Adicionalmente el gen *cheBRA*, es una fusión del dominio de metilesterasa de *cheB*, el dominio de metiltransferasa de *cheR* y un dominio de *cheA*. Todos estos genes están

agrupados en tres regiones del cromosoma I, a excepción de *cheY4* y *mcpG* que se encuentran en el cromosoma II [252].

Cuatro de las MCP's carecen de regiones transmembranales (TlpC, TlpL, TlpS y TlpT) y se encontró que forman complejos quimiosensores citoplásmicos con CheW₄, CheA₃, CheA₄ y CheR₃ [290] [291]. Mientras que el resto de las MCP's, junto con CheW₂, CheW₃, CheA₂ y CheR₂ se encuentran en el polo de la bacteria formando agregados [291] [292], cuya simetría hexagonal es similar a los complejos encontrados en *E. coli* [217] y *C. crescentus* [218] (comunicación oral BLAST X).

Estudios detallados de las proteínas CheA (CheA₁-CheA₄) muestran que no todas las CheA poseen los cinco dominios conservados (P1-P5). Tres de ellas (CheA₂, CheA₃ y CheA₄) están dedicadas a la señalización en el sistema Fla1 [293] [294]. Las proteínas CheA fosforilan específicamente a cada CheY (CheY₁-CheY₆) y CheB (CheB₁ y CheB₂) [295] y recientemente se encontró que CheA₃ es capaz de actuar como fosfatasa únicamente de CheY₆ [296].

Es importante señalar que la ablación de los operones *cheOp2* o *cheOp3*, anula la quimiotaxis de *R. sphaeroides* dependiente del sistema flagelar 1 [297] [298] [294]. Además se encontró que únicamente los reguladores de respuesta CheY₃ ó CheY₄ y CheY₆ son necesarios en el funcionamiento de este mismo sistema flagelar [299]. Sin embargo, se descubrió que todas las *cheY*'s están presentes en la cepa silvestre y experimentos *in vitro* sugieren que interactúan con la proteína FliM del sistema Fla1 [300].

Recientemente se descubrió que CheY₁, CheY₂ y CheY₅ controlan el sistema flagelar 2 y posiblemente interactúan con una proteína identificada como FliM2 [301]. Posteriormente se encontró que la mayoría de los genes del *cheOp1* son necesarios para la quimiotaxis del sistema flagelar 2 (comunicación personal Ana Martínez y BLAST X).

L a c a p a d e p e p t i d o g l i c a n o (P G)

En 1884 el investigador danés Christian **Gram** desarrolló, fortuitamente, un método para distinguir entre dos tipos de bacterias por medio de un microscopio de luz. Cuando células son lavadas con etanol, las cuales fueron previamente expuestas al colorante cristal violeta, retienen una coloración púrpura, son llamadas bacterias *Gram-positivas*. En contraste las bacterias *Gram-negativas* pierden la coloración púrpura [302].

Las bacterias *Gram-negativas* poseen una membrana externa, una membrana interna o citoplásmica y entre ellas un espacio llamado espacio periplasmático donde reside la capa de peptidoglicano (PG) [303] (**figura 11**). En tanto que las bacterias *Gram-positivas* únicamente tienen la

membrana interna y la capa de PG [304]. La capa de peptidoglicano⁴ (PG) o también llamada mureina es una macromolécula esencial que rodea a la membrana citoplásmica. Forma una especie de envoltura presente en casi todos los géneros bacterianos, con excepción de micoplasmas y planctomicetos [303]. No ha sido detectada en el género *chlamydiae*, aunque poseen la mayoría de los genes biosintéticos [305]. El grupo de las arqueas también posee una llamada pseudomureina [306]. La capa PG también está presente en algunos organelos fotosintéticos (cianelos) del alga *Cyanophora paradoxa* [307], y se encontró que nueve genes involucrados en la síntesis de la capa de PG son esenciales para la división del cloroplasto en la planta *Physcomitrella patens* (musgo) [308].

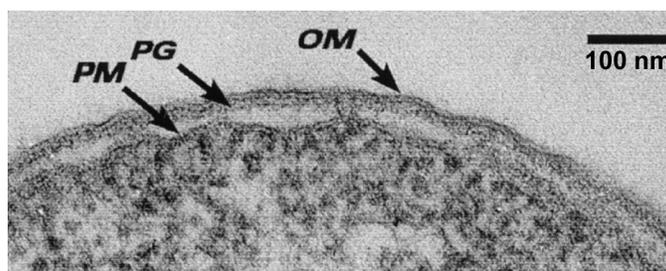


Figura11. Microscopía electrónica de una sección de una célula de *E. coli*, MP, membrana citoplásmica, PG capa de peptidoglicano y OM membrana externa [309].

E s t r u c t u r a d e l a c a p a d e P G

La capa de PG es un heteropolímero de cadenas lineales de residuos alternados de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico que se encuentran unidos a través de un enlace glicosídico β -1,4 [304]. Además el residuo de ácido murámico posee un grupo lactil (-O-C(CH₃)-COOH) en el carbono 3, que permite unir péptidos covalentemente con el grupo lactil de un residuo de ácido murámico de otra cadena de glicanos [304] que se encuentra paralela con respecto a la primera cadena. De esta manera se forma una red tridimensional que cubre a la membrana citoplásmica de la bacteria [310]. La longitud de las cadenas de glicanos varía dependiendo de la cepa y las condiciones de crecimiento. En *E. coli* alrededor de un 66% de las cadenas están formadas por entre 1 a 30 unidades de disacáridos (*N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico) [311], mientras cadenas más largas de 30 disacáridos poseen un promedio de 45 disacáridos [312]. Cada una de estas cadenas terminan generalmente en un residuo modificado de ácido murámico, constituido por un anillo intramolecular debido a la unión entre el C1 y C6, conocido como residuo del ácido *N*-acetil-1,6-anhidromurámico [313], formado posiblemente durante la biosíntesis de la capa de PG o como resultado de la acción enzimática de una proteína llamada transglicosilasa lítica [314] (**figura 12A**).

⁴ La palabra peptidoglicano, derivada directamente del inglés *peptidoglycan* donde *glycan* tiene el significado *polysaccharide*, polisacárido, por lo que otro termino más correcto para peptidoglicano es peptidopoliglúcido o peptidopolisacárido, sin embargo en esta tesis se usará peptidoglicano como es comúnmente conocida.

Los oligopéptidos que unen las cadenas de glicanos tienen una inusual composición. En *E. coli* y otras bacterias *Gram*-negativas, un residuo de L-alanina está unido al grupo lactil del residuo de ácido murámico [315], posteriormente se une un residuo de D-glutamato [316] que se une a un residuo del ácido meso 2,6-diaminopimélico (A_2pm) a través de un enlace γ [317]. Por último se une un dipéptido de D-alanina [318] (L-Ala₁--D-Glu₂--m-A₂pm₃--D-Ala₄--D-Ala₅). Así, cadenas de dos diferentes glicanos se unen entre sí, generalmente por medio del grupo carboxilo de la D-Ala en la posición 4 de una cadena, y el grupo amino del A_2pm de la otra cadena [304].

Aunque la cadena de glicanos se considere lineal, impedimentos estereoelectrónicos promueven la formación de una hélice lineal en la que cada cadena peptídica se encuentra en una orientación de 90° con respecto a la cadena de glicanos [319]. La estructura helicoidal del glicano muestra un desfase de 120° de un oligopéptido con respecto al otro [320]. Por lo que se concluye que 1 de cada 3 oligopéptidos (33%) está entrecruzado con la otra cadena que se encuentra paralela y en el mismo plano que la primera. En realidad se encontró que el grado de entrecruzamiento varía entre 40 a 60% en *E. coli* [321] hasta 93% en *Staphylococcus aureus* [322] (figura 12B).

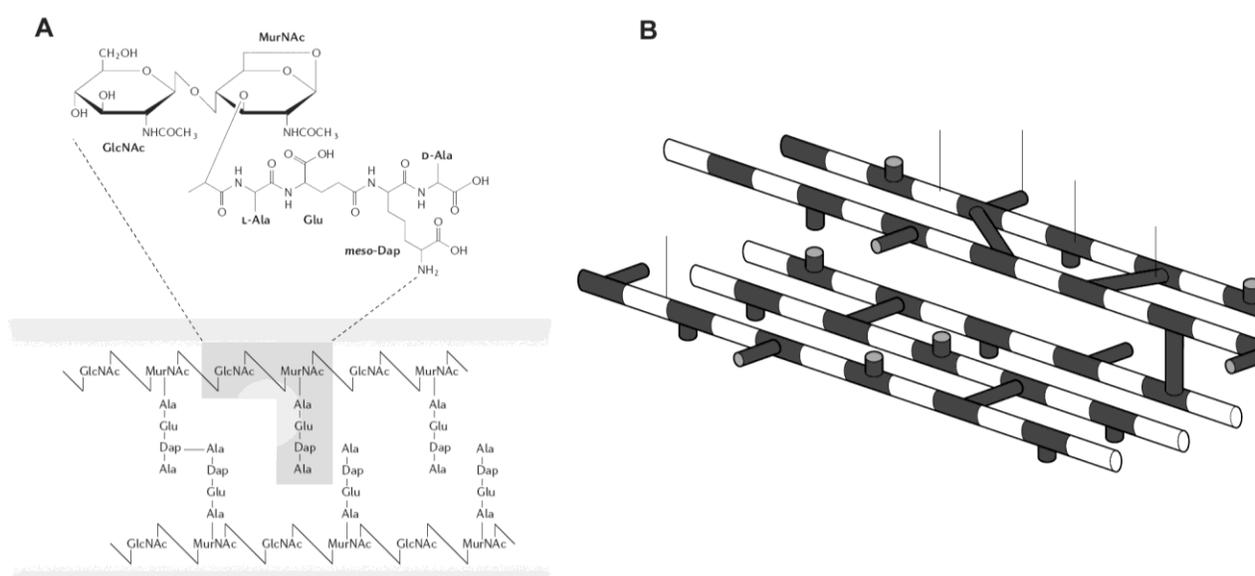


Figura12. A) Esquema de la composición de la capa de PG, en la parte superior esta la estructura del muropéptido GlcNAc-MurNAc péptido. este compuesto es identificado como el agente tóxico en diferentes enfermedades [323]. B) Representación de las cadenas de glicanos MurNAc (gris) y GlcNAc (blanco) entrecruzadas por la cadena peptídica [324].

Propiedades biofísicas de la capa de PG

La capa de PG puede soportar hasta 2 a 3 atmósferas (atm) de presión en bacterias *Gram*-negativas [325] y hasta 25 atm en *Gram*-positivas [314]. Estudios de microscopía de fuerza atómica y criotomografía electrónica mostraron que el grosor de la capa varía entre 4 y 7 nm para bacterias

Gram-negativas como *E. coli* y *C. crescentus* [326] [327], mientras que en bacterias *Gram*-positivas está entre 15 y 30 nm [328] [329]. El mayor grosor en este tipo de bacterias es debido a que las cadenas de glicanos forman varias capas unidas por las cadenas de péptidos que se encuentran fuera del plano de la cadena de glicanos [304]. Mientras que en bacterias *Gram*-negativas se sugirió que del 75 al 80% de la capa de PG se encuentra como monocapa y del 20 al 25% forma una tricapa [330]. Sin embargo, en un estudio reciente se encontró sólo una monocapa de PG en *E. coli* y *C. crescentus* [327].

La capa de PG es elástica, ésta se logra expandir y comprimir hasta tres veces su volumen [331], es 2.5 veces más expandible o comprimible en dirección del eje mayor de la célula [326]. La red que forman glicanos y cadenas cortas de péptidos producen poros con forma hexagonal llamados *tesserae* (mosaicos), de alrededor de 5 nm^2 [332] (**figura 13A**), a través de los cuales pueden atravesar proteínas de hasta 25kDa. Pero imperfecciones en la red [333] provocan que proteínas de hasta 100kDa sean capaces de difundir por la capa de PG [334]. Un estudio reciente mostró que pueden existir hasta un 20% de defectos en la formación de enlaces peptídicos en la red y aún conservar la integridad celular con la consecuente generación de poros de hasta 400 nm^2 [335].

La orientación de la capa de PG con respecto a la membrana citoplásmica ha sido objeto de un gran debate en la comunidad científica [336]. Los datos del grosor de la capa de PG [326], así como estudios bioquímicos, de ultraestructura y biofísicos [325] [326] [327], sugirieron que las cadenas de glicanos se alinean perpendicularmente al eje mayor de la célula y orientadas paralelamente con respecto a la membrana citoplásmica (**figura 13B**).

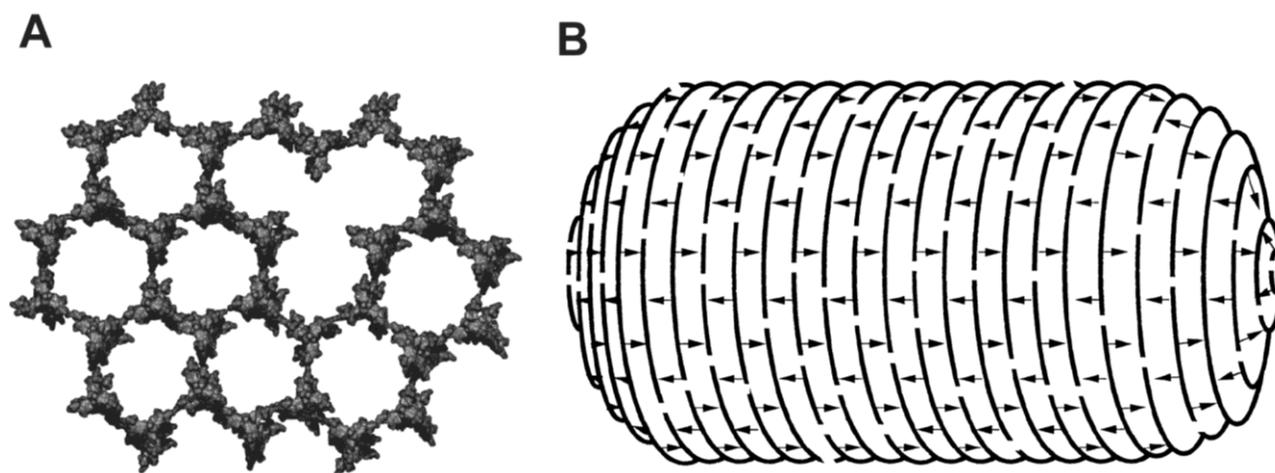


Figura13 A) Estructura cristalográfica de parte de la cadena de PG, en la que se observan los poros de aproximadamente 5 nm^2 y alguna de sus imperfecciones. [320] y B) Representación de la disposición de las cadenas de glicanos en una célula bacteriana. Las flechas representan las cadenas peptídicas que unen las cadenas paralelas de glicanos que se representan con líneas discontinuas [337].

Biosíntesis de la capa de PG

La biosíntesis de la capa de PG es un proceso complejo, involucra más de 20 reacciones enzimáticas que ocurren en el citoplasma, en la membrana interna y en el espacio periplasmático. La biosíntesis inicia en el citoplasma con una serie de reacciones que forman al ácido uridinilfosfato-*N*-acetilmurámico (UDP-MurNAc) a partir de fructosa 6-fosfato (fructosa-6-P) [338]. Posteriormente, mediante una serie de reacciones consecutivas son añadidos cada uno de los 5 aminoácidos al UDP-MurNAc [338] que formarán la cadena peptídica que unirá a las cadenas de glicanos en la capa de PG. El UDP-MurNAc-pentapéptido es unido a un poliisoprenoide membranal (C₅₅), también llamado bactoprenol, por la proteína *MraY* para formar un precursor llamado lípido I (MurNAc-pentapéptido-pyrofosforil-undecaprenol) [339]. En este punto la *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), producida también a partir de la fructosa-6-P [338], es añadida al lípido I por la proteína *MurG* para producir el lípido II [GlcNAc-β-(1,4)-MurNAc-(pentapéptido)-pyrofosforil-undecaprenol] [339]. El lípido II es transportado a través de la membrana citoplásmica por una translocasa o flipasa específica, aunque su identidad todavía no ha sido precisada con exactitud.

El último paso de la biosíntesis involucra la incorporación del disacárido del lípido II a la capa de PG. Este proceso es llevado cabo principalmente por enzimas bifuncionales llamadas proteínas de unión a penicilina PBP (***Penicillin-Binding Proteins***) [340]. Las PBP son responsables de catalizar las reacciones de formación de los enlaces glicosídicos y peptídicos en la capa de PG mediante las reacciones de transglicosilación y transpeptidación respectivamente. En la reacción de transglicosilación un enlace glicosídico es formado entre el C1 del residuo de MurNAc en la cadena de PG y el C4 del residuo de GlcNAc del lípido II [341]. Por otra parte la reacción de transpeptidación ocurre entre la D-Ala de la cadena peptídica del lípido II y el residuo A₂pm de la cadena peptídica de la capa de PG [342].

La capa de PG está en constante remodelación para adecuarse a las condiciones de crecimiento y división celular. Se estimó que alrededor del 50 al 60 % de la capa de PG es regenerada en tan sólo una generación de *E. coli* [343]. Para que las PBP incorporen un nuevo disacárido a la capa de peptidoglicano ésta necesita ser cortada para la inserción del nuevo material, las enzimas que se encargan de estos cortes son las hidrolasas de la capa de peptidoglicano [344] (PGH, ***PetidoGlycan Hydrolases***), también llamadas autolisinas debido a que su acción descontrolada causa la lisis de la célula [345].

Hidrolasas de la capa de PG

Las PGH forman una amplio y diverso grupo de enzimas que cortan cada enlace glicosídico y amida de la capa de PG [346]. Las *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasas hidrolizan el enlace amida entre el MurNAc y la L-alanina, separando la cadenas de glicanos del oligopéptido [347]. Las carboxi y endopeptidasas cortan entre los enlaces peptídicos LD y DD [347]. Hay tres tipos de enzimas que cortan la cadena de glicanos, las *N*-acetilglucosaminidasas, las lisozimas y las transglicosilasas líticas. Estas dos últimas llamadas genéricamente muramidadas [346]. Las *N*-acetilglucosaminidasas cortan el enlace glicosídico β 1,4 entre de los residuos de GlcNAc y MurNAc [348]. Por otra parte las muramidadas cortan el enlace glicosídico β 1,4 entre los residuos de MurNAc y GlcNAc (**figura 14**).

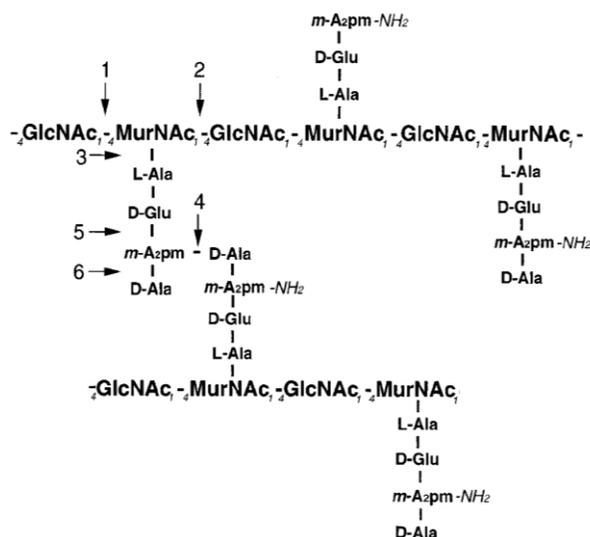


Figura14. Esquema de la capa de PG, donde se señalan los sitios de corte de diferentes PGH. 1) *N*-acetilglucosaminidasa 2) lisozima y transglicosilasa lítica 3) *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa 4) D,D-endopeptidasa 5) γ -D-glutamyl-L-diaminopimelica endopeptidasa y 6) L,D-carboxipeptidasa [337].

Además de participar en el crecimiento celular las PGH participan en diversos procesos fisiológicos como el recambio y reciclamiento de la capa de PG, participan durante el corte del septo en la división celular [349], digieren la capa de PG de las esporas durante la esporulación y germinación [350], participan en la degradación especializada de la capa de PG en el ensamblaje de diferentes sistemas de secreción [351], estimulan la resucitación de células en estado viable no cultivable [352] entre otros procesos (ver tabla 1 de ref. 346).

Transglicosilasas líticas

Las transglicosilasas líticas (LT, *Lytic Transglycosylases*), a diferencia de las lisozimas que producen un residuo de MurNAc con un grupo OH en el C4 [353] (**figura15A**), llevan a cabo concomitantemente con el corte del enlace glicosídico, una reacción intramolecular de transglicosilación que da como resultado la formación de un residuo 1,6-anhidromurámico [354]. La reacción de transglicosilación involucra a un residuo ácido, frecuentemente un glutamato, que dona su protón al enlace glicosídico entre el MurNAc y GlcNAc, y se obtiene un intermediario oxocarbonio estabilizado por el grupo *N*-acetoamida que se encuentra en la posición 2 del MurNAc. En seguida la desprotonación del grupo hidroxilo del C6 del MurNAc por el glutamato catalítico, permite el ataque nucleofílico sobre el C1 para formar el anillo glicosídico 1,6 en el residuo de MurNAc [355] [356] (**figura 15B**).

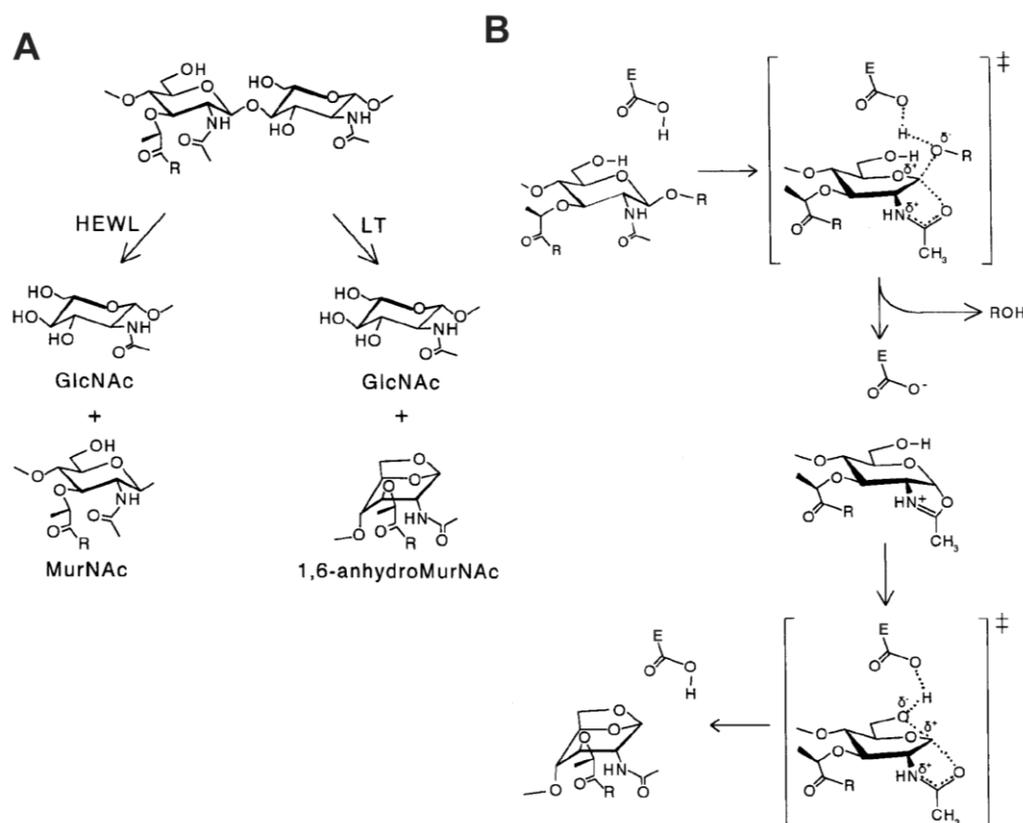


Figura15. A) Comparación de los productos de la acción enzimática de la lisozima (HEWL) y de la transglicosilasa lítica (LT) y B) Mecanismo de reacción propuesto de las transglicosilasas líticas [357].

Con base en sus secuencias las LT son agrupadas en cuatro diferentes familias [358]. La familia 1 se subdivide en 5 subfamilias que poseen la firma característica: ES-(30-40)-GLM/WQ-(10-20)-AYN, mientras que las familias 2, 3 y 4 contienen diferentes motivos [358]. Particularmente se

encontró que la última familia agrupa a enzimas que se encuentran en bacteriófagos. Se sugirió que este tipo de enzimas rompen la pared de peptidoglicano para la entrada del material genético del virus o durante la lisis de la bacteria en la fase lítica del virus [359] [360].

Las LT han sido extensamente estudiadas en diversos organismos, están agrupadas en la base de datos Pfam (PF01464) [361] donde se encuentran casi 3000 secuencias de probables transglicosilasas. *E. coli* posee siete transglicosilasas líticas; Slt70 [362] **Soluble Iytic transglycosylase**, MltA [363], MltB [364], MltC [365], MltD [366] **Membrane-bound Iytic transglycosylase**, YfhD [367] y EmtA [368]. Las primeras cinco son exomuramidasa, ya que únicamente cortan al final de la cadena de glicanos liberando el producto 1,6anhidromurámico, mientras que EmtA posee una actividad de endomuramidasa [368]. Todas son de localización periplásmica y las Mlt y EmtA se encuentran unidas a la cara interna de la membrana externa, sin embargo MltB puede sufrir un corte proteolítico entre sus residuos 39 y 40 para dar lugar a la forma soluble Slt35 [369]. Se han obtenido cristales de varias LT, la primera de ellas fue la Slt70 [370]. Posee un dominio catalítico estructural muy parecido a lo que se encontró en la estructura de la lisozima de pollo (HEWL, **Hen Egg White Lysozyme**) [371] [372], a pesar de no haber similitud al nivel de sus secuencias.

En 2002 se obtuvo una mutante de seis LT de *E. coli* [373]. Esta cepa formó cadenas de células conteniendo de 3 a 8 células hasta en un 50% de la población y también se encontró que la forma de las células era ligeramente cocoide. Por lo que se puede sugerir que estas enzimas están involucradas en la elongación y división celular.

También se encontró que los productos de hidrólisis de las LT que son liberados por las bacterias patógenas *Bordetella pertussis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Helicobacter pylori* funcionan como factores de virulencia [374] [375] [376] (**figura 14A**). Sin embargo, también se encontró que los fragmentos de la hidrólisis de la capa de PG funcionan como factores que intervienen en la simbiosis entre bacteria marina *Vibrio fischeri* y el calamar *Euprymna scolopes* [377] (ver página 6 de esta tesis).

Planteamiento del problema

La biogénesis flagelar ha sido extensamente estudiada y generalmente se ha utilizado como modelo a la enterobacteria *S. enterica* [167]. Más frecuentemente aparecen nuevos sistemas flagelares que aportan nuevas preguntas acerca de la biogénesis de este organelo [29]. La biogénesis flagelar es un proceso regulado a nivel transcripcional, postranscripcional, traduccional y postraduccional [378] [102] [184]. En la década de los 70 ya se había sugerido que

hidrolasas de la capa de peptidoglicano (PG) de *B. subtilis* estaban involucradas en la biogénesis flagelar para permitir el paso del flagelo a través de la capa de PG [379] [380] [381] [382]. Se identificaron qué mutaciones en la amidasa y glucosaminidasa LytC y LytD respectivamente, presentaban fenotipos no flagelados o con una movilidad disminuida [383] [384]. Se piensa que es probable que estas mutaciones estuvieran más relacionadas con efectos pleiotrópicos, como consecuencia en deficiencias durante la división celular, que con la biogénesis flagelar *per se*. Más tarde se pensó que FlgJ de *S. enterica* podría estar llevando a cabo la función de crear la cavidad para el paso del eje flagelar [385]. FlgJ de *S. enterica* es bifuncional; un dominio amino terminal de aproximadamente 150 residuos interactúa con las proteínas del eje flagelar para auxiliar, posiblemente, en su ensamblaje [141] y un dominio carboxilo terminal, de 160 residuos, posee la capacidad de hidrolizar la capa de PG [140] Por lo cual se sugirió que la hidrólisis localizada de la capa de PG crea una cavidad para que el eje flagelar atraviese la capa de PG y la biogénesis flagelar continúe [140].

FlgJ de *R. sphaeroides* es una proteína de 100 residuos, con homología al extremo amino terminal de FlgJ de *S. enterica* [259], pero carece del dominio de hidrólisis de la capa de PG. Únicamente posee el dominio que se sugirió, en *S. enterica*, como el que interacciona con las proteínas del eje flagelar para ensamblarlas. Por lo que aparentemente se trata de una proteína unidominio o monodominio. Posteriormente se reportó que la proteína FlgJ de diversas α -proteobacterias, grupo al que pertenece *R. sphaeroides*, también carecen del dominio catalítico [142].

Esto llevó a una pregunta: ¿ es necesaria una proteína que cumpla la función de hidrólisis ?. Datos sobre la estructura de la capa de PG en *E. coli* y otras bacterias *Gram* negativas, como *C. crescentus*, sugieren que se forma una red con oquedades de aproximadamente 2.5 nm [320] [327]. El eje flagelar de *E. coli* es completamente similar al de *S. enterica*, el cual posee un diámetro de 11 nm [386]. Por lo tanto existe un impedimento estérico que no permite el paso de esta estructura.

R. sphaeroides es una bacteria *Gram* negativa sin particularidades aparentes en cuanto a la estructura de su capa de PG. Por lo que se puede suponer que es similar a la de *C. crescentus*, que como *R. sphaeroides* es una α -proteobacteria. Los genes que codifican para las proteínas del eje flagelar de *R. sphaeroides* fueron identificados previamente, están conservados y presentan homología global con las proteínas de *S. enterica* [263] [259]. Por otra parte, la estructura del flagelo de *R. sphaeroides* se visualizó por microscopía electrónica [260] [261] y los datos sugieren que las dimensiones de este eje flagelar son similares a lo reportado para *S. enterica* [386]

HIPÓTESIS

R. sphaeroides posee un gen homólogo al gen *flgJ* de *S. enterica*, pero este gen codifica para una proteína que carece del dominio carboxilo terminal que es indispensable para la hidrólisis de la capa de PG, por lo tanto es posible que exista un polipéptido independiente con la capacidad de hacer una cavidad localizada en la capa de PG, para que proceda la formación del eje flagelar de *R. sphaeroides*.

OBJETIVOS:

- 1.-** Identificar al gen que codifica para la proteína que hidroliza la capa de peptidoglicano durante la biogénesis flagelar de *R. sphaeroides*.
- 2.-** Caracterizar a la proteína FlgJ de *R. sphaeroides* e identificar cómo participa en la formación del eje flagelar de *R. sphaeroides*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y medios de cultivo. Los plásmidos, cepas de *E. coli* y *R. sphaeroides* y oligonucleótidos utilizados en este trabajo son listados en la tabla 1. Las cepas de *E. coli* se crecieron en el medio LB [387] (*Luria-Bertani*): triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%, para cultivos sólidos se añadió al medio LB 2% de bacto-agar. En caso necesario se añadieron los siguientes antibióticos al medio: ampicilina (200 µg/ml), cloranfenicol (25 µg/ml), espectinomicina (50 µg/ml), gentamicina (30 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml) y tetraciclina (25µg/ml). Las cepas se crecieron a 37°C con una agitación de 250-300 revoluciones por minuto (rpm).

TABLA 1. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos

Cepas	Características relevantes	referencia
<i>E. coli</i>		
JM103	<i>hsdR4Δ (lac-proAB)F' traD 36 proAB lac^f lacZ ΔM15</i>	[387]
M15[pREP4]	<i>thi lac ara⁺ gal mtl F' recA⁺ uvr⁺ lon⁺</i> ; plásmido pREP4 Kan ^r	Qiagen
BL21(DE3)pLysS	<i>F' ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)gal dcm(DE3) pLysS</i>	Novagen
S17-1	<i>recA endA thi hsdR RP4-2-Tc::Mu::Tn7; Tp^r Sm^r</i>	[388]
<i>R. sphaeroides</i>		
WS8-N	Cepa silvestre; resistente espontanea Nal ^r	[389]
Δ <i>sltF</i>	WS8-N, Δ <i>orf_0072NH₂(1-336)::aadA</i> Fla ⁻ ; Spc ^r Nal ^r	Este trabajo
Plásmidos		
pQE30	vector de expresión; Ap ^r N-terminal epitope 6xHis	Qiagen
pQE60	vector de expresión; Ap ^r C-terminal epitope 6xHis	Qiagen
pRSJ	<i>flgJ</i> clonado en el vector pQE60 <i>NcoI/BglII</i>	Este trabajo
pRSorf0072	<i>RSP0072</i> clonado en el vector pQE30 <i>SacI/HindIII</i>	Este trabajo
pRSorf0072E57A	<i>RSP0072E57A</i> clonado en el vector pQE30 <i>SacI/HindIII</i>	Este trabajo
pRSorf0072E83A	<i>RSP0072E83A</i> clonado en el vector pQE30 <i>SacI/HindIII</i>	Este trabajo
pJQ200mp18	vector suicida usado en el remplazo génico en bacterias <i>Gram</i> negativas	[390]
pTZ18R/19R	plásmido derivado de pUC que lleva al gen <i>lacZ</i> para la	Pharmacia

	selección; Ap ^r	
pRK415	Plásmido derivado del pRK404; usado para la expresión en <i>R. sphaeroides</i> bajo el promotor <i>lac</i> ; <i>lacZ mob⁺</i> ; Tc ^r	[391]
pWM5	Contiene un cassette <i>aadA</i> ; Sm ^r Spc ^r	[392]
pBG813	Fragmento de 3.8 kb <i>Bam</i> HI de WS8-N clonado en pTZ19R; Ap ^r	[259]
pGJT00	Fragmento de 1.4 kb <i>Pst</i> I - <i>Pst</i> I de pBG813 subclonado en pRK415; Tc ^r , que lleva RSP_0072	Este trabajo
pGJT01	Fragmento de 1.4 kb <i>Pst</i> I - <i>Pst</i> I de pBGJT00 subclonado en pRK415; Tc ^r , que lleva RSP0072E57A	Este trabajo
pGJT02	Fragmento de 1.4 kb <i>Pst</i> I - <i>Pst</i> I de pBGJT00 subclonado en pRK415; Tc ^r , que lleva RSP0072E83A	Este trabajo
Oligonucleótidos		
F1	5'-CTGATCTAGACCCTCCGGCCCCGGCCACGGTG -3'	Este trabajo
R2	5'-CCGGAATTCGACGAGCGCGAACCTCATGCC -3'	Este trabajo
F3	5'-CGGGAATTCCTCAACTGGCGCTGGCATGCG -3'	Este trabajo
R4	5'-CTGATCTAGAGGGGTCACGCCCGAGAGACAG-3'	Este trabajo
SPC1	5'-CCTGGAATTCGGGCAGATCCGTGC-3'	Este trabajo
SPC2	5'-TCATGGAATTCCTCCCAATTTGTG-3'	Este trabajo
orf72F	5'-CATGGAGCTCGCGGACGAGGGCTGCGAGACG -3'	Este trabajo
orf72R	5'-CCCGAAGCTTTCACGTTTGCATTGCGAGCAG -3'	Este trabajo
FE57A	5'-GGCGATTGCCCGCGTGGCGTCGGGCCGGGGCGGGC-3'	Este trabajo
RE57A	5'-GCCCCGCCCGGCCGACGCCACGCGGGCAATCGCC-3'	Este trabajo
FE83A	5'-CTTCGAGACCCGGGCCGCGGCGGTGCGCATGCTC-3'	Este trabajo
RE83A	5'-GAGCATGCGCACCGCCGCGGCCCGGGTCTCGAAG-3'	Este trabajo
JF	5'-CATGCCATGGATCTGAAGCTTCAGTCC -3'	Este trabajo
JR	5'-GGAAGATCTCGACTTGCCGTCCCTGACGAGAG -3'	Este trabajo

Ap (ampicilina), Kan (kanamicina), Nal (ácido nalidíxico), Spc (espectinomocina), Tc (tetraciclina).

Las cepas de *R. sphaeroides* se crecieron en el medio de cultivo Sistrom [393]: KH₂PO₄ 20 mM, (NH₄)₂SO₄ 3.78 mM, ácido succínico 34 mM, ácido L-glutámico 0.67 mM, ácido L-aspártico 0.25 mM, NaCl 8.5 mM, ácido nitrilotriacético 1.04 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 0.23 mM, FeSO₄ 0.007 mM, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 0.16 μM y 0.1 ml de solución de elementos traza (EDTA 4.7 mM, ZnSO₄ 38 mM, FeSO₄ 18 mM, MnSO₄ 9 mM, CuSO₄ 1.5 mM, Co(NO₃)₂ 0.9 mM y H₃B₃O₃ 1.8 mM). Se ajustó el pH a 7 con KOH y se esterilizó en una autoclave por 20 minutos (min) a 121°C, posteriormente se agregó 1 ml de solución de vitaminas (ácido nicotínico 1%, tiamina 0.5% y biotina 0.01%, esta solución se esterilizó por filtración) por cada litro de medio Sistrom y para cultivos sólidos se añadió 2% de bacto-agar al medio Sistrom. En los casos requeridos se añadieron al medio Sistrom los siguientes antibióticos: ácido nalidíxico (20 μg/ml), espectinomocina (50 μg/ml), gentamicina (30 μg/ml), kanamicina (25 μg/ml)

y tetraciclina (1 $\mu\text{g/ml}$). Las cepas se crecieron quimioheterotróficamente en la obscuridad a 30°C con una agitación de 250-300 rpm o fotoheterotróficamente en tubos de 1.5 ml (tubos genéricamente llamados *ependorf*) completamente llenos de medio Sistrom e iluminados continuamente con luz artificial (6 focos de 40 Watts cada uno).

Transformación de *E. coli* [387]. Los cultivos de *E. coli* se crecieron hasta alcanzar una densidad óptica ($\text{DO}_{550\text{nm}}$)=0.45 - 0.5, se enfrió el cultivo por 5 min, se cosecharon las células a 3,500 $\times\text{g}$ por 6 min a 4°C, el paquete celular se resuspendió en medio volumen del cultivo original con una solución fría y estéril de CaCl_2 100 mM y se incubaron las células en hielo por 20 min. Posteriormente se centrifugó como se describió anteriormente, el paquete celular se resuspendió en 1/15 del volumen original de cultivo con la solución de CaCl_2 . Las células competentes se incubaron en hielo de 1 a 24 hrs, el ADN a transformar se mezcló con 200 μl de células, se incubaron en hielo por 1 hr y en seguida las células se incubaron a 42-43°C durante 2 min, inmediatamente después se colocaron en hielo por 5 min, se agregaron 0.8 ml de LB y se incubaron a 37°C por 1 hr. Finalmente las células transformadas se platearon⁵ en cajas de LB con el agente selectivo y se incubaron a 37°C toda la noche.

Conjugación [394]. Cultivos de 2 y 10 ml de las cepas de *E. coli* y *R. sphaeroides* respectivamente, se crecieron durante toda la noche. Al día siguiente se inocularon 5 ml de LB con 50 μl del cultivo de *E. coli* y se creció hasta una $\text{DO}_{550\text{nm}}$ =0.5, los cultivos de ambas cepas se colocaron 5 min en hielo, se transfirieron 1.5 ml de cada cultivo a tubos *ependorf*, se centrifugaron a 3,000 $\times\text{g}$ por 5 min a temperatura ambiente (TA), el paquete celular se resuspendió en 0.5 ml de LB, se centrifugó y este procedimiento se repitió dos veces con cada una de las cepas. Los paquetes celulares se resuspendieron en 0.5 ml de LB, se mezclaron, se centrifugaron bajo las mismas condiciones y se resuspendieron en 50 μl de LB. La mezcla se colocó sobre un rectángulo de nitrocelulosa de aproximadamente 1 cm^2 , previamente esterilizado y colocado sobre una caja petri con medio LB. Se incubó toda la noche a 30°C, se tomó el papel de nitrocelulosa, se colocó en un tubo *ependorf* y se agregó 1 ml de LB, las células se mezclaron vigorosamente en un agitador tipo “vortex” para separarlas de la nitrocelulosa y se platearon en un medio selectivo.

Electroforesis de geles de agarosa [387]. Para la separación de los fragmentos de ADN se corrieron geles de agarosa al 1% en amortiguador TE (acetato de sodio 5 mM, EDTA 1 mM, Tris-base 40 mM y ácido acético 32 mM) se corrieron aproximadamente de 80 a 100V por 1hr, se incubaron 10 min en una solución de bromuro de etidio y se visualizaron por medio de la exposición a luz ultravioleta.

⁵ Platear en la traducción literal del inglés del verbo *plate* que tiene en una de sus acepciones: distribuir o recubrir uniformemente un inóculo (de microorganismo) sobre una superficie. Webster's Third New International Dictionary.

Purificación de DNA cromosomal [387]. Se crecieron 500 ml de cultivo a 30°C de 14 a 16 hrs, se cosecharon las células a 3,500 xg por 15 min a 4°C, se resuspendieron en 10 ml de amortiguador de sacarosa (sacarosa 25%, 1 mM EDTA y 50 mM Tris-base pH 8), se agregaron 4.5 ml de EDTA 250 mM pH 8, 1 ml de una solución de lisozima (5 mg/ml en Tris-base 25 mM pH 8), 150 μ l de una solución de RNAsa (10 mg/ml en acetato de sodio 100 mM pH 5) y se incubó en hielo por 15 min. Posteriormente se agregaron 3 ml de la solución lítica-triton 3X (Triton X-100 0.3%, EDTA 187.5 mM pH 8 y 150 mM Tris-base pH 8), se incubó 15 min en hielo, se agregaron 10 ml de agua y se centrifugó a 27,000 xg por 30 min a 4°C, la pastilla se resuspendió en 10 ml del amortiguador A (SDS 5%, EDTA 2 mM y Tris-base 50mM pH 7.5), se agregaron 100 μ l de una solución de proteinasa K (5 mg/ml en amortiguador A, previamente incubada a 37°C) y se incubó a 37°C por toda la noche con agitación de 250 rpm. Al siguiente día se agregó RNAsa (10 mg/ml en NaCl 15 mM Tris-base 10 mM pH 7.5) hasta obtener una concentración final de entre 0.1 a 0.5 mg/ml y se incubó por 1hr a 37°C. Se hicieron extracciones con 2 volúmenes de una solución de fenol-cloroformo en relación volumétrica 1:1; se centrifugó a 8,000 xg por 10 min, se descartó la fase orgánica, y se repitió la extracción hasta que desapareció la interfase color blanco. Por último se hizo una extracción con 2 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamilico 24:1. Se repitió la centrifugación, se separó la fase acuosa y se le agregó 1/25 del volumen de una solución de NaCl 5 M y 2 volúmenes de etanol, se centrifugó a 10,000 xg por 10 min a 4°C, el precipitado se lavó con etanol al 80%, el DNA cromosomal se secó y se resuspendió en 500 μ l de agua.

Purificación de plásmidos. Se crecieron cultivos de 2 ml de *E. coli* durante toda la noche. Las células se centrifugaron a 3,000 xg por 2 min y se purificaron mediante el protocolo y columnas de Qiagen (QIAGEN GMBH); se resuspendió el paquete celular en 250 μ l del amortiguador P1, se agregaron 250 μ l del amortiguador de lisis P2, se incubó por 2 min y se añadieron 350 μ l de amortiguador de neutralización N3, se centrifugó a 16,000 xg por 10 min a TA. Se tomó el sobrenadante y se colocó en una columna de Qiagen y se centrifugó a 16,000 xg por 1 min, se añadieron a la columna 500 μ l de amortiguador de lavado PB, y se repitió la centrifugación como la anterior, se añadieron 750 μ l de amortiguador PE, se centrifugó nuevamente y se repitió el lavado con PE. Por último se centrifugó a la columna en las mismas condiciones para quitar el exceso de amortiguador y se colocaron sobre la columna 50 μ l de agua para eluir el DNA plasmídico, se incubó por 1 min y se centrifugó a 16,000 xg por 1min.

PCR, clonación y digestiones con endonucleasas de restricción. Las reacciones de la polimerasa en cadena (PCR *Polimerase Chain Reaction*) se llevaron a cabo en un termociclador PTC-200 MJ *research*, se usó la enzima *Pfu* native o turbo (Stratagene) y también se empleó una enzima Taq polimerasa donada por la unidad de microarreglos del Instituto de Fisiología Celular

(UMA-IFC). Para las clonaciones se usó la enzima T4-DNA ligasa de *New England Biolabs* incubando las reacciones de ligación a 16°C por 16 hrs. Las digestiones enzimáticas se llevaron a cabo con enzimas de *New England Biolabs*, *Promega*, *Invitrogen* y *ROCHE*.

Purificación de fragmentos de DNA. Se corrieron geles de agarosa y se extrajeron las bandas de interés del gel, los fragmentos de DNA ocluidos en el gel se purificaron utilizando el sistema de Qiagen *gel extraction kit*. La banda de agarosa se pesó y se añadieron 3 volúmenes, con relación al peso de la banda, del amortiguador QG, se incubó a 50°C por 10 min, se añadió un volumen de 2-propanol y se colocó en una columna de Qiagen, se centrifugó a 16,000 xg por 1 min, se añadieron a la columna 500 μl del amortiguador QG y se repitió la centrifugación. Se lavó la columna con 750 μl de amortiguador PE, se incubó por 5 min y se centrifugó la columna a la misma velocidad y tiempo, se repitió el proceso de lavado con el amortiguador PE. Posteriormente se centrifugó la columna para quitar el exceso de amortiguador y se eluyó el DNA añadiendo 50 μl de agua, se incubó por 1 min y se centrifugó para colectar el DNA. También se usó el sistema de Qiagen *PCR purification kit* para purificar fragmentos de DNA que fueron previamente aislados de geles de agarosa y del subsecuente tratamiento con enzimas de restricción: el DNA se llevó a un volumen de 100 μl y se añadieron 500 μl del amortiguador PB, la mezcla se colocó en una columna de Qiagen y se centrifugó a 16,000 xg por 1 min. Se añadieron a la columna 750 μl del amortiguador PE, se incubó por 5 min y se centrifugó la columna a la misma velocidad y tiempo, se repitió el proceso de lavado con el amortiguador PE. Posteriormente se centrifugó la columna para quitar el exceso de amortiguador y se eluyó el DNA añadiendo 50 μl de agua, se incubó por 1 min y se centrifugó para colectar el DNA.

PCR en colonia. Cultivos de *R. sphaeroides* de 600 μl se crecieron fotoheterotróficamente por 16 hrs, se centrifugó el cultivo a 16,000 xg por 5 min a TA y la pastilla se resuspendió en el volumen original de agua. Se tomaron 5 μl , que se usaron como templado en un volumen total de 50 μl , se utilizó una Taq polimerasa donada por la UMA-IFC, y se adicionó Mg^{2+} a una concentración de 2.5 mM.

Secuenciación de DNA. El DNA se secuenció en un secuenciador automático ABI PRISM 310 de Perkin-Elmer *Applied Biosystems* en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Aislamiento de la mutante de RSP_0072. Para obtener la mutante del marco de lectura abierto RSP_0072 de *R. sphaeroides*, se amplificaron 604 pb río arriba de RSP_0072, con los oligonucleótidos F1 (*XbaI*) y R2 (*EcoRI*) y se amplificó una región de 550pb a partir de la base 315 de RSP_0072 (residuo 112 de RSP_0072) hasta el final del gen utilizando los oligonucleótidos F3 (*EcoRI*) y R4 (*XbaI*), para la amplificación de estos productos de PCR se utilizó como templado DNA

cromosomal de *R. sphaeroides* WS8-N. Por otra parte se amplificó el gen *aadA*, que confiere resistencia a espectinomicina, utilizando como templado el plásmido pWM5 [392] con los oligonucleótidos SPC1(*EcoRI*) y SPC2 (*EcoRI*), la resistencia se clonó entre los dos productos de PCR, lo que generó una construcción en la que RSP_0072 carece de los primeros 90 residuos. Esta construcción se clonó en el sitio *XbaI* del plásmido pTZ19R (Pharmacia) y posteriormente se subclonó dentro del vector suicida pJQ200mp18 [390], este plásmido se introdujo en la cepa WS8 por conjugación diparental con la cepa S17-1, las exconjugantes fueron seleccionadas por la resistencia a espectinomicina y sensibilidad a gentamicina, lo cual sugiere que en un evento de doble recombinación el alelo silvestre RSP_0072 se sustituyó por el alelo que lleva la ablación de los primeros 90 residuos de RSP_0072. Se comprobó el intercambio del alelo silvestre a través de un PCR en colonia de las mutantes obtenidas (**figura16**). En carril 6 se observa el producto de amplificación en la cepa silvestre (WS8) con los oligonucleótidos orf72F y orf72R que es de 795pb y en el carril 1 el mismo producto de amplificación en la mutante Δ orfRSP_0072, que es más grande debido a la inserción del gen de resistencia a espectinomicina (795pb wt - 270pb la remoción de los primeros 90 residuos + 1440pb de la resistencia a espectinomicina = 1965pb). En el carril 7 es el producto de amplificación en la cepa WS8 con los oligonucleótidos orf72F y R4 que es de 849pb y en el carril 2 el mismo producto en la mutante Δ orfRSP_0072 que es de 2019pb. Por último en el carril 8 y 3 son los productos de amplificación con los oligonucleótidos F1 y orf72R en las cepas Δ RSP_0072 (2521pb) y WS8 (1351pb) respectivamente.

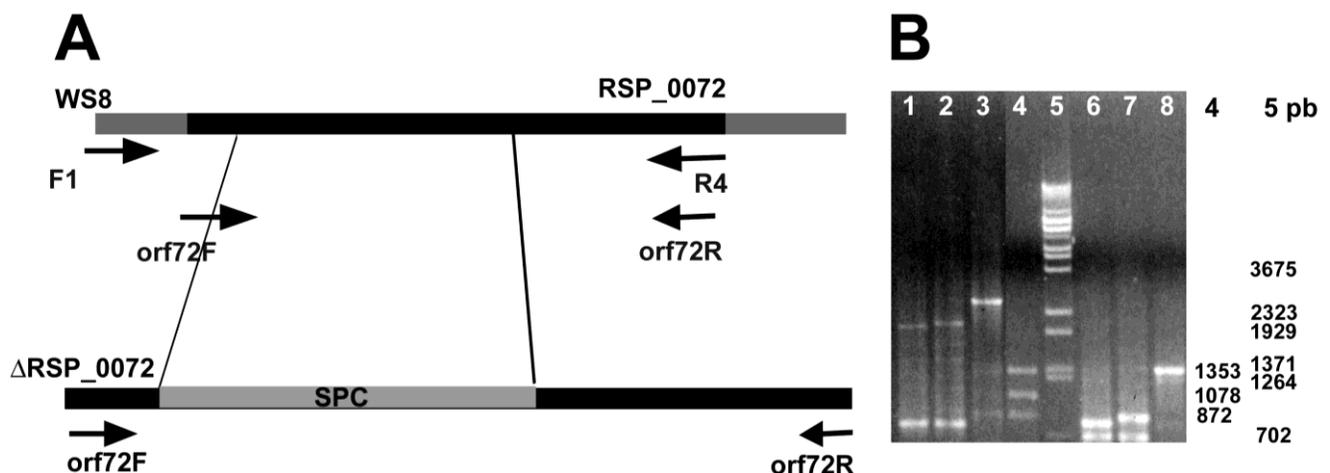


Figura 16. A) Esquema de la región amplificada en el genoma de WS8 y de la mutante en RSP_0072 y B) Gel de agarosa para separar DNA donde se corrieron los productos de amplificación de la cepas WS8 y Δ RSP_0072. Carriles 1, 2, 3 y 6, 7, 8 corresponden a la mutante de RSP_0072 y WS8 respectivamente. Los carriles 4 y 5 corresponden a los estándares de peso molecular. En todos los casos las bandas más pequeñas corresponden a productos inespecíficos

Complementación. La mutante RSP_0072 se complementó con el plásmido pGJT00 el cual se generó mediante la subclonación de un fragmento de 1440 pb que proviene del plásmido pBG813, que contiene a RSP_0072 silvestre así como 92 y 550 pb río arriba y río abajo respectivamente, y esta construcción se introdujo a la mutante por medio de conjugación.

Ensayos de movilidad. Se prepararon cajas de petri con medio M9 (Na_2HPO_4 60 mM, KH_2PO_4 22 mM, NaCl 8.5 mM, NH_4Cl 18.7 mM, MgSO_4 2mM y CaCl_2 0.1 mM) o medio Sistrom, que se preparó sin ácido succínico, se adicionó 0.25% de bacto-agar y 0.1 mM de propionato de sodio como atrayente. Se inocularon las cajas con 2 μl de un cultivo crecido en condiciones fotoheterotróficas por toda la noche. Las cajas se incubaron de 36 a 48 hrs a 30°C en la obscuridad.

Microscopía electrónica. Se crecieron cultivos de las cepas de *R. sphaeroides* fotoheterotróficamente durante toda la noche, se colocaron 10 μl de cultivo sobre una rejilla para microscopía electrónica, se incubó por 30 seg, se removió el exceso de cultivo por absorción, se agregaron 10 μl de acetato de uranilo al 2% y se incubó de 15-20 seg, se retiró el exceso de medio de contraste y las rejillas se observaron en un microscopio JEOL, modelo JEM-1200XII a 80kV en la unidad de microscopía electrónica del Instituto de Fisiología Celular.

Determinación de proteína. Se utilizó el método de TCA-Lowry [395], la fracción de proteína a cuantificar se disolvió en 1 ml de agua, se añadieron 100 μl de deoxicolato de sodio 0.15% y se incubó por 10 min, se añadieron 100 μl de ácido tricloroacético (TCA) 72%, se centrifugó a 8,500 xg por 10 min a TA, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de la siguiente solución: (CuSO_4 0.04 mM, citrato de sodio 0.07 mM, Na_2CO_3 190 mM y NaOH 100 mM) se incubó por 10 min y se añadieron 100 μl de una solución de Folin (SIGMA) al 50% V/V, se incubó por 30 min a TA y se determinó la absorbancia a 750 nm. Para la curva estándar se utilizó albumina sérica bovina (SIGMA).

Precipitación de proteínas [396]. Se utilizó el método de precipitación con metanol-cloroformo, la muestra se llevó a un volumen de 100 μl , se añadieron 400 μl de metanol se mezclaron en vortex, se añadieron 100 μl de cloroformo, 300 μl de agua, se agitaron en vortex y se centrifugó a 16,000 xg por 6 min, a TA, se descartó la fase superior y se añadieron 300 μl de metanol, nuevamente se agitaron con el vortex y se centrifugó a 16,000 xg por 6 min, se descartó el sobrenadante y los residuos de metanol se evaporaron a 60°C por 2 min, por último se añadió amortiguador de carga (glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.02% y Tris-base 62.5 mM pH 6.8) y se hirvieron por 10 min. De esta forma se eliminan sales, se concentran las proteínas y pueden ser cargadas en geles desnaturizantes.

Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida SDS-PAGE. La separación de proteínas se llevó a cabo según el método de Laemmli [397], se utilizaron geles separadores al 12.5, 15 o 17.5%, los geles se tiñeron con una solución de Coomassie R250 al 0.2%, en 50% de metanol y 10% de ácido acético, se utilizaron marcadores de peso molecular preteñidos de *New England Biolabs*.

Ensayo de dicroísmo circular. Para verificar la integridad estructural de FlgJ se utilizó un sistema de dicroísmo circular AVIV modelo 202-01, se hicieron barridos de 260 a 190 nm, se colectaron datos en miligrados a 25°C y el ensayo se repitió 5 veces.

Sobreexpresión y purificación de RSP_0072 (SlfF) y FlgJ. Los genes correspondientes se clonaron en los vectores de sobreexpresión pQE30 N-terminal 6xHis y pQE60 C-terminal 6xHis respectivamente. Para lo cual se llevó a cabo un PCR donde se utilizó DNA cromosomal de WS8 como templado y los oligonucleótidos orf72F (*SacI*) y orf72R (*HindIII*) para *sltF* y JF (*NcoI*) y JR (*BglII*) para *flgJ*, los productos de PCR se purificaron, se digirieron, se volvieron a purificar y se ligaron en los vectores de sobreexpresión, cabe hacer notar que la secuencia amplificada de *sltF* no contiene los primeros 81 pb que codifican para una secuencia de exportación tipo SEC [398]. Las clonas obtenidas se purificaron y secuenciaron.

Los experimentos de sobreexpresión para SlfF se llevaron a cabo en la cepa de *E. coli* [M15 pREP4] que contiene al plásmido pREP4 (Genbank A78782), se creció un cultivo de 15 ml de LB toda la noche y se inoculó un cultivo de 300 ml de LB que se creció a 37°C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.6-0.8, al cual se agregó IPTG (*Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside*) a una concentración de 1 mM, el cultivo se creció a 25 ó 30°C de 6 a 7hrs, las células se cosecharon a 3,500 *xg* por 15 min a 4°C y se guardaron a -20°C. FlgJ se sobreexpresó en la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS en este caso se creció un cultivo de 50 ml a 37°C por toda la noche, con el que se inocularon 500 ml de LB, que se incubaron a 37°C hasta alcanzar un DO_{600nm} de 1.5 y entonces se cosecharon las células de igual forma que SlfF.

Las células que llevan a SlfF se resuspendieron en 10 ml de amortiguador de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.9, con una tableta que contiene diferentes inhibidores de proteasas (ROCHE), se sonicaron en un sonicador Branson modelo 250, en hielo a una intensidad de 50% y con una potencia de 3 a 5 por 1 min, se repitió el proceso 6 veces con intervalos de 1 a 2 min para evitar el calentamiento de la muestra. El extracto celular se centrifugó a 14,500 *xg*, 10 min a 4°C, se tomó el sobrenadante y se ultracentrifugó a 25,000 *xg* por 1hr a 4°C, se tomó el sobrenadante y se incubó 1hr a 4°C con una resina de agarosa acoplada a Ni²⁺ (Qiagen), posteriormente la resina se lavó con amortiguador de lisis adicionado con imidazol en concentraciones crecientes desde 10 a 50 mM, SlfF se eluyó con una concentración de imidazol de 200 mM, la elución se dializó en el

amortiguador (NaH_2PO_4 50 mM pH 6.5), el dializado se concentró en un sistema de concentración de Millipore (Amicon Ultra, con una membrana que impide el paso de moléculas de un peso molecular mayor a 10,000 **Molecular Weight Cut Off**) y al concentrado se le determinó la cantidad de proteína.

FlgJ se purificó de cuerpos de inclusión. Las células se resuspendieron en el amortiguador de lisis, se sonicaron de igual forma que SltF, se centrifugaron a 3,500 $\times g$ por 10 min a 4°C, la pastilla se resuspendió en 10 ml de amortiguador de lisis adicionado con 1 M de cloruro de guanidina (Gu-HCl), se incubó por 1hr a 4°C y se centrifugó nuevamente como en las condiciones anteriores, los cuerpos de inclusión se resuspendieron en amortiguador de lisis adicionado con 5 M de Gu-HCl, se sonicó en hielo a 50% de intensidad y a una potencia de 1 a 2, por 1 min y el proceso se repitió 2 veces más. El sonicado se incubó por 1hr a 4°C y se ultracentrifugó por 1hr a 25,000 $\times g$ a 4°C, se tomó el sobrenadante y se incubó por 4 hr con la resina acoplada a Ni^{2+} , se lavó la resina con amortiguador de lisis con 5 M de Gu-HCl, y con concentraciones crecientes de imidazol de 5 a 15 mM, FlgJ se eluyó con 200 mM de imidazol. FlgJ se renaturalizó por diálisis con amortiguador de NaH_2PO_4 50 mM pH 6.5, el dializado se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4°C en el rotor SS34, se tomó el sobrenadante y se concentró por medio de una membrana de diálisis de 3,500 MWCO espolvoreada con polietilenglicol de 8000 de peso molecular, periódicamente se agregó más polietilenglicol hasta reducir el volumen a 1 ml, otra alternativa fue utilizar un Amicon Ultra de 5,000 MWCO, finalmente se determinó la concentración de proteína.

Mutagénesis dirigida de RSP_0072. El remplazo de los residuos E57 y E83 por alanina se llevó a cabo por el método *QuikChange* (Stratagene); se utilizó como templado al plásmido pGJT00, se utilizaron los oligonucleótidos FE57A, RE57A y FE83A, RE83A, el PCR se llevó a cabo en las siguiente condición : 95°C 5 min, 16 ciclos de (95°C 1 min, 55°C 45 seg y 68°C 9 min) y una extensión a 68°C 10 min, el producto de PCR se digirió con la endonucleasa de restricción *DpnI* por 12 hrs a 37°C, la digestión se purificó por medio de sistema de Qiagen *Extraction kit* y la elución se transformó en células competentes JM103, de las colonias resultantes se aisló DNA plasmídico y se secuenció para confirmar el intercambio. Esta construcción se usó como templado para amplificar a SltFE57A y SltFE83A con los oligonucleótidos orf72F y orf72R, que posteriormente se clonaron en el vector pQE30, se sobreexpresaron y purificaron las proteínas mutantes como en el caso de la SltF silvestre. Al mismo tiempo la construcción con cada mutación puntual se subclonó en el vector pRK415 para llevar a cabo estudios de complementación.

Generación de anticuerpos [399]. Se prepararon anticuerpos contra las proteínas SltF y FlgJ, se utilizaron las proteínas purificadas, aunque en el caso de SltF se utilizó una proteína purificada de cuerpos de inclusión, debido a que se obtuvo una mayor cantidad y pureza de esta fracción. Se utilizaron conejos machos de 1.5 Kg mantenidos en el bioterio del Instituto de Fisiología celular. Se realizaron inmunizaciones intramusculares o subcutáneas con 500 μ g de cada proteína en una suspensión con adyuvante completo de Freund (SIGMA) en una relación volumétrica de 1:1, la mezcla se agitó vigorosamente por 30 min en un agitador tipo vortex, posteriormente se aplicaron tres refuerzos con 100 μ g de proteína en suspensión con adyuvante incompleto de Freund en una relación de 1:1 y con intervalos de tres semanas entre cada refuerzo. En cada inmunización se verificó la presencia de anticuerpos contra las proteínas a través de un ensayo de inmunoréplica tipo western. Para finalizar el conejo se sacrificó, la sangre obtenida se incubó 2 hrs a 37°C para facilitar la formación de un coágulo y se guardó a 4°C toda la noche, posteriormente se separó el coágulo para obtener el suero con los anticuerpos, la mitad del volumen se congeló a -70°C. Del suero restante se precipitaron las γ -inmunoglobulinas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado (SAS pH 7), se adicionó lentamente la mitad del volumen de SAS y se agitó por 6 hrs a 4°C, posteriormente se centrifugó a 8,000 xg por 15 min a 4°C, la pastilla se resuspendió en amortiguador PBS (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1.8 mM, NaCl 137 mM y KCl 2.7 mM pH 7) y se repitió el procedimiento de precipitación con SAS, se centrifugó de igual forma, la pastilla se resuspendió en la mitad del volumen original con PBS y se dializó contra el mismo amortiguador toda la noche a 4°C.

Ensayos de actividad de muramidasa. Para determinar la actividad de muramidasa de SltF, se llevaron a cabo dos ensayos: 1) el lisoplato de actividad [400], el cual consistió en colocar en una caja petri 10 ml de amortiguador NaH_2PO_4 50 mM pH 6.5 con 1% de agarosa y con células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698 SIGMA), que sirve como sustrato para las muramidases, a una concentración de 0.5 mg/ml. Los lisoplatos se inocularon con 7 μ g de SltF silvestre, SltFE57A, SltFE83A, amortiguador, 7 μ g BSA (control negativo) 1 μ g de lisozima SIGMA (control positivo). Las cajas se incubaron por 12 hrs a 37°C, en caso de haber hidrólisis del sustrato se forma un halo transparente concéntrico al sitio de inoculación. 2) ensayo turbidimétrico [401], este se llevo a cabo en un espectrofotómetro en el que se colocó una celda con 3 ml de amortiguador NaH_2PO_4 con 0.5 μ g/ml del mismo sustrato con agitación constante, se colectaron los datos de absorbancia a 450 nm y se agregaron 120 μ g de SltF. Mientras el sustrato es insoluble y se mantiene como una mezcla homogénea por la agitación, con la adición de la enzima disminuye la turbidez (absorbancia) ya que los productos de hidrólisis son solubles.

Inmunoréplica tipo western [402]. Una vez que las proteínas fueron separadas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm , se transfirió en una cámara húmeda con amortiguador de transferencia (NaHCO_3 10 mM, Na_2CO_3 3 mM y metanol 20%) a 350 miliamperios por 1hr a TA. Una vez concluida la transferencia la membrana se bloqueó por 1hr con una solución al 5% de leche (marca comercial *svelty*) en el amortiguador TTBS (NaCl 500 mM, Tris-base 2.4 mM pH 7.5 y Tween-20 0.05%), posteriormente se lavó la membrana con TTBS por 15 min, se removió el TTBS y se añadió amortiguador fresco, se lavó por 10 min y se repitió el lavado por 5 min más. Se incubó 1hr a TA con el anticuerpo deseado diluido en TTBS al que se le adicionó 0.1% de leche para disminuir interacciones inespecíficas, se repitieron los lavados con TTBS, posteriormente se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Amersham), por último se lavó nuevamente la membrana y se reveló la presencia del anticuerpo primario mediante el anticuerpo secundario con una reacción quimioluminiscente de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante del sistema (Amersham) y la quimioluminiscencia se registró en placas radiográficas (KODAK).

Ensayo de secreción de FliC. Las diferentes cepas de *R. sphaeroides* se crecieron fotoheterotróficamente por 16hrs. Los cultivos se centrifugaron a 16,000 $\times g$ por 15 min, se tomó el sobrenadante y se repitió la centrifugación, el sobrenadante se filtró con una membrana de un tamaño de poro de 0.22 μm (Millipore), las proteínas del filtrado se precipitaron con metanol-cloroformo y se resuspendieron en 20 μl de amortiguador de carga, la pastilla que contiene a las células se resuspendió en 200 μl de amortiguador de carga, para ambas muestras se determinó la concentración de proteína por medio del método de TCA-Lowry, las muestras se corrieron en geles desnaturalizantes 12.5%, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, se llevó a cabo la inmunoréplica usando un anticuerpo policlonal antiFliC en una dilución de 1:10,000 y se reveló con el uso del sistema de detección con quimioluminiscencia ECL (Amersham).

Inmunoréplica de afinidad (Affinity blot) [403]. Este método es llevado a cabo para identificar interacción proteína-proteína, SltF, FlgJ, y la proteína quimiotáctica CheY₆ usada como control negativo, se corrieron en un gel desnaturalizante 17.5%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, la membrana se bloqueó con 5% de leche en TTBS por 1hr a TA, la membrana se lavó 3 veces con TTBS 15, 10 y 5 min, posteriormente la membrana se incubó 1hr a TA con SltF a una concentración de 1.8 $\mu\text{g/ml}$ en TTBS. La membrana se lavó 3 veces con TTBS a TA, posteriormente la membrana se incubó con antiSltF en una dilución de 1:5,000 en TTBS con 0.1% de leche. Por último se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Amersham) y se siguió el proceso de revelado como se menciono anteriormente.

Ensayos de coimmunoprecipitación [403]. Se incubaron 20 μ l sefarosa CL-4B acoplada a proteína A (SIGMA) con 4 μ g de γ -inmunoglobulinas antiStf en 1 ml de amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 50mM pH 6.5) por toda la noche a 4°C, la resina se centrifugó a 12,000 xg por 5 min a 4°C, mientras que 0.07 μ M de Stf y FlgJ se incubaron por 30 min a 4°C, en seguida la mezcla se centrifugó a 24,000 xg 10 min a 4°C, el sobrenadante se añadió a la sefarosa y se incubó 30 min 4°C, por último la mezcla se centrifugó a 12,000 xg por 5 min, se descartó el sobrenadante, se agregó 1 ml de amortiguador de fosfatos y el procedimiento de lavado se repitió 4 veces más. Las perlas de sefarosa se resuspendieron en 26 μ l de amortiguador de carga y se hirvieron por 10 min, las muestras se centrifugaron brevemente y el sobrenadante se cargó en un gel desnaturante 17.5%, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se realizó una inmunoréplica tipo western usando un anticuerpo antihistidinas (Pierce chemicals) en una dilución 1:10,000 en TTBS y se siguió el proceso de revelado como ya se menciona.

Bioinformática. La búsqueda de proteínas con dominios de muramidasa en el genoma de *R. sphaeroides* se llevó a cabo mediante un BLAST [404] con los dominios de muramidasa característicos, mediante la base de datos CAZy y por medio de las anotaciones para las diferentes familias de muramidases en el genoma de *R. sphaeroides*. La búsqueda de otras transglicosilasas líticas y FlgJ's en otros microorganismos en un contexto genómico similar a Stf y FlgJ_{RS} se realizó con el auxilio del programa GenCont [405]. Los alineamientos múltiples se realizaron con los programas pileup de GCG [406] y MUSCLE [407]. Los análisis de estructura secundaria se realizaron con el programa PSIPRED [408], se analizó la presencia de secuencia amino terminal para la exportación tipo SEC con el programa Psignal [409].

RESULTADOS

Identificación de RSP_0072

Con el objetivo de encontrar algún marco de lectura abierta en el genoma de *R. sphaeroides*, el cual codifique para una proteína que contenga características de una glicosilhidrolasa, se llevó a cabo una búsqueda en diferentes bases de datos. La base de datos CAZy [410], que agrupa a todas las glicosilhidrolasas en 115 familias distribuidas en todos los organismos, reporta en el genoma de *R. sphaeroides* 2.4.1. 29 glicosilhidrolasas pertenecientes a 13 familias. (tabla 2) Que van desde amilasas (RSP_2848) hasta lisozimas (RSP_3565). En el 2003 se publicó una revisión que muestra que diversos sistemas bacterianos de secreción utilizan un tipo de glicosilhidrolasas llamadas transglicosilasas líticas [351]. Por lo que es posible que *R. sphaeroides* utilice una de estas enzimas en la biogénesis flagelar. La base de datos CAZy muestra para *R. sphaeroides* 2.4.1. once marcos de lectura abiertos (orf's) que codifican para este tipo de enzimas. La base de datos Pfam 01464 [361], que agrupa a las transglicosilasas líticas, predice que *R. sphaeroides* ATCC 25 posee seis LT's y en una búsqueda manual dentro del genoma de *R. sphaeroides* 2.4.1 (<http://genome.ornl.gov/microbial/rsph/>) se encontraron ocho transglicosilasas líticas. Cabe mencionar que la cepas 2.4.1 y WS8-N de *R. sphaeroides*, ésta última utilizada en esta tesis, son altamente similares a nivel de su DNA.

Tabla 2

Marco de lectura abierto en el genoma de <i>R. sphaeroides</i>	Familia	Características relevantes
RSP_2874	1	enzimas como β -glucosidasas y β -galactosidasas
RSP_2941	3	
RSP_0331	8	enzimas como endoglucanasas y quitosanasas
RSP_2848, RSP_2226, RSP_2448, RSP_2449, RSP_2452, RSP_2445, RSP_1370 RSP_0937 RSP_2884 RSP_2450 RSP_2550, RSP_0513	13	enzimas del tipo α -amilasas
RSP_1911, RSP_1496 RSP_0072 RSP_0650 RSP_1794 RSP_1319, RSP_0881	16	enzimas como 1,3-1,4- β -glucanasas, β -agarasas
RSP_0072 RSP_0650	23	enzimas de la familia 1 de las llamadas transglicosilasas líticas
RSP_3565	25	enzimas del tipo lisozima
RSP_0157	26	enzimas del tipo manasas
RSP_2451	77	enzimas tipo 4- α -glucanotransferasas

RSP_3613	94	enzimas glicosiltransferasas
RSP_1240	102	enzimas de la familia 2 de las llamadas transglicosilasas líticas
RSP_1125, RSP_3229, RSP_2163	103	enzimas de la familia 3 de las llamadas transglicosilasas líticas
RSP_2944	108	ND

ND no determinadas

El análisis del contexto genómico de los 11 marcos de lectura abiertos que codifican para transglicosilasas líticas se muestra en la **figura 17**. Entre ellos sobresale RSP_0072 que está situado dentro del contexto flagelar del sistema 1, flanqueado río arriba por *flgL* (HAP3) y río abajo por *flgQ* que codifica para un activador transcripcional flagelo específico. Todos estos genes están contiguos, en una región de 34kb que posee más de 25 genes flagelares, entre los que se encuentra *flgJ* situado 6kb río arriba de RSP_0072. También se encontró que RSP_1319 está dentro de un grupo de genes flagelares, en este caso pertenecientes al sistema flagelar 2 [270].

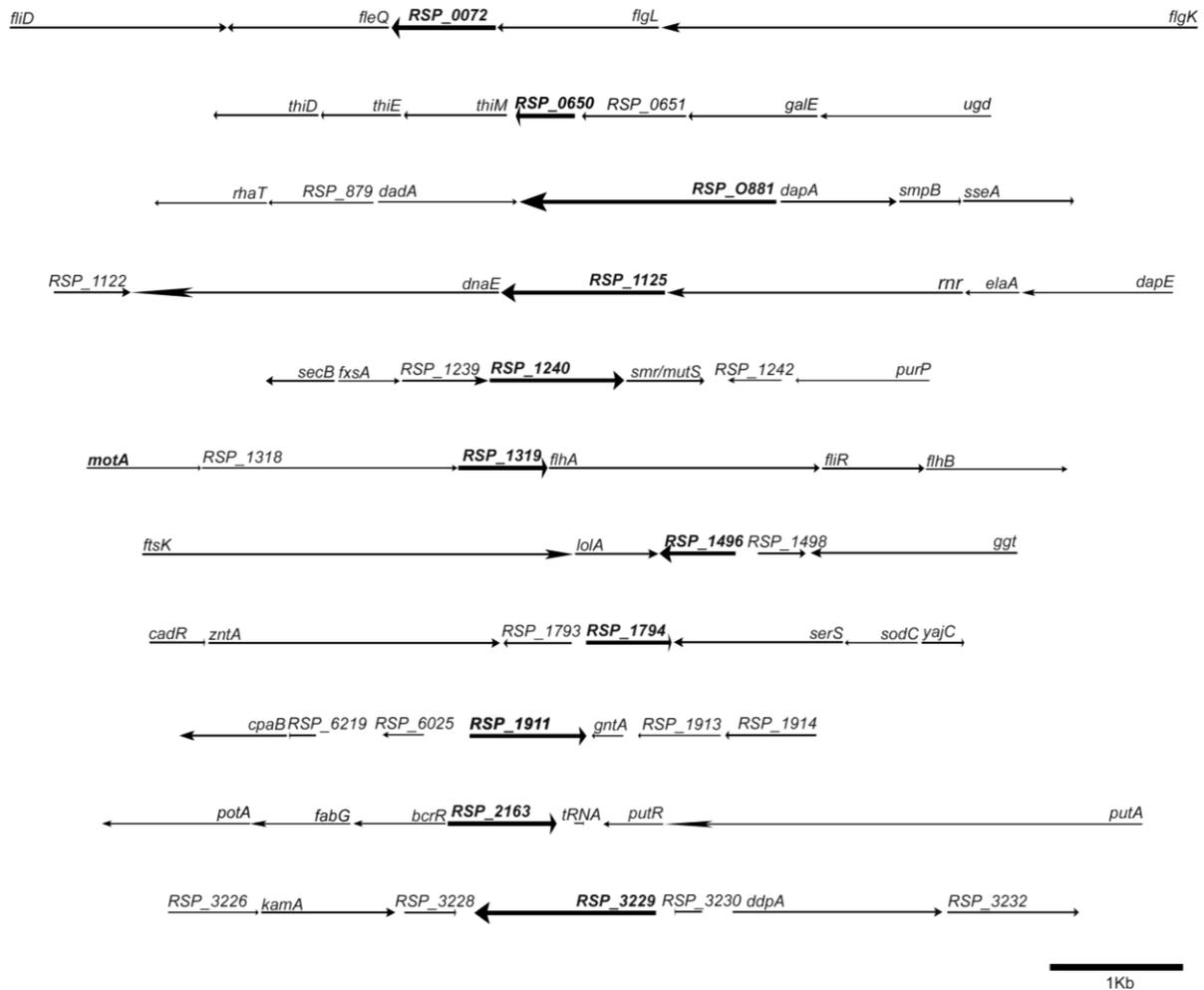


Figura 17. Esquema del contexto genómico de once marcos de lectura abierto (marcados en negritas) de *R. sphaeroides* que codifican para probables transglicosilasas líticas. Cabe notar a RSP_0072 y RSP_1319 que se encuentran en el contexto flagelar 1 y 2 respectivamente.

El marco de lectura abierto RSP_0072 codifica para una proteína de 265 residuos. El análisis de su secuencia de aminoácidos mostró que posee una secuencia amino terminal consenso para la exportación por la vía general de secreción bacteriana [398] (**figura 18**). El sitio más probable de corte de esta secuencia es entre los residuos 27 (ALA) y 28 (ALA). Por lo que ésta es, junto con FlgA, FlgI y FlgH, una proteína flagelar exportada por este sistema de secreción. Es posible que RSP_0072 pueda ser una pre-proteína ligeramente más pequeña; una inspección detallada de la secuencia de nucleótidos de esta región, muestra que un codón que codifica para una metionina que se encuentra 8 codones río abajo de la primera, está precedido por un sitio de unión a ribosomas (RBS *Ribosome Binding Sites*), marcados en negritas, más cercano al consenso que el primero: (**AGAGCCGGATGGCACGGCCCTTGCCCGGGAGGGGCATGAGGTTTC**). Sin embargo; ambos RBS están situados inusualmente cerca de la metionina [411]. La secuencia de corte para las proteínas que son exportadas por la vía SEC es de entre 20 a 40 residuos después de la metionina inicial [412] y cercanos al amino terminal se deben encontrar de 1 a 3 residuos básicos (lisina, arginina ó histidina) considerando estos argumentos ambos residuos de metionina son compatibles como el inicio de la proteína; sin embargo hay que llevar a cabo más experimentos para confirmar el inicio de la transcripción, aunque desde el punto de vista práctico el sitio de corte que da lugar a la proteína madura no se ve alterado.

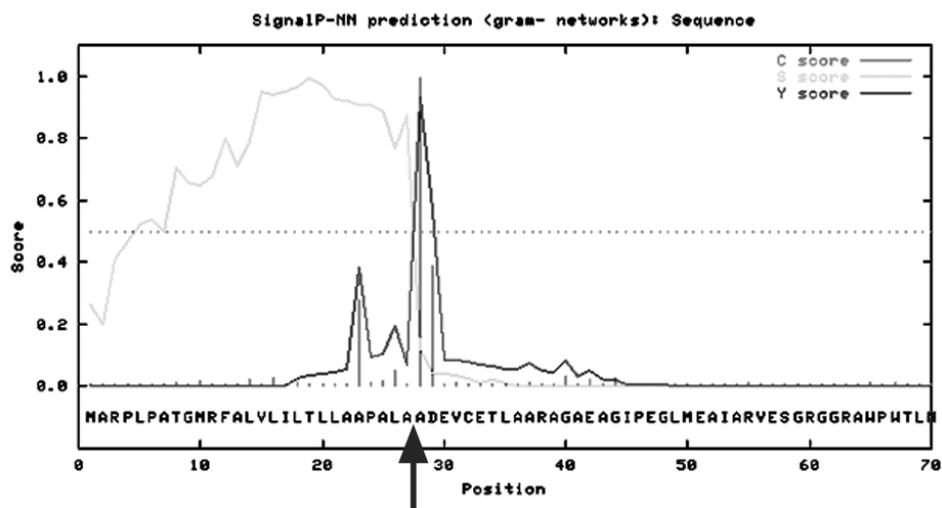


Figura 18. Gráfica generada con el programa SignalP 3 donde se representa la probabilidad de corte del amino terminal de la secuencia RSP_0072 para su exportación por la vía SEC. La flecha señala el sitio de corte más probable.

A partir del sitio de corte inicia el dominio de transglicosilasa lítica y se extiende por aproximadamente 189 residuos (**figura 19A**). Este dominio posee las firmas características de este grupo de enzimas: (ES)-(GCMQ)-(AYL). Particularmente el residuo de glutámico 57 de RSP_0072, sugerido como el residuo catalítico. Una predicción de la estructura terciaria de RSP_0072, (no mostrada en la tesis) sugiere que el residuo de glutámico 83 también pudiera ser considerado un posible residuo catalítico (**figura 19B**).

A



B

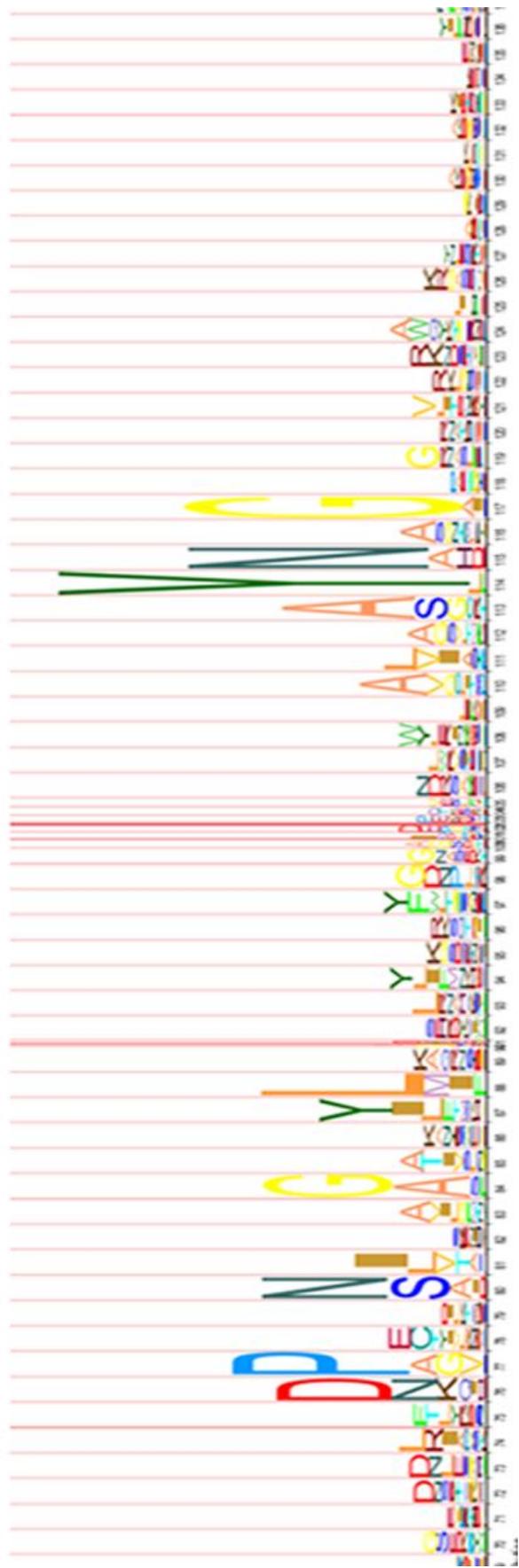
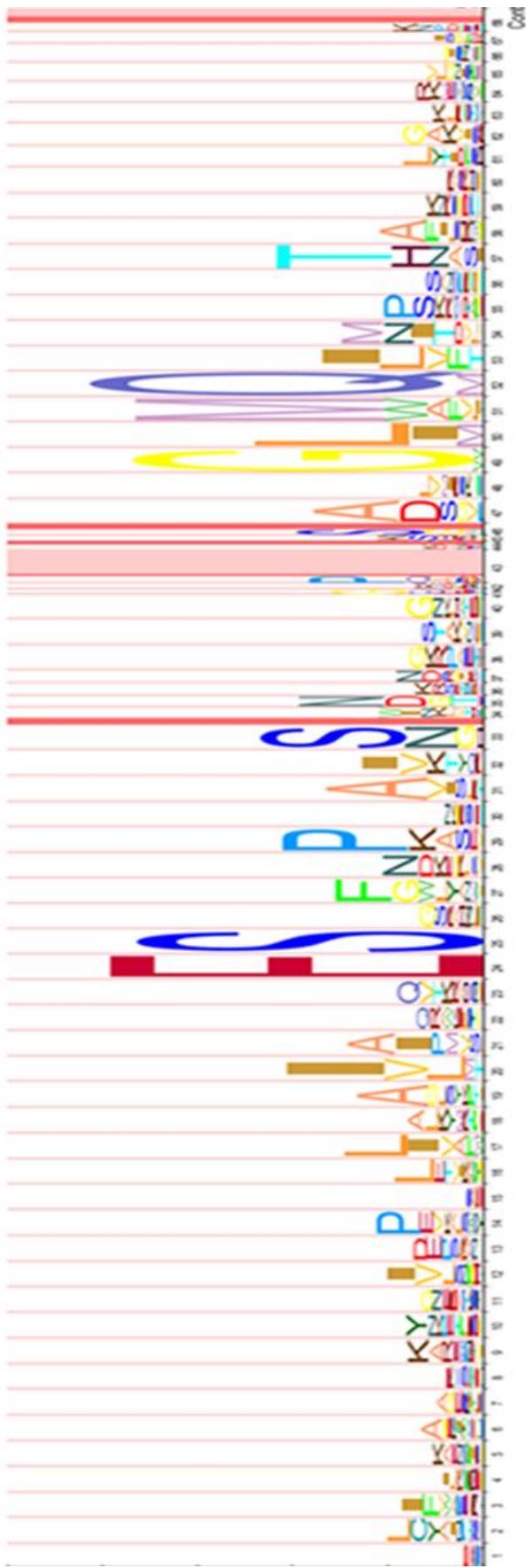


Figura 19. A) Esquema de RSP_0072, donde se indican con barras negras las firmas características para una transglicosilasa lítica, los asteriscos señalan los residuos de glutámico, particularmente el primero que está altamente conservado y B) Alineamiento múltiple del dominio de transglicosilasa lítica de diversas proteínas en el que se incluye a RSP_0072, en negro se marcan las firmas características de este dominio.

El análisis del alineamiento de las transglicosilasas líticas de la base de datos Pfam 01464, que agrupa a más de 2000 secuencias e incluye a RSP_0072, por medio del programa HMM-LOGO muestra gráficamente los residuos más conservados en el alineamiento. Se observa que un residuo de glutámico seguido por una serina es el motivo conservado y es precisamente a este glutámico al que se identificó como el residuo catalítico (**figura 20A**). El alineamiento múltiple mostró que las tres primeras secuencias del alineamiento: RSP_0072, TraL y VirB1 de *R. sphaeroides*, *E. coli* y *A. tumefaciens* respectivamente, poseen una inserción de aproximadamente 24 residuos entre la

primera y segunda firma, ausente en la mayoría de las transglicosilasas (**figura 20B**). Las proteínas TraL y VirB1, poseen un segundo residuo de glutamina y glutámico correspondientemente en la misma posición que el residuo de glutámico 83 de RSP_0072 (**figura 20B**). Al llevar a cabo un análisis de comparación de secuencias con el programa BLAST se encontró que el carboxilo terminal de RSP_0072 no mostró homología con otra proteína de función conocida y únicamente mostró un alineamiento parcial con el amino terminal de la proteína FlgA de *Bordetella pertussis*. Los resultados anteriores del análisis de la secuencia y del contexto genómico de RSP_0072, sugieren que este marco de lectura abierto contiene un dominio de transglicosilasa lítica soluble y por encontrarse en dentro de un grupo de genes flagelares se propone llamarla SttF (por la siglas en inglés **Soluble lytic transglycosylase Flagellar**).

A



B

Q3J17	RHC	TLAPAGACAGIPGLMEATARV	EGRGFAWFWTLINGGRGMEFFETRAEAVRMKST	VASGVSN	DYGLQALNWRHFAFA	SADENM	FVWNT	HAARF	RELFARLGSWEATAAYH	SADRG	DMALAKVEAE	GGSR	---
Q46694	ECO	VARIARQCAPVSPITWAYIVGHS	ENCPYININGSIQLOQPRTE	AEAVSARV	LKDNKS	FDAGIAGINSNI	VLGL	---	LSVDDI	FAPCINLR	ASQIILKACYSALKSYPAG	---	QVALRHALSKYT
VIRB1	AGRT	FMNFARECAPSVAFTIAAQAQVES	RFDP	LAHDNTTGETLHMNQ	---	LDGLMINSRNF	SVLG	---	LTPD	GALQCTSL	SVANMIDG	---	SRVAGNTADD
Q67519	AQU	ELAPKRAQRYGVLNIVLALIEKES	ENFRAYN	KNKOGTE	---	DVGLM	INFQNRIM	REYGVN	---	SPEEL	VPPELNI	---	ELGVRIT
Q46781	ECO	ACVINA	SSVNNTEFALLISWTV	---	GGP	GSVS	INRNGSH	---	DIGI	QINTRA	MILKIS	FFENDERS	SAKUKO
X191	ECOLX	DCDFI	AGROYKIDEDLLBALISWKS	---	ERY	VUNAIG	INFTVGY	---	GSE	LAQVDS	QHFNEI	ARYGIK	---
Q85639	ECO	DCFEI	TQKAYNDPILIKALAMNES	---	KCSG	IKS	TKNKGTY	---	DIGI	QINSSH	LDL	LSKENIS	---
Q07378	92Z	NCFAP	AGARYQIEPILLIKATSAGES	---	SLR	PGAIN	INOKKTKGA	---	SSD	GLM	INSTH	IPKIN	MGVIK
PBL	ECOLI/	SCSNE	AGTMRTEENLKA	LAVES	NL	KOSIG	KNROKNN	---	NIKS	DYV	LAG	INCH	HI
IPGE	SHIFL	DCMD	AGERYNIPSSLLKATAEKES	---	GEN	SAVN	VNNGSK	---	DYGL	QIND	FHSK	RLREMGYS	---
IAGE	SALTI	DCML	CAEMFNEISELLIYA	LAQES	AK	PAIG	HNROGST	---	DYGL	QINS	FHM	RLK	MGIS
TBT1	ALTSW	LYYIV	TEVKRNLPIELAMP	LES	D	ENASAYS	---	---	ASGI	Q	LT	TA	KV
MLT1	ECOLI	MYWIA	QVKRNMWEIVL	PTVES	AD	PHATS	---	---	AGI	Q	II	PT	SG
Q83631	TRE	RPFIE	LLRCAHLEWELLF	VVES	G	LEFRVS	---	---	AVGI	Q	F	M	R
Q26092	HEL	IPIIR	NMLI	ASVPOE	FL	AP	SKSSRAYS	---	AVGI	Q	F	M	P
Q67414	AQU	ENI	VPI	RSYGLPEEF	K	YLP	VESWYNP	PAVS	---	AVGI	Q	L	M
Q25362	HEL	PYEG	I	WQNT	DER	AM	AVAI	ARQES	---	AVGI	Q	L	M
SLI	HAZIN/	EYFNA	LCNLSIXTE	AM	AL	ARQES	ANHP	QAOS	---	AVGI	Q	L	M
SLI	ECOLI/	DLEK	RYTSK	EIP	GS	YAMA	ARQES	ANHP	---	AVGI	Q	L	M
MLTE	ECOLI	PISQ	AGAW	VD	PL	IT	IA	DES	---	AVGI	Q	L	M
MLTC	HAZIN	FLI	BR	AK	RYG	DES	LI	IG	---	AVGI	Q	L	M
MLTC	ECOLI	GMV	CA	RRY	G	DES	LI	IG	---	AVGI	Q	L	M
Q67665	AQU	NLVE	ARQEF	VE	PL	YAV	WRQES	LEDP	---	AVGI	Q	L	M
Q83083	TRE	DVIQ	YAG	KYH	E	YLL	F	AL	---	AVGI	Q	L	M
Q51274	BOR	SLIE	W	ARR	G	LE	AS	V	---	AVGI	Q	L	M
Q55476	SWN	QIIE	NS	K	R	C	V	N	---	AVGI	Q	L	M
Q85953	SPH	EAM	Q	AC	E	N	G	L	---	AVGI	Q	L	M
VP07	BPRD	ETI	GR	AS	Q	N	D	R	---	AVGI	Q	L	M
Q31608	EAC	SAIK	R	AD	K	Y	G	V	---	AVGI	Q	L	M
Q64046	BFS	SYNS	A	K	Y	V	D	E	---	AVGI	Q	L	M
Q48376	BPP	PYE	A	E	N	K	Y	G	---	AVGI	Q	L	M
VIVC	BPT7/	GLF	CA	A	D	A	N	G	---	AVGI	Q	L	M
Y232	HAZIN	FSP	L	E	K	Y	G	L	---	AVGI	Q	L	M
Q51916	PRO	YQ	L	E	K	Y	A	E	---	AVGI	Q	L	M
YFHE	ECOLI	LK	P	E	K	Y	A	E	---	AVGI	Q	L	M
YQBC	EACSU	MA	A	T	K	Y	A	E	---	AVGI	Q	L	M
Q64282	9CA	AL	K	A	N	G	I	E	---	AVGI	Q	L	M
Q38352	BPL	AL	E	A	N	G	I	E	---	AVGI	Q	L	M
Q03937	9CA	AL	K	A	N	G	I	E	---	AVGI	Q	L	M

1

2

3

Cuando se observó a esta mutante al microscopio óptico muy pocas células estaban nadando, mientras la cepa silvestre nadó activamente. Al observar a la mutante al microscopio electrónico no se encontró alguna estructura flagelar aparente, en comparación con la cepa silvestre donde fácilmente se observaron filamentos (**figura 22B**). Cabe mencionar que si el ensayo de nado se prolonga por más tiempo la mutante comienza a formar un halo de nado. Sin embargo, al tomar células de este halo y repetir el ensayo estas células no muestran el fenotipo silvestre (**figura 22C**). Lo que sugiere que estas células no representan pseudo revertantes del alelo ΔRSP_0072 .

La mutante se complementó con el plásmido pGJT00, el cual contiene al gen RSP_0072 . Como se puede observar en la **figura 22A** el halo de nado es similar al de la cepa silvestre. Así mismo al observar esta cepa al microscopio óptico se verificó que es capaz de nadar activamente. De acuerdo con estos resultados se observó por microscopía electrónica que las células poseen las estructuras flagelares características de la cepa silvestre (**figura 22B**). Por lo tanto, se puede atribuir el fenotipo no móvil y la carencia de la estructura flagelar a la ausencia de RSP_0072 .

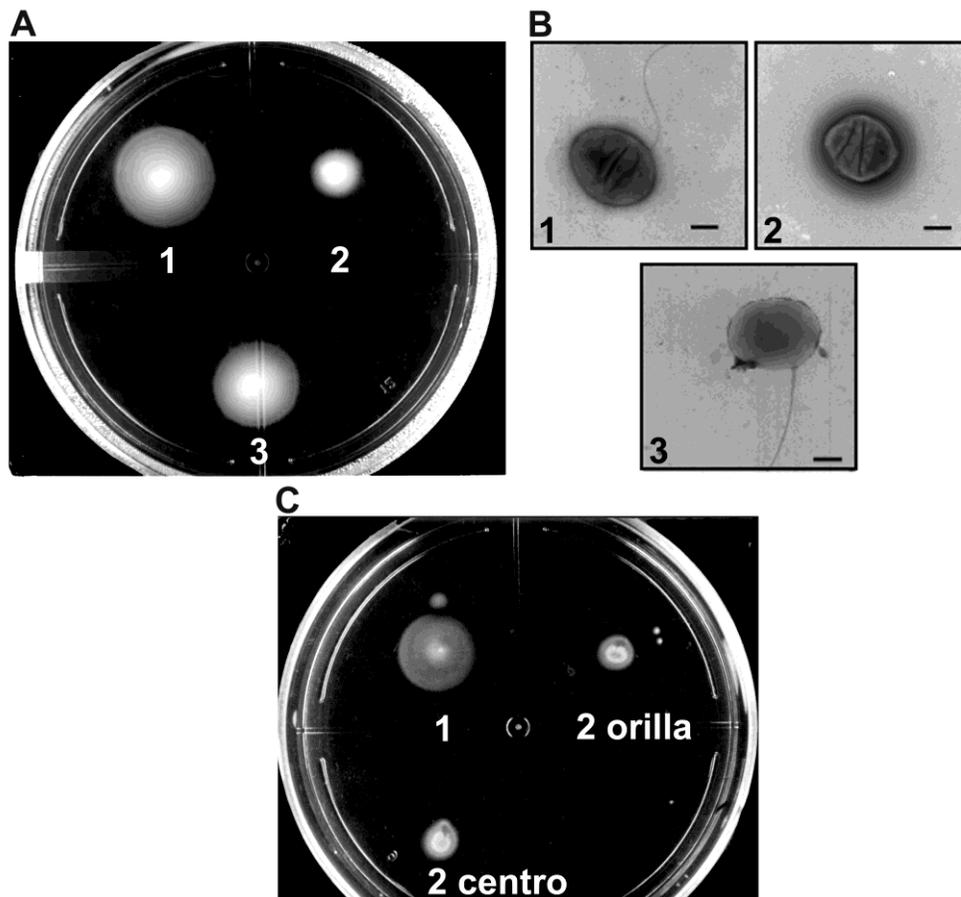


Figura 22. A) Ensayo de nado en medio M9, B) Micrografías electrónicas, barra equivale a 500 nm y C) Ensayo de nado en medio M9, 1) WS8 2) $\Delta sltF$ 3) $\Delta sltF$ complementada con el gen silvestre $sltF$ (pGJT00). 2 orilla y 3 centro se refieren a células tomadas del centro del inoculo o de la orilla del halo de nado de la $\Delta sltF$ del panel A.

Secreción de FliC en las cepas WS8 y $\Delta sltF$

La expresión y exportación de flagelina (FliC) se lleva a cabo hasta que las estructuras flagelares precedentes al filamento han sido correctamente ensambladas. En este ensayo se observó que la mutante $\Delta sltF$ no es capaz de sintetizar ni exportar FliC, lo cual sugiere que la biogénesis flagelar se encuentra detenida en etapas tempranas y cuando la mutante es complementada con el gen silvestre (pGJT00) se restablece la capacidad de exportación como en la cepa silvestre (**figura 23**).

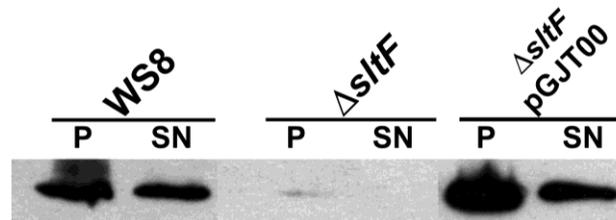


Figura 23. Ensayo de secreción de FliC, *western* anti-FliC. En este ensayo se observa que la expresión de FliC en la mutante $\Delta sltF$ es suprimida debido a que el cuerpo basal no está ensamblado. Una vez que el gancho es ensamblado se libera a la proteína FlgM, que libera al activador transcripcional FliA el cual activa la expresión de FliC y de otros genes flagelares. P se refiere al paquete celular o FliC citoplásmica y SN al sobrenadante o medio extracelular que es la FliC secretada.

Caracterización de la proteína SltF

Con el fin de determinar si SltF posee actividad de muramidasa se clonó el gen *sltF* en un vector de sobreexpresión el cual fusiona al marco abierto de lectura de SltF a seis codones que codifican para el residuo de histidina. La proteína recombinante se aisló y purificó (**Figura 24 A-C**). Por otro lado se obtuvieron las mutantes puntales de SltF que alteran los residuos conservados E57 y E83; que podrían ser responsables de la actividad catalítica de SltF. En ambos casos estos residuos fueron sustituidos por alanina como se describe en la sección de materiales y métodos. Las proteínas mutantes se purificaron siguiendo el mismo protocolo utilizado para SltF silvestre (**Figura 24 D y E**).

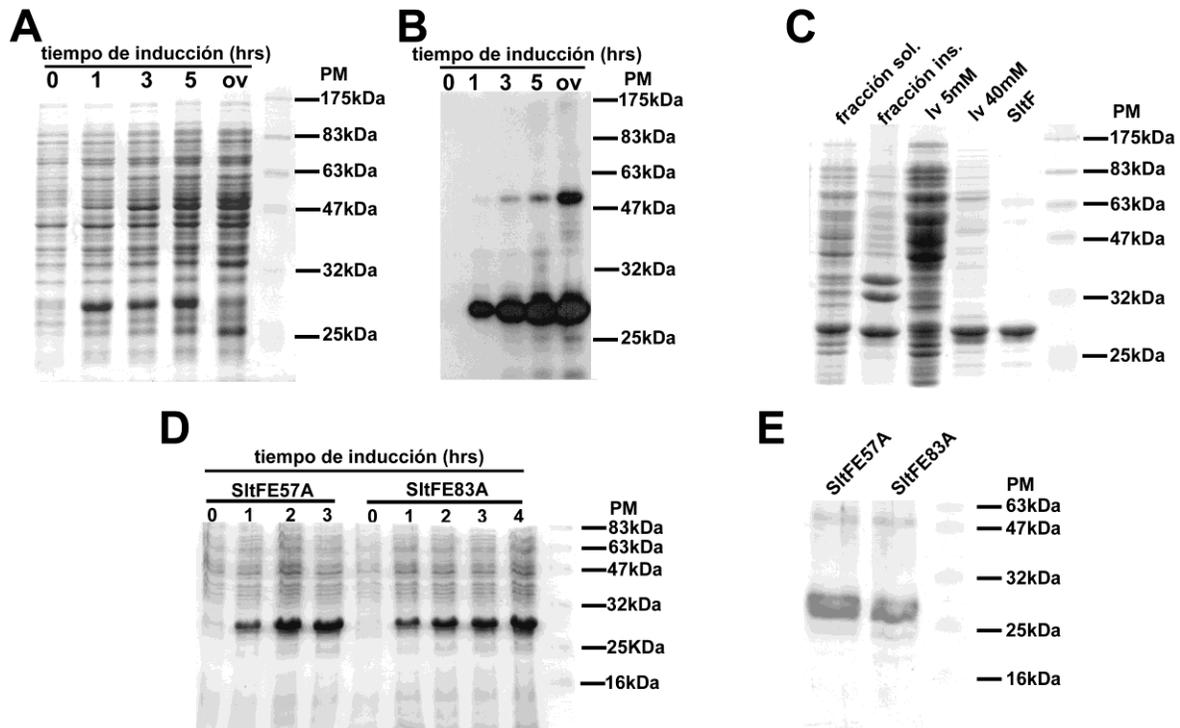


Figura 24. A) Gel teñido con azul de Coomassie de la inducción de SlfF, B) *Western* anti-his de la curva de inducción de SlfF, C) Gel teñido con azul de Coomassie de la purificación de SlfF, D) Gel teñido con azul de Coomassie de la inducción de SlfF57A y SlfF83A y E) Gel teñido con azul de Coomassie de fracciones purificadas de SlfF57A y SlfF83A.

En el ensayo de lisoplato se observó que la proteína SlfF silvestre puede degradar al sustrato al igual que la lisozima. En contraste, las proteínas SlfF mutantes no fueron capaces de degradar la capa de PG (**figura 25**), aun cuando se realizó el ensayo con cinco veces más proteína de cualquiera de las SlfF mutantes.

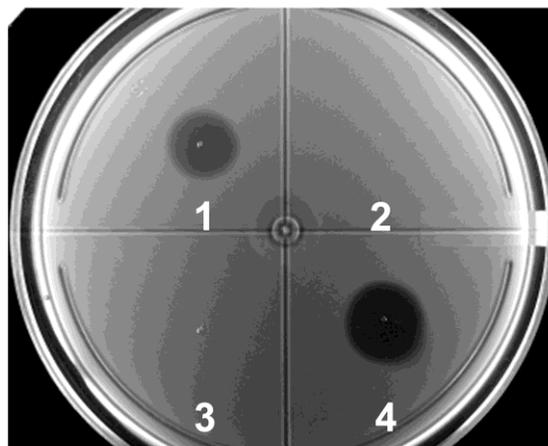


Figura 25. Lisoplato de actividad. En este ensayo se observa un halo transparente cuando hay actividad de muramidasa por parte de proteínas las proteínas purificadas. 1. SlfF, 2. SlfF57A 3. SlfF83A y 4. Lisozima.

Para corroborar la capacidad de SltF para degradar la capa de PG, se llevó a cabo un ensayo espectrofotométrico, el cual mostró que efectivamente SltF es capaz de degradar al substrato, pero de forma mucho menos rápida que la lisozima (**figura 26C**), con este ensayo también se determinó que el pH idóneo para la actividad de SltF es de 6.5 ó 7.5 (**figura 26B**), y que la fuerza iónica afectó la hidrólisis del substrato (**figura 26A**). Los ensayos mostraron que a pH 5.5 o en presencia de 300 mM de NaCl SltF posiblemente tiende a desnaturalizarse. El incremento de la absorbancia puede sugerir que agregados de proteína insolubles impiden el paso de luz con el consecuente aumento de la turbidez.

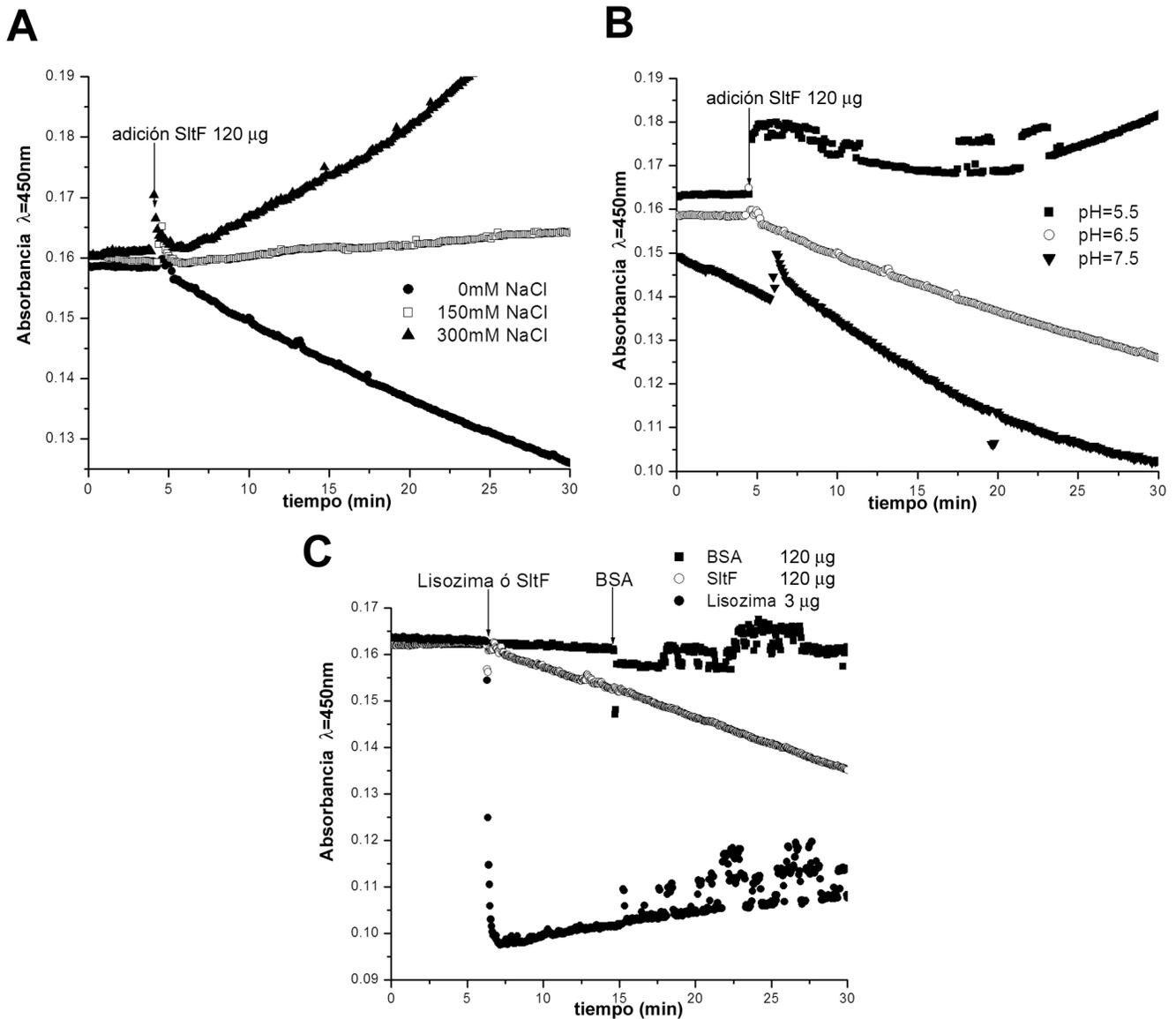


Figura 26. Ensayos turbidimétricos para medir la actividad de muramidasa. A) Dependencia de la actividad de muramidasa de SltF como función de la fuerza iónica a pH 6.5, B) Dependencia de la actividad de muramidasa de SltF como función del pH y en ausencia de NaCl y C) Ensayo de hidrólisis de SltF a pH 6.5 y en ausencia de NaCl y se utilizó BSA y lisozima como controles negativo y positivo respectivamente.

Análisis de la función, *in vivo*, de SlfFE57A y SlfFE83A

Para determinar el efecto en la función de SlfF de dos residuos de glutámico, 57 y 83, los cuales pudieran estar participando en la catálisis de SlfF, se llevó a cabo la mutagénesis dirigida como se describe en materiales y métodos. Cada construcción mutagenizada se introdujo en la cepa $\Delta slfF$. Se encontró que la mutante SlfFE57A fue capaz de complementar parcialmente la función, mientras que SlfFE83A si logró complementar el fenotipo silvestre (**figura 27A**) y el experimento de secreción mostró que FliC es exportada en ambas mutantes (**figura 27B**).

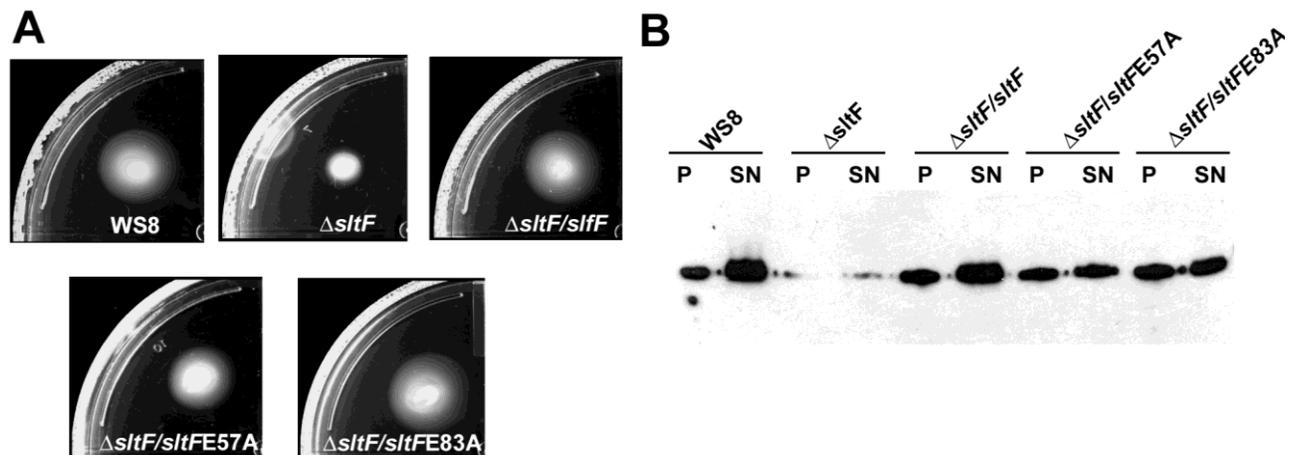


Figura 27. A) Ensayos de nado en medio Siström y B) Ensayo de secreción de la proteína FliC, *western* anti-FliC, P se refiere al paquete celular o FliC citoplásmica y SN al sobrenadante o medio extracelular que es la FliC secretada.

Caracterización de una mutante de *flgJ*

En un estudio previo de nuestro grupo de trabajo se encontró que una mutante de *flgJ* de *R. sphaeroides* no es móvil [259]. Por lo que en esta tesis se continuó con la caracterización de esta mutante. La mutante de *flgJ* se generó mediante la interrupción del gen *flgJ* con el gen de resistencia a espectinomicina *aadA* [259]. La mutante se complementó con un fragmento de DNA que contiene a *flgJ* silvestre y se restableció el fenotipo como en la cepa silvestre (**figura 28A**). Pero al contrario de la mutante $\Delta slfF$, la mutante en *flgJ* es incapaz de formar cualquier tipo de halo de nado, no se observó ninguna estructura flagelar al observarlas en el microscopio electrónico (**figura 28B**) y no se observó ninguna célula con la capacidad de nadar en medio líquido.

De igual manera que la mutante $\Delta sltF$, la mutante de *flgJ* no fue capaz de sintetizar y posteriormente exportar FliC al medio extracelular y se restableció la capacidad de secreción de FliC con la introducción en *trans* del gen *flgJ* silvestre (**figura 28C**).

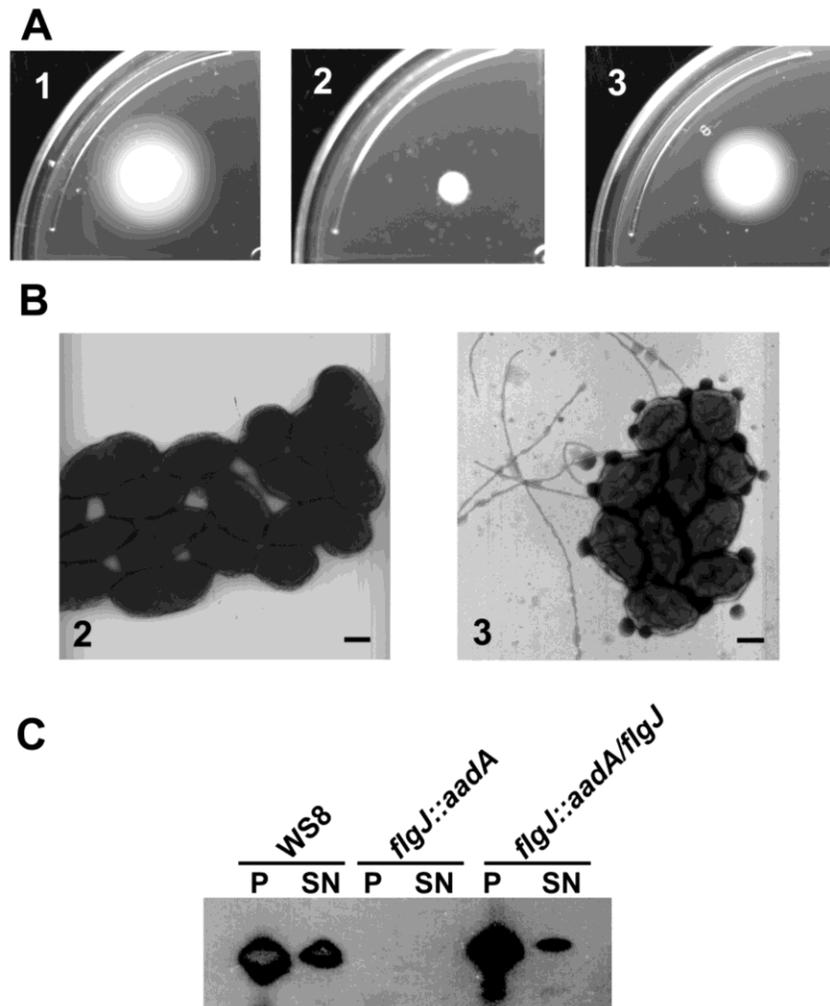


Figura 28. A) Ensayos de nado en medio Sistro, B) Micrografías electrónicas, barra equivale a 500 nm 1) WS8 2) *flgJ::aadA* 3) *flgJ::aadA* complementada con *flgJ* silvestre y C) Ensayo de secreción, *western* anti-FliC, P se refiere al paquete celular o FliC citoplásmica y SN al sobrenadante o medio extracelular que es la FliC secretada.

Purificación de FlgJ

Con el fin de llevar a cabo ensayos de interacción entre SlfF y FlgJ, se clonó el gen *flgJ* en un vector de sobreexpresión el cual fusiona al marco abierto de lectura de *flgJ* a seis codones que codifican para el residuo de histidina. FlgJ se purificó de cuerpos de inclusión, ya que en todas las condiciones probadas se encontró agregada en la fracción insoluble, de tal forma que FlgJ se purificó

en condiciones desnaturizantes y posteriormente se renaturalizó por diálisis (**figura 29A**). La predicción de estructura secundaria sugiere que FlgJ es una proteína formada por exclusivamente α -hélices (**figura 29B**). Una vez purificada y renaturalizada, la proteína FlgJ se sometió a un espectro de dicroísmo circular para verificar la integridad en su estructura secundaria, el resultado mostró un espectro característico de una proteína globular lo que sugiere que FlgJ se plegó adecuadamente al compararla con otra proteína globular de un peso molecular similar como CheY₅ de *R. sphaeroides* y con una proteína que no posee una estructura secundaria en este caso CheY₂ (**figura 29C**).

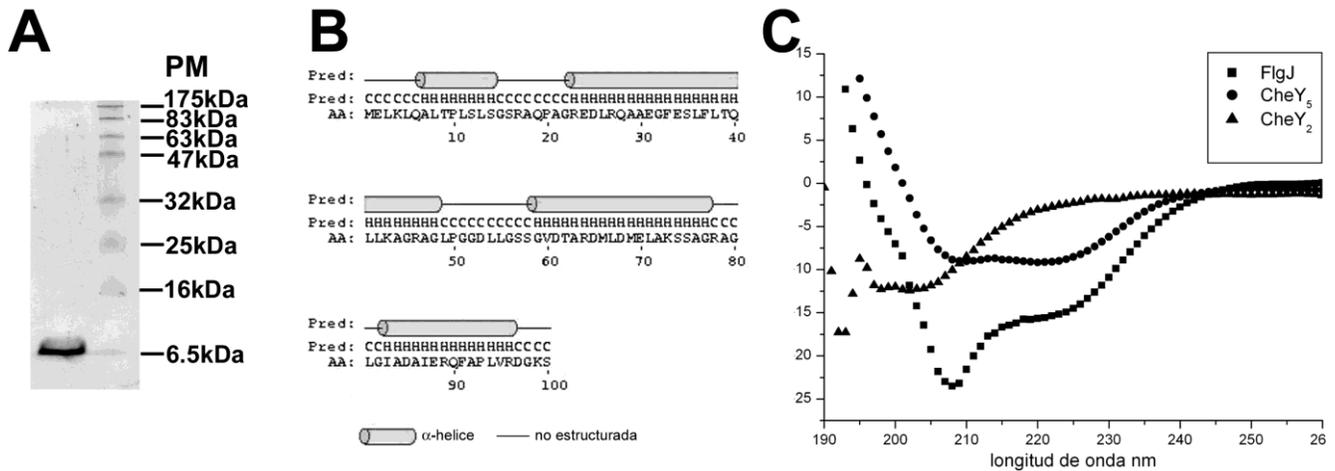


Figura 29. A) Gel teñido con azul de Coomassie de la fracción purificada y renaturalizada de FlgJ, B) Esquema de la estructura secundaria de FlgJ y C) Dicroísmo circular de FlgJ y de las proteínas CheY₅ en estado nativo y CheY₂ en estado no nativo.

Interacción entre las proteínas SttF y FlgJ

Los resultados bioinformáticos sugieren que SttF es exportada por la vía general de secreción bacteriana (**figura 18**). Por lo que se presenta un problema topológico; cómo reconoce SttF el lugar preciso donde cortar la capa de peptidoglicano para que continúe la biogénesis flagelar. Una posibilidad es que sea FlgJ, posiblemente exportada por la vía flagelo específica, la que guíe a SttF para cortar en el lugar preciso. Cabe recordar que en el caso de *S. enterica* y en otras γ -proteobacterias FlgJ es una proteína que posee el dominio de hidrólisis de la capa de PG en su carboxilo terminal. Para examinar la posibilidad de interacción entre SttF y FlgJ se llevó a cabo una inmunoréplica de afinidad. En este ensayo las tres proteínas purificadas (SttF 26kDa, FlgJ 11kDa y CheY₆ 15kDa) se corren en un gel desnaturizante, el cual es transferido a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente la membrana se incubó con SttF y se reveló con un anticuerpo anti-SttF. La señal que aparece muestra la presencia de SttF. En este caso se observó una interacción entre las SttF y FlgJ y esto no ocurrió con una proteína no relacionada como es CheY₆ de *R. sphaeroides* (**figura 30A**).

Para corroborar la interacción entre SltF y FlgJ se realizó un ensayo de coimmunoprecipitación. En este ensayo sefarosa acoplada a proteína A se unió a un anticuerpo anti-SltF. Posteriormente se incubó a esta resina con FlgJ y SltF. La resina se lavó y se corrió en un gel desnaturante que a continuación se transfirió. Se realizó un *western* revelado con anti-histidinas para observar la presencia de ambas proteínas. SltF se unió específicamente a FlgJ y ambas fueron inmunoprecipitadas, mientras que FlgJ por sí sola no se unió a la sefarosa acoplada a la proteína A o al anticuerpo contra SltF (**figura 30B**).

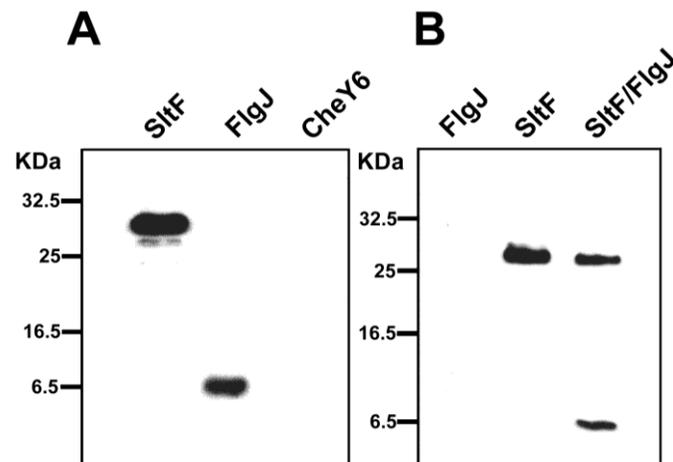


Figura 30. A) Inmunoréplica de afinidad. La membrana se incubó con SltF y posteriormente con anti-SltF, por lo que la señal corresponde a la presencia de SltF y B) Inmunoprecipitación de anti-SltF en presencia de SltF y FlgJ y de ambas proteínas por separado, el *western* se reveló con anti-histidinas.

DISCUSIÓN

Identificación de RSP_0072

Al buscar en el genoma de *R. sphaeroides* un gen que potencialmente codifique para una proteína que degradara a la capa de PG, se encontraron más de 30 posibles candidatos que podrían degradar la capa de PG. Los cuales son glicosilhidrolasas (**tabla 2**), es decir rompen algún enlace en la cadena de glicanos. Además se encontraron otras enzimas que cortan la parte peptídica de la capa de PG como amidasas (RSP_2543, RSP_1363) y carboxipeptidasas (RSP_0550).

En una extensa revisión que apareció en el 2003 [351] y en diversos trabajos [414] [415] [416] [417], se descubrió que dentro del grupo de genes que codifican para diversas proteínas involucradas en los sistemas de secreción bacterianos tipo III y IV se encuentra una glicosilhidrolasa, específicamente una transglicosilasa lítica (LT). Posiblemente encargada de generar una cavidad en la capa de PG por la cual atraviesa el complejo de secreción. Al examinar el genoma de *R. sphaeroides* se encontraron 11 marcos abiertos de lectura que codifican para posibles transglicosilasas líticas, distribuidas 10 de ellas en el cromosoma I y la restante reside en el cromosoma II (RSP_3229). Estas posibles glicosilhidrolasas van desde la que está formada por 652 residuos (RSP_0881), hasta la que posee tan sólo 150 residuos (RSP_0650), que es prácticamente sólo el dominio de transglicosilasa lítica.

Siete de estas enzimas están clasificadas como transglicosilasas líticas asociadas a la membrana (Mlt) por medio de la lipidación, una modificación postraduccional [418]. Se reportó que algunas de estas enzimas pueden dar lugar a un producto periplásmico soluble mediante un corte proteolítico [369]. El contexto genómico de estos once marcos de lectura puede sugerir posiblemente su función; dos de los marcos de lectura se encuentran en regiones donde se codifican sistemas de transporte de carbohidratos y de metales (RSP_3229 y RSP_1794 respectivamente). Por otra parte RSP_0650 se localiza en un contexto genómico asociado con la biosíntesis de la capa de PG. El marco de lectura RSP_1911 está en una región cromosómica donde se encuentran genes relacionados con la estructura de los pili, por lo que éste pudiera ser el marco de lectura que codifica para la transglicosilasa lítica asociada a este sistema de transporte tipo IV, como se reportó en otros sistemas [415]. A otros marcos de lectura no se logró asociarlos con algún proceso fisiológico específico (**figura 17**).

En *E. coli* se han encontrado siete transglicosilasas líticas y mutantes en cada una de estas enzimas no tienen efectos fenotípicos aparentes, sólo una mutante de seis de estas LT posee dificultades para la formación del septo durante la división celular, por lo cual se sugirió que varias de las transglicosilasas líticas están relacionadas con procesos de división celular y recambio de la capa

de peptidoglicano [373]. Por lo que es posible que algunos de los marcos abiertos de lectura encontrados en el genoma de *R. sphaeroides* estén involucrados en procesos similares.

Dos de los marcos de lectura se encontraron claramente en un contexto flagelar: RSP_0072 y RSP_1319 (**figura 17**). Este último dentro de un grupo de genes flagelares identificados como responsables de la generación, del recientemente caracterizado, sistema flagelar 2 [270]. RSP_1319 está flanqueado por los genes RSP_1318 y *flhA*, río arriba y abajo, respectivamente. RSP_1319 codifica para una proteína de 226 residuos, posee las firmas características de una transglicosilasa lítica y una secuencia consenso para su secreción por la vía de secreción tipo SEC. Por lo cual se puede sugerir que RSP_1319 pudiera ser la transglicosilasa lítica que participa en la biogénesis del flagelo 2 de *R. sphaeroides*.

Por otra parte, RSP_0072 se encontró dentro del contexto flagelar 1, por lo que era natural sugerir que RSP_0072 fuera la transglicosilasa lítica encargada de intervenir en la biogénesis del sistema flagelar 1. Sin embargo, hay que mencionar que *C. crescentus* posee una proteína FlgJ, erróneamente anotada como *cheL* [419], con únicamente el dominio homólogo al amino terminal de *S. enterica*, y en el 2003 se identificó a la proteína PleA como una transglicosilasa lítica que carece de una región importante del dominio de LT. Una mutante de este gen fue incapaz de ensamblar flagelo y pili [420]. Hay que señalar que *pleA* no se encuentra en un contexto flagelar. Una posibilidad es que ésta sea una transglicosilasa lítica flagelo específica o bien la mutación en *pleA* esté vinculada con un fenómeno pleiotrópico que afecta a estas dos estructuras.

RSP_0072 codifica para una proteína de 265 de residuos. En el amino terminal posee una secuencia consenso para la exportación por la vía SEC (**figura 18**). RSP_0072 posee las firmas características que identifican al dominio de transglicosilasa lítica (**figura 19A y B**), el cual se encuentra como una región modular en diversas proteínas. La base de datos Pfam agrupa a más de tres mil proteínas con este dominio. RSP_0072 posee el residuo de glutámico, casi invariablemente conservado (con excepción de la familia 2) (**figura 20A y B**) [358], el cual está directamente involucrado en la catálisis que llevan a cabo este tipo de enzimas [370]. Este residuo es seguido, usualmente, por una serina también presente en RSP_0072 (**figura 19A**). Para el segundo y tercer motivo de las transglicosilasas líticas (GLMQ -- AYN) se demostró que está involucrado en mantener la arquitectura del sitio catalítico y en la unión al substrato respectivamente [421]. RSP_0072 contiene una cisteína (C) en lugar de la leucina (L) en el segundo motivo, pero posee la glutamina (Q) y tirosina (Y) altamente conservados de las dos firmas (**figura 20A**). Datos cristalográficos sugieren que estos dos residuos interactúan con el substrato [355] [421]. sin embargo, mutantes de estos residuos en la transglicosilasa lítica P19, que forma parte del plásmido conjugativo R1, no perdieron actividad hidrolítica [422]. Lo cual sugiere que aun estos residuos son dispensables.

Cabe hacer notar que entre la primera y la segunda firma del dominio de LT de RSP_0072 hay una inserción de aproximadamente 24 residuos, también presente en las proteínas VirB1 y TraL [423] (**figura 20B**). La primera es posiblemente una transglicosilasa lítica del sistema de secreción tipo IV de *A. tumefaciens* requerido para la virulencia de esta bacteria. Una mutante en *virB1* disminuye notoriamente su capacidad infectiva [414] y TraL de *E. coli* codificada en el plásmido pKM101, el cual pertenece al sistema de transferencia por conjugación IncN, es necesaria para establecer la transferencia de material genético por medio de los pili conjugativos [424] [425]. La inserción es inusual, la inmensa mayoría de las transglicosilasas líticas no poseen estos residuos. Por lo que aún está por evaluarse la función de esta inserción.

Los datos bioinformáticos sugieren que RSP_0072 es una transglicosilasa lítica asociada al contexto flagelar 1 de *R. sphaeroides* por lo que puede ser renombrada como SlitF.

Origen de RSP_0072

El tipo de dominio de glicosilhidrolasa de FlgJ de *S. enterica* no está completamente caracterizado, sí bien se trata de una hidrolasa de la capa de peptidoglicano [140], la naturaleza de sus productos aún no ha sido determinada. Sin embargo, con base en su homología con otras secuencias, particularmente con el dominio de hidrolasa de la muramidasa 2 de *Enterococcus hirae*, la autolisina de *Streptococcus faecalis* y AcmA de *Lactococcus lactis*, se puede establecer que se trata de una *N*-acetilglucosaminidasa [426] [427]. Es decir una enzima que corta el enlace glicosídico establecido entre el carbono 4 del residuo del ácido *N*-acetilmurámico y el carbono 1 del residuo de *N*-acetilglucosamina. Recientemente se encontró que, efectivamente, la muramidasa 2 y AcmA son glucosaminidasas [428] [429]. El dominio catalítico de FlgJ_{Se} posee dos residuos catalíticos, un glutámico 223 y un aspártico 248 [140], es posible que el mecanismo de reacción sea similar al establecido para la lisozima que también tiene esta misma dupla catalítica [430].

En contraste las transglicosilasas líticas, como posiblemente RSP_0072, sólo poseen un residuo catalítico y tienen una diferencia substancial en los productos generados por una glucosaminidasa o una muramidasa. Las transglicosilasas líticas generan un producto denominado 1,6-anhidromuropéptido [313] que se genera como resultado del ataque nucleofílico del hidroxilo del carbono seis del residuo de ácido murámico sobre el carbono 1 del mismo residuo y da como resultado la formación de un anillo intramolecular en el ácido murámico [313] (**figura 15**). Por lo que para asignar con toda exactitud que se trata de una transglicosilasa lítica debe de ser identificada la presencia de tal producto.

Recientemente nuestro grupo de trabajo descubrió que el segundo sistema flagelar en *R. sphaeroides* es expresado bajo condiciones donde el sistema flagelar 1 no es funcional [270]. También se encontró que el sistema flagelar 1 se adquirió por transferencia horizontal de una γ -

proteobacteria ancestral, mientras que el sistema flagelar 2 es endógeno de *R. sphaeroides* [270]. Si esto sucedió así, ¿porqué RSP_0072, que pertenece al sistema flagelar 1, no es una glucosaminidasa como FlgJ de *S. enterica*, que es una γ -proteobacteria, si no una transglicosilasa lítica ?. En el 2005 se publicó un trabajo [431] donde se encontró a un grupo de genes flagelares inactivos (que llamaron sistema flagelar 2) en varias cepas de *E. coli*. Entre los cuales se encontró un gen *flgJ* con únicamente el dominio homólogo al dominio amino terminal de la FlgJ bifuncional y actualmente utilizada por el sistema flagelar de *E. coli* y también se encontró que este grupo de genes fueron adquiridos por transferencia horizontal. Por lo anterior, es posible que *E. coli* O42, una de las cepas que poseen este grupo de genes flagelares inactivos, tenga una glicosilhidrolasa (por ejemplo una transglicosilasa lítica) asociada a este contexto flagelar 2. Se puede especular que una γ -proteobacteria ancestral transfirió a los ancestros de *E. coli* y *R. sphaeroides* este grupo de genes flagelares entre los que se encontraba el gen *flgJ* monodominio y una transglicosilasa lítica. Posteriormente ocurrió una fusión que unió al dominio amino terminal de *flgJ* del sistema flagelar 1 de *E. coli* con un dominio de glucosaminidasa y el sistema flagelar 2, adquirido por la transferencia horizontal, fue inactivado. En contraste *R. sphaeroides* evolutivamente prefirió usar al sistema flagelar adquirido y en condiciones todavía no determinadas usar al sistema flagelar 2.

En el 2006 [142] se publicó un trabajo donde se realizó la filogenia de *flgJ*, se estableció que diversas γ -proteobacterias poseen una proteína FlgJ con ambos dominios, mientras que un grupo de α -proteobacterias entre las cuales se encuentra *R. sphaeroides* poseen una FlgJ con únicamente con el dominio amino terminal. El estudio sugiere que el ancestro común a todas las proteínas FlgJ es el dominio amino terminal y que posteriormente fue adquirido y fusionado en las γ -proteobacterias el dominio de glucosaminidasa. Se puede sugerir, con base a lo encontrado con el segundo grupo de genes flagelares de *E. coli* O42 y con el sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides*, que ancestros de estas bacterias posiblemente contaban con un FlgJ monodominio y una transglicosilasa lítica.

Al tiempo que apareció ese trabajo también se encontró en esta tesis que un grupo de α -proteobacterias analizadas, poseen un *flgJ* monodominio. Se logró identificar a genes que codifican para transglicosilasas líticas asociadas a un contexto flagelar en varios de estos microorganismos (**figura 21**). Lo que sugiere que cada una de ellas podría tener un papel similar a RSP_0072 de *R. sphaeroides*, lo cual apoya lo encontrado anteriormente en relación con la evolución de *flgJ*. Otro dato relevante que se encontró en esta tesis fue que bacterias que poseen dos sistemas flagelares como *V. parahaemolyticus*, *V. cholera* y *V. shilonii* entre otras, poseen dos FlgJ una de ellas con dominios fusionados y la otra es una FlgJ monodominio con una transglicosilasa lítica en un contexto flagelar (ver *V. parahaemolyticus* en figura 21). El primer sistema flagelar, que contiene a la FlgJ bifuncional, codifica para un flagelo localizado en uno de los polos de la bacteria y que usa para impulsarse en

medios líquidos. El segundo sistema flagelar, donde se encuentra FlgJ monodominio, está vinculado con el surgimiento de flagelos laterales que se utilizan para desplazarse en medios semisólidos [432], por lo que se puede presumir que posiblemente el sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides* es activado en condiciones similares.

Cabe hacer notar que se encontró [142] que el amino terminal de FlgJ de la δ -proteobacteria *Desulfovibrio desulfuricans* no se fusionó a una glucosaminidasa si no a una peptidasa, la cual corta la parte peptídica de la capa de PG. Pero en esta tesis se encontró que *Bdellovibrio bacteriovorus*, también una δ -proteobacteria, posee una FlgJ monodominio y una transglicosilasa lítica asociada al contexto genómico flagelar. Por lo que se puede especular que si *flgJ* de *R. sphaeroides* se fusionara con un dominio de glucosaminidasa, peptidasa o el mismo RSP_0072, podría dar lugar a una proteína funcional.

Los datos bioinformáticos sugieren que RSP_0072 codifica para una transglicosilasa lítica y está asociada al contexto flagelar 1 de *R. sphaeroides* por lo que puede ser renombrada como SltF (*Soluble lytic transglycosylase flagellar*).

Ablación de RSP_0072 (*sltF*)

La generación de la mutante en RSP_0072 (Δ *sltF*) dio como resultado una cepa incapaz de nadar tanto en medio líquido como semisólido (**figura 22A**). Sin embargo, en el medio semisólido se observó un pequeño halo de nado que a mayores tiempos de incubación se hizo más grande, pero al tomar células de este halo y volver a realizar el ensayo de nado, la cepa mutante no mostró desplazamiento. Lo cual sugiere que la formación del halo no es consecuencia de la supresión intergénica de la mutación en *sltF* (**figura 22C**). En el caso de *S. enterica* se observó que en la mutante de *flgJ* hay una población minoritaria que logra ensamblar el flagelo, lo cual se atribuyó a la presencia de imperfecciones en la capa de PG [140] [141]. Por lo que es posible que la aparición del halo en la mutante Δ *sltF* esté vinculada al remodelamiento de la capa de PG. En *E. coli* se encontró que la capa de PG es recambiada hasta en un 60% en tan sólo una generación [343]. Lo cual conduce a que se generen cavidades temporales lo suficientemente grandes [335] como para que el eje flagelar atraviese la capa de PG. Cuando una cavidad coincide espacial y temporalmente con la biogénesis del flagelo éste se forma. En el caso de *R. sphaeroides* la probabilidad de que la generación de la cavidad coincida con la formación del flagelo es menor, ya que sólo posee un flagelo, en comparación de los 6 a 10 de *S. enterica*. Por otra parte se encontró que la biosíntesis de la capa de PG es diferenciada, siendo mayor en el polo donde ocurre la división celular y menor en el polo que no participa en la formación del septo [340]. El flagelo de *R. sphaeroides* se localiza subpolarmente [254]. Una posibilidad es que el flagelo esté situado en el polo que no participa en la

formación del septo como en el caso de *C. crescentus* [433], por lo que la probabilidad de encontrar un hueco posiblemente es todavía menor. Al observar al microscopio óptico a la mutante $\Delta sltF$ que proviene de un cultivo líquido se logra percibir, cualitativamente, una población mucho menor de células nadando, lo cual coincide con lo observado en la caja de nado.

Alternativamente a la hipótesis de la generación de cavidades en la capa de peptidoglicano para la formación del flagelo en la mutante $\Delta sltF$, se puede sugerir que exista otra enzima que suple las funciones de SltF. En el genoma se encontraron otras 10 transglicosilasas líticas y alguna de ellas pudiera estar cumpliendo parcialmente la función de SltF. Entre ellas RSP_1319, que codifica para una transglicosilasa lítica asociada al sistema flagelar 2. En *E. coli* se sugirió que la redundancia de transglicosilasas líticas es una explicación a la ausencia de fenotipo de mutantes múltiples de transglicosilasas líticas [373].

La complementación en *trans* de la mutante $\Delta sltF$ con una construcción que lleva el gen silvestre confirma que el producto génico de *sltF* es necesario para el nado de esta bacteria. Además, la mutante $\Delta sltF$ carece de filamento (**figura 22B**), lo cual indica que la biogénesis flagelar está detenida en alguna etapa inicial. Esto es confirmado por la ausencia de flagelina tanto en el medio de cultivo como en el citoplasma (**figura 23**). En la jerarquía flagelar la flagelina (FliC), que forma el filamento del flagelo, sólo es expresada y posteriormente exportada únicamente cuando el gancho está formado [274]. Se puede sugerir que en la mutante $\Delta sltF$ la biogénesis está detenida a nivel, cuando menos, de la formación del gancho.

Cabe mencionar que, la mutante $\Delta sltF$ se complementó con el vector pRK415 que lleva a *sltF*, clonado en la orientación contraria al promotor del vector. (dato no mostrado en la tesis). Este resultado sugiere la presencia de una región promotora en la secuencia de DNA, río arriba de *sltF*. Una inspección de esta parte de la secuencia reveló la presencia de una región promotora consenso σ^{54} , -12 y -24 [434]: (AGAGCCGGAT**GGCACGGCCCTTGCCCGGGAGGGGCATGAGG**TTC). Lo que pudiera sugerir que la transcripción está regulada por el factor σ^{54} flagelar (RpoN2) [271] y por el heteromultímero de las proteínas activadoras de la transcripción FleQ y FliT [274], que permiten la remodelación de las interacciones DNA-RNapolimerasa para la formación del complejo abierto y proceda la transcripción [275] [435]. La secuencia de unión de estos activadores (UAS *Upstream Activation Sequence*) se encontraría dentro de la región codificante del carboxilo terminal del gen *flgL* (HAP3), lo cual fue similar a lo encontrado en diversos operones flagelares [436]. Sin embargo, al buscar de forma manual la UAS para la unión de FleQ-FliT [436] no se logró encontrarla dentro de estos 120 pb. Lo que puede sugerir alguna divergencia en la secuencia consenso de unión de las proteínas activadoras o bien hay que realizar una búsqueda bioinformática detallada de esta región. Otro dato adicional para suponer que *sltF* puede ser considerado como una unidad transcripcional

independiente viene de una mutante en *flgI*, el anillo P, *flgI* se encuentra del operón *flgGHIJKL*, la mutante tiene efectos polares, sin embargo una construcción que lleva a *flgI* y *flgJ* es capaz de ensamblar gancho [259]. Esto sólo puede suceder si las estructuras precedentes han sido ensambladas [274]. Como el eje flagelar que es ensamblado probablemente con el auxilio de FlgJ y SltF. Por lo tanto, es poco probable que *sltF* pertenezca al operón *flgG*, ya que si así fuera la mutante complementada con *flgJ* no hubiera logrado ensamblar el gancho, es decir SltF debería estar presente en esta mutante independientemente de la transcripción del operón *flgGHIJKL*.

La proteína SltF

RSP_0072, es ahora nombrado SltF ya que las evidencias sugieren que es una transglucosilasa lítica soluble involucrada en la biogénesis del sistema flagelar 1 de *R. sphaeroides*. La purificación de SltF (**figura 24C**) se llevó a cabo con la expresión de la proteína sin su secuencia señal, debido a que la expresión de la proteína completa causó la lisis de la célula durante la inducción de la proteína. Es posible que esta lisis sea debida a que la expresión de una enzima que degrada la capa de PG y exportada al periplasma, degrada la pared tan rápido que el sistema de reparación no es capaz de compensar el daño producido por la sobreexpresión. Otros estudios ya reportan este tipo de daño por la sobreexpresión de esta clase de enzimas, particularmente en el caso de transglucosilasas líticas [362] [422] [437] y ha sido usado como prueba indirecta de que la proteína sobreexpresada es una hidrolasa de la capa PG.

Como se mencionó anteriormente, las transglucosilasas líticas poseen un residuo conservado de glutámico directamente involucrado en la catálisis. SltF posee este residuo asignado con el número 57 de acuerdo a la posición que ocupa en la secuencia de aminoácidos. SltF silvestre purificada mostró, en dos ensayos *in vitro*, que degrada la capa de PG (**figura 25** y **figura 26C**), confirmando que se trata de una hidrolasa de la capa de PG. Además se encontró que a pH 6.5 o 7.5, la enzima degrada la capa de PG (**figura 26B**). Lo cual sugiere que entre estos valores de pH el carboxilo del residuo de glutámico se encuentra preferencialmente protonado, condición necesaria para iniciar la catálisis según el mecanismo de reacción propuesto [370] [438]. El periplasma bacteriano se presume que permanece cercano al pH externo [439] [440]. *R. sphaeroides* crece en un medio con un pH neutro, condiciones donde SltF es probablemente que sea activa, mientras que a un pH de 5.5 el ensayo espectrofotométrico reveló que la enzima posiblemente tiende a desnaturalizarse. El incremento en la turbidez en la celda (DO mayor) puede explicarse como la formación de agregados de SltF que obstruyen el paso de luz. Adicionalmente se observó que la fuerza iónica afectó de forma notable la capacidad de hidrólisis; a una concentración de 150 mM la enzima fue inactiva y a 300 mM también tendió a sufrir un proceso de desnaturalización. En ausencia de NaCl la enzima fue activa sugiriendo que en el periplasma la cantidad de sales es menor (**figura**

26A). Por otra parte cuando la sobreexpresión se realizó a 37°C, SltF formó cuerpos de inclusión que fueron purificados y renaturalizados. Los ensayos de actividad con esta proteína dieron como resultado una enzima completamente inactiva, es posible que en el proceso de renaturalización se obtenga una enzima soluble pero plegada incorrectamente [441] [442].

Diversas mutantes de transglicosilasas en el residuo catalítico no muestran actividad [370] [422] [416]. Sin embargo se encontró que LtgB, una probable transglicosilasa lítica de *Neisseria gonorrhoeae*, posee el motivo ES característico, el glutámico se mutagenizó y sorprendentemente la enzima continuó siendo activa. La mutagénesis de un residuo de glutámico a una distancia de dos residuos antes del glutámico canónico fue el que dio como resultado una LtgB inactiva [437]. Además del residuo de glutámico 57, SltF posee otro residuo de glutámico colocado en la posición 83. Éste se encuentra dentro de la inserción de 24 residuos mencionada anteriormente y podría estar involucrado en la catálisis. La mutagénesis de los residuos de glutámico 57 y 83 de SltF dio como resultado que las enzimas purificadas (**figura 24E**), no fueron capaces de hidrolizar la capa PG en el ensayo de lisoplato (**figura 25**). Al complementar a la mutante $\Delta sltF$ con cada una de estas versiones mutantes de SltF, sorprendentemente SltFE57A complementó de forma parcial y SltFE83A restableció el fenotipo silvestre (**figura 27A**). Los ensayos de secreción de flagelina confirman que ambas mutantes son capaces de ensamblar el filamento. Lo cual indica que las proteínas poseen la capacidad de generar la cavidad por donde pasa el eje flagelar (**figura 27B**). Otra transglicosilasa lítica como VirB1, involucrada en el funcionamiento del sistema de secreción tipo IV de *A. tumefaciens*, mostró que una enzima mutagenizada en el residuo conservado no es capaz de restablecer el fenotipo virulento pero retiene una infectividad residual [414] [443]. En contraste una proteína mutante en el residuo catalítico de AtIA, identificada como una transglicosilasa lítica involucrada en el sistema de secreción tipo IV de *N. Gonorrhoeae*, no es capaz de secretar DNA [417]. De igual forma, una mutante catalítica de la proteína P19, otra transglicosilasa lítica, no es capaz de complementar un defecto en el sistema de conjugación de una cepa de *E. coli* [422]. En el caso de SltFE57A y SltFE83A es posible que aún permanezca una actividad residual, no detectada en el ensayo *in vitro*, que permita abrir la capa de PG, ya que sólo se requieren hidrolizar unos cuantos enlaces glicosídicos para crear una cavidad de un tamaño adecuado para que el eje flagelar atraviese la pared. Por ejemplo en el ensayo turbidimétrico fueron necesarios 120 μg SltF contra sólo 3 μg de lisozima para detectar actividad. Lo que sugiere una baja capacidad hidrolítica de SltF, en concordancia con su limitada función en el periplasma, una capacidad mayor podría poner en peligro la viabilidad celular. Por lo que la capacidad enzimática limitada de SltF podría ser una forma intrínseca de control. También es posible que en el caso de SltFE83A la ausencia de este residuo, posiblemente involucrado en la formación de algún puente de hidrógeno que contribuya al correcto plegamiento del núcleo catalítico, provoque un inadecuado plegamiento en el sitio catalítico cuando la proteína es sobreexpresada.

Afirmar de forma inequívoca que SlfF es una transglicosilasa lítica aún es prematuro. Sin duda es una glicosilhidrolasa, lo que también debe ser aplicable a otras enzimas involucradas en sistemas de secreción. Sorprendentemente VirB1 de *A. tumefaciens* que posee un residuo de aspártico, el cual se encuentra antes de la segunda firma característica de las transglicosilasas líticas (GLMQ), se mutagenizó y también dio como resultado una enzima inactiva [414]. Lo que es completamente inusual para una transglicosilasa lítica. Este mismo residuo de aspártico también está presente en SlfF. La dupla catalítica E y D es característica de enzimas como las lisozimas, las glucosaminidasas y otras glicosilhidrolasas [444]. Ambos residuos están directamente involucrados en la reacción de hidrólisis; el grupo hidroxilo del residuo de glutámico actúa como un ácido y dona su protón al oxígeno del enlace glicosídico que se forma entre el carbono 1 del residuo de murámico y el carbono 4 de residuo de glucosamina. Esto provoca el rompimiento del enlace y se forma un intermediario cargado positivamente (oxocarbonio), que es estabilizado por el carboxilato del residuo de aspártico. La resolución del intermediario está dada por un ataque nucleofílico de una molécula de agua hacia el carbono 1 del residuo de murámico [444]. Las transglicosilasas líticas siguen un mecanismo semejante; el residuo catalítico de glutámico actúa de igual forma que en la lisozima, pero el intermediario es estabilizado por el grupo amida del carbono 2 del residuo de murámico (en lugar del aspártico). La resolución de la reacción está dada por el ataque nucleofílico de hidroxilo del carbono 6 del mismo residuo de murámico dando como resultado la formación de un enlace intramolecular entre el carbono 1 y 6 del residuo de ácido murámico [438]. A nivel de secuencia las lisozimas y transglicosilasas difieren en varios residuos, sin embargo estructuralmente el dominio catalítico es muy similar [372]. Por lo tanto cabe la posibilidad que algunas de las enzimas designadas como transglicosilasas líticas como VirB1, LtgB, TraL y la misma SlfF no sean transglicosilasas líticas si no otro tipo de glicosilhidrolasas. Por lo que es necesario caracterizar a los productos de la hidrólisis para confirmar la identidad de este grupo de enzimas.

La proteína FlgJ

Se postuló que FlgJ es una proteína que sirve como ensambladora del eje, de alguna manera ayuda a ensamblar el eje flagelar [141]. Una mutante de *flgJ* en *S. enterica* es incapaz de ensamblar el flagelo [131]. En *R. sphaeroides* FlgJ tiene la particularidad de ser homóloga solamente al amino terminal de FlgJ de *S. enterica*, precisamente el dominio que se sugirió como el encargado de ensamblar al eje flagelar. En un trabajo previo se inició la caracterización de una mutante de *flgJ* de *R. sphaeroides* [259]. En esta tesis se estableció que la mutante no es capaz de formar alguna estructura flagelar extracelular (**figura 28B**) y al contrario de la mutante $\Delta slfF$, esta mutante no forma ningún halo de nado (**figura 28A**). El experimento de secreción de flagelina indica que en esta mutante la biogénesis flagelar está detenida en estadíos tempranos (**figura 28C**), como en el caso de

la mutante $\Delta sltF$. Lo cual sugiere que al igual que su homólogo de *S. enterica* pudiese estar cumpliendo una función similar. En experimentos de interacción se observó que FlgJ_{Se} interactúa con las proteínas del eje (FliE, FlgB, FlgC, FlgF y FlgG) y además con la proteína del gancho (FlgE) y con FlgD que es la proteína ensambladora del gancho [141]. Es posible que FlgJ de *R. sphaeroides* también interactúe con estas cinco proteínas, pero en el caso de FlgJ_{Se}, que tiene el dominio de glicosilhidrolasa en el carboxilo terminal, al tiempo que ensambla el eje hace la cavidad por donde este naciente eje pasará. Sin embargo en el caso de *R. sphaeroides* FlgJ no posee este dominio, función ahora asignada a SlfF. FlgJ no presenta algún tipo de secuencia señal para su exportación por una vía particular, por lo que es posible sugerir que FlgJ se está exportando por la vía flagelo específica, como lo hace FlgJ_{Se} [140], mientras que SlfF es exportada por la vía tipo SEC. Por lo tanto SlfF debe encontrar el lugar donde se está formando el eje flagelar para hacer la cavidad, esta misma dificultad la tienen las otras proteínas flagelares que se exportan vía SEC, FlgI, FlgH y FlgA, las dos primeras forman los anillos P y L respectivamente. En *S. enterica* se encontró que estos anillos sólo se forman en presencia del eje flagelar [131], por lo que se puede sugerir que interactúan con el eje flagelar y así forman los anillos. Se sugirió que FlgA está involucrada en la formación del anillo P actuando como una chaperona periplásmica facilitando la polimerización de las unidades de FlgI [145]. El carboxilo terminal de SlfF mostró una débil homología con el amino terminal de FlgA de *Bordetella pertussis*, por lo que una posibilidad es que FlgA interactúe con SlfF. Otro candidato casi natural es FlgJ ya que en *S. enterica* los dominios ensamblador y de hidrólisis coexisten como un sólo polipéptido.

FlgJ de *R. sphaeroides* es una proteína de 100 residuos y posee una estructura formada por α hélices exclusivamente (**figura 29B**). Un análisis de hélices entrelazadas “coiled coil” reveló que en su parte central hay una posible región de interacción proteína-proteína. Para SlfF se encontró que en la región central y en el carboxilo terminal hay una posible región de interacción entre proteínas. FlgJ se sobreexpresó y en diversas condiciones examinadas formó cuerpos de inclusión, por lo que se aisló y purificó en condiciones desnaturalizantes. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron con 5 M de cloruro de guanidina y posteriormente la renaturalización por diálisis dio como resultado una proteína soluble (**figura 29A**). El análisis por dicroísmo circular sugirió que encontraba en condiciones nativas. Mostró un espectro característico de una proteína soluble globular al compararla con otra proteína globular nativa como CheY₅ y con una proteína soluble incorrectamente plegada (**figura 29C**), en este caso la proteína CheY₂ usada como un control negativo [441] [442] [300].

La interacción *in vitro* entre SlfF y FlgJ (**figura 30A y B**) sugiere que estas proteínas se reconocen, probablemente en el periplasma, es decir FlgJ direcciona a SlfF para encontrar el lugar donde debe de cortar a la capa de PG. Se identificó que VirB1 de *Brucella suis*, interactúa con las proteínas VirB8, VirB9 y VirB11 [445]. Las dos primeras forman parte del canal periplásmico que

forma el sistema de secreción y VirB11 es una ATPasa del sistema [446]. Se podría considerar que VirB8 y 9 son homólogas funcionales de las proteínas del eje flagelar por lo que podría existir la posibilidad de una interacción entre la proteínas del eje y SltF. Por otra parte se encontró que VirB1 de *A. tumefaciens*, sufre en el periplasma un corte proteolítico en el carboxilo terminal que separa al dominio de transglicosilasa de un fragmento de 73 residuos el cual interactúa con VirB2 y 5, constituyentes mayoritarios que forman los pili. Por lo que se sugirió que puede funcionar como una chaperona de estas proteínas [443]. SltF posee 50 residuos en el carboxilo terminal, al llevar a cabo una comparación en la base de datos del NCBI, no presenta homología con alguna proteína de función conocida. Por lo que se puede especular que el carboxilo de SltF es la región de interacción con FlgJ o con otras proteínas del sistema flagelar.

En resumen, se puede sugerir un modelo de la participación de SltF y FlgJ durante la biogénesis flagelar de *R. sphaeroides*, en el que SltF es exportada por la vía de secreción tipo SEC, mientras que FlgJ es exportada por la vía flagelo específica. Durante la formación del flagelo, FlgJ auxilia en el ensamblaje del eje flagelar e interactúa con SltF, la cual corta la capa de PG para que continúe la formación del eje flagelar, el gancho y finalmente el filamento (**figura 31**).

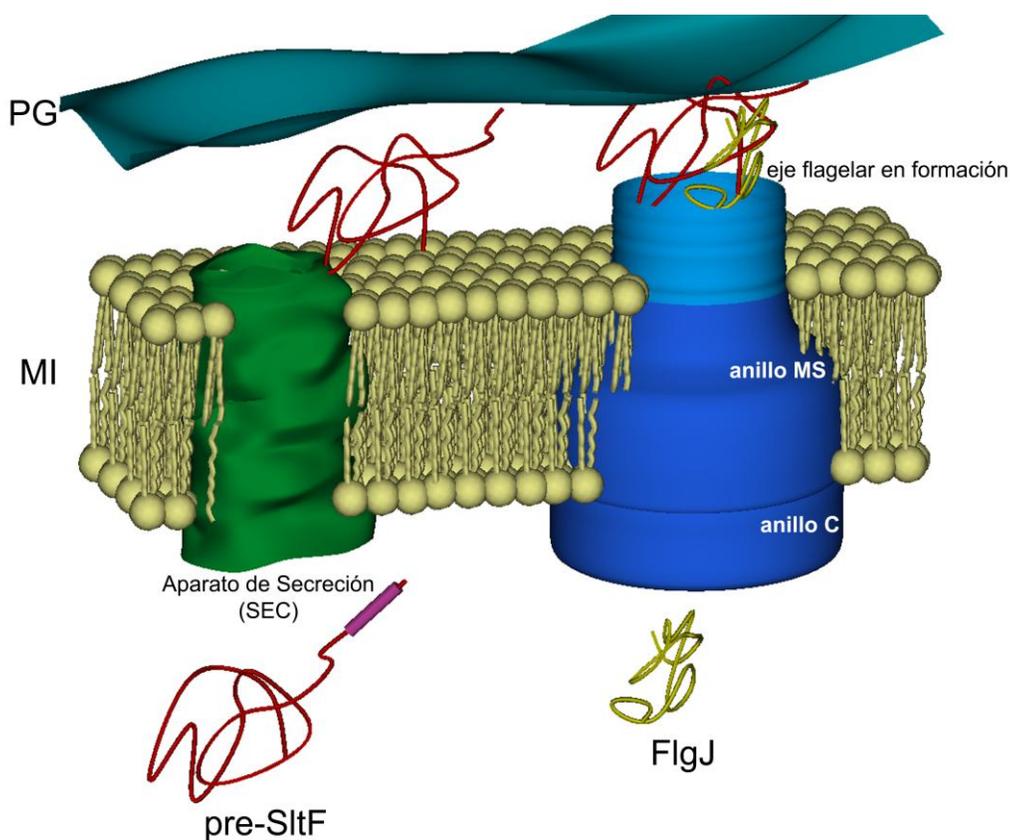


Figura 31. Esquema de la participación de FlgJ y SltF durante la biogénesis del flagelo 1 de *R. sphaeroides*, MI membrana interna y PG capa de peptidoglicano. SltF y FlgJ son exportadas al periplasma por los sistemas de secreción SEC y flagelar respectivamente. Mientras FlgJ participa en la formación del eje, reconoce a SltF y ésta corta la capa de PG para que el eje flagelar continúe su formación.

CONCLUSIONES

- ♣ RSP_0072 (SlfF) de *R. sphaeroides* codifica para una hidrolasa de la capa de peptidoglicano y es posiblemente una transglicosilasa lítica.
- ♣ SlfF participa en la biogénesis del sistema flagelar 1 de *R. sphaeroides*, probablemente generando una cavidad por donde pasa el eje flagelar en formación.
- ♣ FlgJ participa en la biogénesis flagelar de *R. sphaeroides* e interactúa con SlfF. Posiblemente la direcciona para cortar la capa de peptidoglicano localmente durante la formación del flagelo de *R. sphaeroides*.

PERSPECTIVAS

- ♣ Caracterizar detalladamente a SlfF para asignar con plenitud la identidad enzimática de esta proteína.
- ♣ En virtud de que FlgJ de *S. enterica* es bifuncional, se hace interesante evaluar si una proteína quimérica de FlgJ y SlfF es funcional.
- ♣ Identificar mediante ablaciones en serie de FlgJ y SlfF, la región de interacción de estas proteínas.
- ♣ Encontrar cómo se regula la actividad de SlfF tanto a nivel transcripcional, como postraduccional, para comprender cómo SlfF no produce una lisis en la célula.
- ♣ Identificar las regiones de interacción de FlgJ con otras proteínas flagelares, particularmente con las proteínas del eje flagelar con las cuales se postuló interactúa. Es posible que exista una región común en las proteínas del eje flagelar que permita el reconocimiento por parte de FlgJ.
- ♣ En cuanto al flagelo 2 de *R. sphaeroides* será interesante evaluar el papel de RSP_1319 y FlgJ2 en la biogénesis de este flagelo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bardy, S.L., S.Y. Ng, and K.F. Jarrell, *Prokaryotic motility structures*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 2): p. 295-304.
2. Ottemann, K.M. and J.F. Miller, *Roles for motility in bacterial-host interactions*. Mol Microbiol, 1997. **24**(6): p. 1109-17.
3. Szurmant, H. and G.W. Ordal, *Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 301-19.
4. Mattick, J.S., *Type IV pili and twitching motility*. Annu Rev Microbiol, 2002. **56**: p. 289-314.
5. Skerker, J.M. and H.C. Berg, *Direct observation of extension and retraction of type IV pili*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6901-4.
6. McBride, M.J., *Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces*. Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: p. 49-75.
7. Mignot, T., J.W. Shaevitz, P.L. Hartzell, and D.R. Zusman, *Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility*. Science, 2007. **315**(5813): p. 853-6.
8. Miyata, M., *Centipede and inchworm models to explain Mycoplasma gliding*. Trends Microbiol, 2008. **16**(1): p. 6-12.
9. Martinez, A., S. Torello, and R. Kolter, *Sliding motility in mycobacteria*. J Bacteriol, 1999. **181**(23): p. 7331-8.
10. Walsby, A.E., *Gas vesicles*. Microbiol Rev, 1994. **58**(1): p. 94-144.
11. Beard, S.J., P.K. Hayes, F. Pfeifer, and A.E. Walsby, *The sequence of the major gas vesicle protein, GvpA, influences the width and strength of halobacterial gas vesicles*. FEMS Microbiol Lett, 2002. **213**(2): p. 149-57.
12. Geis, G., S. Suerbaum, B. Forsthoff, H. Leying, and W. Opferkuch, *Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of Helicobacter pylori*. J Med Microbiol, 1993. **38**(5): p. 371-7.
13. Kushmaro, A., E. Banin, Y. Loya, E. Stackebrandt, and E. Rosenberg, *Vibrio shiloi sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral Oculina patagonica*. Int J Syst Evol Microbiol, 2001. **51**(Pt 4): p. 1383-8.
14. Murphy, G.E., J.R. Leadbetter, and G.J. Jensen, *In situ structure of the complete Treponema primitia flagellar motor*. Nature, 2006. **442**(7106): p. 1062-4.
15. Motaleb, M.A., L. Corum, J.L. Bono, A.F. Elias, P. Rosa, D.S. Samuels, and N.W. Charon, *Borrelia burgdorferi periplasmic flagella have both skeletal and motility functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(20): p. 10899-904.
16. Childers, S.E., S. Ciufu, and D.R. Lovley, *Geobacter metallireducens accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis*. Nature, 2002. **416**(6882): p. 767-9.
17. Engebrecht, J., K. Nealson, and M. Silverman, *Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from Vibrio fischeri*. Cell, 1983. **32**(3): p. 773-81.
18. Boettcher, K.J., E.G. Ruby, and M.-N.M. J., *Bioluminescence in the symbiotic squid Euprymna scolopes is controlled by a daily biological rhythm*, in *Journal of Comparative Physiology A*. 1996. p. 65-73.
19. Graf, J., P.V. Dunlap, and E.G. Ruby, *Effect of transposon-induced motility mutations on colonization of the host light organ by Vibrio fischeri*. J Bacteriol, 1994. **176**(22): p. 6986-91.
20. Long, S.R., *Genes and signals in the rhizobium-legume symbiosis*. Plant Physiol, 2001. **125**(1): p. 69-72.
21. Stacey, G., *Bradyrhizobium japonicum nodulation genetics*. FEMS Microbiol Lett, 1995. **127**(1-2): p. 1-9.
22. Caetano-Anolles, G., L.G. Wall, A.T. De Micheli, E.M. Macchi, W.D. Bauer, and G. Favelukes, *Role of Motility and Chemotaxis in Efficiency of Nodulation by Rhizobium meliloti*. Plant Physiol, 1988. **86**(4): p. 1228-1235.

23. Liu, R., V.M. Tran, and E.L. Schmidt, *Nodulating Competitiveness of a Nonmotile Tn7 Mutant of Bradyrhizobium japonicum in Nonsterile Soil*. Appl Environ Microbiol, 1989. **55**(8): p. 1895-1900.
24. Eaton, K.A., D.R. Morgan, and S. Krakowka, *Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by Helicobacter pylori*. J Med Microbiol, 1992. **37**(2): p. 123-7.
25. Drake, D. and T.C. Montie, *Flagella, motility and invasive virulence of Pseudomonas aeruginosa*. J Gen Microbiol, 1988. **134**(1): p. 43-52.
26. Eaton, K.A., S. Suerbaum, C. Josenhans, and S. Krakowka, *Colonization of gnotobiotic piglets by Helicobacter pylori deficient in two flagellin genes*. Infect Immun, 1996. **64**(7): p. 2445-8.
27. Feldman, M., R. Bryan, S. Rajan, L. Scheffler, S. Brunnert, H. Tang, and A. Prince, *Role of flagella in pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa pulmonary infection*. Infect Immun, 1998. **66**(1): p. 43-51.
28. Chesnokova, O., J.B. Coutinho, I.H. Khan, M.S. Mikhail, and C.I. Kado, *Characterization of flagella genes of Agrobacterium tumefaciens, and the effect of a bald strain on virulence*. Mol Microbiol, 1997. **23**(3): p. 579-90.
29. Pallen, M.J., C.W. Penn, and R.R. Chaudhuri, *Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era*. Trends Microbiol, 2005. **13**(4): p. 143-9.
30. Toft, C. and M.A. Fares, *The evolution of the flagellar assembly pathway in endosymbiotic bacterial genomes*. Mol Biol Evol, 2008. **25**(9): p. 2069-76.
31. Macnab, R.M. and S. Aizawa, *Bacterial motility and the bacterial flagellar motor*. Annu Rev Biophys Bioeng, 1984. **13**: p. 51-83.
32. Khan, I.H., T.S. Reese, and S. Khan, *The cytoplasmic component of the bacterial flagellar motor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 5956-60.
33. Katayama, E., T. Shiraishi, K. Oosawa, N. Baba, and S. Aizawa, *Geometry of the flagellar motor in the cytoplasmic membrane of Salmonella typhimurium as determined by stereophotogrammetry of quick-freeze deep-etch replica images*. J Mol Biol, 1996. **255**(3): p. 458-75.
34. Akiba, T., H. Yoshimura, and K. Namba, *Monolayer crystallization of flagellar L-P rings by sequential addition and depletion of lipid*. Science, 1991. **252**(5012): p. 1544-6.
35. Yonekura, K., S. Maki, D.G. Morgan, D.J. DeRosier, F. Vonderviszt, K. Imada, and K. Namba, *The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly*. Science, 2000. **290**(5499): p. 2148-52.
36. Jones, C.J., M. Homma, and R.M. Macnab, *Identification of proteins of the outer (L and P) rings of the flagellar basal body of Escherichia coli*. J Bacteriol, 1987. **169**(4): p. 1489-92.
37. O'Brien, E.J. and P.M. Bennett, *Structure of straight flagella from a mutant Salmonella*. J Mol Biol, 1972. **70**(1): p. 133-52.
38. Asakura, S., *Polymerization of flagellin and polymorphism of flagella*. Adv Biophys, 1970. **1**: p. 99-155.
39. Kamiya, R., S. Asakura, K. Wakabayashi, and K. Namba, *Transition of bacterial flagella from helical to straight forms with different subunit arrangements*. J Mol Biol, 1979. **131**(4): p. 725-42.
40. Yamashita, I., K. Hasegawa, H. Suzuki, F. Vonderviszt, Y. Mimori-Kiyosue, and K. Namba, *Structure and switching of bacterial flagellar filaments studied by X-ray fiber diffraction*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(2): p. 125-32.
41. Samatey, F.A., K. Imada, S. Nagashima, F. Vonderviszt, T. Kumasaka, M. Yamamoto, and K. Namba, *Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling*. Nature, 2001. **410**(6826): p. 331-7.
42. Calladine, C.R., *Change of waveform in bacterial flagella: The role of mechanics at the molecular level*. J Mol Biol, 1978. **118**(4): p. 457-479.
43. Namba, K. and F. Vonderviszt, *Molecular architecture of bacterial flagellum*. Q Rev Biophys, 1997. **30**(1): p. 1-65.
44. Hotani, H., *Micro-video study of moving bacterial flagellar filaments. III. Cyclic transformation induced by mechanical force*. J Mol Biol, 1982. **156**(4): p. 791-806.

45. Kamiya, R. and S. Asakura, *Flagellar transformations at alkaline pH*. J Mol Biol, 1976. **108**(2): p. 513-8.
46. Kamiya, R. and S. Asakura, *Helical transformations of Salmonella flagella in vitro*. J Mol Biol, 1976. **106**(1): p. 167-86.
47. Martinez, R.J., A.T. Ichiki, N.P. Lundh, and S.R. Tronick, *A single amino acid substitution responsible for altered flagellar morphology*. J Mol Biol, 1968. **34**(3): p. 559-64.
48. Yonekura, K., S. Maki-Yonekura, and K. Namba, *Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy*. Nature, 2003. **424**(6949): p. 643-50.
49. Aizawa, S.I., F. Vonderviszt, R. Ishima, and K. Akasaka, *Termini of Salmonella flagellin are disordered and become organized upon polymerization into flagellar filament*. J Mol Biol, 1990. **211**(4): p. 673-7.
50. Vonderviszt, F., S. Aizawa, and K. Namba, *Role of the disordered terminal regions of flagellin in filament formation and stability*. J Mol Biol, 1991. **221**(4): p. 1461-74.
51. Galkin, V.E., X. Yu, J. Bielnicki, J. Heuser, C.P. Ewing, P. Guerry, and E.H. Egelman, *Divergence of quaternary structures among bacterial flagellar filaments*. Science, 2008. **320**(5874): p. 382-5.
52. Jones, C.J., R.M. Macnab, H. Okino, and S. Aizawa, *Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of Salmonella typhimurium*. J Mol Biol, 1990. **212**(2): p. 377-87.
53. Hirano, T., S. Yamaguchi, K. Oosawa, and S. Aizawa, *Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1994. **176**(17): p. 5439-49.
54. Wagenknecht, T., D.J. DeRosier, S. Aizawa, and R.M. Macnab, *Flagellar hook structures of Caulobacter and Salmonella and their relationship to filament structure*. J Mol Biol, 1982. **162**(1): p. 69-87.
55. Samatey, F.A., H. Matsunami, K. Imada, S. Nagashima, T.R. Shaikh, D.R. Thomas, J.Z. Chen, D.J. Derosier, A. Kitao, and K. Namba, *Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism*. Nature, 2004. **431**(7012): p. 1062-8.
56. Furuta, T., F.A. Samatey, H. Matsunami, K. Imada, K. Namba, and A. Kitao, *Gap compression/extension mechanism of bacterial flagellar hook as the molecular universal joint*. J Struct Biol, 2007. **157**(3): p. 481-90.
57. Homma, M. and T. Iino, *Locations of hook-associated proteins in flagellar structures of Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1985. **162**(1): p. 183-9.
58. Homma, M., K. Kutsukake, T. Iino, and S. Yamaguchi, *Hook-associated proteins essential for flagellar filament formation in Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1984. **157**(1): p. 100-8.
59. Maki, S., F. Vonderviszt, Y. Furukawa, K. Imada, and K. Namba, *Plugging interactions of HAP2 pentamer into the distal end of flagellar filament revealed by electron microscopy*. J Mol Biol, 1998. **277**(4): p. 771-7.
60. Ikeda, T., M. Homma, T. Iino, S. Asakura, and R. Kamiya, *Localization and stoichiometry of hook-associated proteins within Salmonella typhimurium flagella*. J Bacteriol, 1987. **169**(3): p. 1168-73.
61. Ikeda, T., S. Yamaguchi, and H. Hotani, *Flagellar growth in a filament-less Salmonella fliD mutant supplemented with purified hook-associated protein 2*. J Biochem, 1993. **114**(1): p. 39-44.
62. Francis, N.R., G.E. Sosinsky, D. Thomas, and D.J. DeRosier, *Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex*. J Mol Biol, 1994. **235**(4): p. 1261-70.
63. Yamaguchi, S., S. Aizawa, M. Kihara, M. Isomura, C.J. Jones, and R.M. Macnab, *Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagellar motor of Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1986. **168**(3): p. 1172-9.
64. Thomas, D.R., N.R. Francis, C. Xu, and D.J. DeRosier, *The three-dimensional structure of the flagellar rotor from a clockwise-locked mutant of Salmonella enterica serovar Typhimurium*. J Bacteriol, 2006. **188**(20): p. 7039-48.

65. Zhao, R., N. Pathak, H. Jaffe, T.S. Reese, and S. Khan, *FliN is a major structural protein of the C-ring in the Salmonella typhimurium flagellar basal body*. J Mol Biol, 1996. **261**(2): p. 195-208.
66. Brown, P.N., M.A. Mathews, L.A. Joss, C.P. Hill, and D.F. Blair, *Crystal structure of the flagellar rotor protein FliN from Thermotoga maritima*. J Bacteriol, 2005. **187**(8): p. 2890-902.
67. Lloyd, S.A., H. Tang, X. Wang, S. Billings, and D.F. Blair, *Torque generation in the flagellar motor of Escherichia coli: evidence of a direct role for FliG but not for FliM or FliN*. J Bacteriol, 1996. **178**(1): p. 223-31.
68. Zhou, J., S.A. Lloyd, and D.F. Blair, *Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6436-41.
69. Oosawa, K., T. Ueno, and S. Aizawa, *Overproduction of the bacterial flagellar switch proteins and their interactions with the MS ring complex in vitro*. J Bacteriol, 1994. **176**(12): p. 3683-91.
70. Kihara, M., G.U. Miller, and R.M. Macnab, *Deletion analysis of the flagellar switch protein FliG of Salmonella*. J Bacteriol, 2000. **182**(11): p. 3022-8.
71. Sockett, H., S. Yamaguchi, M. Kihara, V.M. Irikura, and R.M. Macnab, *Molecular analysis of the flagellar switch protein FliM of Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1992. **174**(3): p. 793-806.
72. Toker, A.S., M. Kihara, and R.M. Macnab, *Deletion analysis of the FliM flagellar switch protein of Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1996. **178**(24): p. 7069-79.
73. Irikura, V.M., M. Kihara, S. Yamaguchi, H. Sockett, and R.M. Macnab, *Salmonella typhimurium fliG and fliN mutations causing defects in assembly, rotation, and switching of the flagellar motor*. J Bacteriol, 1993. **175**(3): p. 802-10.
74. Gonzalez-Pedrajo, B., T. Minamino, M. Kihara, and K. Namba, *Interactions between C ring proteins and export apparatus components: a possible mechanism for facilitating type III protein export*. Mol Microbiol, 2006. **60**(4): p. 984-98.
75. Ueno, T., K. Oosawa, and S. Aizawa, *M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of Salmonella typhimurium are composed of subunits of a single protein, FliF*. J Mol Biol, 1992. **227**(3): p. 672-7.
76. Suzuki, H., K. Yonekura, and K. Namba, *Structure of the rotor of the bacterial flagellar motor revealed by electron cryomicroscopy and single-particle image analysis*. J Mol Biol, 2004. **337**(1): p. 105-13.
77. Francis, N.R., V.M. Irikura, S. Yamaguchi, D.J. DeRosier, and R.M. Macnab, *Localization of the Salmonella typhimurium flagellar switch protein FliG to the cytoplasmic M-ring face of the basal body*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(14): p. 6304-8.
78. Homma, M., K. Kutsukake, M. Hasebe, T. Iino, and R.M. Macnab, *FlgB, FlgC, FlgF and FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of Salmonella typhimurium*. J Mol Biol, 1990. **211**(2): p. 465-77.
79. Muller, V., C.J. Jones, I. Kawagishi, S. Aizawa, and R.M. Macnab, *Characterization of the fliE genes of Escherichia coli and Salmonella typhimurium and identification of the FliE protein as a component of the flagellar hook-basal body complex*. J Bacteriol, 1992. **174**(7): p. 2298-304.
80. Chevance, F.F., N. Takahashi, J.E. Karlinsey, J. Gnerer, T. Hirano, R. Samudrala, S. Aizawa, and K.T. Hughes, *The mechanism of outer membrane penetration by the eubacterial flagellum and implications for spirochete evolution*. Genes Dev, 2007. **21**(18): p. 2326-35.
81. Homma, M., Y. Komeda, T. Iino, and R.M. Macnab, *The flaFIX gene product of Salmonella typhimurium is a flagellar basal body component with a signal peptide for export*. J Bacteriol, 1987. **169**(4): p. 1493-8.
82. Khan, S., M. Dapice, and T.S. Reese, *Effects of Mot gene expression on the structure of the flagellar motor*. J Mol Biol, 1988. **202**: p. 575-584.
83. Armstrong, J.B. and J. Adler, *Complementation of nonchemotactic mutants of Escherichia coli*. Genetics, 1969. **61**(1): p. 61-6.
84. Dean, G.E., R.M. Macnab, J. Stader, P. Matsumura, and C. Burks, *Gene sequence and predicted amino acid sequence of the motA protein, a membrane-associated protein required for flagellar rotation in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1984. **159**(3): p. 991-9.

85. Stader, J., P. Matsumura, D. Vacante, G.E. Dean, and R.M. Macnab, *Nucleotide sequence of the Escherichia coli motB gene and site-limited incorporation of its product into the cytoplasmic membrane*. J Bacteriol, 1986. **166**(1): p. 244-52.
86. Sato, K. and M. Homma, *Functional reconstitution of the Na(+)-driven polar flagellar motor component of Vibrio alginolyticus*. J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5718-22.
87. Reid, S.W., M.C. Leake, J.H. Chandler, C.J. Lo, J.P. Armitage, and R.M. Berry, *The maximum number of torque-generating units in the flagellar motor of Escherichia coli is at least 11*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(21): p. 8066-71.
88. Braun, T.F., L.Q. Al-Mawsawi, S. Kojima, and D.F. Blair, *Arrangement of core membrane segments in the MotA/MotB proton-channel complex of Escherichia coli*. Biochemistry, 2004. **43**(1): p. 35-45.
89. Asai, Y., S. Kojima, H. Kato, N. Nishioka, I. Kawagishi, and M. Homma, *Putative channel components for the fast-rotating sodium-driven flagellar motor of a marine bacterium*. J Bacteriol, 1997. **179**(16): p. 5104-10.
90. Terahara, N., T.A. Krulwich, and M. Ito, *Mutations alter the sodium versus proton use of a Bacillus clausii flagellar motor and confer dual ion use on Bacillus subtilis motors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(38): p. 14359-64.
91. Paulick, A., A. Koerdt, J. Lassak, S. Huntley, I. Wilms, F. Narberhaus, and K.M. Thormann, *Two different stator systems drive a single polar flagellum in Shewanella oneidensis MR-1*. Mol Microbiol, 2009. **71**(4): p. 836-50.
92. Zhou, J., L.L. Sharp, H.L. Tang, S.A. Lloyd, S. Billings, T.F. Braun, and D.F. Blair, *Function of protonatable residues in the flagellar motor of Escherichia coli: a critical role for Asp 32 of MotB*. J Bacteriol, 1998. **180**(10): p. 2729-35.
93. Lloyd, S.A. and D.F. Blair, *Charged residues of the rotor protein FliG essential for torque generation in the flagellar motor of Escherichia coli*. J Mol Biol, 1997. **266**(4): p. 733-44.
94. Zhou, J. and D.F. Blair, *Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for torque generation in the bacterial flagellar motor*. J Mol Biol, 1997. **273**(2): p. 428-39.
95. Kojima, S. and D.F. Blair, *Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor*. Biochemistry, 2001. **40**(43): p. 13041-50.
96. Xing, J., F. Bai, R. Berry, and G. Oster, *Torque-speed relationship of the bacterial flagellar motor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(5): p. 1260-5.
97. Lauger, P., *Torque and rotation rate of the bacterial flagellar motor*. Biophys J, 1988. **53**(1): p. 53-65.
98. Magariyama, Y., S. Sugiyama, K. Muramoto, I. Maekawa, I. Kawagishi, Y. Imae, and S. Kudo, *Very fast flagellar rotation*. Nature, 1994. **371**: p. 752.
99. Buttner, D. and U. Bonas, *Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria*. Curr Opin Plant Biol, 2003. **6**(4): p. 312-9.
100. Minamino, T. and R.M. Macnab, *Components of the Salmonella flagellar export apparatus and classification of export substrates*. J Bacteriol, 1999. **181**(5): p. 1388-94.
101. Suzuki, H., K. Yonekura, K. Murata, T. Hirai, K. Oosawa, and K. Namba, *A structural feature in the central channel of the bacterial flagellar FliF ring complex is implicated in type III protein export*. J Struct Biol, 1998. **124**(2-3): p. 104-14.
102. Macnab, R.M., *How bacteria assemble flagella*. Annu Rev Microbiol, 2003. **57**: p. 77-100.
103. Minamino, T. and R.M. MacNab, *Interactions among components of the Salmonella flagellar export apparatus and its substrates*. Mol Microbiol, 2000. **35**(5): p. 1052-64.
104. Zhu, K., B. González-Pedrajo, and R.M. Macnab, *Interactions among membrane and soluble components of the flagellar export apparatus of Salmonella*. Biochemistry, 2002. **41**(30): p. 9516-24.
105. Vogler, A.P., M. Homma, V.M. Irikura, and R.M. Macnab, *Salmonella typhimurium mutants defective in flagellar filament regrowth and sequence similarity of FilI to FOF1, vacuolar, and archaeobacterial ATPase subunits*. J Bacteriol, 1991. **173**(11): p. 3564-72.

106. Fan, F. and R.M. Macnab, *Enzymatic characterization of FliI. An ATPase involved in flagellar assembly in Salmonella typhimurium*. J Biol Chem, 1996. **271**(50): p. 31981-8.
107. Minamino, T. and K. Namba, *Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export*. Nature, 2008. **451**(7177): p. 485-8.
108. Paul, K., M. Erhardt, T. Hirano, D.F. Blair, and K.T. Hughes, *Energy source of flagellar type III secretion*. Nature, 2008. **451**(7177): p. 489-92.
109. Claret, L., S.R. Calder, M. Higgins, and C. Hughes, *Oligomerization and activation of the FliI ATPase central to bacterial flagellum assembly*. Mol Microbiol, 2003. **48**(5): p. 1349-55.
110. Minamino, T. and R.M. MacNab, *FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of Salmonella, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity*. Mol Microbiol, 2000. **37**(6): p. 1494-503.
111. Fraser, G.M., B. González-Pedrajo, J.R. Tame, and R.M. Macnab, *Interactions of FliJ with the Salmonella type III flagellar export apparatus*. J Bacteriol, 2003. **185**(18): p. 5546-54.
112. Minamino, T., B. González-Pedrajo, M. Kihara, K. Namba, and R.M. Macnab, *The ATPase FliI can interact with the type III flagellar protein export apparatus in the absence of its regulator, FliH*. J Bacteriol, 2003. **185**(13): p. 3983-8.
113. González-Pedrajo, B., G.M. Fraser, T. Minamino, and R.M. Macnab, *Molecular dissection of Salmonella FliH, a regulator of the ATPase FliI and the type III flagellar protein export pathway*. Mol Microbiol, 2002. **45**(4): p. 967-82.
114. Minamino, T., R. Chu, S. Yamaguchi, and R.M. Macnab, *Role of FliJ in flagellar protein export in Salmonella*. J Bacteriol, 2000. **182**(15): p. 4207-15.
115. Minamino, T., K. Imada, and K. Namba, *Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly*. Mol Biosyst, 2008. **4**(11): p. 1105-15.
116. Evans, L.D., G.P. Stafford, S. Ahmed, G.M. Fraser, and C. Hughes, *An escort mechanism for cycling of export chaperones during flagellum assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(46): p. 17474-9.
117. Kihara, M., T. Minamino, S. Yamaguchi, and R.M. Macnab, *Intergenic suppression between the flagellar MS ring protein FliF of Salmonella and FlhA, a membrane component of its export apparatus*. J Bacteriol, 2001. **183**(5): p. 1655-62.
118. Minamino, T., T. Iino, and K. Kutsukake, *Molecular characterization of the Salmonella typhimurium flhB operon and its protein products*. J Bacteriol, 1994. **176**(24): p. 7630-7.
119. Minamino, T. and R.M. Macnab, *Domain structure of Salmonella FlhB, a flagellar export component responsible for substrate specificity switching*. J Bacteriol, 2000. **182**(17): p. 4906-14.
120. Ferris, H.U., Y. Furukawa, T. Minamino, M.B. Kroetz, M. Kihara, K. Namba, and R.M. Macnab, *FlhB regulates ordered export of flagellar components via autocleavage mechanism*. J Biol Chem, 2005. **280**(50): p. 41236-42.
121. Fraser, G.M., T. Hirano, H.U. Ferris, L.L. Devgan, M. Kihara, and R.M. Macnab, *Substrate specificity of type III flagellar protein export in Salmonella is controlled by subdomain interactions in FlhB*. Mol Microbiol, 2003. **48**(4): p. 1043-57.
122. Fan, F., K. Ohnishi, N.R. Francis, and R.M. Macnab, *The FliP and FliR proteins of Salmonella typhimurium, putative components of the type III flagellar export apparatus, are located in the flagellar basal body*. Mol Microbiol, 1997. **26**(5): p. 1035-46.
123. Bennett, J.C. and C. Hughes, *From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperones*. Trends Microbiol, 2000. **8**(5): p. 202-4.
124. Fraser, G.M., J.C. Bennett, and C. Hughes, *Substrate-specific binding of hook-associated proteins by FlgN and FliT, putative chaperones for flagellum assembly*. Mol Microbiol, 1999. **32**(3): p. 569-80.
125. Yokoseki, T., K. Kutsukake, K. Ohnishi, and T. Iino, *Functional analysis of the flagellar genes in the fliD operon of Salmonella typhimurium*. Microbiology, 1995. **141** (Pt 7): p. 1715-22.

126. Gygi, D., G. Fraser, A. Dufour, and C. Hughes, *A motile but non-swarming mutant of Proteus mirabilis lacks FlgN, a facilitator of flagella filament assembly*. Mol Microbiol, 1997. **25**(3): p. 597-604.
127. Auvray, F., J. Thomas, G.M. Fraser, and C. Hughes, *Flagellin polymerisation control by a cytosolic export chaperone*. J Mol Biol, 2001. **308**(2): p. 221-9.
128. Evdokimov, A.G., J. Phan, J.E. Tropea, K.M. Routzahn, H.K. Peters, M. Pokross, and D.S. Waugh, *Similar modes of polypeptide recognition by export chaperones in flagellar biosynthesis and type III secretion*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(10): p. 789-93.
129. Ozin, A.J., L. Claret, F. Auvray, and C. Hughes, *The FliS chaperone selectively binds the disordered flagellin C-terminal D0 domain central to polymerisation*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **219**(2): p. 219-24.
130. Muskotal, A., R. Kiraly, A. Sebestyen, Z. Gugolya, B.M. Vegh, and F. Vonderviszt, *Interaction of FliS flagellar chaperone with flagellin*. FEBS Lett, 2006. **580**(16): p. 3916-20.
131. Kubori, T., N. Shimamoto, S. Yamaguchi, K. Namba, and S. Aizawa, *Morphological pathway of flagellar assembly in Salmonella typhimurium*. J Mol Biol, 1992. **226**(2): p. 433-46.
132. Aizawa, S.I., *Flagellar assembly in Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol, 1996. **19**(1): p. 1-5.
133. Obuchowski, P.L. and C. Jacobs-Wagner, *Pfil, a protein involved in flagellar positioning in Caulobacter crescentus*. J Bacteriol, 2008. **190**(5): p. 1718-29.
134. Pandza, S., M. Baetens, C.H. Park, T. Au, M. Keyhan, and A. Matin, *The G-protein FlhF has a role in polar flagellar placement and general stress response induction in Pseudomonas putida*. Mol Microbiol, 2000. **36**(2): p. 414-23.
135. Jones, C.J. and R.M. Macnab, *Flagellar assembly in Salmonella typhimurium: analysis with temperature-sensitive mutants*. J Bacteriol, 1990. **172**(3): p. 1327-39.
136. Kubori, T., S. Yamaguchi, and S. Aizawa, *Assembly of the switch complex onto the MS ring complex of Salmonella typhimurium does not require any other flagellar proteins*. J Bacteriol, 1997. **179**(3): p. 813-7.
137. Blair, D.F. and H.C. Berg, *Restoration of torque in defective flagellar motors*. Science, 1988. **242**(4886): p. 1678-81.
138. Minamino, T., S. Yamaguchi, and R.M. Macnab, *Interaction between FliE and FlgB, a proximal rod component of the flagellar basal body of Salmonella*. J Bacteriol, 2000. **182**(11): p. 3029-36.
139. Okino, H., M. Isomura, S. Yamaguchi, Y. Magariyama, S. Kudo, and S.I. Aizawa, *Release of flagellar filament-hook-rod complex by a Salmonella typhimurium mutant defective in the M ring of the basal body*. J Bacteriol, 1989. **171**(4): p. 2075-82.
140. Nambu, T., T. Minamino, R.M. Macnab, and K. Kutsukake, *Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1999. **181**(5): p. 1555-61.
141. Hirano, T., T. Minamino, and R.M. Macnab, *The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of Salmonella FlgJ, a flagellum-specific muramidase*. J Mol Biol, 2001. **312**(2): p. 359-69.
142. Nambu, T., Y. Inagaki, and K. Kutsukake, *Plasticity of the domain structure in FlgJ, a bacterial protein involved in flagellar rod formation*. Genes Genet Syst, 2006. **81**(6): p. 381-9.
143. Jones, C.J., M. Homma, and R.M. Macnab, *L-, P-, and M-ring proteins of the flagellar basal body of Salmonella typhimurium: gene sequences and deduced protein sequences*. J Bacteriol, 1989. **171**(7): p. 3890-900.
144. Kutsukake, K., *Excretion of the anti-sigma factor through a flagellar substructure couples flagellar gene expression with flagellar assembly in Salmonella typhimurium*. Mol Gen Genet, 1994. **243**(6): p. 605-12.
145. Nambu, T. and K. Kutsukake, *The Salmonella FlgA protein, a putative periplasmic chaperone essential for flagellar P ring formation*. Microbiology, 2000. **146** (Pt 5): p. 1171-8.
146. Nakamoto, H. and J.C. Bardwell, *Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in the Escherichia coli periplasm*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1694**(1-3): p. 111-9.

147. Hizukuri, Y., T. Yakushi, I. Kawagishi, and M. Homma, *Role of the intramolecular disulfide bond in FlgI, the flagellar P-ring component of Escherichia coli*. J Bacteriol, 2006. **188**(12): p. 4190-7.
148. Hizukuri, Y., S. Kojima, T. Yakushi, I. Kawagishi, and M. Homma, *Systematic Cys mutagenesis of FlgI, the flagellar P-ring component of Escherichia coli*. Microbiology, 2008. **154**(Pt 3): p. 810-7.
149. DePamphilis, M.L. and J. Adler, *Attachment of flagellar basal bodies to the cell envelope: specific attachment to the outer, lipopolysaccharide membrane and the cytoplasmic membrane*. J Bacteriol, 1971. **105**(1): p. 396-407.
150. Ohnishi, K., Y. Ohto, S. Aizawa, R.M. Macnab, and T. Iino, *FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1994. **176**(8): p. 2272-81.
151. Patterson-Delafield, J., R.J. Martínez, B.A. Stocker, and S. Yamaguchi, *A new fla gene in Salmonella typhimurium--flaR--and its mutant phenotype--superhooks*. Arch Mikrobiol, 1973. **90**(2): p. 107-20.
152. Muramoto, K., S. Makishima, S.I. Aizawa, and R.M. Macnab, *Effect of cellular level of FliK on flagellar hook and filament assembly in Salmonella typhimurium*. J Mol Biol, 1998. **277**(4): p. 871-82.
153. Williams, A.W., S. Yamaguchi, F. Togashi, S.I. Aizawa, I. Kawagishi, and R.M. Macnab, *Mutations in fliK and flhB affecting flagellar hook and filament assembly in Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1996. **178**(10): p. 2960-70.
154. Minamino, T., Y. Saijo-Hamano, Y. Furukawa, B. González-Pedrajo, R.M. Macnab, and K. Namba, *Domain organization and function of Salmonella FliK, a flagellar hook-length control protein*. J Mol Biol, 2004. **341**(2): p. 491-502.
155. Minamino, T., H.U. Ferris, N. Moriya, M. Kihara, and K. Namba, *Two parts of the T3S4 domain of the hook-length control protein FliK are essential for the substrate specificity switching of the flagellar type III export apparatus*. J Mol Biol, 2006. **362**(5): p. 1148-58.
156. Hirano, T., S. Shibata, K. Ohnishi, T. Tani, and S. Aizawa, *N-terminal signal region of FliK is dispensable for length control of the flagellar hook*. Mol Microbiol, 2005. **56**(2): p. 346-60.
157. Karlinsey, J.E., A.J. Pease, M.E. Winkler, J.L. Bailey, and K.T. Hughes, *The flk gene of Salmonella typhimurium couples flagellar P- and L-ring assembly to flagellar morphogenesis*. J Bacteriol, 1997. **179**(7): p. 2389-400.
158. Kutsukake, K., *Hook-length control of the export-switching machinery involves a double-locked gate in Salmonella typhimurium flagellar morphogenesis*. J Bacteriol, 1997. **179**(4): p. 1268-73.
159. Aldridge, P., J.E. Karlinsey, E. Becker, F.F. Chevance, and K.T. Hughes, *Flk prevents premature secretion of the anti-sigma factor FlgM into the periplasm*. Mol Microbiol, 2006. **60**(3): p. 630-43.
160. Makishima, S., K. Komoriya, S. Yamaguchi, and S.I. Aizawa, *Length of the flagellar hook and the capacity of the type III export apparatus*. Science, 2001. **291**(5512): p. 2411-3.
161. Shibata, S., N. Takahashi, F.F. Chevance, J.E. Karlinsey, K.T. Hughes, and S. Aizawa, *FliK regulates flagellar hook length as an internal ruler*. Mol Microbiol, 2007. **64**(5): p. 1404-15.
162. Journet, L., C. Agrain, P. Broz, and G.R. Cornelis, *The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1757-60.
163. Agrain, C., I. Callebaut, L. Journet, I. Sorg, C. Paroz, L.J. Mota, and G.R. Cornelis, *Characterization of a Type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from Yersinia enterocolitica*. Mol Microbiol, 2005. **56**(1): p. 54-67.
164. Moriya, N., T. Minamino, K.T. Hughes, R.M. Macnab, and K. Namba, *The type III flagellar export specificity switch is dependent on FliK ruler and a molecular clock*. J Mol Biol, 2006. **359**(2): p. 466-77.
165. Iino, T., *Polarity of flagellar growth in salmonella*. J Gen Microbiol, 1969. **56**(2): p. 227-39.
166. Iino, T., *Assembly of Salmonella flagellin in vitro and in vivo*. J Supramol Struct, 1974. **2**(2-4): p. 372-84.

167. Macnab, R.M., *Flagella and Motility*, in *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, F.C. Neidhardt, et al., Editors. 1996, ASM press: Washinton DC. p. 132-145.
168. Frye, J., J.E. Karlinsey, H.R. Felise, B. Marzolf, N. Dowidar, M. McClelland, and K.T. Hughes, *Identification of new flagellar genes of Salmonella enterica serovar Typhimurium*. J Bacteriol, 2006. **188**(6): p. 2233-43.
169. Chilcott, G.S. and K.T. Hughes, *Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in Salmonella enterica serovar typhimurium and Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(4): p. 694-708.
170. Kutsukake, K., Y. Ohya, and T. Iino, *Transcriptional analysis of the flagellar regulon of Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1990. **172**(2): p. 741-7.
171. England, J.C. and J.W. Gober, *Cell cycle control of cell morphogenesis in Caulobacter*. Curr Opin Microbiol, 2001. **4**(6): p. 674-80.
172. McCarter, L.L., *Regulation of flagella*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(2): p. 180-6.
173. Yanagihara, S., S. Iyoda, K. Ohnishi, T. Iino, and K. Kutsukake, *Structure and transcriptional control of the flagellar master operon of Salmonella typhimurium*. Genes Genet Syst, 1999. **74**(3): p. 105-11.
174. Liu, X. and P. Matsumura, *The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the Escherichia coli flagellar class II operons*. J Bacteriol, 1994. **176**(23): p. 7345-51.
175. Wang, S., R.T. Fleming, E.M. Westbrook, P. Matsumura, and D.B. McKay, *Structure of the Escherichia coli FlhDC complex, a prokaryotic heteromeric regulator of transcription*. J Mol Biol, 2006. **355**(4): p. 798-808.
176. Kutsukake, K., *Autogenous and global control of the flagellar master operon, flhD, in Salmonella typhimurium*. Mol Gen Genet, 1997. **254**(4): p. 440-8.
177. Li, C., C.J. Louise, W. Shi, and J. Adler, *Adverse conditions which cause lack of flagella in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1993. **175**(8): p. 2229-35.
178. Shi, W., C. Li, C.J. Louise, and J. Adler, *Mechanism of adverse conditions causing lack of flagella in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1993. **175**(8): p. 2236-40.
179. Soutourina, O.A., E. Krin, C. Laurent-Winter, F. Hommais, A. Danchin, and P.N. Bertin, *Regulation of bacterial motility in response to low pH in Escherichia coli: the role of H-NS protein*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 5): p. 1543-51.
180. Bertin, P., E. Terao, E.H. Lee, P. Lejeune, C. Colson, A. Danchin, and E. Collatz, *The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1994. **176**(17): p. 5537-40.
181. Soutourina, O., A. Kolb, E. Krin, C. Laurent-Winter, S. Rimsky, A. Danchin, and P. Bertin, *Multiple control of flagellum biosynthesis in Escherichia coli: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the flhDC master operon*. J Bacteriol, 1999. **181**(24): p. 7500-8.
182. Vogler, A.P. and J.W. Lengeler, *Indirect role of adenylate cyclase and cyclic AMP in chemotaxis to phosphotransferase system carbohydrates in Escherichia coli K-12*. J Bacteriol, 1987. **169**(2): p. 593-9.
183. Wei, B.L., A.M. Brun-Zinkernagel, J.W. Simecka, B.M. Pruss, P. Babitzke, and T. Romeo, *Positive regulation of motility and flhDC expression by the RNA-binding protein CsrA of Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2001. **40**(1): p. 245-56.
184. Chevance, F.F. and K.T. Hughes, *Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(6): p. 455-65.
185. Ohnishi, K., K. Kutsukake, H. Suzuki, and T. Iino, *Gene fliA encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in Salmonella typhimurium*. Mol Gen Genet, 1990. **221**(2): p. 139-47.
186. Ohnishi, K., K. Kutsukake, H. Suzuki, and T. Iino, *A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of Salmonella typhimurium: an antisigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, sigma F*. Mol Microbiol, 1992. **6**(21): p. 3149-57.

187. Kutsukake, K. and T. Iino, *Role of the FliA-FlgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1994. **176**(12): p. 3598-605.
188. Kutsukake, K., S. Iyoda, K. Ohnishi, and T. Iino, *Genetic and molecular analyses of the interaction between the flagellum-specific sigma and anti-sigma factors in Salmonella typhimurium*. Embo J, 1994. **13**(19): p. 4568-76.
189. Chadsey, M.S., J.E. Karlinsey, and K.T. Hughes, *The flagellar anti-sigma factor FlgM actively dissociates Salmonella typhimurium sigma28 RNA polymerase holoenzyme*. Genes Dev, 1998. **12**(19): p. 3123-36.
190. Hughes, K.T., K.L. Gillen, M.J. Semon, and J.E. Karlinsey, *Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator*. Science, 1993. **262**(5137): p. 1277-80.
191. Aldridge, P.D., J.E. Karlinsey, C. Aldridge, C. Birchall, D. Thompson, J. Yagasaki, and K.T. Hughes, *The flagellar-specific transcription factor, sigma28, is the Type III secretion chaperone for the flagellar-specific anti-sigma28 factor FlgM*. Genes Dev, 2006. **20**(16): p. 2315-26.
192. Aldridge, P., J. Karlinsey, and K.T. Hughes, *The type III secretion chaperone FlgN regulates flagellar assembly via a negative feedback loop containing its chaperone substrates FlgK and FlgL*. Mol Microbiol, 2003. **49**(5): p. 1333-45.
193. Yamamoto, S. and K. Kutsukake, *FliT acts as an anti-FlhD2C2 factor in the transcriptional control of the flagellar regulon in Salmonella enterica serovar typhimurium*. J Bacteriol, 2006. **188**(18): p. 6703-8.
194. Adler, J., *Chemotaxis in bacteria*. Science, 1966. **153**(737): p. 708-16.
195. Adler, J., *Chemoreceptors in bacteria*. Science, 1969. **166**(913): p. 1588-97.
196. Macnab, R.M., *Bacterial flagella rotating in bundles: a study in helical geometry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(1): p. 221-5.
197. Berg, H.C. and D.A. Brown, *Chemotaxis in Escherichia coli analysed by three-dimensional tracking*. Nature, 1972. **239**(5374): p. 500-4.
198. Armitage, J.P. and R. Schmitt, *Bacterial chemotaxis: Rhodobacter sphaeroides and Sinorhizobium meliloti--variations on a theme?* Microbiology, 1997. **143** (Pt 12): p. 3671-82.
199. Wadhams, G.H. and J.P. Armitage, *Making sense of it all: bacterial chemotaxis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(12): p. 1024-37.
200. Falke, J.J. and G.L. Hazelbauer, *Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(4): p. 257-65.
201. West, A.H. and A.M. Stock, *Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(6): p. 369-76.
202. Singh, M., B. Berger, P.S. Kim, J.M. Berger, and A.G. Cochran, *Computational learning reveals coiled coil-like motifs in histidine kinase linker domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 2738-43.
203. Weis, R.M. and D.E. Koshland, Jr., *Reversible receptor methylation is essential for normal chemotaxis of Escherichia coli in gradients of aspartic acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(1): p. 83-7.
204. Kehry, M.R., M.W. Bond, M.W. Hunkapiller, and F.W. Dahlquist, *Enzymatic deamidation of methyl-accepting chemotaxis proteins in Escherichia coli catalyzed by the cheB gene product*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(12): p. 3599-603.
205. Surette, M.G. and J.B. Stock, *Role of alpha-helical coiled-coil interactions in receptor dimerization, signaling, and adaptation during bacterial chemotaxis*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17966-73.
206. Baker, M.D., P.M. Wolanin, and J.B. Stock, *Signal transduction in bacterial chemotaxis*. Bioessays, 2006. **28**(1): p. 9-22.
207. Bibikov, S.I., R. Biran, K.E. Rudd, and J.S. Parkinson, *A signal transducer for aerotaxis in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1997. **179**(12): p. 4075-9.

208. Mowbray, S.L. and M.O. Sandgren, *Chemotaxis receptors: a progress report on structure and function*. J Struct Biol, 1998. **124**(2-3): p. 257-75.
209. Rebbapragada, A., M.S. Johnson, G.P. Harding, A.J. Zuccarelli, H.M. Fletcher, I.B. Zhulin, and B.L. Taylor, *The Aer protein and the serine chemoreceptor Tsr independently sense intracellular energy levels and transduce oxygen, redox, and energy signals for Escherichia coli behavior*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10541-6.
210. Mowbray, S.L. and D.E. Koshland, Jr., *Additive and independent responses in a single receptor: aspartate and maltose stimuli on the tar protein*. Cell, 1987. **50**(2): p. 171-80.
211. Zhulin, I.B., *The superfamily of chemotaxis transducers: from physiology to genomics and back*. Adv Microb Physiol, 2001. **45**: p. 157-98.
212. Yeh, J.I., H.P. Biemann, G.G. Prive, J. Pandit, D.E. Koshland, Jr., and S.H. Kim, *High-resolution structures of the ligand binding domain of the wild-type bacterial aspartate receptor*. J Mol Biol, 1996. **262**(2): p. 186-201.
213. Kim, K.K., H. Yokota, and S.H. Kim, *Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor*. Nature, 1999. **400**(6746): p. 787-92.
214. Ames, P., C.A. Studdert, R.H. Reiser, and J.S. Parkinson, *Collaborative signaling by mixed chemoreceptor teams in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(10): p. 7060-5.
215. Studdert, C.A. and J.S. Parkinson, *Crosslinking snapshots of bacterial chemoreceptor squads*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 2117-22.
216. Maddock, J.R. and L. Shapiro, *Polar location of the chemoreceptor complex in the Escherichia coli cell*. Science, 1993. **259**(5102): p. 1717-23.
217. Weis, R.M., T. Hirai, A. Chalah, M. Kessel, P.J. Peters, and S. Subramaniam, *Electron microscopic analysis of membrane assemblies formed by the bacterial chemotaxis receptor Tsr*. J Bacteriol, 2003. **185**(12): p. 3636-43.
218. Briegel, A., H.J. Ding, Z. Li, J. Werner, Z. Gitai, D.P. Dias, R.B. Jensen, and G.J. Jensen, *Location and architecture of the Caulobacter crescentus chemoreceptor array*. Mol Microbiol, 2008. **69**(1): p. 30-41.
219. Bray, D., M.D. Levin, and C.J. Morton-Firth, *Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity*. Nature, 1998. **393**(6680): p. 85-8.
220. Lamanna, A.C., J.E. Gestwicki, L.E. Strong, S.L. Borchardt, R.M. Owen, and L.L. Kiessling, *Conserved amplification of chemotactic responses through chemoreceptor interactions*. J Bacteriol, 2002. **184**(18): p. 4981-7.
221. Ottemann, K.M., T.E. Thorgeirsson, A.F. Kolodziej, Y.K. Shin, and D.E. Koshland, Jr., *Direct measurement of small ligand-induced conformational changes in the aspartate chemoreceptor using EPR*. Biochemistry, 1998. **37**(20): p. 7062-9.
222. Ottemann, K.M., W. Xiao, Y.K. Shin, and D.E. Koshland, Jr., *A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor*. Science, 1999. **285**(5434): p. 1751-4.
223. Boukhvalova, M., R. VanBruggen, and R.C. Stewart, *CheA kinase and chemoreceptor interaction surfaces on CheW*. J Biol Chem, 2002. **277**(26): p. 23596-603.
224. Varughese, K.I., Madhusudan, X.Z. Zhou, J.M. Whiteley, and J.A. Hoch, *Formation of a novel four-helix bundle and molecular recognition sites by dimerization of a response regulator phosphotransferase*. Mol Cell, 1998. **2**(4): p. 485-93.
225. Surette, M.G., M. Levit, Y. Liu, G. Lukat, E.G. Ninfa, A. Ninfa, and J.B. Stock, *Dimerization is required for the activity of the protein histidine kinase CheA that mediates signal transduction in bacterial chemotaxis*. J Biol Chem, 1996. **271**(2): p. 939-45.
226. Welch, M., N. Chinardet, L. Mourey, C. Birck, and J.P. Samama, *Structure of the CheY-binding domain of histidine kinase CheA in complex with CheY*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(1): p. 25-9.
227. Stewart, R.C., K. Jahreis, and J.S. Parkinson, *Rapid phosphotransfer to CheY from a CheA protein lacking the CheY-binding domain*. Biochemistry, 2000. **39**(43): p. 13157-65.
228. Bilwes, A.M., L.A. Alex, B.R. Crane, and M.I. Simon, *Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase*. Cell, 1999. **96**(1): p. 131-41.

229. Bilwes, A.M., C.M. Quezada, L.R. Croal, B.R. Crane, and M.I. Simon, *Nucleotide binding by the histidine kinase CheA*. *Nat Struct Biol*, 2001. **8**(4): p. 353-60.
230. Levit, M.N., T.W. Grebe, and J.B. Stock, *Organization of the receptor-kinase signaling array that regulates Escherichia coli chemotaxis*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(39): p. 36748-54.
231. Li, M. and G.L. Hazelbauer, *Cellular stoichiometry of the components of the chemotaxis signaling complex*. *J Bacteriol*, 2004. **186**(12): p. 3687-94.
232. Stock, A.M., J.M. Mottonen, J.B. Stock, and C.E. Schutt, *Three-dimensional structure of CheY, the response regulator of bacterial chemotaxis*. *Nature*, 1989. **337**(6209): p. 745-9.
233. Stewart, R.C., *Kinetic characterization of phosphotransfer between CheA and CheY in the bacterial chemotaxis signal transduction pathway*. *Biochemistry*, 1997. **36**(8): p. 2030-40.
234. Bren, A. and M. Eisenbach, *The N terminus of the flagellar switch protein, FliM, is the binding domain for the chemotactic response regulator, CheY*. *J Mol Biol*, 1998. **278**(3): p. 507-14.
235. Dyer, C.M., A.S. Vartanian, H. Zhou, and F.W. Dahlquist, *A molecular mechanism of bacterial flagellar motor switching*. *J Mol Biol*, 2009. **388**(1): p. 71-84.
236. Postma, P.W., J.W. Lengeler, and G.R. Jacobson, *Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria*. *Microbiol Rev*, 1993. **57**(3): p. 543-94.
237. Lux, R., K. Jahreis, K. Bettenbrock, J.S. Parkinson, and J.W. Lengeler, *Coupling the phosphotransferase system and the methyl-accepting chemotaxis protein-dependent chemotaxis signaling pathways of Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(25): p. 11583-7.
238. Lux, R., V.R. Munasinghe, F. Castellano, J.W. Lengeler, J.E. Corrie, and S. Khan, *Elucidation of a PTS-carbohydrate chemotactic signal pathway in Escherichia coli using a time-resolved behavioral assay*. *Mol Biol Cell*, 1999. **10**(4): p. 1133-46.
239. Djordjevic, S. and A.M. Stock, *Crystal structure of the chemotaxis receptor methyltransferase CheR suggests a conserved structural motif for binding S-adenosylmethionine*. *Structure*, 1997. **5**(4): p. 545-58.
240. Li, J., R.V. Swanson, M.I. Simon, and R.M. Weis, *The response regulators CheB and CheY exhibit competitive binding to the kinase CheA*. *Biochemistry*, 1995. **34**(45): p. 14626-36.
241. Djordjevic, S., P.N. Goudreau, Q. Xu, A.M. Stock, and A.H. West, *Structural basis for methylesterase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(4): p. 1381-6.
242. Zhao, R., E.J. Collins, R.B. Bourret, and R.E. Silversmith, *Structure and catalytic mechanism of the E. coli chemotaxis phosphatase CheZ*. *Nat Struct Biol*, 2002. **9**(8): p. 570-5.
243. Blat, Y., B. Gillespie, A. Bren, F.W. Dahlquist, and M. Eisenbach, *Regulation of phosphatase activity in bacterial chemotaxis*. *J Mol Biol*, 1998. **284**(4): p. 1191-9.
244. Cantwell, B.J., R.R. Draheim, R.B. Weart, C. Nguyen, R.C. Stewart, and M.D. Manson, *CheZ phosphatase localizes to chemoreceptor patches via CheA-short*. *J Bacteriol*, 2003. **185**(7): p. 2354-61.
245. Wang, H. and P. Matsumura, *Characterization of the CheAS/CheZ complex: a specific interaction resulting in enhanced dephosphorylating activity on CheY-phosphate*. *Mol Microbiol*, 1996. **19**(4): p. 695-703.
246. Kofoid, E.C. and J.S. Parkinson, *Tandem translation starts in the cheA locus of Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1991. **173**(6): p. 2116-9.
247. Woese, C.R., E. Stackebrandt, W.G. Weisburg, B.J. Paster, M.T. Madigan, V.J. Fowler, C.M. Hahn, P. Blanz, R. Gupta, K.H. Nealson, and G.E. Fox, *The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision*. *Syst Appl Microbiol*, 1984. **5**: p. 315-26.
248. Roh, J.H., W.E. Smith, and S. Kaplan, *Effects of oxygen and light intensity on transcriptome expression in Rhodobacter sphaeroides 2.4.1. Redox active gene expression profile*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(10): p. 9146-55.
249. Joshi, H.M. and F.R. Tabita, *A global two component signal transduction system that integrates the control of photosynthesis, carbon dioxide assimilation, and nitrogen fixation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(25): p. 14515-20.

250. Kiley, P.J. and S. Kaplan, *Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in Rhodobacter sphaeroides*. Microbiol Rev, 1988. **52**(1): p. 50-69.
251. Zeilstra-Ryalls, J.H. and S. Kaplan, *Oxygen intervention in the regulation of gene expression: the photosynthetic bacterial paradigm*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(4): p. 417-36.
252. Mackenzie, C., M. Choudhary, F.W. Larimer, P.F. Predki, S. Stilwagen, J.P. Armitage, R.D. Barber, T.J. Donohue, J.P. Hosler, J.E. Newman, J.P. Shapleigh, R.E. Sockett, J. Zeilstra-Ryalls, and S. Kaplan, *The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of Rhodobacter sphaeroides 2.4.1*. Photosynth Res, 2001. **70**(1): p. 19-41.
253. Cohen-Bazire, G. and J. London, *Basal organelles of bacterial flagella*. J Bacteriol, 1967. **94**(2): p. 458-65.
254. Armitage, J.P. and R.M. Macnab, *Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of Rhodobacter sphaeroides*. J Bacteriol, 1987. **169**(2): p. 514-8.
255. Packer, H.L. and J.P. Armitage, *The unidirectional flagellar motor of Rhodobacter sphaeroides WS8 can rotate either clockwise or counterclockwise: characterization of the flagellum under both conditions by antibody decoration*. J Bacteriol, 1993. **175**(18): p. 6041-5.
256. Armitage, J.P., T.P. Pitta, M.A. Vigeant, H.L. Packer, and R.M. Ford, *Transformations in flagellar structure of Rhodobacter sphaeroides and possible relationship to changes in swimming speed*. J Bacteriol, 1999. **181**(16): p. 4825-33.
257. Ballado, T., A. Campos, L. Camarena, and G. Dreyfus, *Flagellar genes from Rhodobacter sphaeroides are homologous to genes of the fliF operon of Salmonella typhimurium and to the type-III secretion system*. Gene, 1996. **170**(1): p. 69-72.
258. Garcia, N., A. Campos, A. Osorio, S. Poggio, B. Gonzalez-Pedrajo, L. Camarena, and G. Dreyfus, *The flagellar switch genes fliM and fliN of Rhodobacter sphaeroides are contained in a large flagellar gene cluster*. J Bacteriol, 1998. **180**(15): p. 3978-82.
259. Gonzalez-Pedrajo, B., J. de la Mora, T. Ballado, L. Camarena, and G. Dreyfus, *Characterization of the flgG operon of Rhodobacter sphaeroides WS8 and its role in flagellum biosynthesis*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1579**(1): p. 55-63.
260. West, M.A. and G. Dreyfus, *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, 1997. **238**(3): p. 733-7.
261. Kobayashi, K., T. Saitoh, D.S. Shah, K. Ohnishi, I.G. Goodfellow, R.E. Sockett, and S.I. Aizawa, *Purification and characterization of the flagellar basal body of Rhodobacter sphaeroides*. J Bacteriol, 2003. **185**(17): p. 5295-300.
262. Castillo, D.J., T. Ballado, L. Camarena, and G. Dreyfus, *Functional analysis of a large non-conserved region of FlgK (HAP1) from Rhodobacter sphaeroides*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2009. **95**(1): p. 77-90.
263. Ballado, T., L. Camarena, B. González-Pedrajo, E. Silva-Herzog, and G. Dreyfus, *The hook gene (flgE) is expressed from the flgBCDEF operon in Rhodobacter sphaeroides: study of an flgE mutant*. J Bacteriol, 2001. **183**(5): p. 1680-7.
264. Packer, H.L., D.M. Harrison, R.M. Dixon, and J.P. Armitage, *The effect of pH on the growth and motility of Rhodobacter sphaeroides WS8 and the nature of the driving force of the flagellar motor*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1188**(1-2): p. 101-7.
265. Shah, D.S. and R.E. Sockett, *Analysis of the motA flagellar motor gene from Rhodobacter sphaeroides, a bacterium with a unidirectional, stop-start flagellum*. Mol Microbiol, 1995. **17**(5): p. 961-9.
266. Shah, D.S., J.P. Armitage, and R.E. Sockett, *Rhodobacter sphaeroides WS8 expresses a polypeptide that is similar to MotB of Escherichia coli*. J Bacteriol, 1995. **177**(10): p. 2929-32.
267. Asai, Y., I. Kawagishi, R.E. Sockett, and M. Homma, *Hybrid motor with H(+)- and Na(+)-driven components can rotate Vibrio polar flagella by using sodium ions*. J Bacteriol, 1999. **181**(20): p. 6332-8.

268. Morehouse, K.A., I.G. Goodfellow, and R.E. Sockett, *A chimeric N-terminal Escherichia coli--C-terminal Rhodobacter sphaeroides FliG rotor protein supports bidirectional E. coli flagellar rotation and chemotaxis*. J Bacteriol, 2005. **187**(5): p. 1695-701.
269. Choudhary, M., Y.X. Fu, C. Mackenzie, and S. Kaplan, *DNA sequence duplication in Rhodobacter sphaeroides 2.4.1: evidence of an ancient partnership between chromosomes I and II*. J Bacteriol, 2004. **186**(7): p. 2019-27.
270. Poggio, S., C. Abreu-Goodger, S. Fabela, A. Osorio, G. Dreyfus, P. Vinuesa, and L. Camarena, *A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in Rhodobacter sphaeroides*. J Bacteriol, 2007. **189**(8): p. 3208-16.
271. Poggio, S., A. Osorio, G. Dreyfus, and L. Camarena, *The four different sigma(54) factors of Rhodobacter sphaeroides are not functionally interchangeable*. Mol Microbiol, 2002. **46**(1): p. 75-85.
272. Poggio, S., A. Osorio, G. Dreyfus, and L. Camarena, *Transcriptional specificity of RpoN1 and RpoN2 involves differential recognition of the promoter sequences and specific interaction with the cognate activator proteins*. J Biol Chem, 2006. **281**(37): p. 27205-15.
273. Martin, A.C., M. Gould, E. Byles, M.A. Roberts, and J.P. Armitage, *Two chemosensory operons of Rhodobacter sphaeroides are regulated independently by sigma 28 and sigma 54*. J Bacteriol, 2006. **188**(22): p. 7932-40.
274. Poggio, S., A. Osorio, G. Dreyfus, and L. Camarena, *The flagellar hierarchy of Rhodobacter sphaeroides is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins*. Mol Microbiol, 2005. **58**(4): p. 969-83.
275. Buck, M., M.T. Gallegos, D.J. Studholme, Y. Guo, and J.D. Gralla, *The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor*. J Bacteriol, 2000. **182**(15): p. 4129-36.
276. Poggio, S., C. Aguilar, A. Osorio, B. González-Pedrajo, G. Dreyfus, and L. Camarena, *sigma(54) Promoters control expression of genes encoding the hook and basal body complex in Rhodobacter sphaeroides*. J Bacteriol, 2000. **182**(20): p. 5787-92.
277. Clayton, R.K., *Studies in the phototaxis of Rhodospirillum rubrum. III. Quantitative relations between stimulus and response*. Arch Mikrobiol, 1953. **19**(2): p. 141-65.
278. Ingham, C.J. and J.P. Armitage, *Involvement of transport in Rhodobacter sphaeroides chemotaxis*. J Bacteriol, 1987. **169**(12): p. 5801-7.
279. Jeziore-Sassoon, Y., P.A. Hamblin, C.A. Bootle-Wilbraham, P.S. Poole, and J.P. Armitage, *Metabolism is required for chemotaxis to sugars in Rhodobacter sphaeroides*. Microbiology, 1998. **144 (Pt 1)**: p. 229-39.
280. Poole, P.S., M.J. Smith, and J.P. Armitage, *Chemotactic signalling in Rhodobacter sphaeroides requires metabolism of attractants*. J Bacteriol, 1993. **175**(1): p. 291-4.
281. Jacobs, M.H., T. van der Heide, B. Tolner, A.J. Driessen, and W.N. Konings, *Expression of the gltP gene of Escherichia coli in a glutamate transport-deficient mutant of Rhodobacter sphaeroides restores chemotaxis to glutamate*. Mol Microbiol, 1995. **18**(4): p. 641-7.
282. Romagnoli, S., H.L. Packer, and J.P. Armitage, *Tactic responses to oxygen in the phototrophic bacterium Rhodobacter sphaeroides WS8N*. J Bacteriol, 2002. **184**(20): p. 5590-8.
283. Packer, H.L., D.E. Gauden, and J.P. Armitage, *The behavioural response of anaerobic Rhodobacter sphaeroides to temporal stimuli*. Microbiology, 1996. **142 (Pt 3)**(no disponible en pdf buscar en archivos en papel): p. 593-9.
284. Romagnoli, S. and J.P. Armitage, *Roles of chemosensory pathways in transient changes in swimming speed of Rhodobacter sphaeroides induced by changes in photosynthetic electron transport*. J Bacteriol, 1999. **181**(1): p. 34-9.
285. Berry, R.M. and J.P. Armitage, *Response kinetics of tethered Rhodobacter sphaeroides to changes in light intensity*. Biophys J, 2000. **78**(3): p. 1207-15.
286. Kort, R., W. Crielgaard, J.L. Spudich, and K.J. Hellingwerf, *Color-sensitive motility and methanol release responses in Rhodobacter sphaeroides*. J Bacteriol, 2000. **182**(11): p. 3017-21.

287. Packer, H.L. and J.P. Armitage, *The chemokinetic and chemotactic behavior of Rhodobacter sphaeroides: two independent responses*. J Bacteriol, 1994. **176**(1): p. 206-12.
288. Brown, S., P.S. Poole, W. Jeziorska, and J.P. Armitage, *Chemokinesis in Rhodobacter sphaeroides is the result of a long term increase in the rate of flagellar rotation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1993. **1141**(2-3): p. 309-312.
289. Harrison, D.M., H.L. Packer, and J.P. Armitage, *Swimming speed and chemokinetic response of Rhodobacter sphaeroides investigated by natural manipulation of the membrane potential*. FEBS Lett, 1994. **348**(1): p. 37-40.
290. Wadhams, G.H., A.C. Martin, S.L. Porter, J.R. Maddock, J.C. Mantotta, H.M. King, and J.P. Armitage, *TlpC, a novel chemotaxis protein in Rhodobacter sphaeroides, localizes to a discrete region in the cytoplasm*. Mol Microbiol, 2002. **46**(5): p. 1211-21.
291. Wadhams, G.H., A.V. Warren, A.C. Martin, and J.P. Armitage, *Targeting of two signal transduction pathways to different regions of the bacterial cell*. Mol Microbiol, 2003. **50**(3): p. 763-70.
292. Wadhams, G.H., A.C. Martin, and J.P. Armitage, *Identification and localization of a methyl-accepting chemotaxis protein in Rhodobacter sphaeroides*. Mol Microbiol, 2000. **36**(6): p. 1222-33.
293. Hamblin, P.A., B.A. Maguire, R.N. Grishanin, and J.P. Armitage, *Evidence for two chemosensory pathways in Rhodobacter sphaeroides*. Mol Microbiol, 1997. **26**(5): p. 1083-96.
294. Porter, S.L., A.V. Warren, A.C. Martin, and J.P. Armitage, *The third chemotaxis locus of Rhodobacter sphaeroides is essential for chemotaxis*. Mol Microbiol, 2002. **46**(4): p. 1081-94.
295. Porter, S.L. and J.P. Armitage, *Phosphotransfer in Rhodobacter sphaeroides chemotaxis*. J Mol Biol, 2002. **324**(1): p. 35-45.
296. Porter, S.L., M.A. Roberts, C.S. Manning, and J.P. Armitage, *A bifunctional kinase-phosphatase in bacterial chemotaxis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(47): p. 18531-6.
297. Ward, M.J., A.W. Bell, P.A. Hamblin, H.L. Packer, and J.P. Armitage, *Identification of a chemotaxis operon with two cheY genes in Rhodobacter sphaeroides*. Mol Microbiol, 1995. **17**(2): p. 357-66.
298. Shah, D.S., S.L. Porter, A.C. Martin, P.A. Hamblin, and J.P. Armitage, *Fine tuning bacterial chemotaxis: analysis of Rhodobacter sphaeroides behaviour under aerobic and anaerobic conditions by mutation of the major chemotaxis operons and cheY genes*. Embo J, 2000. **19**(17): p. 4601-13.
299. Porter, S.L., G.H. Wadhams, A.C. Martin, E.D. Byles, D.E. Lancaster, and J.P. Armitage, *The CheYs of Rhodobacter sphaeroides*. J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32694-704.
300. Ferre, A., J. De La Mora, T. Ballado, L. Camarena, and G. Dreyfus, *Biochemical study of multiple CheY response regulators of the chemotactic pathway of Rhodobacter sphaeroides*. J Bacteriol, 2004. **186**(15): p. 5172-7.
301. del Campo, A.M., T. Ballado, J. de la Mora, S. Poggio, L. Camarena, and G. Dreyfus, *Chemotactic control of the two flagellar systems of Rhodobacter sphaeroides is mediated by different sets of CheY and Flim proteins*. J Bacteriol, 2007. **189**(22): p. 8397-401.
302. Salton, M.R., *The relationship between the nature of the cell wall and the Gram stain*. J Gen Microbiol, 1963. **30**: p. 223-35.
303. Rogers, H.J., H.R. Perkins, and J.B. Ward, *Microbial Cell Walls and membranes*. 1980, London, United Kingdom: Champman and Hall, Ltd.
304. Schleifer, K.H. and O. Kandler, *Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications*. Bacteriol Rev, 1972. **36**(4): p. 407-77.
305. Chopra, I., C. Storey, T.J. Falla, and J.H. Pearce, *Antibiotics, peptidoglycan synthesis and genomics: the chlamydial anomaly revisited*. Microbiology, 1998. **144** (Pt 10): p. 2673-8.
306. Hartmann, E. and H. König, *Comparison of the biosynthesis of the methanobacterial pseudomurein and the eubacterial murein*. Naturwissenschaften, 1990. **77**(10): p. 472-5.
307. Aitken, A. and R.Y. Stainer, *Characterization of Peptidoglycan from the Cyanelles of Cyanophora paradoxa*. J Gen Microbiol, 1979. **112**(2): p. 219-223.

308. Machida, M., K. Takechi, H. Sato, S.J. Chung, H. Kuroiwa, S. Takio, M. Seki, K. Shinozaki, T. Fujita, M. Hasebe, and H. Takano, *Genes for the peptidoglycan synthesis pathway are essential for chloroplast division in moss*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(17): p. 6753-8.
309. Beveridge, T.J., *Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles*. J Bacteriol, 1999. **181**(16): p. 4725-33.
310. Koch, A.L., *Bacterial wall as target for attack: past, present, and future research*. Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(4): p. 673-87.
311. Harz, H., K. Burgdorf, and J.V. Holtje, *Isolation and separation of the glycan strands from murein of Escherichia coli by reversed-phase high-performance liquid chromatography*. Anal Biochem, 1990. **190**(1): p. 120-8.
312. Ishidate, K., A. Ursinus, J.V. Holtje, and L. Rothfield, *Analysis of the length distribution of murein glycan strands in ftsZ and ftsI mutants of E. coli*. FEMS Microbiol Lett, 1998. **168**(1): p. 71-5.
313. Holtje, J.V., D. Mirelman, N. Sharon, and U. Schwarz, *Novel type of murein transglycosylase in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1975. **124**(3): p. 1067-76.
314. Vollmer, W., D. Blanot, and M.A. de Pedro, *Peptidoglycan structure and architecture*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(2): p. 149-67.
315. Liger, D., A. Masson, D. Blanot, J. van Heijenoort, and C. Parquet, *Over-production, purification and properties of the uridine-diphosphate-N-acetylmuramate:L-alanine ligase from Escherichia coli*. Eur J Biochem, 1995. **230**(1): p. 80-7.
316. Pratviel-Sosa, F., D. Mengin-Lecreulx, and J. van Heijenoort, *Over-production, purification and properties of the uridine diphosphate N-acetylmuramoyl-L-alanine:D-glutamate ligase from Escherichia coli*. Eur J Biochem, 1991. **202**(3): p. 1169-76.
317. Michaud, C., D. Mengin-Lecreulx, J. van Heijenoort, and D. Blanot, *Over-production, purification and properties of the uridine-diphosphate-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate: meso-2,6-diaminopimelate ligase from Escherichia coli*. Eur J Biochem, 1990. **194**(3): p. 853-61.
318. Duncan, K., J. van Heijenoort, and C.T. Walsh, *Purification and characterization of the D-alanyl-D-alanine-adding enzyme from Escherichia coli*. Biochemistry, 1990. **29**(9): p. 2379-86.
319. Labischinski, H., G. Barnickel, D. Naumann, and P. Keller, *Conformational and topological aspects of the three-dimensional architecture of bacterial peptidoglycan*. Ann Inst Pasteur Microbiol, 1985. **136A**(1): p. 45-50.
320. Meroueh, S.O., K.Z. Bencze, D. Heseck, M. Lee, J.F. Fisher, T.L. Stemmler, and S. Mobashery, *Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(12): p. 4404-9.
321. Glauner, B., J.V. Holtje, and U. Schwarz, *The composition of the murein of Escherichia coli*. J Biol Chem, 1988. **263**(21): p. 10088-95.
322. Snowden, M.A. and H.R. Perkins, *Peptidoglycan cross-linking in Staphylococcus aureus. An apparent random polymerisation process*. Eur J Biochem, 1990. **191**(2): p. 373-7.
323. Cloud-Hansen, K.A., S.B. Peterson, E.V. Stabb, W.E. Goldman, M.J. McFall-Ngai, and J. Handelsman, *Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interactions*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(9): p. 710-6.
324. Beveridge, T., *Bacterial Cell Wall*, in *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*. 2001, Jonh Wiley and Sons: United Kingdom. p. 2-7.
325. Koch, A.L., *The biophysics of the gram-negative periplasmic space*. Crit Rev Microbiol, 1998. **24**(1): p. 23-59.
326. Yao, X., M. Jericho, D. Pink, and T. Beveridge, *Thickness and elasticity of gram-negative murein sacculi measured by atomic force microscopy*. J Bacteriol, 1999. **181**(22): p. 6865-75.
327. Gan, L., S. Chen, and G.J. Jensen, *Molecular organization of Gram-negative peptidoglycan*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(48): p. 18953-7.

328. Matias, V.R. and T.J. Beveridge, *Cryo-electron microscopy reveals native polymeric cell wall structure in Bacillus subtilis 168 and the existence of a periplasmic space*. Mol Microbiol, 2005. **56**(1): p. 240-51.
329. Matias, V.R. and T.J. Beveridge, *Native cell wall organization shown by cryo-electron microscopy confirms the existence of a periplasmic space in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2006. **188**(3): p. 1011-21.
330. Labischinski, H., E.W. Goodell, A. Goodell, and M.L. Hochberg, *Direct proof of a "more-than-single-layered" peptidoglycan architecture of Escherichia coli W7: a neutron small-angle scattering study*. J Bacteriol, 1991. **173**(2): p. 751-6.
331. Koch, A.L. and S. Woeste, *Elasticity of the sacculus of Escherichia coli*. J Bacteriol, 1992. **174**(14): p. 4811-9.
332. Demchick, P. and A.L. Koch, *The permeability of the wall fabric of Escherichia coli and Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1996. **178**(3): p. 768-73.
333. Pink, D., J. Moeller, B. Quinn, M. Jericho, and T. Beveridge, *On the architecture of the gram-negative bacterial murein sacculus*. J Bacteriol, 2000. **182**(20): p. 5925-30.
334. Vazquez-Laslop, N., H. Lee, R. Hu, and A.A. Neyfakh, *Molecular sieve mechanism of selective release of cytoplasmic proteins by osmotically shocked Escherichia coli*. J Bacteriol, 2001. **183**(8): p. 2399-404.
335. Huang, K.C., R. Mukhopadhyay, B. Wen, Z. Gitai, and N.S. Wingreen, *Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(49): p. 19282-7.
336. Vollmer, W. and J.V. Holtje, *The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)?* J Bacteriol, 2004. **186**(18): p. 5978-87.
337. Holtje, J.V., *Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(1): p. 181-203.
338. Barreteau, H., A. Kovac, A. Boniface, M. Sova, S. Gobec, and D. Blanot, *Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(2): p. 168-207.
339. Bouhss, A., A.E. Trunkfield, T.D. Bugg, and D. Mengin-Lecreulx, *The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(2): p. 208-33.
340. Scheffers, D.J. and M.G. Pinho, *Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies*. Microbiol Mol Biol Rev, 2005. **69**(4): p. 585-607.
341. Lovering, A.L., L.H. de Castro, D. Lim, and N.C. Strynadka, *Structural insight into the transglycosylation step of bacterial cell-wall biosynthesis*. Science, 2007. **315**(5817): p. 1402-5.
342. Sauvage, E., F. Kerff, M. Terrak, J.A. Ayala, and P. Charlier, *The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(2): p. 234-58.
343. Goodell, E.W., *Recycling of murein by Escherichia coli*. J Bacteriol, 1985. **163**(1): p. 305-10.
344. Vollmer, W. and U. Bertsche, *Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(9): p. 1714-34.
345. Shockman, G.D., L. Daneo-Moore, R. Kariyama, and O. Massidda, *Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins, and autolysis*. Microb Drug Resist, 1996. **2**(1): p. 95-8.
346. Vollmer, W., B. Joris, P. Charlier, and S. Foster, *Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(2): p. 259-86.
347. Holtje, J.V., *From growth to autolysis: the murein hydrolases in Escherichia coli*. Arch Microbiol, 1995. **164**(4): p. 243-54.
348. Karamanos, Y., *Endo-N-acetyl-beta-D-glucosaminidases and their potential substrates: structure/function relationships*. Res Microbiol, 1997. **148**(8): p. 661-71.
349. Priyadarshini, R., M.A. de Pedro, and K.D. Young, *Role of peptidoglycan amidases in the development and morphology of the division septum in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2007. **189**(14): p. 5334-47.
350. Smith, T.J., S.A. Blackman, and S.J. Foster, *Autolysins of Bacillus subtilis: multiple enzymes with multiple functions*. Microbiology, 2000. **146** (Pt 2): p. 249-62.
351. Koraimann, G., *Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(11): p. 2371-88.

352. Mukamolova, G.V., A.G. Murzin, E.G. Salina, G.R. Demina, D.B. Kell, A.S. Kaprelyants, and M. Young, *Muralytic activity of Micrococcus luteus Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation*. Mol Microbiol, 2006. **59**(1): p. 84-98.
353. Holtje, J.V., *Bacterial lysozymes*. Exs, 1996. **75**: p. 65-74.
354. Holtje, J.V., *Lytic transglycosylases*. Exs, 1996. **75**: p. 425-9.
355. Thunnissen, A.M., H.J. Rozeboom, K.H. Kalk, and B.W. Dijkstra, *Structure of the 70-kDa soluble lytic transglycosylase complexed with bulgecin A. Implications for the enzymatic mechanism*. Biochemistry, 1995. **34**(39): p. 12729-37.
356. van Asselt, E.J., K.H. Kalk, and B.W. Dijkstra, *Crystallographic studies of the interactions of Escherichia coli lytic transglycosylase Slt35 with peptidoglycan*. Biochemistry, 2000. **39**(8): p. 1924-34.
357. Blackburn, N.T. and A.J. Clarke, *Characterization of soluble and membrane-bound family 3 lytic transglycosylases from Pseudomonas aeruginosa*. Biochemistry, 2002. **41**(3): p. 1001-13.
358. Blackburn, N.T. and A.J. Clarke, *Identification of four families of peptidoglycan lytic transglycosylases*. J Mol Evol, 2001. **52**(1): p. 78-84.
359. Fokine, A., K.A. Miroshnikov, M.M. Shneider, V.V. Mesyanzhinov, and M.G. Rossmann, *Structure of the bacteriophage phi KZ lytic transglycosylase gp144*. J Biol Chem, 2008. **283**(11): p. 7242-50.
360. Koonin, E.V. and K.E. Rudd, *A conserved domain in putative bacterial and bacteriophage transglycosylases*. Trends Biochem Sci, 1994. **19**(3): p. 106-7.
361. Finn, R.D., J. Tate, J. Mistry, P.C. Coghill, S.J. Sammut, H.R. Hotz, G. Ceric, K. Forslund, S.R. Eddy, E.L. Sonnhammer, and A. Bateman, *The Pfam protein families database*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D281-8.
362. Engel, H., B. Kazemier, and W. Keck, *Murein-metabolizing enzymes from Escherichia coli: sequence analysis and controlled overexpression of the slt gene, which encodes the soluble lytic transglycosylase*. J Bacteriol, 1991. **173**(21): p. 6773-82.
363. Ursinus, A. and J.V. Holtje, *Purification and properties of a membrane-bound lytic transglycosylase from Escherichia coli*. J Bacteriol, 1994. **176**(2): p. 338-43.
364. Engel, H., A.J. Smink, L. van Wijngaarden, and W. Keck, *Murein-metabolizing enzymes from Escherichia coli: existence of a second lytic transglycosylase*. J Bacteriol, 1992. **174**(20): p. 6394-403.
365. Dijkstra, A.J. and W. Keck, *Identification of new members of the lytic transglycosylase family in Haemophilus influenzae and Escherichia coli*. Microb Drug Resist, 1996. **2**(1): p. 141-5.
366. Bateman, A. and M. Bycroft, *The structure of a LysM domain from E. coli membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD)*. J Mol Biol, 2000. **299**(4): p. 1113-9.
367. Scheurwater, E.M. and A.J. Clarke, *The C-terminal domain of Escherichia coli YfhD functions as a lytic transglycosylase*. J Biol Chem, 2008. **283**(13): p. 8363-73.
368. Kraft, A.R., M.F. Templin, and J.V. Holtje, *Membrane-bound lytic endotransglycosylase in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1998. **180**(13): p. 3441-7.
369. Ehlert, K., J.V. Holtje, and M.F. Templin, *Cloning and expression of a murein hydrolase lipoprotein from Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1995. **16**(4): p. 761-8.
370. Thunnissen, A.M., A.J. Dijkstra, K.H. Kalk, H.J. Rozeboom, H. Engel, W. Keck, and B.W. Dijkstra, *Doughnut-shaped structure of a bacterial muramidase revealed by X-ray crystallography*. Nature, 1994. **367**(6465): p. 750-3.
371. Blake, C.C., D.F. Koenig, G.A. Mair, A.C. North, D.C. Phillips, and V.R. Sarma, *Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution*. Nature, 1965. **206**(986): p. 757-61.
372. Thunnissen, A.M., N.W. Isaacs, and B.W. Dijkstra, *The catalytic domain of a bacterial lytic transglycosylase defines a novel class of lysozymes*. Proteins, 1995. **22**(3): p. 245-58.
373. Heidrich, C., A. Ursinus, J. Berger, H. Schwarz, and J.V. Holtje, *Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2002. **184**(22): p. 6093-9.

374. Goldman, W.E., D.G. Klapper, and J.B. Baseman, *Detection, isolation, and analysis of a released Bordetella pertussis product toxic to cultured tracheal cells*. Infect Immun, 1982. **36**(2): p. 782-94.
375. Cloud, K.A. and J.P. Dillard, *A lytic transglycosylase of Neisseria gonorrhoeae is involved in peptidoglycan-derived cytotoxin production*. Infect Immun, 2002. **70**(6): p. 2752-7.
376. Viala, J., C. Chaput, I.G. Boneca, A. Cardona, S.E. Girardin, A.P. Moran, R. Athman, S. Memet, M.R. Huerre, A.J. Coyle, P.S. DiStefano, P.J. Sansonetti, A. Labigne, J. Bertin, D.J. Philpott, and R.L. Ferrero, *Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island*. Nat Immunol, 2004. **5**(11): p. 1166-74.
377. Koropatnick, T.A., J.T. Engle, M.A. Apicella, E.V. Stabb, W.E. Goldman, and M.J. McFall-Ngai, *Microbial factor-mediated development in a host-bacterial mutualism*. Science, 2004. **306**(5699): p. 1186-8.
378. Soutourina, O.A. and P.N. Bertin, *Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria*. FEMS Microbiol Rev, 2003. **27**(4): p. 505-23.
379. Fein, J.E., *Possible involvement of bacterial autolytic enzymes in flagellar morphogenesis*. J Bacteriol, 1979. **137**(2): p. 933-46.
380. Ayusawa, D., Y. Yoneda, K. Yamane, and B. Maruo, *Pleiotropic phenomena in autolytic enzyme(s) content, flagellation, and simultaneous hyperproduction of extracellular alpha-amylase and protease in a Bacillus subtilis mutant*. J Bacteriol, 1975. **124**(1): p. 459-69.
381. Fein, J.E. and H.J. Rogers, *Autolytic enzyme-deficient mutants of Bacillus subtilis 168*. J Bacteriol, 1976. **127**(3): p. 1427-42.
382. Pooley, H.M. and D. Karamata, *Genetic analysis of autolysin-deficient and flagellaless mutants of Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1984. **160**(3): p. 1123-9.
383. Blackman, S.A., T.J. Smith, and S.J. Foster, *The role of autolysins during vegetative growth of Bacillus subtilis 168*. Microbiology, 1998. **144** (Pt 1): p. 73-82.
384. Rashid, M.H., M. Mori, and J. Sekiguchi, *Glucosaminidase of Bacillus subtilis: cloning, regulation, primary structure and biochemical characterization*. Microbiology, 1995. **141** (Pt 10): p. 2391-404.
385. Dijkstra, A.J. and W. Keck, *Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport*. J Bacteriol, 1996. **178**(19): p. 5555-62.
386. Sosinsky, G.E., N.R. Francis, M.J. Stallmeyer, and D.J. DeRosier, *Substructure of the flagellar basal body of Salmonella typhimurium*. J Mol Biol, 1992. **223**(1): p. 171-84.
387. Ausubel, F.M., R. Brent, E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and Struhl, *Current protocol in molecular biology*. 1987.
388. Simon, R., U. Priefer, and A. Puhler, *A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria*. Bio/technology, 1983. **1**: p. 37-45.
389. Sockett, R.E., J. C. A. Foster, and J. P. Armitage., *Molecular biology of Rhodospirillum rubrum flagellum*. FEMS Symp, 1990. **53**: p. 473-479.
390. Quandt, J. and M.F. Hynes, *Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria*. Gene, 1993. **127**(1): p. 15-21.
391. Keen, N.T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger, *Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria*. Gene, 1988. **70**(1): p. 191-7.
392. Metcalf, W.W. and B.L. Wanner, *Construction of new beta-glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement*. Gene, 1993. **129**(1): p. 17-25.
393. Siström, W.R., *The kinetics of the synthesis of photopigments in Rhodospirillum rubrum*. J Gen Microbiol, 1962. **28**: p. 607-16.
394. Davis, J., T.J. Donohue, and S. Kaplan, *Construction, characterization, and complementation of a Puf- mutant of Rhodospirillum rubrum*. J Bacteriol, 1988. **170**(1): p. 320-9.
395. Peterson, G.L., *A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable*. Anal Biochem, 1977. **83**(2): p. 346-56.

396. Wessel, D. and U.I. Flugge, *A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids*. Anal Biochem, 1984. **138**(1): p. 141-3.
397. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
398. Oliver, D., *Protein secretion in Escherichia coli*. Annu Rev Microbiol, 1985. **39**: p. 615-48.
399. Harlow E., a.D.L., ed. *Antibodies A laboratory Manual*. ed. USA. 1988, Cold Spring Harbor Laboratory: USA.
400. Wayne J. Becketl and Walter A. Basse, *A lysoplate assay for escherichia coli Cell Wall-Active Enzymes*. Anal Biochem, 1985. **150**: p. 258-263.
401. Hash, J.H., *Measurement of bacteriolytic enzymes*. J Bacteriol, 1967. **93**(3): p. 1201-2.
402. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
403. Golemis, E., *Protein-Protein Interactions. A Molecular Cloning manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2002, New York, US: Inglis John. 673.
404. Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman, *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(17): p. 3389-402.
405. Ciria, R., C. Abreu-Goodger, E. Morett, and E. Merino, *GeConT: gene context analysis*. Bioinformatics, 2004. **20**(14): p. 2307-8.
406. Devereux, J., P. Haeblerli, and O. Smithies, *A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX*. Nucleic Acids Res, 1984. **12**(1 Pt 1): p. 387-95.
407. Edgar, R.C., *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(5): p. 1792-7.
408. McGuffin, L.J., K. Bryson, and D.T. Jones, *The PSIPRED protein structure prediction server*. Bioinformatics, 2000. **16**(4): p. 404-5.
409. Bendtsen, J.D., H. Nielsen, G. von Heijne, and S. Brunak, *Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0*. J Mol Biol, 2004. **340**(4): p. 783-95.
410. Cantarel, B.L., P.M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, and B. Henrissat, *The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D233-8.
411. Shine, J. and L. Dalgarno, *The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(4): p. 1342-6.
412. Pugsley, A.P., *The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria*. Microbiol Rev, 1993. **57**(1): p. 50-108.
413. Schuster-Bockler, B., J. Schultz, and S. Rahmann, *HMM Logos for visualization of protein families*. BMC Bioinformatics, 2004. **5**: p. 7.
414. Mushegian, A.R., K.J. Fullner, E.V. Koonin, and E.W. Nester, *A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(14): p. 7321-6.
415. Bayer, M., R. Eferl, G. Zellnig, K. Teferle, A. Dijkstra, G. Koraimann, and G. Hogenauer, *Gene 19 of plasmid R1 is required for both efficient conjugative DNA transfer and bacteriophage R17 infection*. J Bacteriol, 1995. **177**(15): p. 4279-88.
416. Zahrl, D., M. Wagner, K. Bischof, M. Bayer, B. Zavec, A. Beranek, C. Ruckenstuhl, G.E. Zarfel, and G. Koraimann, *Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 11): p. 3455-67.
417. Kohler, P.L., H.L. Hamilton, K. Cloud-Hansen, and J.P. Dillard, *AtIA functions as a peptidoglycan lytic transglycosylase in the Neisseria gonorrhoeae type IV secretion system*. J Bacteriol, 2007. **189**(15): p. 5421-8.

418. Juncker, A.S., H. Willenbrock, G. Von Heijne, S. Brunak, H. Nielsen, and A. Krogh, *Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria*. Protein Sci, 2003. **12**(8): p. 1652-62.
419. Khambaty, F.M. and B. Ely, *Molecular genetics of the flgI region and its role in flagellum biosynthesis in Caulobacter crescentus*. J Bacteriol, 1992. **174**(12): p. 4101-9.
420. Viollier, P.H. and L. Shapiro, *A lytic transglycosylase homologue, PleA, is required for the assembly of pili and the flagellum at the Caulobacter crescentus cell pole*. Mol Microbiol, 2003. **49**(2): p. 331-45.
421. van Asselt, E.J., A.M. Thunnissen, and B.W. Dijkstra, *High resolution crystal structures of the Escherichia coli lytic transglycosylase Slt70 and its complex with a peptidoglycan fragment*. J Mol Biol, 1999. **291**(4): p. 877-98.
422. Bayer, M., R. Iberer, K. Bischof, E. Rassi, E. Stabentheiner, G. Zellnig, and G. Koraimann, *Functional and mutational analysis of p19, a DNA transfer protein with muramidase activity*. J Bacteriol, 2001. **183**(10): p. 3176-83.
423. Lehnherr, H., A.M. Hansen, and T. Ilyina, *Penetration of the bacterial cell wall: a family of lytic transglycosylases in bacteriophages and conjugative plasmids*. Mol Microbiol, 1998. **30**(2): p. 454-7.
424. Winans, S.C. and G.C. Walker, *Conjugal transfer system of the IncN plasmid pKM101*. J Bacteriol, 1985. **161**(1): p. 402-10.
425. Hoppner, C., Z. Liu, N. Domke, A.N. Binns, and C. Baron, *VirB1 orthologs from Brucella suis and pKM101 complement defects of the lytic transglycosylase required for efficient type IV secretion from Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol, 2004. **186**(5): p. 1415-22.
426. Joris, B., S. Englebert, C.P. Chu, R. Kariyama, L. Daneo-Moore, G.D. Shockman, and J.M. Ghuyssen, *Modular design of the Enterococcus hirae muramidase-2 and Streptococcus faecalis autolysin*. FEMS Microbiol Lett, 1992. **70**(3): p. 257-64.
427. Buist, G., J. Kok, K.J. Leenhouts, M. Dabrowska, G. Venema, and A.J. Haandrikman, *Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of Lactococcus lactis, a muramidase needed for cell separation*. J Bacteriol, 1995. **177**(6): p. 1554-63.
428. Eckert, C., S. Magnet, and S. Mesnage, *The Enterococcus hirae Mur-2 enzyme displays N-acetylglucosaminidase activity*. FEBS Lett, 2007. **581**(4): p. 693-6.
429. Steen, A., G. Buist, G.J. Horsburgh, G. Venema, O.P. Kuipers, S.J. Foster, and J. Kok, *AcmA of Lactococcus lactis is an N-acetylglucosaminidase with an optimal number of LysM domains for proper functioning*. Febs J, 2005. **272**(11): p. 2854-68.
430. Chipman, D.M. and N. Sharon, *Mechanism of lysozyme action*. Science, 1969. **165**(892): p. 454-65.
431. Ren, C.P., S.A. Beatson, J. Parkhill, and M.J. Pallen, *The Flag-2 locus, an ancestral gene cluster, is potentially associated with a novel flagellar system from Escherichia coli*. J Bacteriol, 2005. **187**(4): p. 1430-40.
432. McCarter, L.L., *Dual flagellar systems enable motility under different circumstances*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2004. **7**(1-2): p. 18-29.
433. Skerker, J.M. and M.T. Laub, *Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in Caulobacter crescentus*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(4): p. 325-37.
434. Barrios, H., B. Valderrama, and E. Morett, *Compilation and analysis of sigma(54)-dependent promoter sequences*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(22): p. 4305-13.
435. Studholme, D.J. and R. Dixon, *Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators*. J Bacteriol, 2003. **185**(6): p. 1757-67.
436. Pena-Sanchez, J., S. Poggio, U. Flores-Perez, A. Osorio, C. Domenzain, G. Dreyfus, and L. Camarena, *Identification of the binding site of the {sigma}54 hetero-oligomeric FleQ/FleT activator in the flagellar promoters of Rhodobacter sphaeroides*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 5): p. 1669-79.

437. Kohler, P.L., K.A. Cloud, K.T. Hackett, E.T. Beck, and J.P. Dillard, *Characterization of the role of LtgB, a putative lytic transglycosylase in Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiology*, 2005. **151**(Pt 9): p. 3081-8.
438. Scheurwater, E., C.W. Reid, and A.J. Clarke, *Lytic transglycosylases: bacterial space-making autolysins*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. **40**(4): p. 586-91.
439. Wilks, J.C. and J.L. Slonczewski, *pH of the cytoplasm and periplasm of Escherichia coli: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry*. *J Bacteriol*, 2007. **189**(15): p. 5601-7.
440. Nikaido, H., *Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003. **67**(4): p. 593-656.
441. Johnson, W.C., Jr., *Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide*. *Proteins*, 1990. **7**(3): p. 205-14.
442. Maxwell, K.L., D. Bona, C. Liu, C.H. Arrowsmith, and A.M. Edwards, *Refolding out of guanidine hydrochloride is an effective approach for high-throughput structural studies of small proteins*. *Protein Sci*, 2003. **12**(9): p. 2073-80.
443. Zupan, J., C.A. Hackworth, J. Aguilar, D. Ward, and P. Zambryski, *VirB1* promotes T-pilus formation in the vir-Type IV secretion system of Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 2007. **189**(18): p. 6551-63.
444. Davies, G. and B. Henrissat, *Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases*. *Structure*, 1995. **3**(9): p. 853-9.
445. Hoppner, C., A. Carle, D. Sivanesan, S. Hoepfner, and C. Baron, *The putative lytic transglycosylase VirB1 from Brucella suis interacts with the type IV secretion system core components VirB8, VirB9 and VirB11*. *Microbiology*, 2005. **151**(Pt 11): p. 3469-82.
446. Christie, P.J., K. Atmakuri, V. Krishnamoorthy, S. Jakubowski, and E. Cascales, *Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems*. *Annu Rev Microbiol*, 2005. **59**: p. 451-85.

The Flagellar Muramidase from the Photosynthetic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides*[∇]

Javier de la Mora,¹ Teresa Ballado,¹ Bertha González-Pedrajo,¹
Laura Camarena,² and Georges Dreyfus^{1*}

*Instituto de Fisiología Celular¹ and Instituto de Investigaciones Biomédicas,² Universidad Nacional
Autónoma de México, México DF 04510, México*

Received 6 July 2007/Accepted 5 September 2007

We have characterized open reading frame RSP0072, which is located within the *flgG* operon in *Rhodobacter sphaeroides*. The amino acid sequence analysis of this gene product showed the presence of a soluble lytic transglycosylase domain. The deletion of the N-terminal region (90 amino acids) of the product of RSP0072 yields a leaky nonmotile phenotype, as determined by swarm assays in soft agar. Electron micrographs revealed the lack of flagella in mutant cells. The purified wild-type protein showed lytic activity on extracts of *Micrococcus luteus*. In contrast, no lytic activity was observed when the residues E57 or E83 were replaced by alanine. Affinity blotting suggests that the protein encoded by RSP0072 interacts with the flagellar rod-scaffolding protein FlgJ, which lacks the muramidase domain present in FlgJ of many bacteria. We propose that the product of RSP0072 is a flagellar muramidase that is exported to the periplasm via the Sec pathway, where it interacts with FlgJ to open a gap in the peptidoglycan layer for the subsequent penetration of the nascent flagellar structure.

Bacteria swim by means of flagella, which are locomotive chemiosmotic nanomachines that are widely distributed among this kingdom. This structure utilizes the energy from the electrochemical gradient to generate torque and propel the cell through its environment. The bacterial flagellum consists of at least three substructures: a basal body, a hook, and a filament. The biogenesis of this organelle is a tightly regulated process and requires the expression of more than 50 genes in a strict hierarchical manner (1, 8, 31). It extends from the cytoplasm to the cell exterior and assembly proceeds outwardly in an orchestrated manner from proximal structures to more distal ones. It uses the Sec pathway for the integral membrane components and a few other components. At a certain point in the assembly process the peptidoglycan layer must be penetrated by the rod, which is apparently thicker (ca. 11 nm) than the peptidoglycan mesh diameter (ca. 4 to 8 nm) (11, 21, 49, 50). Although the chemical composition of the peptidoglycan polymer might vary between different bacteria, the basic architecture is conserved. Fein (15) was the first to propose the necessity for the localized breakdown of peptidoglycan in order to incorporate the flagellum into the cell wall (12, 26). It has been shown that defects in FlgJ in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium arrest the flagellar structure at the MS ring level (27). Within the C-terminal region, *Salmonella* FlgJ shows homology to the catalytic domains of various muramidases, which suggests a role in the degradation of the rigid peptidoglycan layer. It has also been shown that in *Salmonella enterica* FlgJ is exported into the periplasm via the flagellar export system and also that it displays peptidoglycan-hydrolyz-

ing activity, which is essential for the formation of the flagellum (32). Recently, Viollier and Shapiro (54) reported that PleA is a lytic transglycosylase that is required for the assembly of pili and the flagella of *Caulobacter crescentus*.

However, muramidase activity is not absolutely required. Mutations in catalytically relevant residues result in poor flagellation and swarming ability, perhaps because the rod has a low probability of penetrating gaps generated during peptidoglycan biogenesis (38) and also perhaps due to the elastic properties and conformational freedom of the peptide cross-link that can be stretched up to fourfold (28).

The rod is composed by four proteins: FlgB, FlgC, FlgF, and FlgG (23). In addition to these structural components, several more proteins are required for rod assembly (27). Among these, FlgJ protein from *S. enterica* has been postulated to be a dual-function protein: the N-terminal half could function as a scaffold or cap essential for rod assembly, and the C-terminal half may function as a muramidase that degrades the peptidoglycan layer to facilitate rod penetration (20).

We have previously reported that the FlgJ protein of *Rhodobacter sphaeroides* lacks the C-terminal muramidase domain and that mutations in this protein yield a Fla⁻ phenotype (16). The absence of the muramidase domain in this protein suggests that another polypeptide must accomplish this function. More recently, Pallen et al. have also reported the absence of a muramidase domain in FlgJ of another set of bacteria (40). In the present study we describe the characterization of the protein encoded by the gene RSP0072 that belongs to the flagellar *flgG* operon and contains a putative muramidase domain.

MATERIALS AND METHODS

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

Media and growth conditions. *R. sphaeroides* cell cultures were grown in liquid Siström's culture medium (46) at 30°C under constant illumination in completely

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-243 Cd. Universitaria, México DF 04510, México. Phone: (5255) 5622-5618. Fax: (5255) 5622-5611. E-mail: gdreyfus@ifc.unam.mx.

[∇] Published ahead of print on 14 September 2007.

TABLE 1. Bacterial strains, plasmids, and oligonucleotides

Strain, plasmid, or oligonucleotide	Relevant characteristics or sequence ^a	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
JM103	<i>hsdR4</i> Δ(<i>lac-pro</i>) F' <i>traD36 proAB lacI</i> ^q ΔM15	3
M15[pREP4]	Lac ⁻ Ara ⁻ Gal ⁻ Mfl ⁻ F' RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺	QIAGEN
BL21DE3pLysS	F' <i>ompT hsdSB</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)pLysS	Novagen
S17-1	<i>recA endA thi hsdR</i> RP4-2-Tc::Mu::Tn7; Tp ^r Sm ^r	45
<i>R. sphaeroides</i>		
WS8-N	Wild type; spontaneous Nal ^r	47
SltF1	WS8 <i>sltF</i> Δ1:: <i>aadA</i> derivative; Fla ⁻ Spc ^r	This study
Plasmids		
pQE30	Expression vector; Ap ^r N-terminal His ₆ tag	QIAGEN
pQE60	Expression vector; Ap ^r C-terminal His ₆ tag	QIAGEN
pRSJ	<i>flgJ</i> cloned into the NcoI/BglII sites of pQE60 sites	This study
pRS0072	RSP0072 cloned into NcoI/BamHI sites of pQE30 sites	This study
pRS0072E57A	RSP0072 E57A cloned into pQE30	This study
pRS0072E83A	RSP0072 E83A cloned into pQE30	This study
pJQ200mp18	Suicide vector used for gene replacement	42
pTZ19R	Cloning vector, pUC derivative, Ap ^r	Pharmacia
pRK415	pRK404 derivative; used for expression in <i>R. sphaeroides</i>	24
pWM5	pUC derivative carrying the omega-Spc ^r cassette	34
pBG313	3.8-kb BamHI fragment carrying RSP0072 from WS8-N	
	Cloned into pTZ19R	16
pRKsltF	1.4-kb PstI/PstI fragment from pBG313 subcloned into pRK415 carrying <i>sltF</i> (RSP0072); Tc ^r	This study
Oligonucleotides		
F1	5'-CTGATCTAGACCCTCCGGCCCCGGCCACGGTG-3'	This study
R2	5'-CCGGAATTCGACGAGCGCGAACCTCATGCC-3'	This study
F3	5'-CGGGAATTCCTCAACTGGCGCTGGCATGCG-3'	This study
R4	5'-CTGATCTAGAGGGGTCACGCCCGAGAGACAG-3'	This study
SPC1	5'-CCTGGATATCGGGCAGATCCGTGC-3'	This study
SPC2	5'-TCATGATATCTCTCCCAATTTGTG-3'	This study
orf72F	5'-CATGGAGCTCGCGGACGAGGGCTGCGAGACG-3'	This study
orf72R	5'-CCCAGAGCTTTCACGGTTGCATTGCGAGCAG-3'	This study
orf72F57A	5'-GGCGATTGCCCGCGTGGCGTCGGGCCGGGGCGGGC-3'	This study
orf72R57R	5'-GCCCCCCCCGGCCCCGACGCCACGCGGGCAATCGCC-3'	This study
orf72F83A	5'-CTTCGAGACCCGGGCCGCGGCGGTGCGCATGCTC-3'	This study
orf72R83A	5'-GAGCATGCGCACCGCCGCGGCCGGTCTCGAAG-3'	This study
JF	5'-CATGCCATGGATCTGAAGCTTCAGTCC-3'	This study
JR	5'-GGAAGATCTCGACTTGCCGTCCCTGACGAGAG-3'	This study

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

filled screw-cap tubes. Motility plates were prepared using 0.25% agar and propionate 0.1 mM in M9 minimal culture medium. When required, the following antibiotics were added at the indicated concentrations nalidixic acid, 20 μg/ml; spectinomycin, 50 μg/ml; and tetracycline, 1 μg/ml. Strains of *Escherichia coli* were grown in Luria-Bertani medium (3). When needed, antibiotics were added at the following concentrations: spectinomycin, 50 μg/ml; gentamicin, 30 μg/ml; and ampicillin, 200 μg/ml. Standard molecular biology techniques were used for the isolation and purification of chromosomal DNA from *R. sphaeroides* WS8-N (3). Plasmid DNA and PCR fragments were purified with the QIAprep Spin and QIAquick PCR kits, respectively (QIAGEN GmbH).

Isolation of a mutant in RSP0072. In order to obtain a mutant in RSP0072 a segment of 600 bp located upstream of RSP0072 was amplified by PCR using the oligonucleotides F1 and R2. The region downstream was amplified by using oligonucleotides F3 and R4 with chromosomal DNA from *R. sphaeroides* WS8-N as a template. From pWM5 plasmid, we amplified the *aadA* gene (which confers spectinomycin resistance), using oligonucleotides SPC1 and SPC2 (34). The resistance cassette was cloned in the joining point of the two PCR products. This construction was subcloned into suicide vector pJQ200mp18 (42), which was introduced to *R. sphaeroides* by diparental conjugation with *E. coli* S17-1 (10). The deletion of the soluble lytic transglycosylase (Slt) domain reported here runs from V15 to L105. This is in contrast to a previously reported mutation of this gene (16), which carries an *aadA* insertion at the ClaI site corresponding to I122.

Site-directed mutagenesis of RSP0072. Replacement of the residues E57 and E83 by alanine was carried out according to the QuikChange mutagenesis method (Stratagene), and the presence of the desired mutations was confirmed by sequencing. These mutant proteins were overproduced and purified as described below.

Motility assays. A 5-μl sample of a stationary-phase culture was placed on the surface of swarm plates (3) and incubated aerobically in the dark at 30°C. Swarming ability was recorded as the ability of bacteria to move away from the inoculation point after 24 to 36 h of incubation.

Electron microscopy. Cultures were grown for 16 h under phototrophic conditions. The cells were washed and treated with 2% uranyl acetate for 10 min and observed at 80 kV with a JEM-1200EXII JEOL electron microscope.

Overexpression and purification of FlgJ and the product of RSP0072. The *flgJ* and RSP0072 genes were amplified from chromosomal DNA of *R. sphaeroides* WS8-N. The oligonucleotides used were orf72F and orf72R for RSP0072 and JF and JR for *flgJ*. The PCR products were cloned into overexpression vectors pQE30 and pQE60, respectively. *E. coli* cells (strain M15 pREP4) were grown at 37°C to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.6, and at this point, IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) was added to a final concentration of 0.1 mM, and cell growth was allowed to proceed for 6 to 7 h at 25°C. To overproduce FlgJ, we used the *E. coli* BL21(DE3)pLysS strain; in this case, the culture was grown to an OD₆₀₀ of 1.5, and then the cells were harvested.

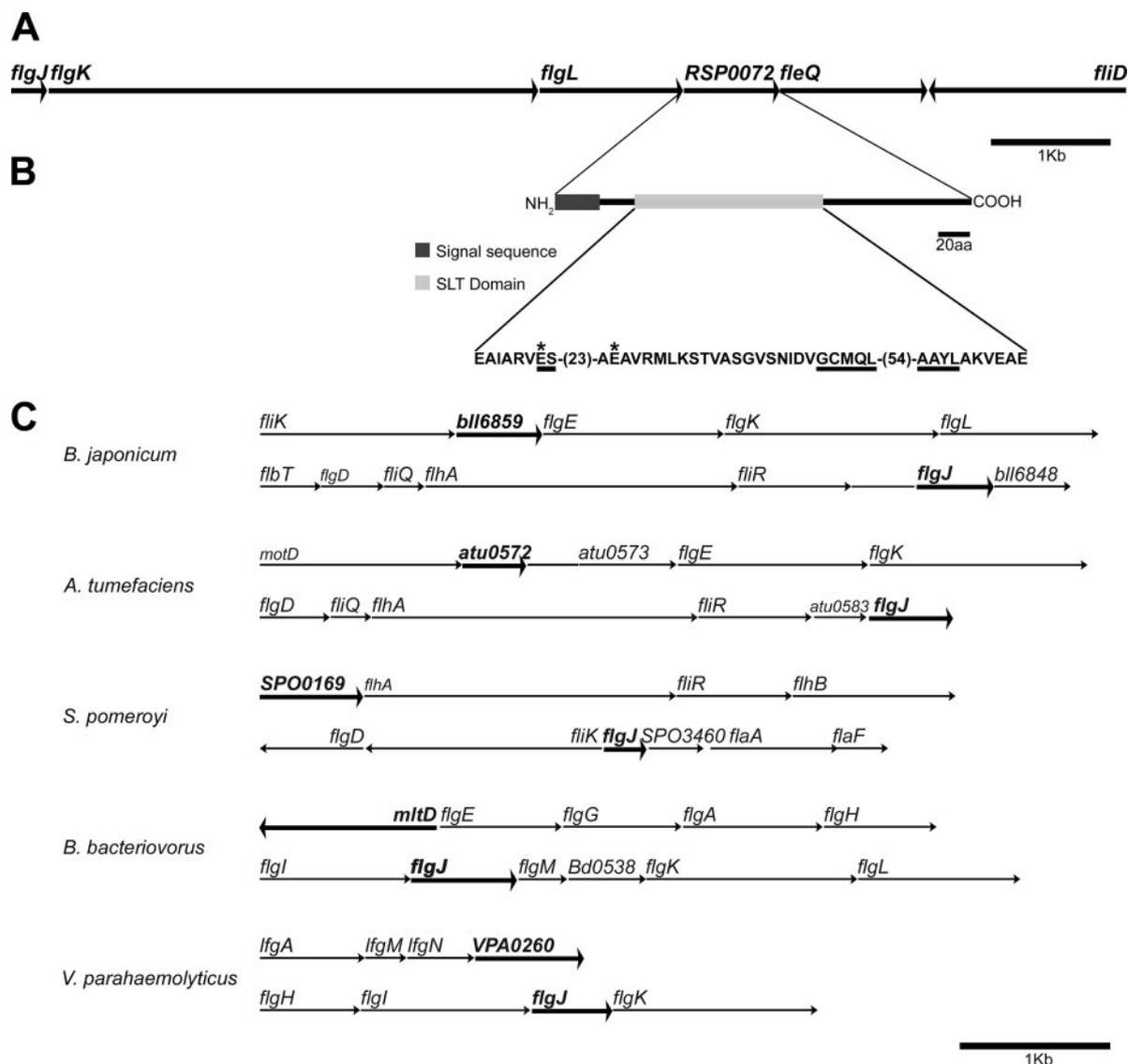


FIG. 1. (A) Genetic context of *flgJ* and RSP0072 in *R. sphaeroides*. (B) Representation of the protein coded by RSP0072 that contains an export signal sequence and an Slt domain. Also shown is the amino acid sequence of the Slt domain with underlined conserved signatures and marked with asterisks the two catalytically relevant glutamic residues that were exchanged in the present study for alanine. (C) Genetic context of genes coding for FlgJ that lack the muramidase domain. Also shown (in boldface) are genes that code for putative Slt proteins in the same microorganisms.

For the purification of FlgJ and the product of RSP0072, the cells were sonicated, and the cell debris was removed by centrifugation. The supernatant from the overexpressed product of RSP0072 was incubated with nickel-Sepharose beads for 1 to 2 h and washed several times with 50 mM imidazole. In the case of FlgJ the protein was obtained from inclusion bodies that were resuspended in 5 M guanidine-HCl, and the solubilized protein was treated as mentioned above for RSP0072 except that the nickel-Sepharose beads were washed with 10 mM imidazole. Finally, the proteins were eluted with imidazole 200 mM. After purification, FlgJ was renatured by dialysis against a buffer containing 50 mM sodium phosphate (pH 6.5). Protein determination was carried out by the method described by Lowry et al. (30), and the purity was determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (29). The structural integrity of FlgJ was verified by circular dichroism (AVIV model 202-01). Antibodies to the protein encoded by RSP0072 were raised in rabbits according to standard procedures (18), and anti-FlhC antibodies were obtained as reported previously (16).

FlhC secretion assays. *R. sphaeroides* was grown photoheterotrophically for 16 h ($OD_{600} = 2.0$) and harvested by centrifugation at $16,000 \times g$ for 15 min. The

supernatant was centrifuged and filtered (pore size, 0.22 μ m; Millipore Corp., Bedford, MA); the flowthrough was treated with chloroform-methanol as described previously (55) and resuspended in 20 μ l of sample buffer. The cell pellet was resuspended in 200 μ l of SDS sample buffer. The protein concentration was determined according to the method of Lowry (30). After SDS-PAGE, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes and incubated with a 1:10,000 solution of anti-FlhC polyclonal antiserum and developed by using an ECL immunoblotting detection kit (Amersham International, Little Chalfont, United Kingdom).

Muramidase activity assays. To determine the muramidase activity, a zimodot or lisoplate technique was used. Petri dishes filled with soft 1% agar containing lyophilized *Micrococcus luteus* cells used as a substrate at a concentration of 50 mg/ml in phosphate buffer (50 mM NaH_2PO_4 [pH 6.5]) as described in reference 4). The lisoplates were inoculated with 7 μ g of protein and incubated for 12 h at 37°C.

Affinity blotting. The proteins SltF (the product of RSP0072), FlgJ, and CheY6 were subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Richmond, CA). Membranes were blocked overnight at room

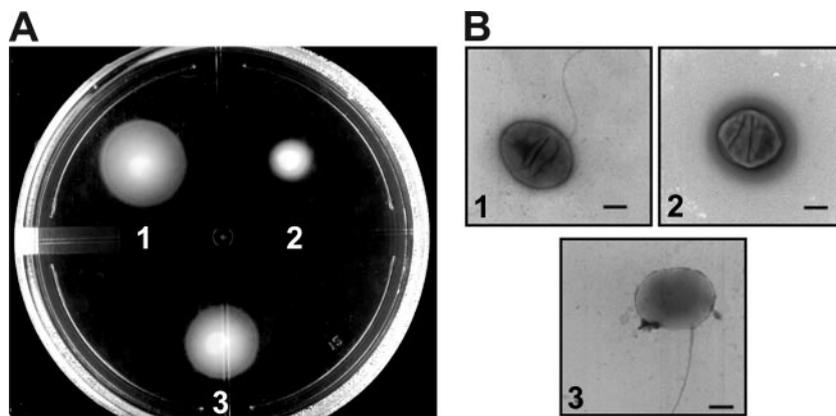


FIG. 2. Characterization of SltF1 mutant. (A) Swimming assay in 0.25% soft agar. Spots: 1, wild-type strain WS8-N; 2, mutant SltF1 strain (*sltFΔ1::aadA*); 3, SltF1 strain complemented with the wild-type RSP0072 gene. (B) Electron micrographs of cells from the strains shown in the swimming assay (same order as in panel A). Bar, 500 nm.

temperature in Tris-buffered saline containing 0.1% (vol/vol) Tween 20 (TTBS)–5% nonfat milk powder. For immunoblotting, these membranes were probed with specific anti-SltF polyclonal antiserum at a 1:5,000 dilution in TTBS solution containing 0.1% nonfat milk powder. Detection was performed by using an ECL immunoblotting detection kit (Amersham).

For affinity blotting experiments, nitrocellulose membranes were incubated with purified SltF (1.8 μg/ml) for 1 h at room temperature, washed with TTBS, and probed with anti-SltF polyclonal antiserum at a 1:5,000 dilution. Detection was performed as described above for immunoblots.

Immunoprecipitation. Sepharose CL-4B coupled to protein A (20 μl) (Sigma Chemicals) was incubated with 4 μg of anti-SltF gamma globulins in 1 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 6.5) for 12 h at 4°C; the tube was then centrifuged, and the supernatant was discarded. To evaluate the interaction of SltF with FlgJ, 0.07 μM concentrations of each protein were incubated for 30 min at 4°C before the addition of the specific anti-SltF gamma globulins attached to protein A Sepharose. The mixture was then incubated for 30 min at 4°C and washed five times with 1 ml of phosphate buffer. The resulting pellet was suspended in 26 μl of sample buffer and boiled for 10 min. The samples were subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes treated as described above and developed using anti-His₆ antibodies at a 1:10,000 dilution (Pierce Chemicals).

Gene context. We analyzed the genomic context of genes similar to RSP0072 by using GeConT (9).

RESULTS

We have previously reported (16) the presence of an open reading frame downstream of *flgL* that codes for a protein of 265 amino acid residues (Fig. 1) that did not give an apparent phenotype on swarm plates after it was interrupted. This gene has been annotated in the genome of *R. sphaeroides* as RSP0072 (<http://genome.ornl.gov/microbial/rsph/>). Further analysis of the sequence with PSI-BLAST (2) revealed that the protein encoded by RSP0072 is similar to one type of muramidases also known as a soluble lytic transglycosylase (Slt). We determined that this protein shows a sec-type export sequence (39) that was detected by using SignalP-3 (5). Using the program GeConT, we identified genes similar to RSP0072, as well as their genomic context (9) (Fig. 1C). It should be noted that the five examples shown correspond to putative Slt proteins from the group of alphaproteobacteria. In all cases, the genes similar to RSP0072 are flanked by flagellar genes. Therefore, we tentatively named this putative soluble flagellar lytic transglycosylase encoded by RSP0072 as SltF.

We noticed that in the previously reported mutant (16), the Slt domain was left basically intact. Therefore, we isolated a new

mutant strain in RSP0072 with a deletion of the Slt domain (the details of these mutants are in Materials and Methods). Figure 2A shows that swimming in such a mutant is significantly impaired compared to the wild-type WS8-N strain. When the mutant was complemented with the wild-type gene, motility was recovered to levels similar to those of wild-type cells (Fig. 2A). This mutant was analyzed with the electron microscope and compared to WS8-N cells and also to the complemented mutant (Fig. 2B). It should be noted that the deletion of the Slt motif renders cells that lack the flagellar filament, which explains the leaky motile phenotype observed in swarm plates. The absence of filament was further confirmed by analyzing the presence of flagellin, either attached to the surface of the bacterium or secreted to the medium. Specific polyclonal anti-flagellin antibodies were used to determine by immunoblotting the presence of this protein in either a low-speed pellet (cell bodies) or supernatant. Figure 3 shows that mutant cells do not produce or export flagellin, in contrast to what was observed with wild-type WS8-N and complemented cells.

SltF contains a conserved glutamic residue (E57) that has been reported to be responsible for catalysis in all of the Slt proteins reported previously (51; data not shown). From the alignment of these proteins, we also detected a region that is present in VirB but is absent in many SltS.

We purified SltF to determine catalytic activity. In a first attempt, we amplified by PCR the complete region encoding SltF, and this product was cloned into pQE30. However, a few minutes after induction, the optical density of the culture decreased, presumably due to cell lysis (data not shown). We then cloned a PCR product that lacked the sequence encoding the predicted signal peptide of SltF. In this case the protein

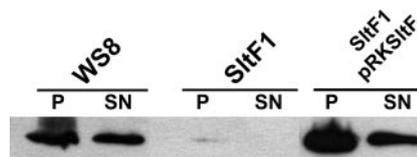


FIG. 3. Immunoblotting of wild-type, SltF1 mutant, and SltF1/pRKSlf strains with a polyclonal anti-FlgC antibody. Lanes: P, pellet; SN, supernatant. Fractions were obtained as indicated in Materials and Methods.

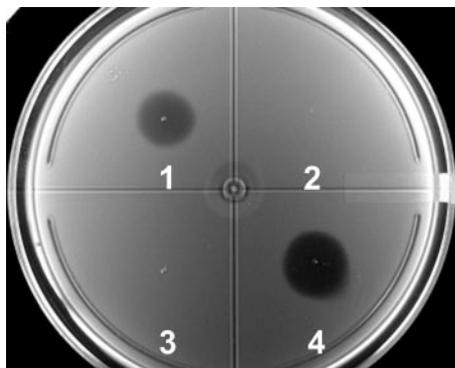


FIG. 4. Activity of wild-type SltF and mutant proteins. Agar plates containing *M. luteus* as a substrate were used to test the activity of the pure proteins SltF (spot 1), SltF E57A (spot 2), SltF E83A (spot 3), egg white lysozyme (EWL) (spot 4). The clear zone is due to enzymatic activity degrading peptidoglycan from "*M. lysodeikticus*." Pure protein (7 μ g) was deposited, and the lisoplate was incubated 12 h at 37°C.

was successfully induced and then purified, and its activity was tested in agar plates containing a cell extract from *M. luteus*. As shown in Fig. 4, both SltF and lysozyme produce a lysis area. Two mutant versions of SltF in which glutamic acid residues E57 or E83 were changed by site-directed mutagenesis to alanine were tested in this assay. Figure 4 shows that these two mutant proteins lack enzymatic activity.

The putative sec-dependent export sequence found in the N-terminal region of SltF suggests that this protein is not exported through the flagellar type III secretion system (35). How then does this lytic transglycosylase find its target in order to allow growth of the flagellar structure at a precise location? One possibility could be that, once it is exported to the periplasmic space, SltF is guided by FlgJ, which is exported to the periplasm through the flagellar export system.

To explore possible interactions between FlgJ and SltF, we used affinity blotting and coimmunoprecipitation. These methods have been used as direct proof of interaction between different flagellum specific proteins such as the switch proteins FliM, FliN (52), FliI, FliC, and FlgE (44), as well as protein kinase C and its substrate (43). An unrelated protein was included and was used as a control that allowed us to distinguish between specific and nonspecific interactions in the case of affinity blotting. FlgJ, SltF, and CheY6 were subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes, which were incubated with purified SltF for 1 h at room temperature, and then probed with anti-SltF antibodies. Figure 5A shows that anti-SltF antibodies reveal SltF interacting with FlgJ but not with CheY6. To further confirm the specific interaction between SltF and FlgJ, we used protein A-Sepharose beads carrying anti-SltF gamma globulins. The result shows that protein A-Sepharose beads bind SltF as well as SltF-FlgJ complex but do not retain FlgJ (Fig. 5B).

DISCUSSION

The flagellar morphogenetic pathway has been extensively studied in several bacterial species. In its early stages, the assembly process relies on a specific muramidase that locally digests the peptidoglycan layer to allow penetration of the

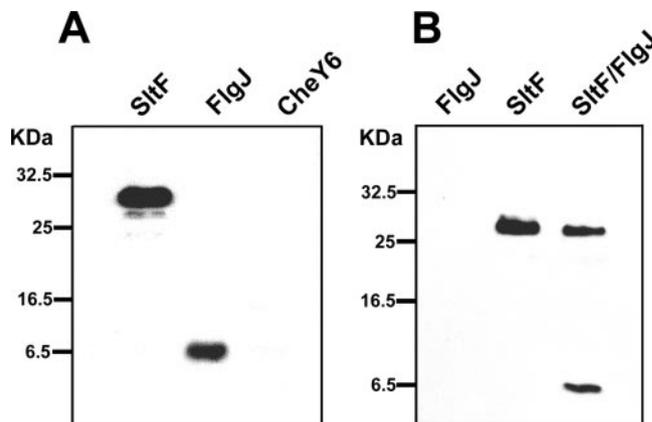


FIG. 5. Affinity blot and coimmunoprecipitation. (A) An affinity blot was performed as described in Materials and Methods. In this case, pure protein (2 μ g) was subjected to SDS-17.5% PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, incubated with SltF, and probed with anti-SltF antibodies. (B) Coimmunoprecipitation assay showing specific interaction between SltF and FlgJ. Protein A-Sepharose beads to which specific anti-SltF gamma globulins were bound were incubated with FlgJ, SltF, or both proteins previously mixed. The retained proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes developed with anti-His₆ histidine commercial antibodies (see Materials and Methods).

nascent rod (31). In *R. sphaeroides* the open reading frame RSP0072, which we propose after the present study be named SltF, is located within a flagellar region that comprises 35 kb in chromosome I of this photosynthetic bacterium. It is flanked by *flgL* and *fleQ* that code for HAP3 (16) and a flagellum-specific enhancer-binding protein (41). The genetic context strongly suggests that SltF is the flagellar muramidase. In the present study we analyzed the relevance of this gene product in the biogenesis of the flagellum by means of several experimental approaches. Our results show that the deletion of the N-terminal region of SltF renders a nonmotile phenotype in swarm assays after an incubation period of 24 h. Nevertheless, if the incubation time is extended to 5 to 6 days the swarming spot becomes apparent (data not shown). A possible explanation for this could be the redundancy of the lytic transglycosylases present in many bacteria or to the elastic properties of the peptidoglycan layer or both. It has been shown in *E. coli* that mutations in either one of seven lytic transglycosylases do not show an observable phenotype (19). The authors of that study suggested that amidases, lytic transglycosylases, and endopeptidases are involved in cell separation after cell division. Similarly, the genome of *R. sphaeroides* shows at least four putative lytic transglycosylases (<http://genome.ornl.gov/microbial/rsph/>), which could partially complement the function lost after the deletion of the N-terminal region of SltF. An alternative explanation for the recovery of the swimming behavior is the high exchange rate of the peptidoglycan layer that has been estimated to reach levels of 50 to 60% in one generation (17, 53). Therefore, the possibility exists that eventually gaps and flagellar biogenesis coincide, allowing the nascent structure to penetrate this barrier, as has been suggested by Hirano et al. (20). We have consistently observed that the wild-type phenotype is recovered with the reintroduction of *sltF*, suggesting that the protein is necessary for efficient morphogenesis. The

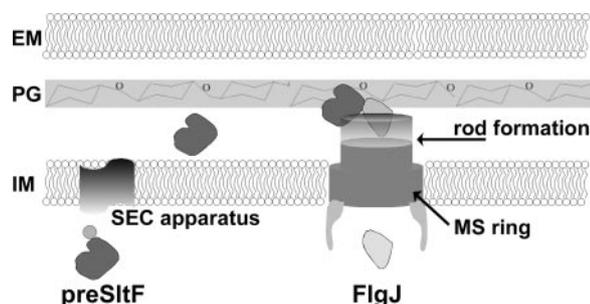


FIG. 6. Model showing the possible mode of action of SltF during flagellar biogenesis. The external membrane (EM), peptidoglycan cell wall (PG), and inner membrane (IM) are indicated.

absence of a flagellar structure as well as the lack of flagellin (FliC) in either the cytoplasm or the extracellular medium strongly suggests that the structure is arrested at the MS ring level and that FlgM, which is the anti-sigma factor, is present in the cytoplasm repressing the expression of the class IV genes, among which is *fliC* (41).

The protein sequence of SltF clearly shows the reported motifs that identify the family of proteins known as SltS (6, 13, 25). These enzymes differ from lysozymes in that they induce a molecular rearrangement during lysis of the peptidoglycan layer that converts the glycosidic bond between *N*-acetylmuramic acid and *N*-acetylglucosamine into an internal 1→6 anhydro *N*-acetylmuramyl (hemiacetal) bond (22). Furthermore, these enzymes require a single catalytic glutamic acid residue to carry out its function. In contrast, lysozymes require an aspartic and a glutamic acid residue for catalysis (48). Some examples of this are the hen egg white lysozyme (33) and lysozyme from T4 bacteriophage (14). In the present study we show that SltF contains two glutamic acid residues (E57 and E83) that, when mutated to alanine, rendered the enzyme inactive. From the sequence alignment (data not shown), we deduced that E57 might be the catalytic residue. However, further studies are needed to determine the role of E83 in catalysis, i.e., whether it is structural or functional.

We also addressed the question of the possible interaction between FlgJ and SltF that would help explain the mechanism by which this lytic transglycosylase (SltF) would be directed to the site where the flagellar structure penetrates the cell wall (see Fig. 6). According to this model, SltF would be exported by the general secretion pathway to the periplasm, where it would interact with FlgJ and perform the localized degradation of the cell wall, this would allow the growing rod to cross the peptidoglycan wall. There are examples of lytic transglycosylases involved in various secretion systems such as VirB1 of the type IV secretion system from *Agrobacterium tumefaciens* (36) or IpgF in the type III secretion system from *Shigella sonnei* (56).

Further questions remain to clarify how the catalytic activity of the lytic transglycosylase that has been exported to the periplasmic space is regulated in order to avoid random generation of gaps in the peptidoglycan layer. Regarding this issue, preliminary data show that the interaction between FlgJ and SltF does not modify the activity of the muramidase (F. J. de la Mora et al., unpublished results).

Recently, Nambu et al. (37) found that various alphaproteo-

teobacteria, including *R. sphaeroides*, possess proteins homologous to FlgJ that lack the lytic transglycosylase domain, whereas beta- and gammaproteobacteria possess FlgJ that contains the N-terminal domain fused to the lytic C-terminal moiety. It should be noted that this catalytic domain does not show muramidase enzymatic activity (21). These proteins behave more like amidases similar to the T7 lysozyme that breaks bonds linking muramic acid and L-alanine (7, 38, 40).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sebastian Poggio for helpful discussions, Aurora Osorio for helpful technical assistance, and the IFC Molecular Biology Unit for sequencing facilities as well as the Microscopy Unit for the electron micrographs.

This study was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología grants 47172/A-1 and P42600-Q.

REFERENCES

- Aldridge, P., and K. T. Hughes. 2002. Regulation of flagellar assembly. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:160–165.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403–410.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1987. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
- Becktel, W. J., and W. A. Baase. 1985. A lysoplate assay for *Escherichia coli* cell wall-active enzymes. *Anal. Biochem.* **150**:258–263.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne, and S. Brunak. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**:783–795.
- Blackburn, N. T., and A. J. Clarke. 2001. Identification of four families of peptidoglycan lytic transglycosylases. *J. Mol. Evol.* **52**:78–84.
- Cheng, X., X. Zhang, J. W. Pflugrath, and F. W. Studier. 1994. The structure of bacteriophage T7 lysozyme, a zinc amidase and an inhibitor of T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:4034–4038.
- Chilcott, G. S., and K. T. Hughes. 2000. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:694–708.
- Ciria, R., C. Abreu-Goodger, E. Morett, and E. Merino. 2004. GeConT: gene context analysis. *Bioinformatics* **20**:2307–2308.
- Davis, J., T. J. Donohue, and S. Kaplan. 1988. Construction, characterization, and complementation of a Puf⁺ mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **170**:320–329.
- Demchick, P., and A. L. Koch. 1996. The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**:768–773.
- Dijkstra, A. J., and W. Keck. 1996. Peptidoglycan as a barrier to trans-envelope transport. *J. Bacteriol.* **178**:5555–5562.
- Dijkstra, B. W., and A. M. Thunnissen. 1994. 'Holy' proteins. II: the soluble lytic transglycosylase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**:810–813.
- Fastrez, J. 1996. Phage lysozymes. *EXS.* **75**:35–64.
- Fein, J. E. 1979. Possible involvement of bacterial autolytic enzymes in flagellar morphogenesis. *J. Bacteriol.* **137**:933–946.
- González-Pedraja, B., J. de la Mora, T. Ballado, L. Camarena, and G. Dreyfus. 2002. Characterization of the *flgG* operon of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 and its role in flagellum biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1579**:55–63.
- Goodell, E. W. 1985. Recycling of murein by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **163**:305–310.
- Harlow, E., and D. Lane. 1988. *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Heidrich, C., A. Ursinus, J. Berger, H. Schwarz, and J. V. Höltje. 2002. Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**:6093–6099.
- Hirano, T., T. Minamino, and R. M. Macnab. 2001. The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase. *J. Mol. Biol.* **312**:359–369.
- Höltje, J. V. 1998. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:181–203.
- Höltje, J. V., D. Mirelman, N. Sharon, and U. Schwarz. 1975. Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **124**:1067–1076.
- Homma, M., K. Kutsukake, M. Hasebe, T. Iino, and R. M. Macnab. 1990. FlgB, FlgC, FlgF, and FlgG: a family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **211**:465–477.
- Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* **70**:191–197.
- Koonin, E. V., and K. E. Rudd. 1994. A conserved domain in putative

- bacterial and bacteriophage transglycosylases. *Trends Biochem. Sci.* **19**:106–107.
26. **Koraimann, G.** 2003. Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of gram-negative bacteria. *Cell Mol. Life Sci.* **60**:2371–2388.
 27. **Kubori, T., N. Shimamoto, S. Yamaguchi, K. Namba, and S. Aizawa.** 1992. Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **226**:433–446.
 28. **Labischinsky, H., G. Barnickel, and D. Naumann.** 1983. The state of order of bacterial peptidoglycan, p. 49–54. *In* R. Hackenbeck, J. V. Höltje, and H. Labischinsky (ed.), *The target of penicillin*. Walter Gruyter, Berlin, Germany.
 29. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685.
 30. **Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265–275.
 31. **Macnab, R. M.** 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**:77–100.
 32. **Macnab, R. M.** 2004. Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**:207–217.
 33. **Malcolm, B. A., S. Rosenberg, M. J. Corey, J. S. Allen, A. de Baetselier, and J. F. Kirsch.** 1989. Site-directed mutagenesis of the catalytic residues Asp-52 and Glu-35 of chicken egg white lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:133–137.
 34. **Metcalfe, W. W., and B. L. Wanner.** 1993. Construction of new β -glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement. *Gene* **129**:17–25.
 35. **Minamino, T., and R. M. Macnab.** 1999. Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J. Bacteriol.* **181**:1388–1394.
 36. **Mushegian, A. R., K. J. Fullner, E. V. Koonin, and E. W. Nester.** 1996. A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:7321–7326.
 37. **Nambu, T., Y. Inagaki, and K. Kutsukake.** 2006. Plasticity of the domain structure in FlgJ, a bacterial protein involved in flagellar rod formation. *Genes Genet. Syst.* **81**:381–389.
 38. **Nambu, T., T. Minamino, R. M. Macnab, and K. Kutsukake.** 1999. Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **181**:1555–1561.
 39. **Oliver, D.** 1985. Protein secretion in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**:615–648.
 40. **Pallen, M. J., C. W. Penn, and R. R. Chaudhuri.** 2005. Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era. *Trends Microbiol.* **13**:143–149.
 41. **Poggio, S., A. Osorio, G. Dreyfus, and L. Camarena.** 2005. The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins. *Mol. Microbiol.* **58**:969–983.
 42. **Quandt, J., and M. F. Hynes.** 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**:15–21.
 43. **Robles-Flores, M., and J. A. García-Sáinz.** 1994. Immunological crossreactivity of G-protein beta subunit and receptors for activated C-kinase. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **34**:465–473.
 44. **Silva-Herzog, E., and G. Dreyfus.** 1999. Interaction of Flil, a component of the flagellar export apparatus, with flagellin and hook protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1431**:374–383.
 45. **Simon, R., Priefer, U., and A. Pühler.** 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology* **1**:37–45.
 46. **Sistrom, W. R.** 1962. The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J. Gen. Microbiol.* **28**:607–616.
 47. **Sockett, R. E., J. C. A. Foster, and J. P. Armitage.** 1990. Molecular biology of the *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. *FEMS Symp.* **53**:473–479.
 48. **Strynadka, N. C., and M. N. James.** 1996. Lysozyme: a model enzyme in protein crystallography. *EXS* **75**:185–222.
 49. **Suzuki, H., K. Yonekura, K. Murata, T. Hirai, K. Oosawa, and K. Namba.** 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**:104–114.
 50. **Tampakaki, A. P., V. E. Fadouloglou, A. D. Gazi, N. J. Panopoulos, and M. Kokkinidis.** 2004. Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol.* **6**:805–816.
 51. **Thunnissen, A. M., A. J. Dijkstra, K. H. Kalk, H. J. Rozeboom, H. Engel, W. Keck, and B. W. Dijkstra.** 1994. Doughnut-shaped structure of a bacterial muramidase revealed by X-ray crystallography. *Nature* **367**:750–753.
 52. **Toker, A. S., and R. M. Macnab.** 1997. Distinct regions of bacterial flagellar switch protein FlIM interact with FlIG, FlIN, and CheY. *J. Mol. Biol.* **273**:623–634.
 53. **Uehara, T., K. Suefuji, N. Valbuena, B. Meehan, M. Donegan, and J. T. Park.** 2005. Recycling of the anhydro-N-acetylmuramic acid derived from cell wall murein involves a two-step conversion to N-acetylglucosamine-phosphate. *J. Bacteriol.* **187**:3643–3649.
 54. **Viollier, P. H., and L. Shapiro.** 2003. A lytic transglycosylase homologue, PleA, is required for the assembly of pili and the flagellum at the *Caulobacter crescentus* cell pole. *Mol. Microbiol.* **49**:331–345.
 55. **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**:141–143.
 56. **Zahrl, D., M. Wagner, K. Bischof, M. Bayer, B. Zavec, A. Beranek, C. Ruckenstein, G. E. Zarfel, and G. Koraimann.** 2005. Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology* **151**:3455–3467.