



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la biogénesis del eje flagelar de *Rhodobacter sphaeroides*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Manuel Osorio Valeriano

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Georges Dreyfus Cortés, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Daniel Alejandro Fernández, Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Sebastián Poggio Ghilarducci, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

MÉXICO, D. F. Septiembre, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÒN	4
El flagelo bacteriano	4
Elementos estructurales anulares	6
Anillo MS	7
Anillo C	8
Anillos P y L	9
Elementos estructurales axiales	10
Filamento	10
Gancho	15
Eje	18
Estructura	18
Características bioquímicas de FliE, FlgB, FlgC, FlgF y FlgG	19
Ensamblaje	19
<i>R. sphaeroides</i> como modelo de estudio	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
RESULTADOS	39
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	63
PERSPECTIVAS	65
ANEXOS	67
REFERENCIAS	69

AGRADECIMIENTOS

- El presente trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Georges Dreyfus Cortés en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Agradezco al Dr. Francisco Javier de la Mora Bravo y a la Q. F. B. Teresa Ballado Nava por su invaluable asesoría técnica.
- A los miembros de mi comité tutor: Dr. Daniel Alejandro Fernández y Dr. Sebastián Poggio Ghilarducci.
- Al Dr. Diego González Halphen por facilitarnos reactivos, por prestarnos equipo y por sus valiosos comentarios.
- A los miembros de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM: la Dra. Laura Ongay Larios y la Biol. Guadalupe Códiz Huerta por su ayuda con la secuenciación del ADN utilizado en este trabajo.
- A la Biblioteca del Instituto de Fisiología Celular, en particular a la M. en C. Sandra Moncada por las facilidades prestadas.
- Al Bioterio del Instituto de Fisiología Celular por el apoyo brindado con el manejo de los conejos utilizados en este trabajo, especialmente al M.V.Z. Héctor Malagón Rivero.
- Agradezco a los miembros del jurado por la revisión de esta tesis, los doctores: Luis Servín González, María Soledad Funes Argüello, Bertha González Pedrajo, Dimitris Georgellis y Lorenzo Patrick Segovia Forcella.
- Agradezco a CONACyT por la beca de posgrado que se me otorgó durante mis estudios de maestría.
- A PAEP por los apoyos otorgados durante la maestría para la asistencia al 114 Congreso General de la Sociedad Americana de Microbiología (ASM) y para la estancia de investigación que realicé en la Universidad de Guelph, ON, Canadá.
- Este trabajo fue financiado por el CONACyT con el donativo 106081 y por la DGAPA con el donativo PAPIIT IN204614.

RESUMEN

El flagelo es el organelo de locomoción más utilizado por las bacterias, se trata de un complejo multiproteico formado por aproximadamente 30 proteínas diferentes. Los elementos estructurales del flagelo bacteriano pueden clasificarse en 2 grupos de acuerdo con la simetría que presentan: el primero está formado por estructuras anulares y el segundo por estructuras helicoidales o axiales. Los elementos estructurales axiales del flagelo bacteriano son: el filamento, el gancho y el eje.

El eje flagelar consiste en una porción distal formada por 26 subunidades de la proteína FlgG y una porción proximal formada por las proteínas FlgB, FlgC y FlgF, con aproximadamente 6 subunidades de cada una. A pesar de que se han realizado una gran cantidad de estudios estructurales sobre otras proteínas axiales (proteína del gancho y flagelina), son muy pocos los datos que se conocen sobre las proteínas que conforman al eje flagelar. Tampoco se sabe con certeza el orden en que estas proteínas son incorporadas al complejo durante su polimerización.

En este trabajo, se llevó a cabo la caracterización bioquímica de las proteínas que conforman al eje del sistema flagelar 1 (Fla 1) de *R. sphaeroides* y se estudiaron las interacciones que existen entre ellas. A partir de los resultados obtenidos, asignamos una función a los dominios estructurales de las proteínas FlgF y FlgG y proponemos un modelo secuencial de ensamblaje.

INTRODUCCIÓN

Flagelo bacteriano

El flagelo bacteriano es una nanomáquina molecular compleja, compuesta por aproximadamente 30 proteínas diferentes, presentes en un número de copias que varía desde unas pocas unidades hasta decenas de miles (Macnab, 2003). El flagelo permite a un gran número de especies bacterianas moverse a través de medios líquidos (“swimming” o nado) (Chevance & Hughes, 2008) o sobre superficies sólidas (“swarming” o movimiento en enjambre) (Kearns, 2010).

El desplazamiento mediado por el flagelo, junto con el mecanismo de direccionamiento quimiotáctico, permiten a la bacteria alejarse de ambientes desfavorables hacia condiciones beneficiosas, dando como resultado una ventaja de supervivencia significativa (Armitage, 1999).

Además de su función esencial como estructura de locomoción, el flagelo bacteriano participa en otros procesos tales como la formación de biopelículas (Belas, 2014) y la patogenicidad; en este último contribuye en la adherencia y en la colonización (Duan, Zhou et al., 2013).

El flagelo puede ser dividido en 3 principales subestructuras: filamento, gancho y cuerpo basal (Macnab, 2003) (figura 1). El filamento actúa como una propela y realiza el trabajo mecánico sobre el medio para propulsar a la célula; el gancho sirve como conector entre el filamento y el cuerpo basal. El cuerpo basal es un complejo multiproteico que contiene a su vez varios componentes estructurales y funcionales del flagelo como son: el motor, al menos 4 estructuras anulares (anillos C, MS P y L), el aparato de exportación y una estructura de tipo axial llamada eje (figura 1). En total son alrededor de 20 proteínas diferentes las que lo constituyen (Minamino, Imada et al., 2008).

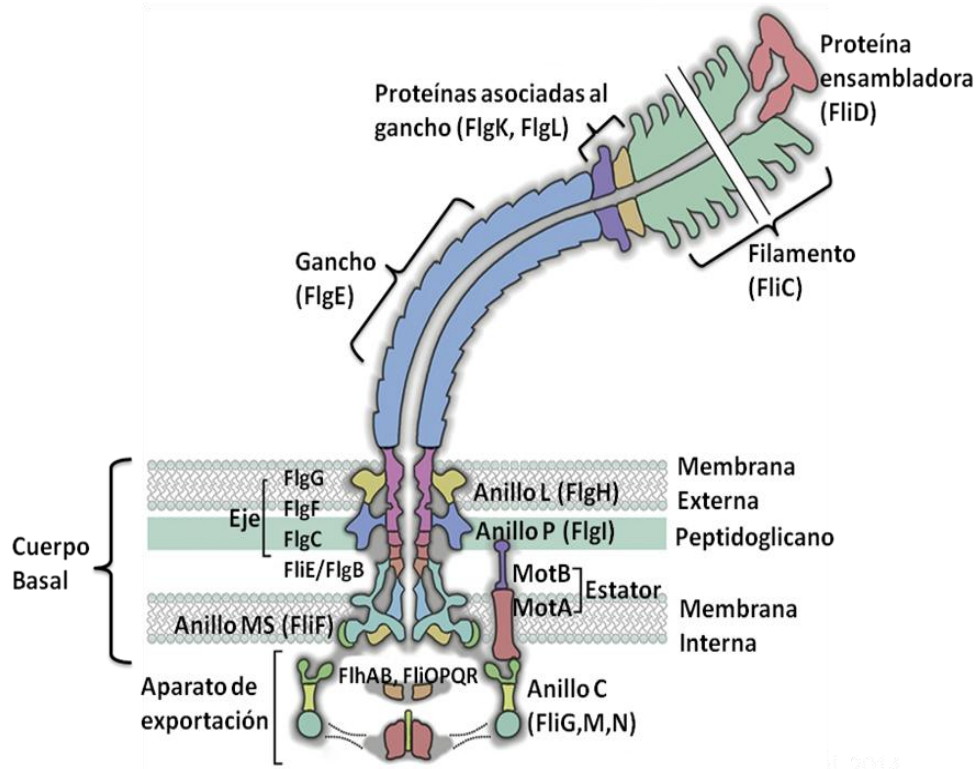


Figura 1. Estructura del flagelo bacteriano. El flagelo cónicamente se divide en: filamento, gancho y cuerpo basal. El filamento y el gancho son homopolímeros formados por múltiples copias de las proteínas FlgE y FliC, respectivamente; el cuerpo basal se compone por al menos 4 estructuras anulares (anillos C, MS, P y L) y una estructura de tipo axial (eje), además incluye al aparato de exportación y a los complejos estatores del motor. Imagen modificada de: Evans, Hughes et al., 2014

El funcionamiento del flagelo ocurre mediante un mecanismo rotatorio potenciado por el gradiente transmembranal de protones H^+ o de iones Na^+ (Berg & Anderson, 1973, Yorimitsu & Homma, 2001) (figura 2). El motor es el encargado de impulsar la rotación del flagelo, al transformar la energía electroquímica en energía mecánica y se compone por dos partes: una rotatoria (rotor) que recibe el nombre de anillo C (Erhardt et al., 2010) y otra estática (estator) que lleva a cabo el transporte de iones.

El estator está formado aproximadamente por 11 complejos MotA/MotB o PomA/PomB (dependiendo de la especie bacteriana), que funcionan de manera independiente para conducir protones H^+ o iones Na^+ respectivamente, a través de la membrana citoplasmática y

acoplar su flujo a la rotación (Kojima & Blair, 2001). Muchos estudios sugieren que la estequiometría de la unidad del estator flagelar es $(MotA)_4(MotB)_2$ (Yonekura et al., 2011).

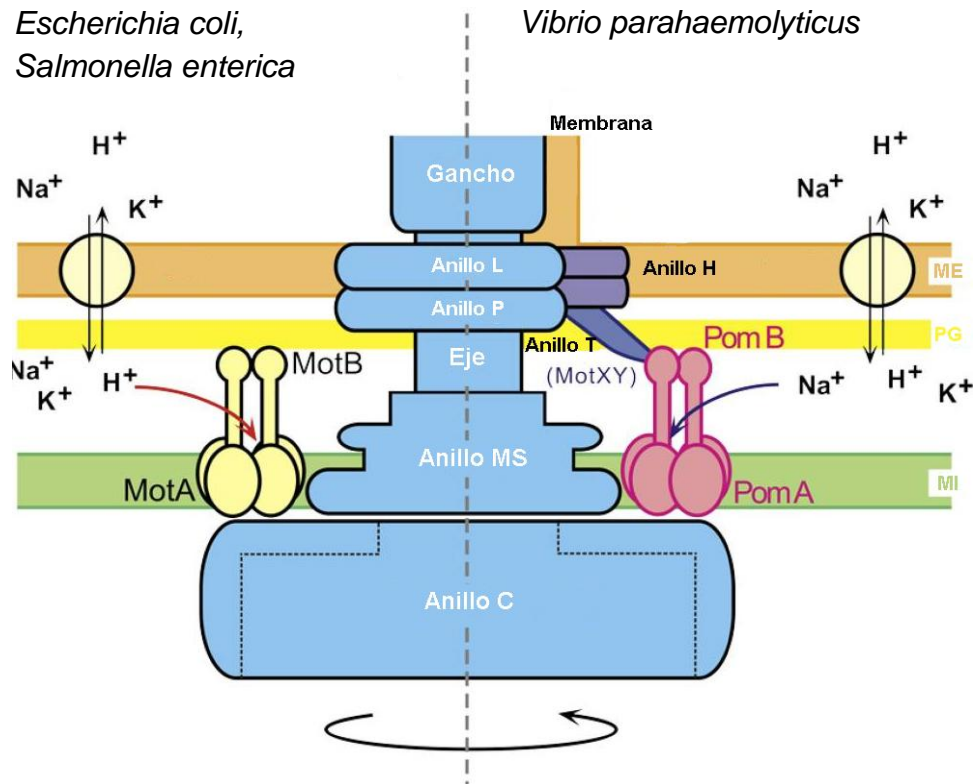


Figura 2. Esquema de los dos tipos de motores flagelares: El motor energizado por protones H^+ como el que poseen *S. enterica* y *E. coli* y el motor energizado por iones Na^+ como el que poseen algunas bacterias del género *Vibrio*. En estas últimas existen componentes estructurales adicionales como los anillo H y T, además, el filamento posee un recubrimiento membranoso. MI, membrana interna; PG, peptidoglicano; ME, membrana externa. Imagen modificada de: Yonekura. Maki-Yonekura et al.. 2011.

Elementos estructurales anulares.

Los elementos estructurales del flagelo bacteriano también pueden clasificarse de acuerdo con la simetría que presentan, en este caso encontramos dos grupos: el primero está formado por estructuras anulares y el segundo por estructuras helicoidales o axiales. Dentro de las estructuras anulares se encuentran: el anillo MS, el anillo C y los anillos P y L; en algunas bacterias existen dos anillos adicionales llamados anillo T y anillo H (Minamino & Imada, 2015) (figuras 1 y 2).

Las estructuras anulares pertenecen a un grupo de simetría llamado grupo cíclico y se caracterizan por tener un único eje de simetría rotacional, generalmente están formadas por múltiples copias de una sola proteína que se asocian en un mismo plano. Las estructuras anulares diméricas y tetraméricas son las más comunes, en cambio, estructuras de mayor número de copias como las encontradas en el flagelo bacteriano son muy raras; este tipo de estructuras generalmente están involucradas en funciones que requieren de una unidireccionalidad como son la interacción con membranas o el movimiento rotacional (Goodsell & Olson, 2000).

Anillo MS

Desde los primeros aislamientos de flagelos realizados por DePamphilis y Adler en 1971, se reportó la presencia de diferentes estructuras anulares localizadas en el cuerpo basal (DePamphilis & Adler, 1971b). A partir de ese trabajo y hasta 1992, se habló de la existencia de los anillos M por “membrane” ya que se ubica en la membrana interna y S por “supramembrane” el cual se encuentra justo encima del anillo M y por lo tanto sobresale de la membrana interna. Finalmente se demostró que ambos anillos eran parte de una misma estructura formada por aproximadamente 26 copias de la proteína FliF (Ueno, Oosawa et al., 1992) y actualmente recibe el nombre de anillo MS (figuras 1 y 3).

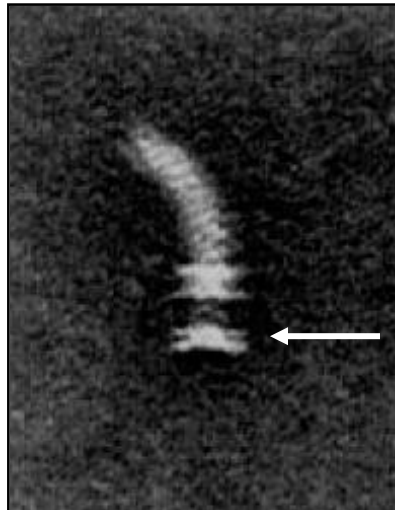


Figura 3. Complejo Gancho-cuerpo basal (HBB) aislado de *E. coli*. Imagen de microscopía electrónica, la flecha señala el anillo MS. Imagen tomada de: Jones, Macnab et al., 1990, Ueno, Oosawa et al., 1994.

El anillo MS es el primer componente estructural del flagelo en ensamblarse; en su interior alberga al aparato de exportación y funciona como una estructura de anclaje a la célula (DePamphilis & Adler, 1971a). Además, sirve como templado para el ensamblaje del anillo C y en la cara periplásmica constituye la plataforma sobre la cual inicia la polimerización de los elementos axiales del flagelo bacteriano (Kubori, Yamaguchi et al., 1997, Zhao et al., 2013).

Anillo C

El anillo C o anillo citoplasmático, es el elemento rotatorio del motor flagelar y al mismo tiempo es responsable del cambio en el sentido de la rotación del flagelo, lo cual tiene como consecuencia un cambio de dirección en el desplazamiento de la bacteria (Lee, Ginsburg et al., 2010, Minamino, Imada et al., 2011). El anillo C se ensambla alrededor de la cara citoplasmática del anillo MS y se compone de 3 proteínas con diferente número de copias: FliG, 26 copias (Zhao, Amsler et al., 1996); FliM, 34 copias (Thomas, Francis et al., 2006, Thomas, Morgan et al., 1999) y FliN de 110 a 140 copias (Brown, Mathews et al., 2005, Zhao, Pathak et al., 1996) (figuras 1 y 4).

Los primeros 90 residuos de la región N-terminal de FliG son los responsables de la interacción del anillo C con el anillo MS, mientras que la región C-terminal de esta proteína interacciona con los complejos estatores y está implicada en la generación de la torca (Levenson, Zhou et al., 2012). La proteína FliM tiene un papel fundamental en el cambio de dirección de la rotación del flagelo e interacciona con FliN en una estequiometría 1:4 (Levenson et al., 2012).

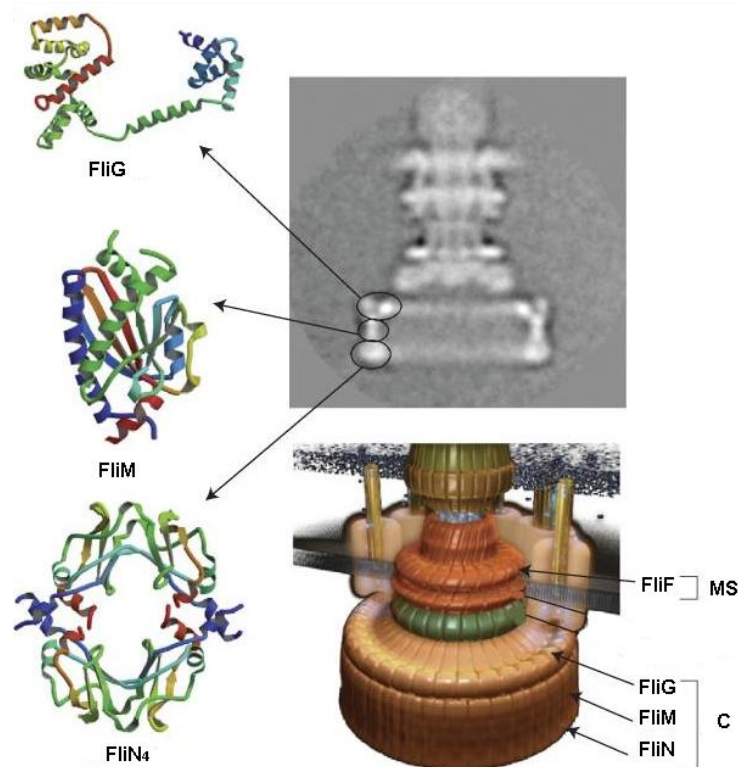


Figura 4. Localización del anillo C en el cuerpo basal flagelar y estructuras cristalográficas de las proteínas que lo conforman. En la parte superior derecha: imagen de crio-microscopía electrónica del cuerpo basal flagelar. A la izquierda, representación de listones de las estructuras cristalográficas de FliG, FliM y del tetrámero formado por FliN. En la parte inferior derecha, representación del cuerpo basal, se señala la posición de cada una de estas proteínas. Imagen tomada de: Erhardt, Namba et al., 2010.

Anillos P y L

Los anillos P y L están formados por 24 copias de la proteína FlgI y 28 de la proteína FlgH respectivamente (Jones et al., 1990); se localizan rodeando al eje flagelar a la altura de la pared de peptidoglicano (anillo P) y de la membrana de lipopolisacárido en bacterias Gram negativas (anillo L) (DePamphilis & Adler, 1971b).

Se propone que el anillo P es un elemento no rotatorio del cuerpo basal, que actúa como un forro o rodamiento en la región distal del eje flagelar, a la altura de la pared de peptidoglicano. Se piensa que su función es facilitar una rotación suave (Hizukuri, Kojima et al., 2008).

Por su parte el anillo L, se localiza por encima del anillo P a la altura de la membrana externa y se sabe que forma un poro por el cual atraviesa el eje flagelar, permitiendo que el gancho y el filamento se extiendan hacia el exterior de la célula (figura 1). Las espiroquetas carecen de dicho anillo por lo que sus flagelos se localizan en el espacio periplásmico (Chevance et al., 2007).

Elementos estructurales axiales

Existen complejos proteicos que rompen con una simetría perfecta para poder desarrollar sus funciones biológicas, en los casos en los que las subunidades de una misma proteína adoptan una posición similar pero no idéntica se habla de una cuasisimetría. En este tipo de estructuras las proteínas se asocian en un arreglo helicoidal. En la naturaleza, los ejemplos clásicos de este tipo de complejos son las cápsides de algunos virus y el flagelo bacteriano (Goodsell & Olson, 2000). Los elementos estructurales axiales del flagelo bacteriano son: el filamento, el gancho y el eje.

Filamento

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

La estructura cristalográfica de la flagelina (Samatey, Imada et al., 2000), junto con el análisis del mapa de densidades electrónicas obtenido por medio de la técnica de criotomografía electrónica (Yonekura et al., 2003) en *S. enterica*, muestran que esta proteína está compuesta por 4 dominios estructurales los cuales han sido denominados: D0, D1, D2, y D3 .

El dominio D0 está compuesto por las regiones del extremo N y C-terminal las cuáles forman 2 α -hélices entrelazadas, El dominio D1 comprende la región N-terminal que va desde la Asp54 a la Gln176 y la región C-terminal que abarca desde la Thr402 a la Arg450 y está formado casi exclusivamente por estructuras α -hélice. El dominio D2 también está formado por dos segmentos que van de la Lys177 a la Gly189 y de la Ala248 a la Ala401 y contrario a

los dominios D0 y D1, este dominio está formado en su mayoría por estructuras β -plegada. Finalmente el dominio D3 que corresponde a la región central de la proteína, abarca desde el residuo Tyr190 a Val283 y también contiene mayoritariamente estructuras β -plegada (Samatey et al., 2001) (figura 5).

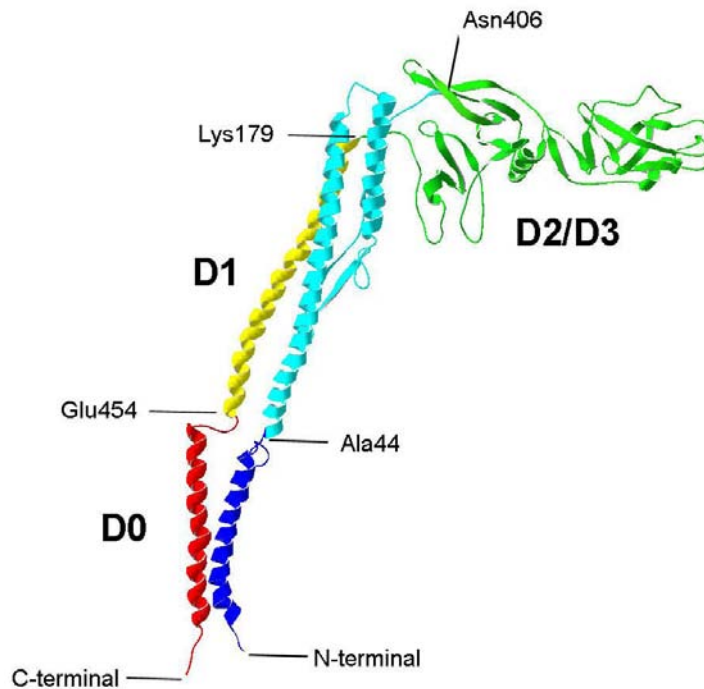


Figura 5. Estructura terciaria de la proteína FliC. Diagrama de listones de la proteína FliC, la estructura se encuentra coloreada de la siguiente manera: en azul el dominio D0 del N-terminal, residuos 1-44; en cian el dominio D1 del N-terminal, residuos 44-179; en verde los dominios D2 y D3, residuos 179-406; en amarillo el dominio D1 del C-terminal, residuos 406-454 y en rojo el dominio D0 del C-terminal, residuos 454-494. Imagen modificada de: Yonekura et al., 2003.

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

Las estructuras α -hélice del dominio D0 forman la cara interna del filamento y constituyen el canal por el cual las nuevas subunidades son exportadas para finalmente polimerizar en el extremo distal (Yonekura et al., 2003) (figura 6). Una vez incorporadas al filamento, las regiones N- y C-terminal sufren una transición desorden-orden y adquieren una estructura compacta de α -hélice (Aizawa, Vonderviszt et al., 1990). Cabe resaltar que ambas regiones se encuentran altamente conservadas, probablemente por su participación en la polimerización y en el mantenimiento de un ambiente homogéneo a lo largo del canal que se extiende desde la base del eje hasta la punta del filamento (Pallen & Matzke, 2006).

Por su parte, el dominio D1 constituye un segundo tubo más externo también densamente empacado y junto con el dominio D0 forman una estructura concéntrica tubular doble (figura 6). Este dominio también tiene un papel importante en la polimerización y está altamente conservado.

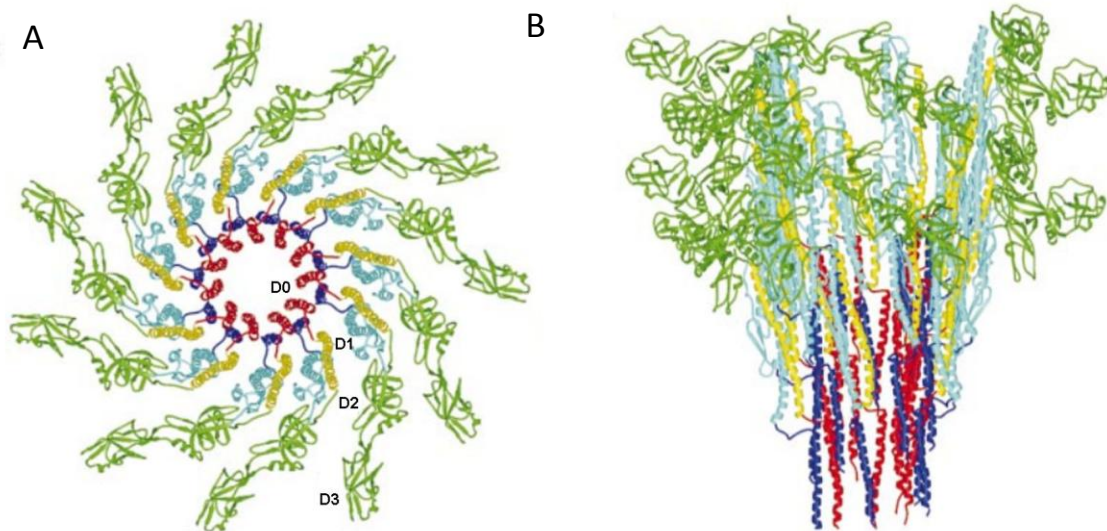


Figura 6. Modelo de listones de múltiples subunidades de FliC polimerizadas. **A)** Vista superior del extremo distal, se señalan los diferentes dominios de una de las subunidades. **B)** Vista lateral de la cara externa del filamento, se observa la estructura de doble tubo formada por los dominios D0 y D1 y la región expuesta y más laxa que corresponde a los dominios D2 y D3. Se conserva la misma simbología de colores que en la imagen anterior: en azul marino el dominio NDO; en azul claro el dominio ND1; en verde los dominios D2 y D3; en amarillo el dominio CD1 y en rojo el dominio CD0. Imagen modificada de: Yonekura, Maki-Yonekura et al., 2003.

La región central de la proteína que corresponde a los dominios D2 y D3 no es esencial para su polimerización, incluso algunas mutantes con deleciones en dicha región aún son capaces de formar filamentos (Kuwajima, 1988). Además, existe una muy alta variabilidad tanto en la composición como en la longitud de ambos dominios entre las flagelinas pertenecientes a distintas especies bacterianas; en *Bacillus cereus* está prácticamente ausente (figura 7), mientras que en *Desulfotsea psychrophila* tiene una longitud de aproximadamente 1000 residuos (Altegoer et al., 2014, Beatson et al., 2006). Es la región más expuesta en la superficie del filamento (figura 6) y es la responsable de las propiedades antigénicas de la molécula, probablemente a esto se deba la gran variabilidad que presenta (Beatson et al., 2006).

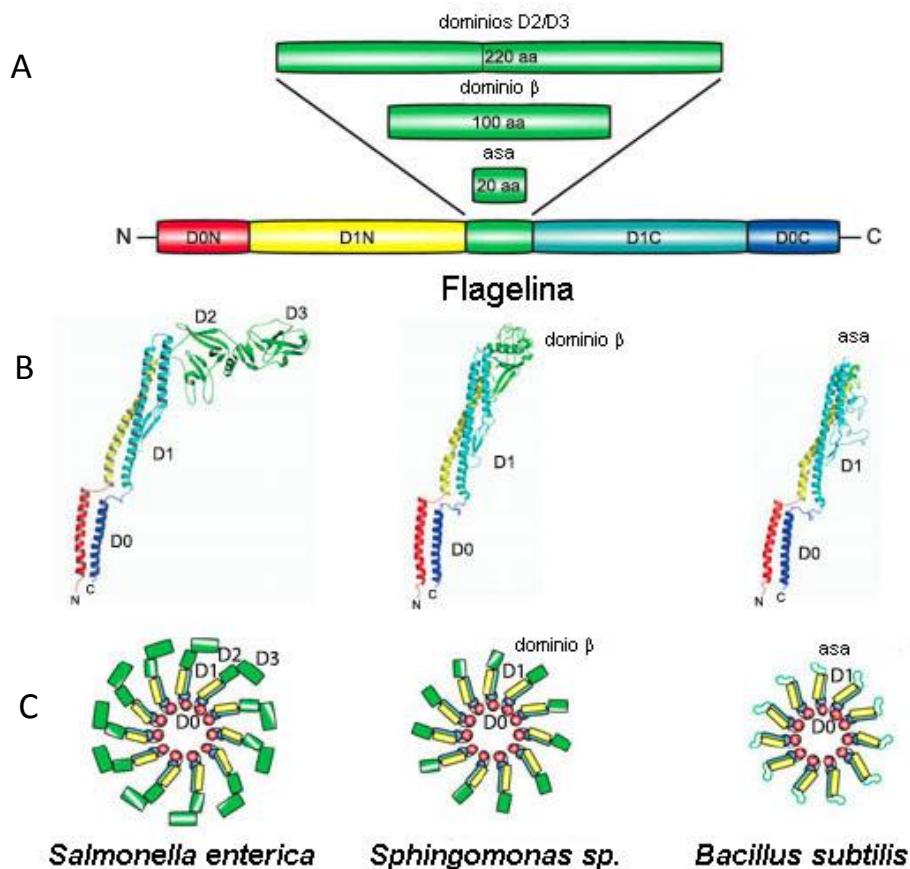


Figura 7. Arquitectura de los dominios de la flagelina. **A)** Esquema lineal de los dominios que componen a las flagelinas de *S. enterica*, *Spingomonas sp.* y *B. subtilis*. **B)** Modelos de las estructuras de las flagelinas mencionadas en A. **C)** Caricaturas de los filamentos formados por las distintas flagelinas. En azul y rojo, el dominio D0; en cian y amarillo el dominio D1 y en verde el dominio central. Modificado de: Altegoer, Schuhmacher et al., 2014.

A pesar de que *in vitro* la flagelina es capaz de autopolimerizar y formar filamentos, *in vivo* dicho proceso requiere necesariamente de la participación de una proteína llamada FliD o también conocida como la tapa del filamento “filament cap” o HAP2 (por “Hook-associated protein”). Debido a que las subunidades que se van incorporando al filamento tienen que viajar a través del canal interno cuyo diámetro es muy estrecho (30 Å) (figura 8 panel A y B), estas lo hacen en un estado semidesplegado y cuando finalmente llegan a la punta del filamento, adquieren su conformación tridimensional final (Yonekura et al., 2000).

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

FliD forma un decámero en solución (Imada, Vonderviszt et al., 1998), sin embargo, cuando se asocia a la punta del filamento lo hace en forma de pentámero (figura 8 panel C). Cada subunidad de flagelina que se incorpora obliga al pentámero de FliD a desplazarse siempre hacia el extremo distal del filamento en una posición energéticamente equivalente. La asimetría que existe entre el filamento y el pentámero de FliD le indican a la flagelina en que sitio incorporarse. La polimerización del filamento ocurre en un mecanismo rotatorio (Yonekura et al., 2000).

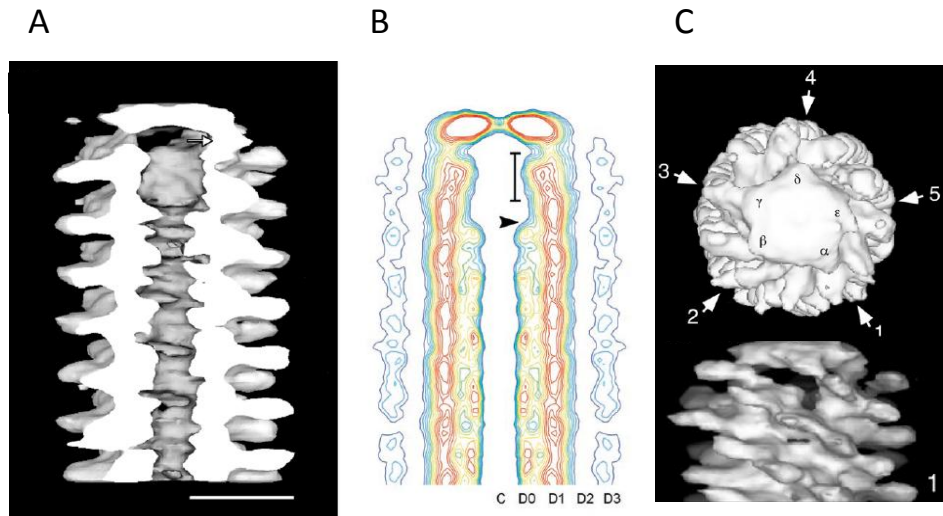


Figura 8. Mapa tridimensional de densidades electrónicas del complejo filamento-FliD. **A y B)** Complejo filamento-FliD, se observa el canal central (C) y los diferentes dominios de la flagelina (D0, D1, D2 y D3), la punta de flecha indica el inicio del pentámero de FliD. **C)** Pentámero de FliD situado sobre el extremo del filamento; vista superior (arriba) y vista lateral (abajo), se aprecia el sitio por el cual se propone que ocurre la incorporación de cada subunidad de flagelina con forma de L invertida. Imagen tomada de: Yonekura, Maki et al., 2000.

Gancho

El gancho es una estructura relativamente corta (55 nm en *S. enterica*) (Hirano, Yamaguchi et al., 1994), curva y flexible compuesta aproximadamente por 120 copias de la proteína FlgE dispuestas en un arreglo helicoidal (Fujii et al., 2009) (figuras 9 y 10). Su función es conectar el cuerpo basal con el filamento y transmitir la torca generada por el motor (Samatey et al., 2004b).

Para la cristalización de la proteína FlgE se empleó la misma estrategia utilizada en el caso de la flagelina, es decir, se eliminaron las regiones del N- y C-terminal; el producto resultante abarca de los residuos Arg71 a Ser369 de los 402 que posee la proteína silvestre de *S. enterica* (Samatey, Matsunami et al., 2004a). La estructura cristalográfica, junto con el modelo atómico muestran que la proteína FlgE está compuesta por tres dominios estructurales (D0, D1 y D2, figura 9 panel B) (Fujii et al., 2009, Shaikh, Thomas et al., 2005).

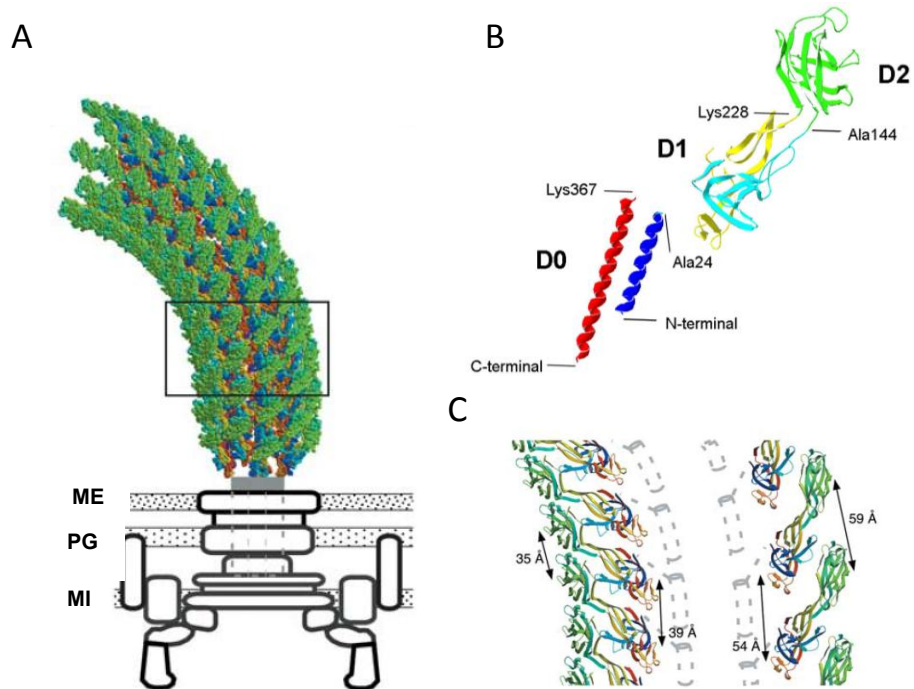


Figura 9. Modelo atómico del gancho y estructura terciaria de la proteína FigE. **A)** Modelo atómico del gancho curvo con una representación esquemática del cuerpo basal en la parte inferior: membrana externa (ME), peptidoglicano (PG) y membrana interna (MI). **B)** Estructura terciaria de la proteína FigE, se indican los diferentes dominios estructurales que la conforman. **C)** Imagen ampliada del gancho curvo, se esquematizan los protofilamentos localizados en la curvatura mayor y menor y el canal central formado por los dominios D0 (líneas punteadas grises). Imágenes tomadas de: Samatey, Matsunami et al., 2004b y de: Fujii et al., 2009.

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

Los dominios D1 y D2 están menos densamente empacados lo cual pudiera explicar la flexibilidad del gancho. Las interacciones intermoleculares que ocurren a nivel de estos dominios sufren una serie de cambios que permiten la extensión y compresión de cada protofilamento en aproximadamente 9 Å, dando como resultado una alta flexibilidad que permite que dicha estructura adquiera una forma curva (figura 9, panel C) (Fujii et al., 2009). Estos cambios de extensión y compresión deben ocurrir en cada vuelta que da el flagelo, es decir, aproximadamente 300 veces por segundo (Samatey et al., 2004b). Los tres dominios mencionados (D0, D1 y D2) se disponen en un arreglo radial del centro hacia el exterior de la estructura tubular del gancho (figura 10).

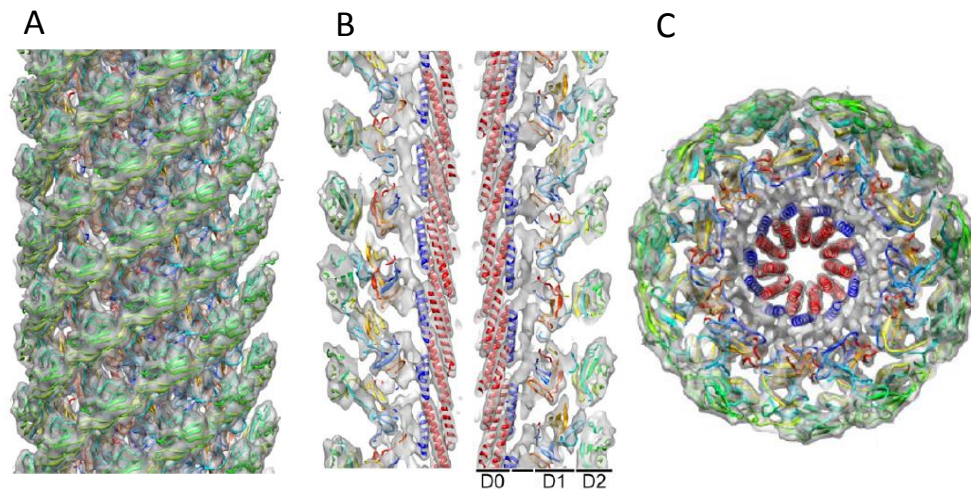


Figura 10. Mapa tridimensional de densidades electrónicas del gancho. **A)** Vista lateral de la superficie del gancho **B)** Corte longitudinal del gancho, se muestra el arreglo radial de los diferentes dominios de FlgE. **C)** Vista superior, el diámetro del gancho es de 180 Å, el canal interno mide 18 Å. Imagen tomada de: Fujii, Kato et al., 2009.

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

Existen 3 proteínas que se encuentran asociadas al gancho en algún punto de la biogénesis flagelar (proteína asociada al gancho HAP2), o de forma permanente (proteínas asociadas al gancho HAPs 1 y 3). La primera de ellas es la proteína HAP2, también llamada FliD de la cual se habló en la sección previa, las otras dos (HAP1 y HAP3) forman una interfase entre el filamento y el gancho permitiendo que ambas estructuras se acoplen (Homma, Kutsukake et al., 1984, Ikeda, Homma et al., 1987) (figura1).

Eje

El eje constituye la porción más proximal del continuo formado por las estructuras axiales (figura 1), su función es transmitir la torca generada por el motor hacia el gancho y el filamento. Se localiza parcialmente embebido en la parte superior del anillo MS (Francis, Sosinsky et al., 1994) y está rodeado por los anillos P y L en su región distal (DePamphilis & Adler, 1971b, Jones, Homma et al., 1987).

Estructura

El eje flagelar consiste en una porción distal formada por veintiséis subunidades de la proteína FlgG (Chevance et al., 2007, Okino et al., 1989) y una porción proximal formada por las proteínas FlgB, FlgC y FlgF, con aproximadamente 6 subunidades de cada una (Jones et al., 1990). En total el eje tiene una longitud de 25 nm de los cuales 10 corresponden a la región proximal y 15 nm a la distal (Chevance et al., 2007). El diámetro aproximado en la base es de 8 nm (Francis et al., 1994) y en el extremo distal de 18 nm (Okino et al., 1989). Además de las proteínas previamente mencionadas, existe una quinta proteína llamada FliE, la cual se propone que constituye una zona de unión o de interfase entre el anillo MS y la región más proximal del eje. Se piensa que es la responsable de la transición de la simetría anular del anillo MS a la simetría axial del eje (Minamino, Yamaguchi et al., 2000).

De acuerdo con el número de subunidades de cada proteína, se estima que las 6 subunidades de FlgB, FlgC y FlgF son suficientes para completar un giro; en cuanto a FlgG, esta podría completar hasta 4 giros (Chevance et al., 2007). Se ha estimado que la estequiometría de FliE en el cuerpo basal es de aproximadamente nueve subunidades (Müller, Jones et al., 1992)

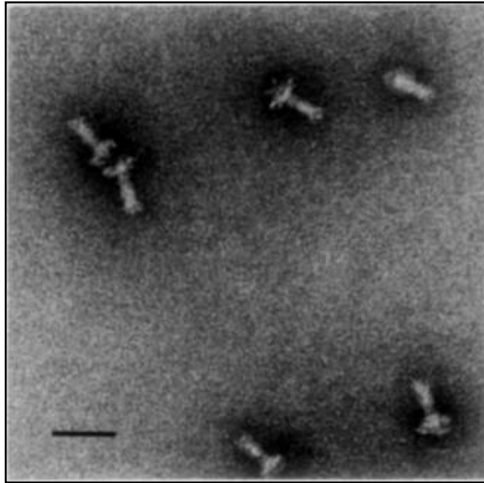


Figura 11. Imagen de microscopía electrónica de complejos anillo MS-eje, obtenidos a partir de una cepa mutante $\Delta flgI$ incapaz de ensamblar anillos P y L. La barra de escala corresponde a 50 nm. (Kubori, Shimamoto et al., 1992).

Características bioquímicas de FliE, FlgB, FlgC, FlgF y FlgG

Cada una de las 5 proteínas que componen al eje flagelar en *S. enterica* es capaz de polimerizar *in vitro* y formar fibras en presencia de altas concentraciones de NaCl. Dichas fibras son del tipo β -amiloide y no reflejan la polimerización que llevan a cabo *in vivo* durante la formación del eje (Saijo-Hamano, Uchida et al., 2004).

De las 5 proteínas, FlgG ha causado mayor interés entre los grupos de investigación que se dedican al estudio del ensamblaje del flagelo bacteriano. Esto se debe a que a diferencia del resto, que polimerizan para formar un solo giro, FlgG es capaz de formar 4 giros. Existen algunas mutantes puntuales de FlgG las cuales pierden el mecanismo de regulación de la longitud intrínseco y polimerizan hasta alcanzar la longitud del gancho (*flgG**) (figura 12) o en ausencia de FliK, llegan a medir 100 nm o más (figura 13) (Chevance et al., 2007).

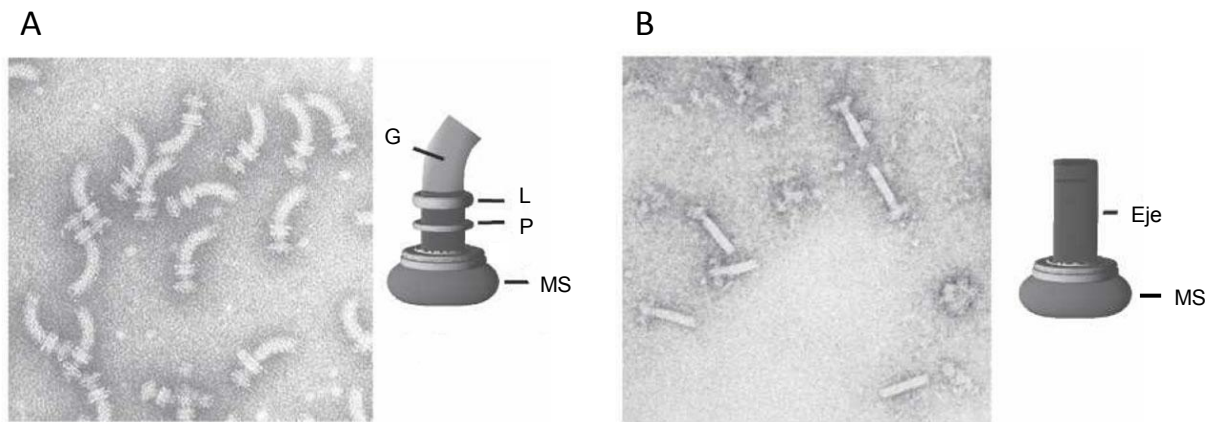


Figura 12. Mutaciones regulatorias en FigG tienen como resultado la formación de ejes filamentosos. **A)** HBBs aislados de la cepa silvestre de *S. enterica*. **B)** HBBs aislados a partir de una doble mutante $\Delta flgI$, $flgG^*$ (Chevance, Takahashi et al., 2007).

Estos resultados además de confirmar la localización de FigG en la región distal del eje, también apoyan la idea de que los anillos P y L polimerizan alrededor de dicha región, ya que se encontraron múltiples complejos de anillos P y L rodeando a ejes de longitud desregulada (poli-ejes) (figura 13).

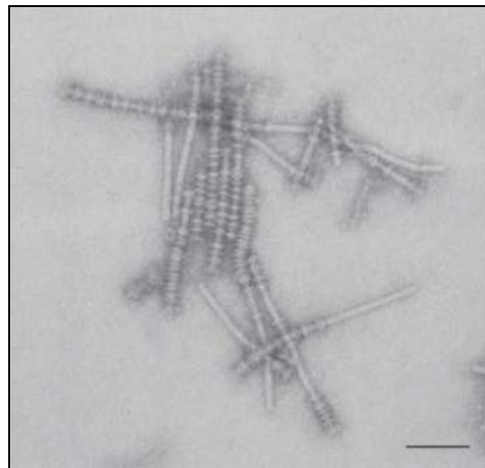


Figura 13. Estructuras flagelares obtenidas a partir de de una doble mutante $\Delta fliK$, $flgG^*$, la cual es capaz de ensamblar estructuras poli-ejes rodeadas de múltiples complejos de anillos P-L. La barra de escala representa 100 nm. (Chevance et al., 2007).

Ensamblaje

En cuanto a la localización de las 5 proteínas a lo largo del eje; se sabe que FlgG es la más distal, ya que se identificó asociada a la base del gancho en flagelos desprendidos del cuerpo basal como resultado de una mutación en la proteína del anillo MS (FliF) (figura 14, panel A) (Okino et al., 1989). Por otro lado, se ha sugerido que FliE se localiza en contacto con la cara periplásmica del anillo MS (Müller et al., 1992). FliE interacciona físicamente con FlgB, por lo que se propone que esta última es la proteína axial más próxima al cuerpo basal (Minamino et al., 2000).

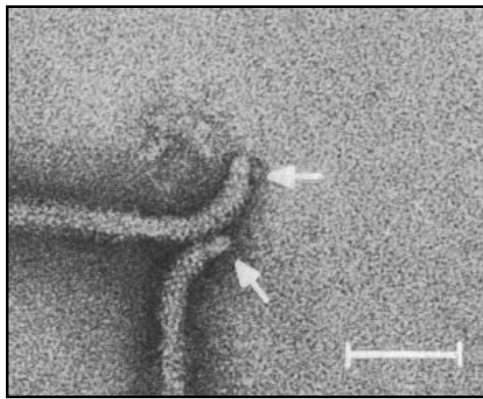


Figura 14. Localización de FlgG en eje flagelar de *S. enterica*. **A)** Imagen de microscopía electrónica de complejos filamento-gancho-eje desprendidos de una mutante puntual en *fliF*. La flecha blanca señala la porción compuesta por FlgG, la barra de escala corresponde a 100 nm. (Okino, Isomura et al., 1989).

En un trabajo reciente, se analizaron mediante la técnica de crio-tomografía electrónica mutantes de los genes que codifican para las proteínas que forman el eje flagelar de la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*. En la figura 15, se muestra la acumulación secuencial de una densidad electrónica globosa poco definida en las mutantes $\Delta fliE$, $\Delta flgB$, $\Delta flgC$ y $\Delta flgF$. Al analizar la mutante $\Delta flgG$, dicha densidad sufre un rearrreglo y adquiere la forma tubular característica del eje. A partir de estos resultados se propuso que el ensamblaje del eje flagelar ocurre de manera secuencial en el siguiente orden: FliE, FlgB, FlgC, FlgF y FlgG (Zhao et al., 2013).

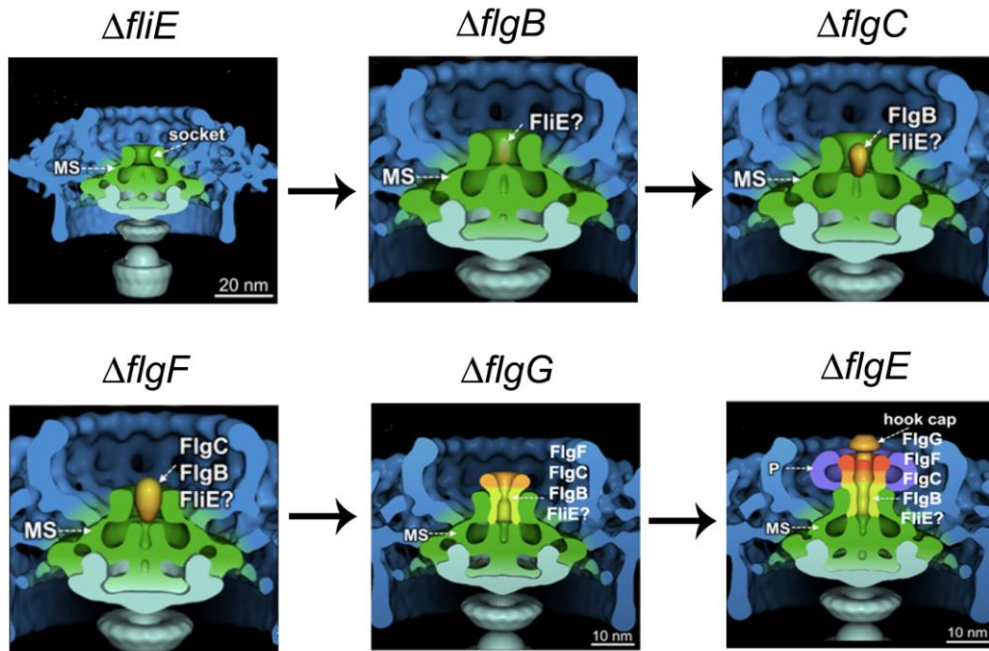


Figura 15. Ensamblaje secuencial del eje flagelar de *B. burgdorferi*. Reconstrucciones a partir de imágenes obtenidas mediante la técnica de crio-tomografía electrónica de diferentes cepas mutantes que carecen de los genes que codifican para las proteínas del eje flagelar. MS, anillo MS; P, anillo P. Imagen modificada de: Zhao, Zhang et al., 2013.

***R. sphaeroides* como modelo de estudio**

R. sphaeroides es una bacteria fotosintética no sulfurosa que pertenece al grupo de las α -proteobacterias. Esta bacteria posee dos sistemas flagelares que son mutuamente excluyentes, ambos sistemas le permiten nadar en medio líquido y ninguno le confiere la capacidad de desplazarse sobre superficies sólidas como ocurre con otras bacterias que poseen dos sistemas flagelares ((McCarter, 2004)). El sistema flagelar 1 (Fla1) produce un único flagelo de localización subpolar, mientras que el segundo sistema flagelar (Fla2) produce varios flagelos polares (4.6 en promedio, figura 16) (de la Mora et al., 2015).

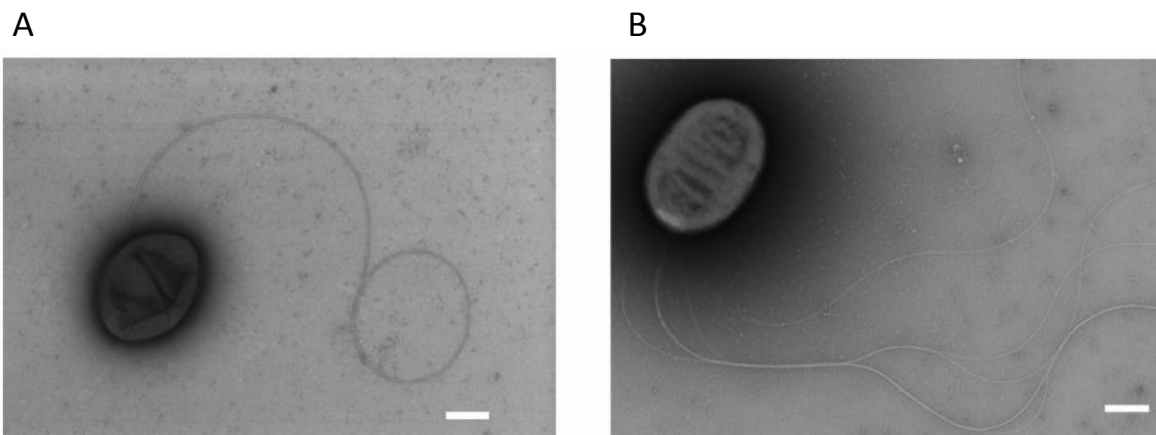


Figura 16. *R. sphaeroides* posee 2 sistemas flagelares **A)** Imagen de microscopía electrónica de la cepa silvestre WS8 N, se observa un único flagelo de localización subpolar que corresponde al sistema flagelar 1 (fla1). **B)** Imagen de microscopía electrónica de la cepa AM1 (fla1⁻), se observan múltiples flagelos polares que corresponden al sistema flagelar 2 (fla2). Las barras de escala representan 500 nm. (de la Mora et al., 2015).

Existen diferencias estructurales entre ambos sistemas flagelares, por ejemplo: el filamento del sistema flagelar 1 (Fla1) es más ancho que el del sistema flagelar 2 (Fla2), mientras que la longitud del gancho es mayor en este último (figura 17), además, este gancho es capaz de adoptar diferentes formas (recto, curvo y en forma de “s”) a diferencia del gancho del Fla1 que es invariablemente recto; ambos ganchos presentan una longitud mayor a la reportada en *S. enterica* (Fla1, 94 nm; Fla2, 121 nm). Otra diferencia evidente es la prominencia de la región entre el gancho y el filamento, lo cual se debe a la longitud inusual de la proteína FlgK (1363 aa) que forma dicha región (Castillo, Ballado et al., 2009) (figura 17).

A nivel del cuerpo basal, la principal diferencia está dada por la presencia de una estructura adicional en el Fla1 llamada anillo H, dicha estructura está formada al menos en parte por la proteína FlgT (Fabela, Domenzain et al., 2013, Terashima, Koike et al., 2010, Terashima, Li et al., 2013).

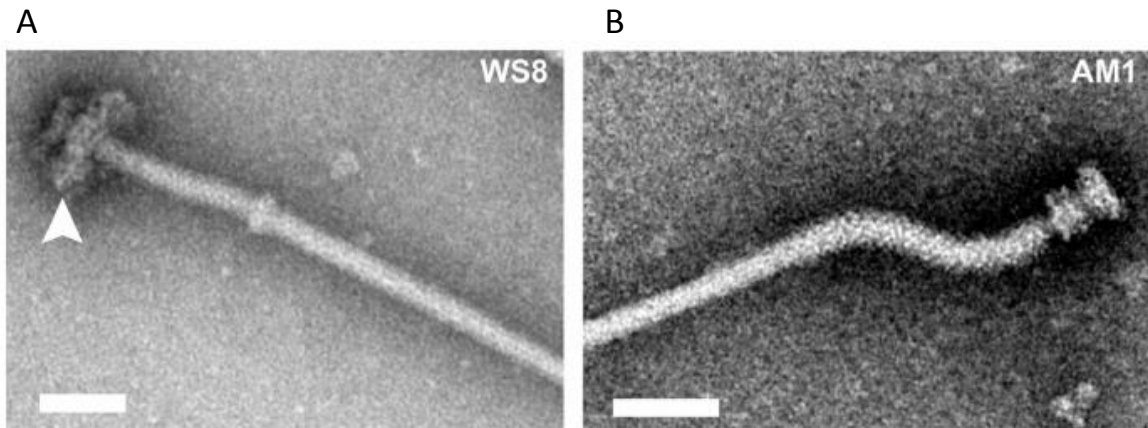


Figura 17. Estructura de los 2 tipos de flagelos que posee *R. sphaeroides*. **A)** Complejos filamento-gancho-cuerpo basal aislados de la cepa WS8 que expresa el sistema flagelar 1, Fla1 y **B)** de la cepa AM1 que expresa el sistema flagelar 2, Fla2. Las barras de escala corresponden a 50 nm. La punta de flecha en el panel A señala la presencia del anillo H. (de la Mora, Uchida et al., 2015).

El sistema flagelar 1 es utilizado por esta bacteria en las condiciones estándares de cultivo, mientras que la expresión del sistema flagelar 2 ocurre en cepas que carecen de genes estructurales o regulatorios que impiden la formación del sistema flagelar 1 (Martínez-del Campo, Ballado et al., 2011, Vega-Baray, Domenzain et al., 2015).

La presencia de dos sistemas flagelares así como los potenciales usos biotecnológicos de *R. sphaeroides* debido a su versatilidad metabólica (Nybo, Khan et al., 2015, Porter, Wilkinson et al., 2011) la convierten en un excelente modelo de estudio.

Planteamiento del problema

A pesar de que se han realizado una enorme cantidad de estudios estructurales sobre otras proteínas axiales (proteína del gancho y flagelina) (Samatey et al., 2004b, Yonekura et al., 2003), son muy pocos los datos estructurales que se conocen sobre las proteínas que conforman al eje flagelar.

Las características del eje que complican su estudio son: se trata de una estructura de dimensiones muy pequeñas, en *S. enterica* tiene una longitud de 25 nm y un diámetro que va de los 8 a los 18 nm (Chevance et al., 2007, Francis et al., 1994), lo cual dificulta su visualización por técnicas microscópicas. Aunado a lo anterior, la región proximal del eje se encuentra embebida en la cara periplásmica del anillo MS y la región distal se encuentra rodeada por los anillos P y L (Jones et al., 1987).

A diferencia del gancho y del filamento que están formados por múltiples copias de una sola proteína (FlgE y FliC respectivamente), el eje está formado por 5 proteínas diferentes en un número de copias muy reducido que va de 6 (FlgB, FlgC y FlgF), a 9 (FliE) y hasta 26 en el caso de FlgG (Jones et al., 1990).

Hasta el momento no se sabe con certeza el orden en que las proteínas que componen al eje son incorporadas al complejo durante su polimerización. A pesar de que las 5 proteínas pertenecen a la misma clase de exportación, es decir, se exportan a través del sistema de secreción flagelar indiscriminadamente (Hirano, Minamino et al., 2003); su ensamblaje parece seguir un orden secuencial. Es importante establecer el orden de ensamblaje así como entender cuáles son las propiedades que lo determinan.

El estudio de complejos proteicos autoensamblables ha resultado de gran interés principalmente por las aplicaciones nanotecnológicas que se les podrían dar (estructuras de andamiaje, nano fibras o nano polímeros con propiedades definidas, vehículos para el transporte de otras moléculas, etc.) (Altegoer et al., 2014). Las estructuras axiales flagelares y en particular el filamento se han convertido en un templado atractivo para diferentes aplicaciones biotecnológicas.

El eje al estar formado por diferentes proteínas, presenta distintas propiedades arquitectónicas a lo largo de su estructura y es capaz de interactuar con otros complejos a través de regiones particulares. Estas características lo convierten en un modelo más versátil para distintas aplicaciones, además es capaz de autoregular su longitud probablemente gracias a propiedades intrínsecas de las proteínas que lo componen; por lo anterior, también es interesante estudiar las características bioquímicas y estructurales de estas proteínas.

HIPÓTESIS:

El ensamblaje del eje flagelar de *R. sphaeroides* ocurre de manera secuencial en un orden que depende de las interacciones que existen entre las proteínas que lo conforman.

OBJETIVOS:

Generales

- Caracterizar bioquímicamente a las proteínas que componen al eje del sistema flagelar 1 (Fla1) de *R. sphaeroides*.
- Estudiar las interacciones físicas que ocurren entre estas proteínas.

Particulares

- Sobreexpresar en *E. coli* y purificar a las proteínas que componen al eje flagelar de *R. sphaeroides*.
- Obtener información estructural de dichas proteínas mediante la predicción de modelos de estructura terciaria *in silico* y análisis por dicroísmo circular.
- Conocer el estado de oligomerización de estas proteínas mediante la técnica de cromatografía líquida de exclusión molecular por FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).
- Estudiar las interacciones entre estas proteínas *in vitro* con ensayos de inmuno réplica de afinidad e *in vivo* mediante experimentos de entrecruzamiento químico en cuerpos basales flagelares purificados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios y condiciones de cultivo.

Las diferentes cepas de *Rhodobacter sphaeroides* se crecieron en medio Sistrom (Sistrom, 1962): KH_2PO_4 20 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.78 mM, ácido succínico 34 mM, ácido L-glutámico 0.67 mM, ácido L-aspartico 0.25 mM, NaCl 8.5 mM, ácido nitrilotriacético 1.04 mM, MgSO_4 1.2 mM, CaCl_2 0.23 mM, FeSO_4 0.007 mM, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0.16 μM y 0.01% v/v de solución de elementos traza (EDTA 4.7 mM, ZnSO_4 38 mM, FeSO_4 18 mM, MnSO_4 9 mM, CuSO_4 1.5 mM, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 0.9 mM y H_3BO_3 1.8 mM), pH 7.0 (ajustado con KOH). Posterior a su esterilización se añadió 0.1% v/v de solución de vitaminas (ácido nicotínico 1%, tiamina 0.5% y biotina 0.01%), previamente esterilizada por filtración. En el caso de medio sólido se añadió 2% p/v de bacto-agar.

Los cultivos líquidos se crecieron a 30°C en agitación constante (250 rpm), cuando fue necesario se adicionó espectinomycinina [50 $\mu\text{g}/\text{mL}$].

Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio LB (Bertani, 1951): triptona 1% p/v, Extracto de levadura 0.5% p/v y NaCl 1% p/v; a 37°C en agitación constante (250 rpm), cuando se requirió, se adicionaron los siguientes antibióticos: kanamicina [50 $\mu\text{g}/\text{L}$], ampicilina [200 $\mu\text{g}/\text{L}$] y cloranfenicol [34 $\mu\text{g}/\text{L}$].

Cepas, plásmidos y oligonucleótidos.

Las cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este estudio se enlistan en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos.

Cepas o plásmidos	Características relevantes	Referencia
Cepas		
<i>E. coli</i>		
Top10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻	Invitrogen
JM109	<i>hdsR17</i> Δ(<i>lac-pro</i>) F' <i>traD36 proAB lacZ</i> ΔM15	(Yanisch-Perron, Vieira et al., 1985)
M15[pREP4]	<i>thi lac⁻ ara⁻ gal⁻ mtf⁻ F['] recA⁺ uvr⁺ lon⁺</i> ; plásmido pREP4; Kan ^r	Qiagen
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3) pLysS(cm ^R)	Promega
<i>R. sphaeroides</i>		
WS8-N	Cepa silvestre; Nal ^r	(Sockett, Foster et al., 1990)
DC	<i>flgK::aadA</i>	(Castillo et al., 2009)
Plásmidos		
pQE30	Vector de sobreexpresión; Amp ^r , etiqueta His ₆ N-terminal	Qiagen
pET19b	Vector de sobreexpresión ; Amp ^r , etiqueta His ₁₀ N-terminal	Novagen
pRSFiiE	<i>fliE</i> clonado en los sitios SacI/HindIII de pQE-30	Este trabajo
pRSFiiB	<i>flgB</i> clonado en los sitios BamHI/HindIII de pQE-30	Este trabajo
pRSFiiC	<i>flgC</i> clonado en los sitios NdeI/BamHI de pET-19b	Este trabajo
pRSFiiF	<i>flgF</i> clonado en los sitios KpnI/HindIII de pQE-30	Este trabajo
pRSFiiFΔD0	<i>flgF</i> ΔD0 clonado en los sitios KpnI/HindIII de pQE-30	Este trabajo
pRSFiiG	<i>flgG</i> clonado en los sitios NdeI/BamHI de pET-19b	Este trabajo
pRSFiiGΔD0	<i>flgG</i> ΔD0 clonado en los sitios NdeI/BamHI de pET-19b	Este trabajo
Oligonucleótidos		
	5' 3'	
<i>fliE</i> _{fw}	cgatgagctc atg accatccagtcgatcagc	Este trabajo
<i>fliE</i> _{rv}	cgataagctt tca gaccggcatgttcatgat	Este trabajo
<i>flgB</i> _{fw}	cgatggatcc atg acgggatttcgcatcag	Este trabajo
<i>flgB</i> _{rv}	cgataagctt tca attcccccttgatcgccgt	Este trabajo
<i>flgC</i> _{fw}	ggaattccat atg agcgggatcgacagtgctcttc	Este trabajo

flgCrv	cgcggatcct tca ctgccccatgctggcggt	Este trabajo
flgFfw	cggggtacc gac gggctgatccacaccgcg	Este trabajo
flgFrv	cgataagctt tca ctcgggcgacgcaggag	Este trabajo
flgFΔD0fw	cggggtacc gcg atggacgcggcctcggcg	Este trabajo
flgFΔD0rv	cgataagctt tca cgtattgacgttcgagccata	Este trabajo
flgGfw	ggaattccatatg tcc accaatgcatgcatgtc	Este trabajo
flgGrv	cgcggatcct tca gagcttggtgaaagata	Este trabajo
flgGΔD0fw	ggaattccatatg tac cagacctggaagcccggc	Este trabajo
flgGΔD0rv	cgcggatcct tca cacgttgacgttcgaggcttc	Este trabajo

Técnicas de biología molecular.

Se utilizaron técnicas estándares de biología molecular para el aislamiento y purificación de DNA cromosomal de *R. sphaeroides* WS8-N (Ausubel, 1987). Los plásmidos y fragmentos de DNA amplificados mediante PCR se purificaron con los kits QIAprep spin y QIAquick PCR respectivamente (Qiagen), los productos se clonaron en el plásmido correspondiente utilizando los sitios de restricción que se indican en la tabla 1. La secuenciación de DNA se realizó en un secuenciador automático ABS-Prism de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM; las reacciones de PCR se llevaron a cabo con la enzima Pfu Turbo (Invitrogen) y los oligonucleótidos se sintetizaron por Sigma-Aldrich.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

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

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

Se crecieron 10 mL de cultivo de la cepa deseada hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{550nm})=0.5, posteriormente se incubaron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 3,500 xg durante 10 min. El sobrenadante se decantó y el paquete celular se resuspendió en 5 mL de una solución a 4°C de $CaCl_2$ 100 mM; se incubó en hielo durante 20 min. Nuevamente se centrifugó en las mismas condiciones, el sobrenadante se decantó y el paquete celular se resuspendió esta vez en 666 μ L de la solución de $CaCl_2$ 100 mM. Las células se incubaron 24 h a 4°C, pasado ese tiempo se tomaron alícuotas de 200 μ L y se añadió el DNA; se incubó durante 1 h. Las células se sometieron a un choque de calor a 43°C por 2 min e inmediatamente se incubaron en hielo por 2 min más; se añadió el volumen necesario de medio LB para completar a 1 mL y se incubó durante 1 h a 37°C. Por último, las células transformadas se sembraron en cajas Petri con medio LB sólido (2% p/v de agar) en presencia del agente selectivo (ver tabla 1) y se incubaron por 12 h a 37°C.

Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes SDS-PAGE.

La separación de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli, 1970); se utilizaron geles al 15 o 17.5%. Los geles se corrieron a un voltaje de 100 V durante aproximadamente 1.5 h, posteriormente se tiñeron con una solución de azul de Coomassie R250 al 2% p/v, en 50% v/v de metanol y 10% v/v de ácido acético. Se utilizaron marcadores de peso molecular (New England Biolabs).

Generación de anticuerpos policlonales e Inmuno réplica tipo Western.

Los anticuerpos policlonales dirigidos contra cada una de las 5 proteínas que componen al eje flagelar de *R. sphaeroides* se generaron en conejos machos de la raza New Zealand. El antisuero se obtuvo de la sangre total y las gamma globulinas se precipitaron dos veces con sulfato de amonio (Harlow & Lane, 1988).

Las proteínas sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida SDS, se transfirieron posteriormente a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m en una cámara húmeda con amortiguador de transferencia ($NaHCO_3$ 10 mM, Na_2CO_3 3 mM y metanol 20% v/v) a 350 miliamperios por 1.5 h a temperatura ambiente.

La membrana se incubó en una solución al 5% p/v de leche baja en grasas (marca comercial *velty*) en amortiguador TTBS (NaCl 0.5 M, Tris-base 2.4 mM, pH 7.5 y Tween-20 0.01% v/v) durante 1 h y se realizaron tres lavados con 25 mL de amortiguador TTBS de 15, 10 y 5 min. Se incubó con el anticuerpo primario en diferentes diluciones según se requirió, en un volumen de 10 mL de amortiguador TTBS durante 1 h, se repitieron los tres lavados y cuando fue necesario se incubó en las mismas condiciones con el anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa (GE Healthcare Life Science), se hicieron nuevamente los lavados y se reveló mediante una reacción quimioluminiscente de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante (GE Healthcare Life Science). La quimioluminiscencia se registró en placas radiográficas (Kodak).

Sobreexpresión y purificación de FliE, FlgB y FlgC en condiciones desnaturizantes.

Las cepas de *E. coli* M15[Prep4] que contienen los plásmidos PRSFliE y PRSFlgB se crecieron hasta una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.5, en este punto se añadió el inductor IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopironósido) a una concentración final de 0.1 mM y se incubó por 3 h. En el caso de la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS que contiene el plásmido PRSFlgC, se creció hasta una DO_{600nm} de 0.8 y se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM; la inducción se dejó proceder durante 1h.

Los cultivos se centrifugaron a 3,500 xg por 15 min y el paquete celular se resuspendió en 10 mL de amortiguador 20 mM Tris-HCl pH 8.5. Se sonicó 6 veces durante 1 min cada una, haciendo uso de un sonicador Branson modelo 250, las células se mantuvieron en hielo en todo momento para evitar el calentamiento. El extracto celular resultante se centrifugó a 12,000 xg durante 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante.

Las proteínas FliE y FlgB forman cuerpos de inclusión por lo que su purificación se realizó en condiciones desnaturizantes (amortiguador 20 mM Tris-HCl pH 8.5, GuHCl 6M), se sonicó durante 1 min dos veces y se incubó en agitación por 1 h a 4°C. La proteína FlgC, a pesar de ser soluble, es rápidamente degradada por la acción de proteasas endógenas y se pierde durante la purificación, por tal motivo se procedió a romper las células en condiciones desnaturizantes y se incubó en agitación a 4°C por 1 h (Saijo-Hamano, Namba et al., 2000). Los cuerpos de inclusión solubilizados en el caso de FliE y FlgB o el extracto celular en el

caso de FlgC se centrifugaron a 160,000 xg por 1 h, se recuperó el sobrenadante y se incubó con 500 µL de resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen) durante 2 h en agitación constante a 4°C.

Las proteínas contaminantes se removieron de la resina mediante lavados con amortiguador 6 M GuHCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.5 y concentraciones crecientes de imidazol (10, 20 y 30 mM). Finalmente, se utilizó una concentración de 100 mM de imidazol para eluir a la proteína purificada.

La fracción que contiene a la proteína purificada se dializó en amortiguador 20 mM Tris-HCl pH 8.5 para su renaturalización y para retirar el imidazol. La diálisis se realizó a 4°C en agitación constante. En el caso de FlgB, se añadió NaCl a una concentración final de 250 mM al amortiguador de diálisis por las razones que se indican en los resultados. Por último, las proteínas se concentraron en un sistema de ultrafiltración de la marca Millipore (Amicon Ultra 10,000 MWCO) y se determinó la cantidad de proteína por el método que se describe más adelante.

Sobreexpresión y purificación de FlgF y FlgG y de las mutantes FlgFΔD0 y FlgGΔD0 en condiciones nativas.

Las cepas de *E. coli* M15[Prep4] que contienen los plásmidos PRSFlgF y PRSFlgFΔD0, así como las cepas BL21(DE3)pLysS que contienen los plásmidos PRSFlgG y PRSFlgGΔD0 se crecieron hasta una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.5, en este punto se añadió el inductor IPTG a una concentración final de 0.1 mM y se incubó por 3 h en el caso de FlgF y FlgFΔD0, mientras que en el caso de FlgG y FlgGΔD0, se utilizó una concentración de 1 mM de IPTG y la inducción se incubó por 2 h.

Los cultivos se centrifugaron a 3,500 xg por 15 min y el paquete celular se resuspendió en 10 mL de amortiguador 20 mM Tris-HCl pH 8.5. Se sonicó 6 veces durante 1 min, las células se mantuvieron en hielo en todo momento para evitar el calentamiento. El extracto celular resultante se centrifugó a 12,000 xg durante 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se incubó con 500 mL de resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen) durante 2 h en agitación constante a 4°C.

Las proteínas contaminantes se removieron de la resina mediante lavados con amortiguador 20 mM Tris-HCl pH 8.5 y concentraciones crecientes de imidazol (10, 20 y 30

mM). Finalmente, se utilizó una concentración de 250 mM de imidazol para eluir a la proteína purificada. La fracción que contiene a la proteína purificada se dializó en amortiguador 20 mM Tris-HCl pH 8.5 para retirar el imidazol, la diálisis se realizó a 4°C en agitación constante.

Por último la proteína se concentró en un sistema de ultrafiltración de la marca Millipore (Amicon Ultra 10,000 MWCO) y se determinó la cantidad de proteína por el método que se describe más adelante.

Cuantificación de proteína.

Para determinar la concentración de proteína, se utilizó el método TCA-Lowry (Peterson, 1977); la fracción de proteína a cuantificar se disolvió en 1 mL de agua, se añadieron 100 µL de desoxicolato de sodio al 0.15% v/v y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, se añadieron 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 72% v/v y se agitó vigorosamente. Se centrifugó a 8,500 xg durante 10 min, se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 mL de una solución CuSO₄ 0.04 mM, citrato de sodio 0.07 mM, Na₂CO₃ 190 mM y NaOH 100 mM; se incubó durante 10 min y se añadieron 100 µL de una solución de Folín 1:1. Se incubó durante 30 min y se determinó la absorbancia a 750 nm. La curva estándar se realizó con albúmina sérica bovina (Sigma) a diferentes concentraciones (de 0.1 a 1 mg/mL).

Predicción de estructura terciaria de las 5 proteínas que componen al eje flagelar.

Los modelos de estructura terciaria de las 5 proteínas que componen al eje flagelar de *R. sphaeroides* se obtuvieron a través de 2 servidores diferentes: el servidor Robetta (<http://robeta.bakerlab.org>) de la Universidad de Washington (Raman et al., 2009) y el programa Quark del servidor Zhang Lab (<http://zhanglab.ccmb.umich.edu/Quark/>) de la Universidad de Michigan (Roy et al., 2010). Ambos servidores generaron un total de 5 modelos para cada proteína; para las proteínas FliE y FlgG, se escogieron los modelos número 1 del servidor Zhang Lab y para las proteínas FlgB, FlgC y FlgF se seleccionaron los modelos número 1 del servidor Robetta.

Análisis de estructura secundaria por dicroísmo circular.

Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron mediante un espectrofotómetro AVIV modelo 202-0, en UV lejano (195-260 nm). Se utilizaron las proteínas purificadas a una

concentración de 20 μM en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8.5 (en los casos en que se indica se añadió 250 mM NaCl). Las mediciones se realizaron a 25 °C en una celda de cuarzo de 0.1 mm a un intervalo de 1 nm y a una velocidad de 20 nm/min. La deconvolución de los espectros se realizó con el programa CDNN 2.1 (Böhm, Muhr et al., 1992).

Cromatografía líquida de exclusión molecular.

Los ensayos de cromatografía líquida se realizaron en un sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare), se utilizó una columna de exclusión molecular Superdex 200 HR 10/30, equilibrada con amortiguador 20 mM Tris-HCl pH 8.5 (en los casos en los que se indica, se añadió 250 mM NaCl); se utilizó un flujo de 0.2 mL/min. Se inyectó un volumen de 500 μL a una concentración de [1 mg/mL] de cada proteína. Cada trazo representa un experimento independiente. Para el cálculo de la masa molecular se utilizó una mezcla estándares comerciales de masa molecular conocida (Sigma-Aldrich): citocromo c, 12.4 kDa; anhidrasa carbónica, 29 kDa; albúmina sérica bovina (BSA), 66 kDa y β -amilasa, 200 kDa.

Ensayos *in vitro* de interacción proteína-proteína por inmuno réplica de afinidad.

Los ensayos de inmuno réplica de afinidad se llevaron a cabo de acuerdo a Hall (Hall, 2004). Se cargaron 0.05 nmoles de cada proteína purificada en geles SDS 17.5% p/v de acrilamida y posteriormente se transfirieron en membranas de nitrocelulosa. Dichas membranas se bloquearon como se indica en el apartado de inmuno réplica tipo Western y se realizaron 3 lavados con 25 mL de amortiguador TTBS (15, 10 y 5 min.). Se incubó durante 1h a temperatura ambiente con la proteína prueba purificada, la cual se añadió directamente al amortiguador TTBS a diferentes concentraciones: FliE [1.2 $\mu\text{g/mL}$], FlgB [1.5 $\mu\text{g/mL}$], FlgC [12 $\mu\text{g/mL}$], FlgF [1.2 $\mu\text{g/mL}$] y FlgG [2 $\mu\text{g/mL}$].

Se retiró el exceso de proteína soluble que se añadió externamente mediante lavados de 25 mL del mismo amortiguador (15, 10 y 5 min.), después se incubó por 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal generado para cada proteína en las siguientes diluciones: anti-FliE, anti-FlgB and anti-FlgF 1:20,000 y anti-FlgG 1:100,000. Dichas concentraciones se establecieron para evitar cualquier reacción inespecífica con las proteínas inmovilizadas en la membrana. Finalmente se incubó durante 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa (Amersham) en dilución 1:10,000,

se realizaron los lavados correspondientes y se registró la señal como se indica previamente en el apartado de inmuno réplica tipo Western.

En el caso de FlgC, se trabajó con una versión de la proteína doblemente etiquetada, ya que se le añadió una etiqueta de “FLAG” entre la etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal y la metionina inicial; se utilizó un anticuerpo monoclonal comercial anti-FLAG acoplado a la enzima peroxidasa (Sigma Aldrich) en dilución 1:5,000.

Purificación de complejos flagelares cuerpo basal-gancho (Hook Basal Body, HBB).

Aislamiento.

Se inocularon 500 mL de medio Siström (Siström, 1962) sin succinato con 5 mL de un cultivo en fase estacionaria de la cepa mutante DC de *R. sphaeroides* y se incubó a 30°C en agitación constante (250 rpm) hasta una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.33. Se cosecharon las células y se centrifugó a 4,000 xg durante 20 min, se decantó el medio y se limpió el interior de la botella sin perturbar el paquete celular. Las células se resuspendieron suavemente con ayuda de una espátula en amortiguador 150 mM Tris, 500 mM sacarosa, manteniendo siempre las células en hielo.

Las células resuspendidas se decantaron en un vaso de precipitados y se agitó suavemente durante 10 min a 4°C. Se añadieron 100 µL de una solución fresca de lisozima a una concentración de [10 mg/mL] girando lentamente el émbolo de la micropipeta, se dejó agitar durante 5 min más. Pasado dicho tiempo se agregó 1 mL de una solución 20 mM EDTA igualmente girando muy despacio el émbolo de la micropipeta para evitar una alta concentración local y se dejó en agitación durante 5 min. Se agitó durante 50 min más a temperatura ambiente.

Se añadió 1 mL de tritón X-100 al 10% v/v y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min, posteriormente se agregaron 600 µL de $MgSO_4$ 0.1 M y se dejó agitar por 5 min más, después se añadió 1 mg de DNasa 1 (Roche) y se incubó en agitación durante aproximadamente 10 min a temperatura ambiente hasta que se perdió completamente la viscosidad. Se añadieron 600 µL de EDTA 0.1 M. y 10 mL más de amortiguador 150 mM Tris, 500 mM sacarosa.

Se centrifugó a 9,800 xg durante 10 min y se recuperó el sobrenadante. Nuevamente se centrifugó, esta vez a 109,000 xg durante 1 h, se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 200 µL de amortiguador 10 mM HEPES, 1mM EDTA, 0.1% Tritón X-100 pH 8.0 (HET). Se centrifugó a 3000 xg para retirar el material insoluble.

Purificación.

Se juntaron 5 aislamientos de HBBs a partir cultivos de 500 mL y se sometieron a un gradiente de CsCl 34% en amortiguador 10 mM HEPES, 0.1% Tritón X-100, 1mM EDTA pH 8.0. Se centrifugó a 20,000 rpm en un rotor SW40 (Beckman Coulter) durante 21 h a 20°C. Se recuperó la banda correspondiente a los HBBs puros, se diluyó en amortiguador HET y se ultracentrifugó a 109,000 xg por una hora para retirar el exceso de CsCl. El botón se resuspendió en el mismo amortiguador HET.

Microscopía electrónica.

Las muestras se tiñeron negativamente con ácido fosfotúngstico al 2% p/v y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión modelo JEM-1200EXII (JEOL, Tokyo). Las micrografías se tomaron con una cámara digital Gatan 11-Mp a una aceleración de 80 kV.

RESULTADOS

Análisis de secuencia de las proteínas que componen al eje flagelar de *R. sphaeroides*.

R. sphaeroides posee homólogos de los genes que codifican para las 5 proteínas que constituyen el eje flagelar en *S. enterica*. La proteína FliE tiene una longitud de 107 residuos, seguida de FlgB y FlgC con 128 y 138 residuos, las proteínas de mayor longitud son FlgF y FlgG con 251 y 262 residuos respectivamente (figura 18).



Figura 18. Esquema lineal de las proteínas que componen al eje flagelar de *R. sphaeroides*, En azul y rojo se indican las estructuras α -hélice del N- y C- terminal respectivamente. Los esquemas están hechos a la misma escala y se indica el número de residuos que componen a cada una al final.

El análisis de la secuencia de estas proteínas permite identificar dos zonas conservadas entre FlgB, FlgC, FlgF y FlgG; la primera comprende aproximadamente a los primeros 50 residuos de la región N-terminal y la segunda aproximadamente a los últimos 50 residuos en la región C-terminal (figura 19). Además de estas regiones, se distingue un tercer dominio, el cual tiene una longitud de apenas 28 residuos en FlgB y aumenta su tamaño hasta alcanzar una longitud de 162 residuos en el caso de FlgG. Dicho dominio es el responsable del aumento de tamaño en estas proteínas (figura 18). FliE no es homóloga al resto de las proteínas, por tal motivo no se incluyó en los alineamientos.

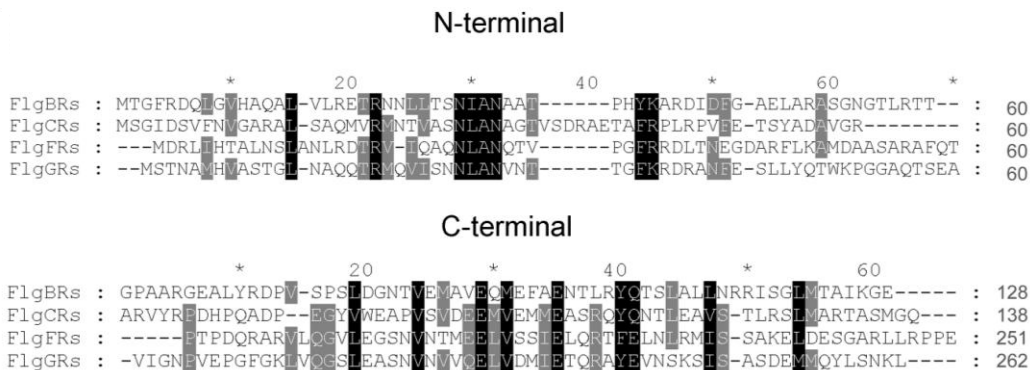


Figura 19. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de los primeros 50 residuos del N-terminal y los últimos 50 residuos del C-terminal de FlgB, FlgC, FlgF y FlgG de *R. sphaeroides*. El alineamiento se realizó con el programa MUSCLE. En negro se subrayan los aminoácidos más conservados y en gris aquellos que se conservan únicamente en 3 de las 4 secuencias.

Sobreexpresión y purificación de las proteínas que componen al eje flagelar de *R. sphaeroides*.

Los genes *fliE*, *flgB* y *flgF* se clonaron en el vector de sobreexpresión pQE-30 (Qiagen) el cual añade una etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal. Los plásmidos resultantes se transformaron en la cepa de *E. coli* M15[pREP4]. Se realizaron curvas de inducción con 0.1 mM IPTG y se tomaron alícuotas cada hora. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida, en los 3 casos se observó una banda que corresponde a la proteína de interés ya que migró a la altura esperada conforme a las predicciones de la masa molecular de cada proteína recombinante (FliE, 12.9 kDa; FlgB, 15.3 kDa y FlgF 29.3 kDa) (figura 20). Adicionalmente se confirmó la presencia de cada una de las 3 proteínas recombinantes mediante ensayos de inmuno réplica tipo Western utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente la etiqueta añadida por el vector (dato no mostrado).

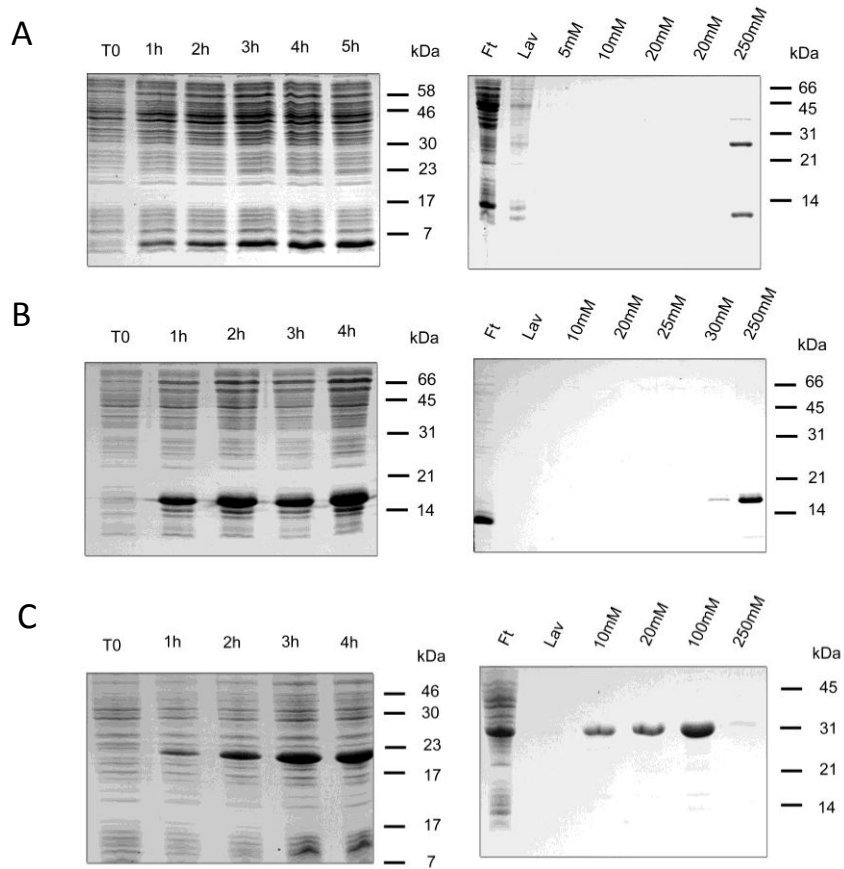


Figura 20. Inducción y purificación de las proteínas FliE, FlgB y FlgF de *R. sphaeroides*. Inducción y purificación de FliE (A), FlgB (B) y FlgF (C). Geles SDS, 17.5% de acrilamida, teñidos con azul de Coomassie. Las concentraciones que se indican en la parte superior de los geles de la columna derecha corresponden a las concentraciones de imidazol utilizadas en cada elución.

Los genes *flgC* y *flgG* se clonaron en el vector de sobreexpresión pET-19b (Novagen) debido a que los niveles de inducción en el vector pQE-30 fueron muy bajos. El vector pET-19b añade una etiqueta de 10 histidinas también en el extremo N-terminal de la proteína. Se realizaron curvas de inducción, en ambos casos utilizando IPTG a una concentración de 1mM, se tomaron alícuotas cada hora y se analizaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poli(acrilamida).

En el caso de FlgC, no fue posible detectar una banda intensa correspondiente a la proteína deseada (figura 21, panel A), sin embargo, sí se pudo detectar mediante inmuno réplica tipo Western (dato no mostrado). La inducción de FlgG es claramente reconocible en el gel teñido con azul de Coomassie (figura 21, panel B) y su presencia se confirmó por inmuno réplica tipo Western (dato no mostrado). Los pesos moleculares predichos para estas proteínas recombinantes son: FlgC, 17.8 kDa y FlgG, 30.5 kDa.

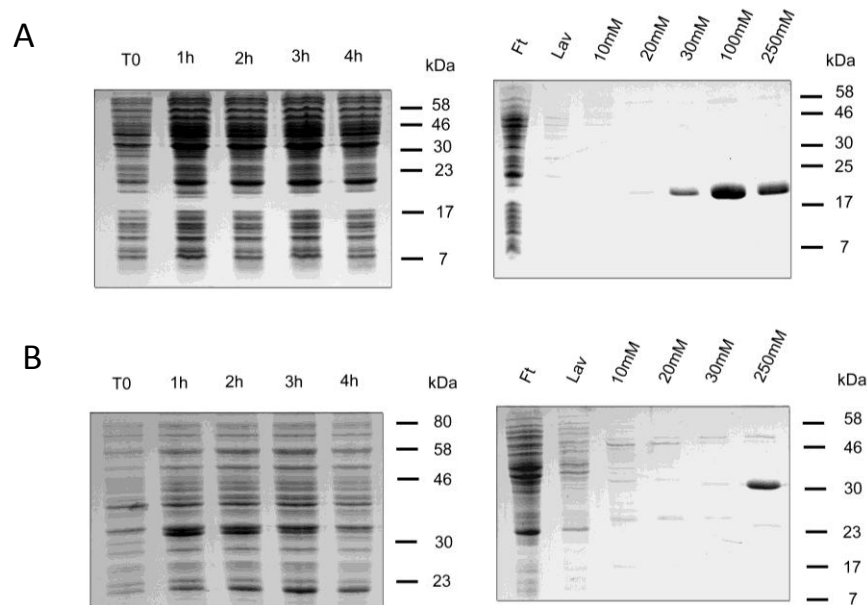


Figura 21. Inducción y purificación de las proteínas FlgC y FlgG de *R. sphaeroides*. Inducción y purificación de FlgC (A) y FlgG (B). Geles SDS, 17.5% de acrilamida, teñidos con azul de Coomassie. Las concentraciones que se indican en la parte superior de los geles de la columna derecha corresponden a las concentraciones de imidazol utilizadas en cada elución.

Las proteínas FliE y FlgB forman cuerpos de inclusión, y a pesar de nuestros múltiples intentos nunca fue posible obtenerlas solubles, por tal razón se procedió a purificarlas en condiciones desnaturizantes (6M GuHCl). FlgC se induce en su forma soluble, sin embargo, además de inducirse en niveles muy bajos, rápidamente es degradada por la acción proteolítica endógena de la cepa, incluso en presencia de inhibidores de proteasas y se pierde completamente durante la purificación (dato no mostrado). Debido a esto, se procedió a purificarla mediante un método previamente descrito para la proteína FlgF de *S. enterica*

(Saijo-Hamano et al., 2000). Las células se rompieron en condiciones desnaturizantes (6M GuHCl) y la purificación procedió en las mismas condiciones.

Los cuerpos de inclusión solubilizados de FliE y FlgB o el extracto total de FlgC se incubaron con 500µL de resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen). Posteriormente se realizaron lavados con concentraciones crecientes de imidazol para remover proteínas contaminantes y finalmente se eluyó a la proteína deseada con 100 y 250mM de imidazol (figura 20). Las proteínas purificadas se renaturalizaron mediante diálisis contra un amortiguador Tris-HCl 20mM, pH8.5.

Las proteínas FlgF y FlgG se purificaron en condiciones nativas, después de romper a las células por sonicación, se centrifugó y el sobrenadante se incubó con 500 µL de resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen). Se realizaron lavados con concentraciones crecientes de imidazol y las fracciones se analizaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (figura 21). Las fracciones que contuvieron a la proteína de interés se dializaron contra amortiguador Tris-HCl 20mM, pH 8.5 para retirar el imidazol.

Análisis de estructura secundaria mediante dicroísmo circular.

Con la intención de evaluar el contenido de estructura secundaria de las proteínas renaturalizadas y de obtener información estructural de todas las proteínas utilizadas en este estudio, se empleó la técnica de dicroísmo circular. Los espectros obtenidos muestran que las proteínas FliE, FlgB y FlgC renaturalizadas adquirieron elementos de estructura secundaria que sugieren un plegamiento correcto. Los datos obtenidos en miligrados se deconvolucionaron con el programa CDNN 2.1 (Böhm et al., 1992) para obtener los porcentajes de elementos de estructura secundaria. Los resultados obtenidos se comparan con el promedio de las predicciones computacionales realizadas con diferentes programas (anexo 1).

Oligomerización *in vitro* de las proteínas que componen al eje flagelar.

Con la finalidad de analizar el estado de oligomerización de las proteínas que componen al eje flagelar, realizamos ensayos de cromatografía líquida utilizando una columna de exclusión molecular Superdex 200 HR 10/30. Cada proteína purificada se utilizó a una

concentración de [1mg/mL] en amortiguador Tris-HCl 20mM, pH 8.5. La columna se equilibró con el mismo amortiguador y se utilizó un flujo de 0.2 mL/min (figura 22).

Las proteínas FliE, FlgC, FlgF y FlgG eluyeron en volúmenes que corresponden a complejos de alto peso molecular que van de los 240 kDa (FliE) a los 155 kDa (FlgC) (figura 22 y tabla 2). No fue posible detectar ninguna señal en el caso de la proteína FlgB (figura 22) debido a que esta se agrega en la manguera de inyección (dato no mostrado).

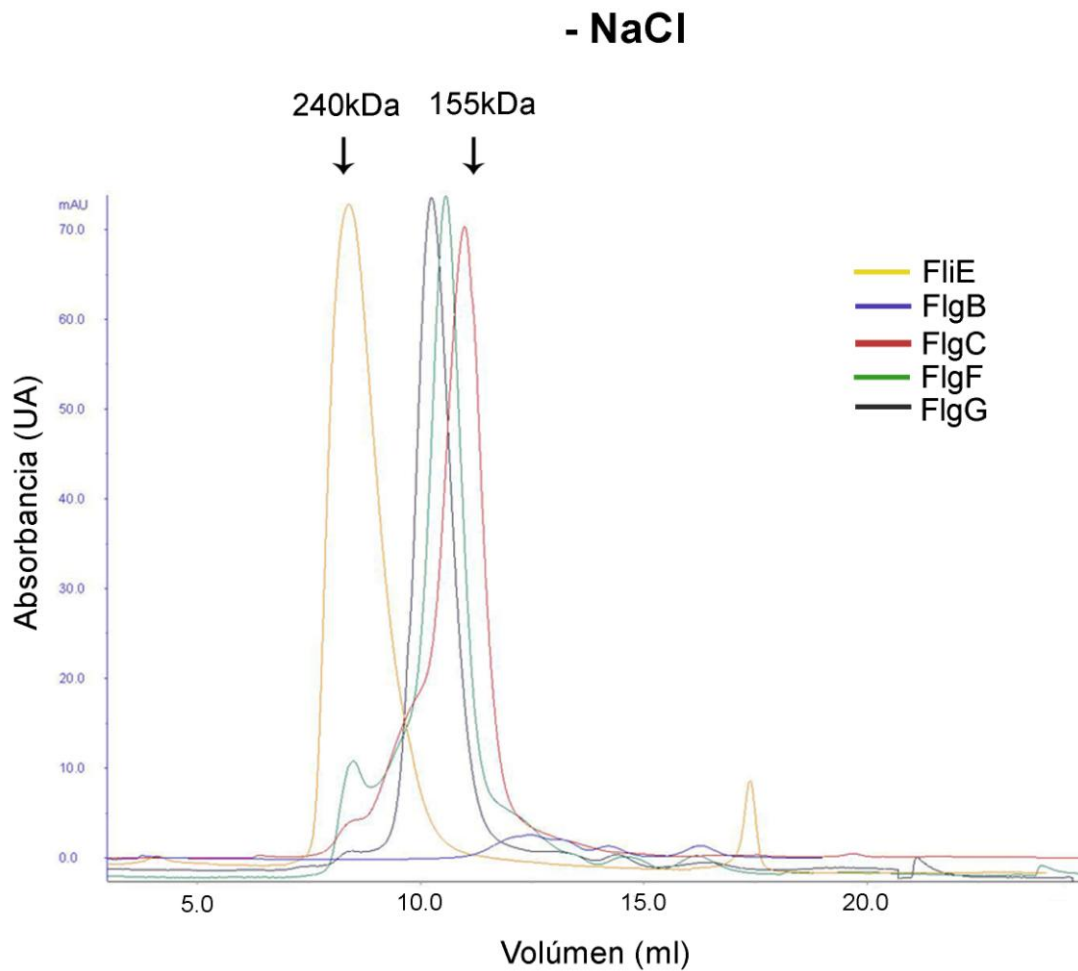


Figura 22. Oligomerización *in vitro* de las proteínas que componen al eje flagelar de *R. sphaeroides*. Cromatograma de las 5 proteínas en amortiguador Tris-HCl 20mM, pH 8.5. Cada trazo representa un experimento independiente, las proteínas se utilizaron a una concentración de 1mg/mL, en un volumen de 500 μ L y se utilizó un flujo de 0.2 mL/min.

Llamó nuestra atención el hecho de que la proteína FlgB se precipitó en la manguera de inyección del equipo (dato no mostrado), probablemente debido al cambio de temperatura. Este hecho sugirió cierta inestabilidad de la proteína; por ello se realizaron diferentes modificaciones al amortiguador con el objetivo de mejorar la estabilidad de la proteína la cual se evaluó al analizar la fracción soluble de FlgB luego de renaturalizarla en los diferentes amortiguadores.

Primero se probó modificar el pH del amortiguador a 7.6, añadir 10% de glicerol o 150mM de NaCl. En un trabajo previo, se reportó que el NaCl favorece la agregación de estas proteínas en *S. enterica* (Saijo-Hamano et al., 2004) y por esta razón se decidió trabajar en ausencia de NaCl en un principio. Sin embargo, en el panel B de la figura 23, se muestra que la mayor cantidad de la proteína FlgB soluble se obtuvo con el amortiguador que contiene 150mM de NaCl. Por el contrario, añadir glicerol tiene un efecto negativo, mientras que el cambio de pH no tiene ningún efecto.

Posteriormente decidimos evaluar si el efecto del NaCl era dependiente de la concentración, por tal razón se incrementó a 250 mM. La cantidad de FlgB soluble pasó de 0.65 mg/mL con 150 mM NaCl a 1.077 mg/mL con NaCl 250mM (figura 23, panel B). Finalmente se probó con NaCl 500mM, sin embargo, no hubo mayor efecto (dato no mostrado). Se decidió trabajar con NaCl 250mM ya que concentraciones mayores no representan mayor estabilidad y podrían interferir con los ensayos posteriores.

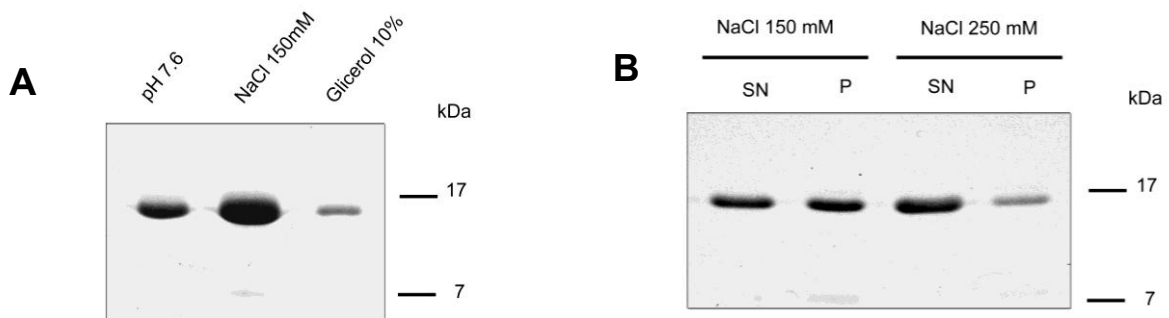


Figura 23. Efecto del NaCl en la solubilidad de FlgB. **A)** Gel SDS, acrilamida 17.5% p/v teñido con azul de Coomassie de las fracciones solubles de FlgB en diferentes amortiguadores. **B)** Gel SDS, acrilamida 17.5% p/v teñido con azul de Coomassie de las fracciones solubles (SN) e insolubles (P) en 2 diferentes concentraciones de NaCl.

Una vez que se logró una mayor estabilidad de la proteína FlgB, esta se analizó por cromatografía en el mismo amortiguador (Tris-HCl 20mM, NaCl 250mM, pH 8.5). Bajo estas condiciones, FlgB eluyó en un volumen que corresponde a un complejo de apenas 62 kDa (figura 24 y tabla 2). A partir de este resultado decidimos analizar si el NaCl también tenía un efecto sobre la oligomerización del resto de las proteínas.

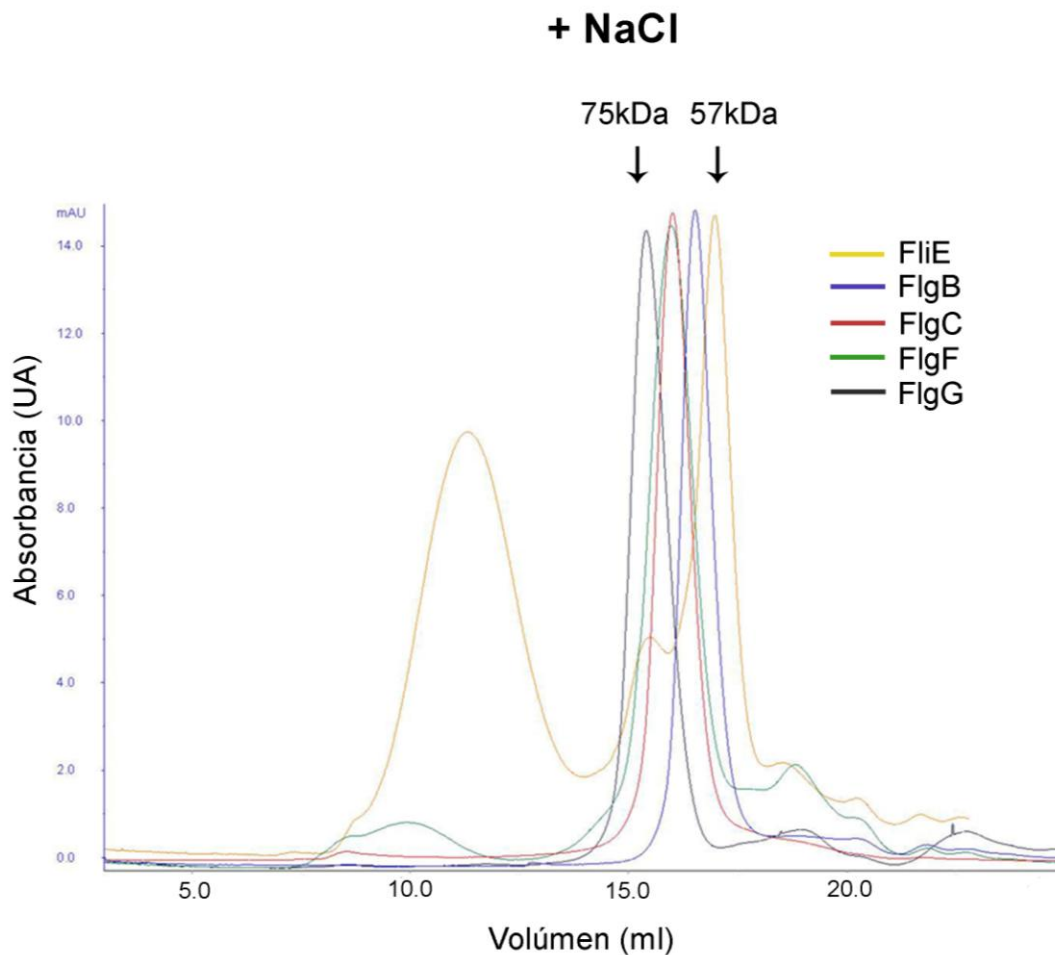


Figura 24. Cromatograma de las 5 proteínas en amortiguador Tris-HCl 20mM con sal. **C)** Gel SDS, 17.5% acrilamida teñido con azul de Coomassie de las fracciones solubles de FlgB en diferentes amortiguadores. **D)** Gel SDS, 17.5% acrilamida teñido con azul de Coomassie de las fracciones solubles e insolubles en 2 diferentes concentraciones de NaCl.

Efectivamente, todas las proteínas eluyeron en volúmenes mayores (figura 24). En el caso de FliE, se obtuvieron 3 picos lo cual probablemente se deba a que se trata de la proteína con la mayor propensión a la oligomerización de todas ellas (Saijo-Hamano et al., 2004). Los cálculos de las masas moleculares aparentes se resumen en la tabla 2. A partir de estos datos se estimó el número aproximado de copias que podrían estar formando dichos complejos en ambas condiciones (tabla 2).

Tabla 2. Pesos moleculares aparentes de los homo-oligómeros que forman las 5 proteínas que componen al eje flagelar.

Proteína	Masa molecular predicha (kDa)	- NaCl		+NaCl	
		Masa (kDa)	Subunidades	Masa (kDa)	Subunidades
FliE	12.94	240	18	147	11
				74	5
				57	4
FlgB	15.26	nd	nd	62	4
FlgC	17.84	155	8	68	3
FlgF	29.27	167	5	68	2
FlgG	30.49	176	5	75	2

Los pesos moleculares se calcularon a partir de los datos obtenidos mediante los experimentos de cromatografía de exclusión molecular (figuras 22 y 24). Para el cálculo se utilizó una mezcla estándares comerciales de peso molecular conocido (Sigma-Aldrich): citocromo c, 12.4 kDa; anhidrasa carbónica, 29 kDa; albúmina sérica bovina (BSA), 66 kDa y β -amilasa, 200 kDa.

Las 5 proteínas que componen al eje flagelar de *R. sphaeroides* forman homo-oligómeros en solución, los cuales son al menos parcialmente disociados por la acción del NaCl. El efecto del NaCl es dependiente de su concentración.

Predicciones de estructura terciaria.

A pesar de que se han realizado una enorme cantidad de estudios estructurales sobre otras proteínas axiales (proteína del gancho o FlgE y filamento o FliC), de las cuales se conocen sus estructuras cristalográficas (Samatey et al., 2001, Samatey et al., 2004a) e incluso se cuenta con los modelos atómicos de ambas estructuras polimerizadas (Fujii et al., 2009, Yonekura et al., 2003); son muy pocos los datos estructurales sobre las proteínas que

conforman al eje flagelar. Hasta el momento, no se ha reportado la estructura cristalográfica de ninguna de estas proteínas. La única proteína que se ha logrado cristalizar es FlgG (Saijo-Hamano, Matsunami et al., 2013); sin embargo, la estructura cristalográfica no ha sido depositada en el sitio Protein Data Bank, PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

Para obtener información acerca de la estructura terciaria de estas proteínas, se generaron modelos computacionales en 2 diferentes servidores. En la figura 25 se muestran los modelos obtenidos para cada proteína, cabe mencionar que los modelos de ambos servidores fueron muy similares (dato no mostrado). En los modelos de las proteínas FlgB, FlgC, FlgF y FlgG, se distingue una arquitectura básica que asemeja a las estructuras cristalográficas de las proteínas axiales FlgE y FliC previamente reportadas (Samatey et al., 2004a, Samatey et al., 2004b, Yonekura et al., 2003).

Identificamos dos dominios estructurales independientes que nombramos con base en la nomenclatura utilizada para las proteínas FlgE y FliC: dominio D0, formado por las hélices del amino y carboxilo y dominio D1, formado principalmente por un conjunto de láminas beta y segmentos al azar que corresponden a la región intermedia de estas proteínas.

La proteína FliE está formada por las dos α -hélices presentes en las regiones N y C-terminal y una tercera que las conecta. Las 3 hélices se agrupan en una arquitectura distinta al resto de las proteínas que componen al eje flagelar (figura 25).

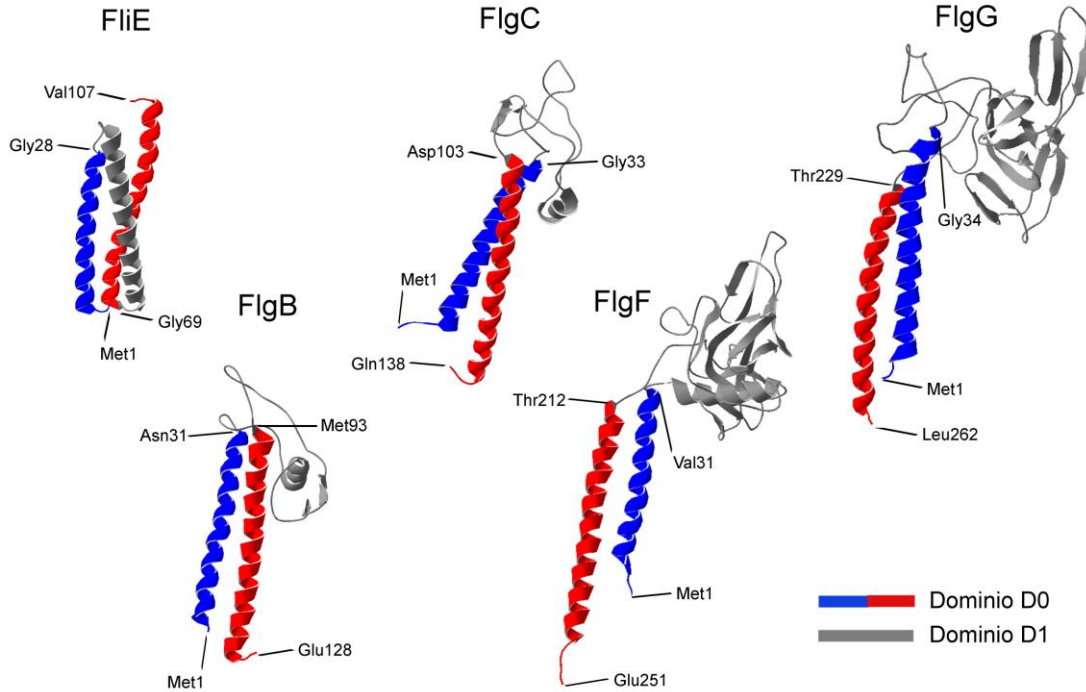


Figura 25. Modelos de estructura terciaria de las proteínas que componen al eje flagelar de *R. sphaeroides*. Los modelos se obtuvieron a través de 2 servidores diferentes: el servidor Robetta (<http://robetta.bakerlab.org>) de la Universidad de Washington (Raman, Vernon et al., 2009) y el servidor Zhang Lab (<http://zhanglab.cmb.umich.edu/Quark/>) de la Universidad de Michigan (Roy, Kucukural et al., 2010).

Papel del dominio D1 en la oligomerización de FlgF y FlgG.

Con base en los modelos obtenidos, se diseñaron versiones mutantes de las proteínas FlgF y FlgG que carecen del dominio D0, con la intención de analizar el papel de dicho dominio en su oligomerización. Se decidió trabajar únicamente con estas 2 proteínas debido a que poseen un dominio D1 de mayor tamaño que el resto. Las mutantes se nombraron: FlgF Δ D0, que comprende del residuo Ala49 a Thr212 de FlgF y FlgG Δ D0 que abarca del residuo Tyr47 a Val227 de FlgG, ambas proteínas se purificaron en las mismas condiciones que las proteínas silvestres (anexo 2). Para el diseño de estas mutantes también se tomaron en cuenta las predicciones de estructura secundaria y en el caso de FlgG, la versión que se

utilizó en este trabajo es equivalente a la versión cristalizada de la proteína de *S. enterica* (Saijo-Hamano et al., 2013).

Se analizó por cromatografía de exclusión molecular si estas mutantes retenían o perdían su capacidad de homo-oligomerizar. Como se muestra en la figura 26, ambas mutantes siguen formando complejos de alto peso molecular, además dichos complejos son sensibles al efecto del NaCl de la misma manera que las proteínas silvestres (figura 26).

El dominio D1 es suficiente para permitir la homo-oligomerización de FlgF y FlgG, el efecto del NaCl sugiere que las interacciones que permiten dicha homo-oligomerización son principalmente del tipo electrostáticas.

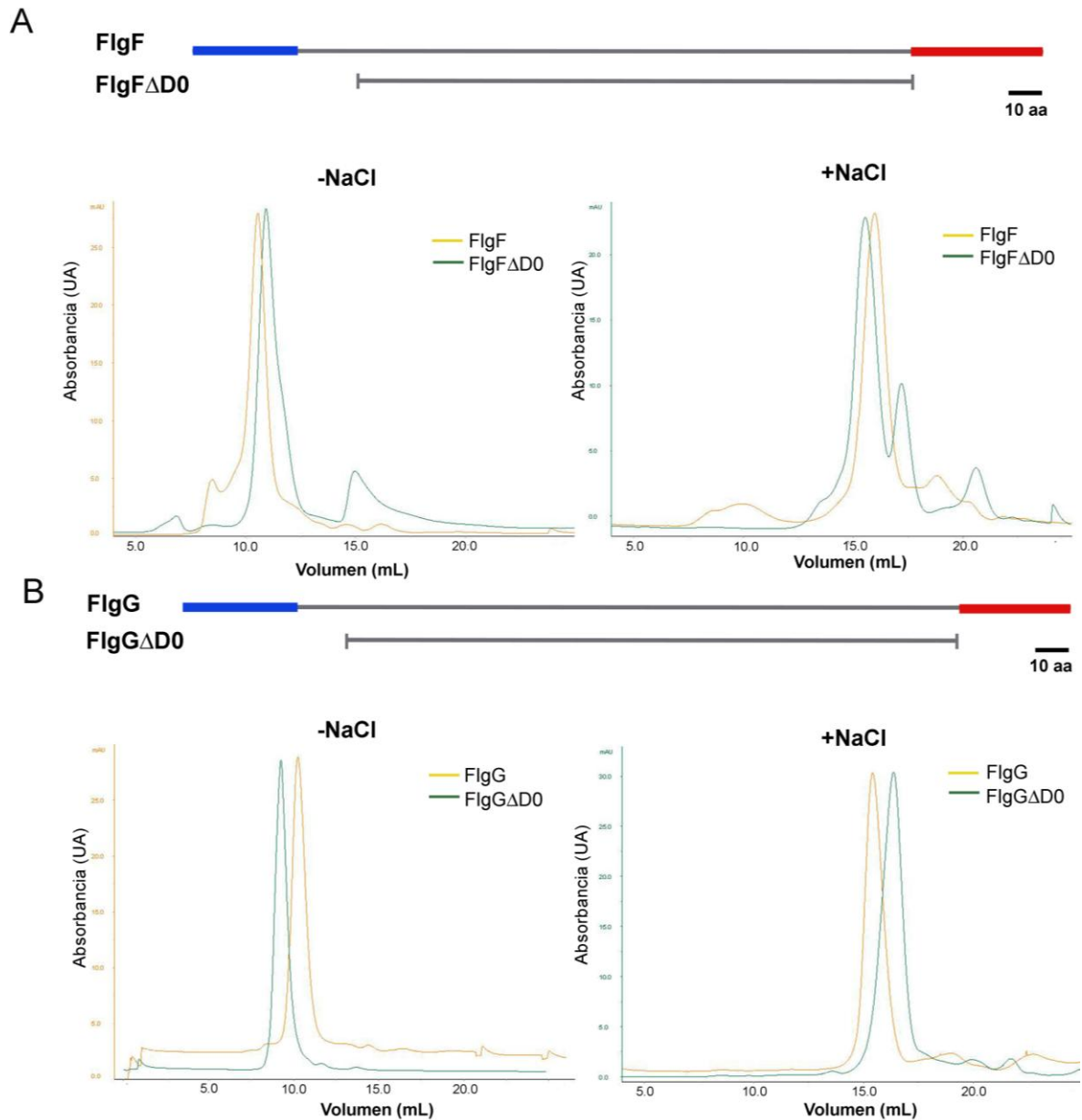


Figura 26. Papel del dominio D1 en la oligomerización de FigF y FigG. **A)** Esquema lineal a escala de la proteína FigF y su mutante FigF Δ D0, en azul y rojo se señalan las α -hélices del N y C-terminal respectivamente que forman el dominio D0 y en gris, la región central que corresponde al dominio D1. Cromatogramas de ambas proteínas en dos diferentes condiciones: sin NaCl y con 250 mM de NaCl. **B)** Esquema lineal a escala de la proteína FigG y su mutante FigG Δ D0, se utilizó la misma nomenclatura que en el panel A. Cromatograma de ambas proteínas en dos diferentes condiciones: sin NaCl y con 250 mM de NaCl. Cada trazo representa un experimento independiente, las proteínas se utilizaron a una concentración de 1mg/mL, en un volumen de 500 μ L y se utilizó un flujo de 0.2 mL/min.

Interacciones físicas entre las proteínas que componen al eje flagelar de *R. sphaeroides*.

Para estudiar las interacciones físicas que existen entre las 5 proteínas que componen al eje flagelar de *R. sphaeroides*, empleamos la técnica de inmuno réplica de afinidad. Esta técnica consiste en inmovilizar a las proteínas deseadas en una matriz, en este caso se utilizó una membrana de nitrocelulosa, y añadir externamente a la proteína que se analiza de forma soluble, posteriormente se incubó para permitir que la proteína soluble interactuara con alguna o algunas de las proteínas inmovilizadas en la membrana. Finalmente se incubó con un anticuerpo específico que reconoce a la proteína soluble y se reveló de la misma manera que una inmuno réplica tipo Western.

Nuestros resultados confirmaron la interacción previamente reportada entre FliE y FlgB (Minamino et al., 2000), y nos permitieron detectar nuevas interacciones que nunca antes habían sido reportadas y son las siguientes: entre FlgB y FlgF (figura 27 paneles B y C) y entre FlgC y FlgG (figura 27, paneles D y E).

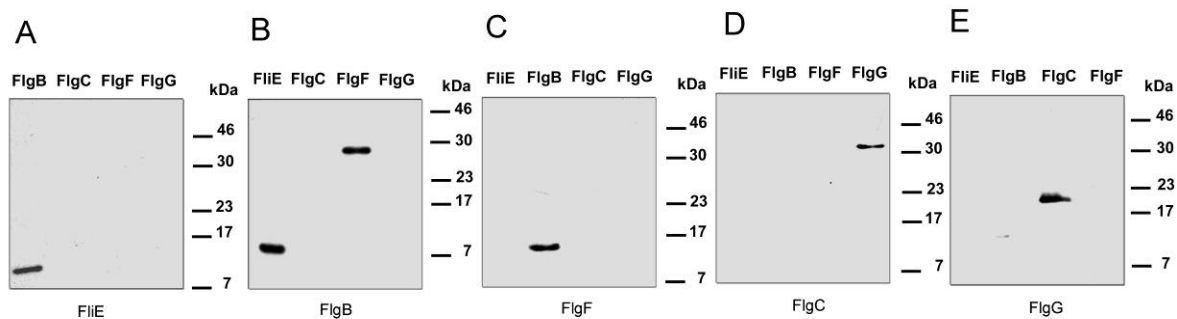


Figura 27. Interacciones entre las proteínas que componen al eje flagelar. Ensayos de inmuno réplica de afinidad con proteínas purificadas, (0.05 nmoles de cada una). Se añadió externamente a la proteína prueba en diferentes concentraciones: FliE [1.2 µg/mL], FlgB [1.5 µg/mL], FlgC [12 µg/mL], FlgF [1.2 µg/mL] y FlgG [2 µg/mL] y se reveló con el anticuerpo específico contra cada una de ellas. En el caso de FlgC, se utilizó una versión con una etiqueta de Flag y se reveló utilizando el anticuerpo comercial contra esta.

Con base en las interacciones encontradas podemos sugerir que estas proteínas se incorporan en el siguiente orden durante la formación del eje flagelar: FliE, FlgB, FlgF, FlgC y FlgG.

Papel del dominio D0 en la interacción de FlgF y FlgG con sus parejas de interacción.

Mediante los experimentos de cromatografía de la figura 26, demostramos que el dominio D1 contiene las regiones que permiten la interacción de ambas proteínas consigo mismas (homo-oligomerización). Decidimos estudiar si el dominio D0 tiene un papel en la interacción de FlgF y FlgG con sus parejas de interacción (FlgB y FlgC respectivamente), para ello realizamos ensayos de inmuno réplica de afinidad, utilizando a las mutantes FlgF Δ D0 y FlgG Δ D0. Como se observa en la figura 28, al añadir a las proteínas FlgB y FlgC externamente, estas son incapaces de reconocer a las versiones mutantes de FlgF y FlgG.

El mismo experimento se realizó añadiendo externamente a las mutantes FlgF Δ D0 y FlgG Δ D0, esta vez no fue posible detectar señal alguna (dato no mostrado), de modo que se confirma el resultado que sugiere que el dominio D0 de ambas proteínas es el responsable de permitir la interacción con otras proteínas del eje flagelar.

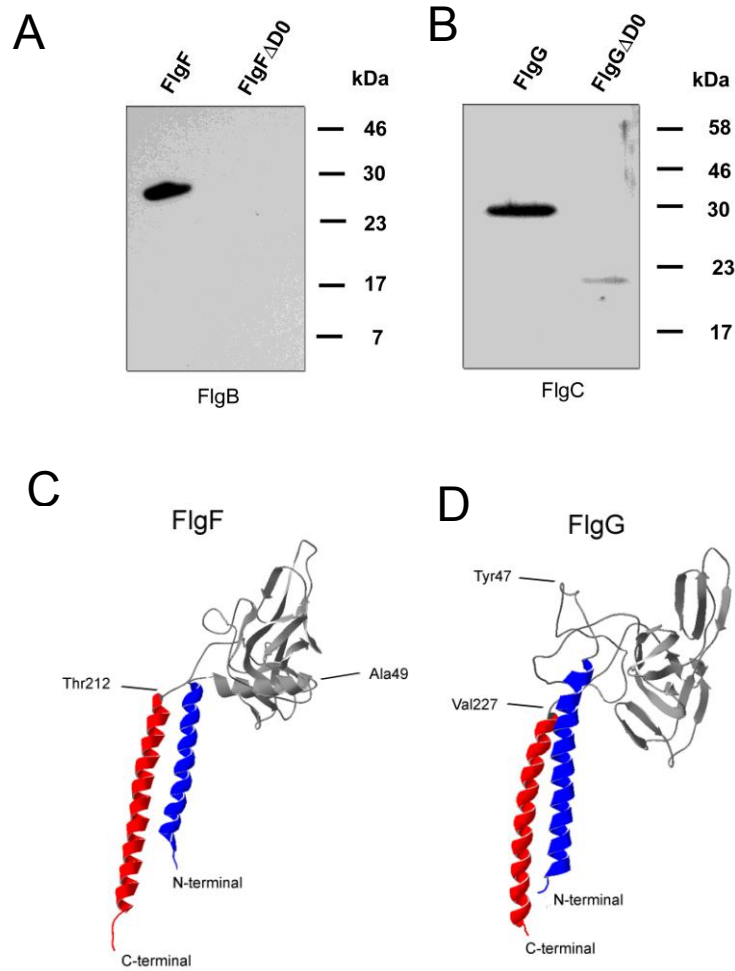


Figura 28. Papel del dominio D0 de FlgF y FlgG en la interacción con FlgB y FlgC respectivamente. **A)** Ensayo de Inmuno réplica de afinidad con proteínas purificadas, (0.05 nmoles de cada una). Se añadió externamente FlgB [1.5 μ g/mL], y se reveló con el anticuerpo anti-FlgB en dilución 1:20,000. **B)** Se añadió externamente FlgC [12 μ g/mL] y se reveló con el anticuerpo anti-FLAG (Sigma Aldrich) dilución 1:5,000. **C)** Predicción de estructura terciaria de FlgF y **D)** FlgG, se indican las regiones del N y C-terminal, los aminoácidos que comprenden las versiones mutantes FlgF Δ D0 (Ala49 a Thr212) y FlgG Δ D0 (Tyr47 a Val227) y los dominios estructurales de cada proteína.

Aislamiento de complejos flagelares Gancho-Cuerpo Basal (Hook-Basal Bodies, HBB).

Finalmente para comprobar nuestros resultados de interacción *in vitro*, optamos por realizar ensayos de entrecruzamiento en HBBs aislados. Este ensayo se basa en la utilización de entrecruzadores químicos, que son moléculas pequeñas, de diferentes longitudes dependiendo del entrecruzador. Estas moléculas poseen grupos reactivos en sus extremos, si se trata del mismo grupo reactivo se denominan homo-bifuncionales y si son grupos distintos se les conoce como hetero-bifuncionales.

Las condiciones que deben cumplir las moléculas a entrecruzar son principalmente: que posean grupos funcionales capaces de reaccionar con los grupos reactivos del entrecruzador y que se encuentren en proximidad a una distancia menor o igual a la longitud del entrecruzador utilizado. En este caso, estamos trabajando con un complejo proteico muy estable, en el cual las proteínas polimerizadas se encuentran en contacto todo el tiempo y la libertad de movimiento es muy reducida, lo cual favorece la reacción de entrecruzamiento.

Como primer paso, aislamos los complejos HBB de la cepa DC de *R. sphaeroides* la cual carece de la proteína adaptadora entre el gancho y el filamento HAP1 o FlgK y por lo tanto es incapaz de ensamblar el filamento (Castillo et al., 2009). La razón de trabajar con esta mutante es que el filamento constituye más del 99% del total de proteínas del flagelo bacteriano y provocaría una sobreestimación de la cantidad de proteína total en las reacciones de entrecruzamiento.

En la figura 29 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de los HBBs aislados, se aprecian estructuras intactas, no es posible observar el eje ya que se encuentra rodeado de los anillos L y P y en el caso de esta bacteria, por un anillo adicional formado al menos en parte por la proteína FlgT (Fabela et al., 2013), sin embargo, es claro que el eje debe estar presente de lo contrario sería imposible observar estas estructuras.

Hasta el momento únicamente contamos con datos preliminares de los experimentos de entrecruzamiento (dato no mostrado), los cuales deben ser confirmados mediante la escisión del entrecruzador y el análisis por inmuno réplica tipo Western.

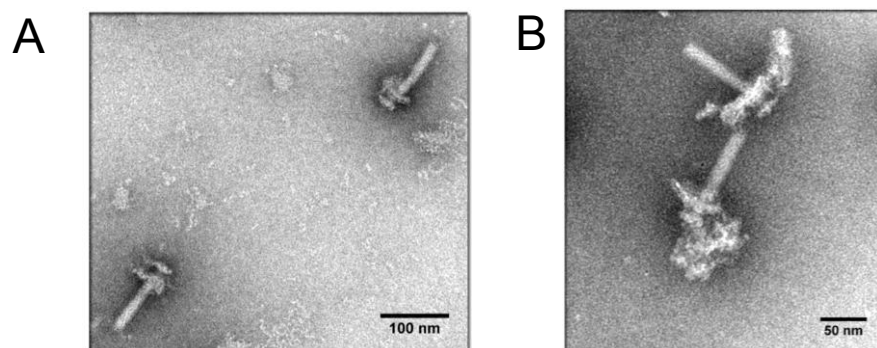


Figura 29. Complejos Gancho-Cuerpo Basal (HBBs) aislados de la cepa DC de *R. sphaeroides*. Tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 2%, pH 7.0. Imágenes tomadas a diferentes aumentos (**A** y **B**).

DISCUSIÓN

Hasta antes del presente trabajo, únicamente se habían estudiado estas proteínas en *S. enterica*. Cabe mencionar que en dicho estudio, las 5 proteínas se purificaron en condiciones desnaturalizantes; en los casos de FliE, FlgB, FlgC y FlgG, debido a que estas forman cuerpos de inclusión al sobreexpresarse, mientras que en el caso de FlgF fue para evitar la rápida degradación que experimenta por la acción de proteasas intrínsecas de la cepa de sobreexpresión (Saijo-Hamano et al., 2000).

En este estudio se logró por primera vez la purificación en condiciones nativas de FlgF y FlgG. A pesar de que las otras 3 proteínas se purificaron en condiciones desnaturalizantes, las 5 proteínas mostraron un comportamiento similar en los ensayos de cromatografía, lo cual tomando en cuenta las similitudes estructurales, sugiere que estas últimas recuperaron su estructura nativa.

Los ensayos de dicroísmo circular también confirman que las proteínas renaturalizadas recuperaron elementos de estructura secundaria, sin embargo, en los 3 casos los porcentajes de α -hélice son menores a los predichos por diferentes programas. Se ha reportado que las regiones del extremo amino y carboxilo de las proteínas axiales flagelares se encuentran en un estado semidesplegado o desordenado cuando están en solución y que adoptan una conformación de α -hélice al polimerizar (Aizawa et al., 1990, Vonderviszt et al., 1992, Vonderviszt et al., 1989). Incluso se ha visto por dicroísmo circular que el contenido de α -hélice en la flagelina aumenta al doble después de su polimerización (Uratani, Asakura et al., 1972).

Las proteínas del eje no son la excepción, la migración anómala en la cromatografía por filtración en gel junto con los ensayos de proteólisis limitada realizados con las proteínas de *S. enterica* también sugieren que las regiones N- y C-terminal presentan una conformación semidesplegada en solución (Saijo-Hamano et al., 2004).

En un trabajo reciente, en el que se estudió a la proteína que forma la estructura análoga al eje flagelar en el inyectisoma (eje interno) llamada PscI, se reportó que al analizarla por dicroísmo circular, mostró valores de α -hélice por debajo de las predicciones y se observó que estos valores incrementaban en presencia de trifluoroetanol (Monlezun, Liebl et al., 2015),

molécula que ayuda a inducir la formación de α -hélices en regiones desordenadas de proteínas.

Con respecto a los ensayos de cromatografía por filtración en gel o de exclusión molecular, podemos sugerir que el fenómeno de homo-oligomerización detectado es un reflejo de la capacidad que tienen estas proteínas de interactuar consigo mismas. Si partimos de la hipótesis de que cada una de las 5 proteínas que conforman al eje flagelar se asocian para formar al menos una vuelta, eso supone que deben ser capaces de mantener interacciones con otras copias de sí mismas al menos de manera lateral en la estructura polimerizada.

Ya se había sugerido previamente que FliE es la proteína con la mayor propensión a interactuar consigo misma (Saijo-Hamano et al., 2004). Nuestros resultados apoyan dicha hipótesis ya que observamos que FliE forma el complejo de mayor peso molecular y además el efecto del NaCl en la disociación de dicho complejo no es tan evidente como en el resto de las proteínas. FliE es una proteína interesante ya que se considera que es responsable de la transición de la simetría radial del anillo MS a la simetría axial del eje (Minamino et al., 2000) y probablemente por ello tenga propiedades de polimerización distintas al resto. La unión entre los elementos axiales del flagelo y el anillo MS debe ser lo suficientemente fuerte para soportar la fuerza generada por el motor durante la rotación.

El efecto del NaCl en la disociación de los complejos fue un resultado inesperado ya que se había publicado que éste favorecía la agregación de las proteínas que conforman el eje del flagelo en *Salmonella* (Saijo-Hamano et al., 2004). Nuestros resultados contrastan con dicho reporte, no solamente porque en las condiciones sin NaCl las proteínas forman complejos de alto peso molecular, sino porque observamos que el NaCl es capaz de disociar al menos parcialmente dichos complejos.

Una diferencia importante entre nuestro trabajo y el de los otros autores, es que nosotros contamos con dos proteínas purificadas en condiciones nativas y ellos trabajan solamente con proteínas renaturalizadas. Probablemente, en su caso las proteínas renaturalizadas no hayan recuperado su estructura nativa y por eso se comporten de manera distinta, desafortunadamente ellos no hicieron los análisis de estructura secundaria por diroísmo circular. Un detalle importante de mencionar es que si bien en un principio el NaCl

disocia los complejos, al paso de una semana es posible observar la agregación de la proteína de forma más evidente en esta condición.

La explicación más convincente que podemos ofrecer para explicar el efecto del NaCl es que las interacciones responsables de la homo-oligomerización sean principalmente de tipo electrostáticas y que los iones Na^+ y Cl^- estén enmascarando las cargas de la superficie de la proteína e interfiriendo con dichas interacciones.

Sin lugar a dudas contar con la estructura cristalográfica de una proteína ofrece una fuente de información valiosísima para su estudio, desgraciadamente hasta el momento ninguna de las estructuras de estas proteínas está disponible, a pesar de que existe un reporte de la cristalización exitosa de una versión mutante de FlgG (Saijo-Hamano et al., 2013). La cristalización de este tipo de proteínas no es trivial debido a su propensión a formar fibras; como se menciona brevemente en la introducción, la cristalización de la flagelina y de la proteínas del gancho únicamente fue posible al eliminar las regiones del N y C-terminal. Existe una alternativa para obtener información estructural de una proteína que si bien no es la mejor, sí ha demostrado ser de gran utilidad que es el modelado *in silico* de la estructura terciaria de proteínas (Raman et al., 2009).

Es importante mencionar que los modelos obtenidos a partir de 2 servidores diferentes fueron muy similares, además los modelos de FlgB, FlgC, FlgF y FlgG guardan una importante similitud con las estructuras cristalográficas reportadas para la proteína del gancho y la flagelina, que son proteínas relacionadas al menos a nivel estructural y probablemente a nivel de secuencia (Chevance et al., 2007, Pallen, Penn et al., 2005, Vonderviszt et al., 1992). Estas 4 proteínas poseen residuos conservados principalmente en sus regiones N y C-terminal (figura 19) y quizás eso contribuya al parecido estructural que reflejan los modelos obtenidos (figura 25).

La proteína FliE no está relacionada a nivel de secuencia con el resto y tampoco tiene la arquitectura típica de las proteínas axiales flagelares (figura 25), sin embargo, también presenta las repeticiones de residuos hidrofóbicos a intervalos de 7 residuos que se encuentran típicamente en este grupo de proteínas (Homma, Kutsukake et al., 1990, Saijo-Hamano et al., 2004). Nos pareció interesante que la estructura que obtuvimos en el caso de FliE es muy similar a una estructura predicha para la proteína que forma el eje interno del

inyectisoma (el inyectisoma y el flagelo bacteriano son estructuras relacionadas evolutivamente) de *Pseudomonas aeruginosa* Psc1 (Monlezun et al., 2015).

Al observar las estructuras obtenidas para FlgB, FlgC, FlgF y FlgG, es evidente que existe un parecido entre todas ellas. Con base en la nomenclatura utilizada para FliC y FlgE, nombramos 2 dominios estructurales presentes en las proteínas del eje: el dominio D0 y el dominio D1. El dominio D0 es estructuralmente independiente del resto de la proteína en la flagelina y el gancho (ver introducción) y probablemente también lo sea al menos en FlgG (Saijo-Hamano et al., 2013) La delección o eliminación del dominio D0 no afecta de manera significativa el plegamiento del resto de la proteína (Fujii et al., 2009, Samatey et al., 2000, Samatey et al., 2004a, Yonekura et al., 2003).

Acerca del aumento en la longitud del dominio D1 a nivel de secuencia y de volumen a nivel estructural, se ha sugerido que es resultado de múltiples eventos de inserción en la evolución de estas proteínas (Pallen & Matzke, 2006, Pallen et al., 2005). Es posible relacionar este aumento de tamaño en las proteínas con la longitud del diámetro del eje que en la región proximal formada por las proteínas FliE y FlgB es menor y aumenta en la región distal formada por FlgG.

El estar formado por 5 diferentes proteínas, le confiere al eje características estructurales diferenciales, además le permite interactuar con múltiples complejos (anillo MS, anillos P y L) y probablemente se trate de un mecanismo intrínseco de regulación de su longitud ya que cada proteína es capaz de polimerizar para formar una sola vuelta a excepción de FlgG que es capaz de formar 4 vueltas, no obstante también se autorregula.

La generación de versiones mutantes de las proteínas FlgF y FlgG nos permitió analizar la función de los dominios estructurales de estas proteínas de manera independiente. Como ya se mencionó esta estrategia ha sido previamente utilizada en el caso de FliC y FlgE (Samatey et al., 2000, Samatey et al., 2004a) y más recientemente también en el caso de FlgG (Saijo-Hamano et al., 2013). Las regiones deletadas se determinaron con base en los modelos de estructura terciaria, las predicciones de estructura secundaria y por homología mediante alineamientos, de hecho, la versión que generamos de FlgG es equivalente a la utilizada en la cristalización de esta proteína en *S. enterica* (Saijo-Hamano et al., 2013).

Nuestros experimentos de cromatografía muestran que el dominio D1 es suficiente para que ocurra la homo-oligomerización y que se mantiene el efecto del NaCl en la disociación de estos oligómeros (figura 24). El dominio D1, corresponde a la región central de estas proteínas y en los casos de FlgF y FlgG, representa aproximadamente una tercera parte del total de la proteína. Basándonos en el modelo del gancho y del filamento, este dominio se localizaría en la cara externa de eje y debido a su volumen es probable que existan contactos laterales entre los dominios D1 de diferentes subunidades de la misma proteína.

Un antecedente que apoya nuestros resultados, es que mutaciones puntuales en el dominio D1 de FlgG, afectan sus capacidades de polimerización, permitiéndole formar más de 4 vueltas e incluso alcanzar una longitud que supera los 100 nm bajo ciertas condiciones (Chevance et al., 2007). Con base en las similitudes estructurales, podemos especular que la función del dominio D1 que encontramos en FlgF y FlgG se extiende a FlgC y FlgB, desafortunadamente el tamaño reducido de dicho dominio en ambas proteínas dificulta que se realicen el mismo tipo de experimentos.

Finalmente, con los ensayos de inmuno réplica de afinidad detectamos interacciones entre distintas proteínas que componen al eje flagelar de *R. sphaeroides*. La única interacción previamente reportada es la de FliE con FlgB en *S. enterica* (Minamino et al., 2000). Teniendo en cuenta los antecedentes que demuestran que FlgG es la proteína más distal (Okino et al., 1989) y que sugieren que FliE se localiza en contacto con el anillo MS (Müller et al., 1992) y a partir de las interacciones que detectamos, pudimos generar un modelo secuencial del ensamblaje del eje en *R. sphaeroides* (figura 30).

De acuerdo con el modelo que proponemos, hay una interacción que no logramos detectar por medio de esta técnica, se trata de la interacción entre FlgF y FlgC. A reserva de comprobar esta interacción mediante otras técnicas, podemos ofrecer algunas explicaciones al respecto: 1) que la técnica no haya sido adecuada o lo suficientemente sensible para detectar dicha interacción, 2) que esta interacción esté mediada por otra proteína, posiblemente por FlgJ cuya función no está completamente clara hasta el momento, 3) que requiera de una conformación específica que adopta FlgF al incorporarse a la estructura.

El modelo generado en este trabajo propone un orden de ensamblaje distinto del propuesto en *B. burgdorferi* a partir del análisis hecho por crio-tomografía electrónica de las

cepas mutantes de cada uno de los genes que codifican para las 5 proteínas que componen el eje flagelar (Zhao et al., 2013). Además, proponemos que las interacciones físicas que existen entre estas proteínas determinan el orden de ensamblaje, es decir, que ocurre un reconocimiento molecular específico entre la proteína que está siendo exportada y la proteína polimerizada más distal. Además, asignamos un papel a cada uno de los dominios estructurales que componen a estas proteínas.

CONCLUSIONES

- Las proteínas FlgB, FlgC, FlgF y FlgG están relacionadas a nivel de secuencia y a nivel de estructura terciaria de acuerdo con las predicciones computacionales; la arquitectura que presentan es similar a las estructuras cristalográficas previamente reportadas para otras proteínas axiales flagelares (gancho y filamento). En las 4 proteínas se pueden distinguir dos dominios estructurales denominados D0 y D1: El dominio D0 está formado por las α -hélices del N y C-terminal y el dominio D1, se compone principalmente por estructuras lámina- β y segmentos al azar. Este último dominio es de longitud variable que va desde apenas 28 residuos en FlgB y aumenta su tamaño hasta alcanzar una longitud de 162 residuos en el caso de FlgG.
- Todas las proteínas que componen al eje flagelar de *R. sphaeroides* tienen la capacidad de formar homo-oligómeros *in vitro*, los cuales son al menos parcialmente disociados por la acción del NaCl.
- La homo-oligomerización de estas proteínas está principalmente mediada por el dominio D1, ya que versiones mutantes que contienen únicamente dicho dominio retienen la capacidad de oligomerizar y son sensibles al efecto del NaCl que presentan las proteínas silvestres.
- Con base en las interacciones físicas detectadas *in vitro*, podemos proponer un modelo del orden de ensamblaje para esta estructura en *R. sphaeroides* (figura 23), dicho modelo tendrá que ser comprobado *in vivo* mediante los ensayos de entrecruzamiento químico.
- El dominio D0 de FlgF y FlgG es el responsable de la interacción con sus parejas de interacción (FlgB y FlgC, respectivamente), así lo demuestran los ensayos de inmuno réplica de afinidad.

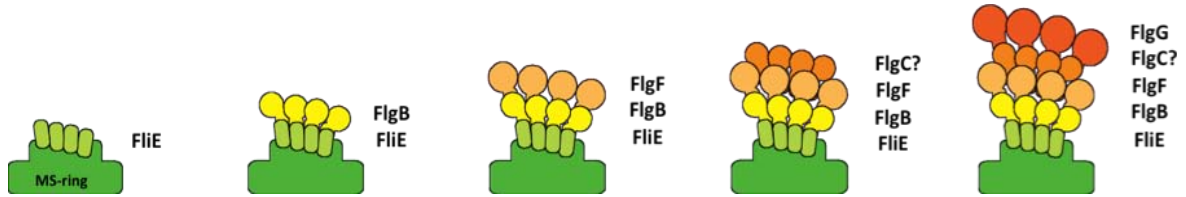


Figura 30. Orden de ensamblaje del eje flagelar en *R. sphaeroides*. Modelo de ensamblaje propuesto con base en las interacciones físicas detectadas por inmuno réplica de afinidad, el signo de interrogación en FlgC indica que la interacción entre FlgF y FlgC no pudo ser detectada mediante dicha técnica.

PERSPECTIVAS

- Realizar los análisis de contenido de estructura secundaria por dicroísmo circular de FliE, FlgB y FlgC en presencia de concentraciones crecientes de trifluoroetanol y ver si ocurre un incremento en el contenido de α -hélices.
- Repetir los ensayos de inmuno réplica de afinidad para probar la interacción FlgF-FlgC en presencia de FlgJ, con la finalidad de analizar si esta proteína podría estar mediando dicha interacción.
- Continuar con los ensayos de entrecruzamiento en complejos gancho-cuerpo basal purificados para comprobar el orden de ensamblaje propuesto mediante los ensayos de inmuno réplica de afinidad. Se utilizará un entrecruzador escindible que permita analizar la composición de los complejos entrecruzados. Contamos con anticuerpos policlonales específicos para cada una de las 5 proteínas que nos permitirán detectar los eventos de entrecruzamiento. En el mejor de los casos, mediante esta técnica podríamos entrecruzar no solamente a las 5 proteínas sino también a FliE con el anillo MS y a FlgG con la proteína del gancho.
- Realizar ensayos de entrecruzamiento con las proteínas recombinantes purificadas. Si se obtienen productos de entrecruzamiento, se pueden analizar por espectrometría de masas e identificar los residuos entrecruzados para describir las interacciones a un nivel más detallado.
- Aislar HBBs a partir de las cepas mutantes de cada uno de los genes que codifican para las proteínas que componen el eje flagelar y analizarlas por inmuno réplica tipo Western. En el intento previo reportado, las estructuras se sometieron a un gradiente de CsCl que pudo haber disociado proteínas lábiles (Kubori et al., 1992). Nosotros evitaremos dicho paso para perturbar lo menos posible ese tipo de interacciones.
- Realizar ensayos de interacción por doble híbrido u otras técnicas de biología molecular para el estudio de interacciones entre proteínas.

- Inducir simultáneamente a las proteínas del eje flagelar en parejas, una de ellas etiquetada con un etiqueta de histidinas y la otra sin etiqueta y realizar ensayos de copurificación, con la finalidad de confirmar nuestros resultados de interacción *in vitro*.
- Reconstruir ejes *in vitro* al añadir a las proteínas purificadas en solución y en presencia de FlgJ. Este experimento ya se intentó con las proteínas de *Salmonella* sin resultados satisfactorios (Saijo-Hamano et al., 2004), sin embargo, en esa ocasión no se tomó en cuenta a FlgJ. Nosotros podríamos mezclar a las proteínas en presencia de NaCl y posteriormente removerlo mediante diálisis para promover la polimerización.
- Estudiar las interacciones que existen entre las proteínas que componen al eje flagelar y otras proteínas del cuerpo basal como la proteína FliF (anillo MS), la proteína del gancho (FlgE) y las proteínas de los anillos P y L (FlgH y FlgI).

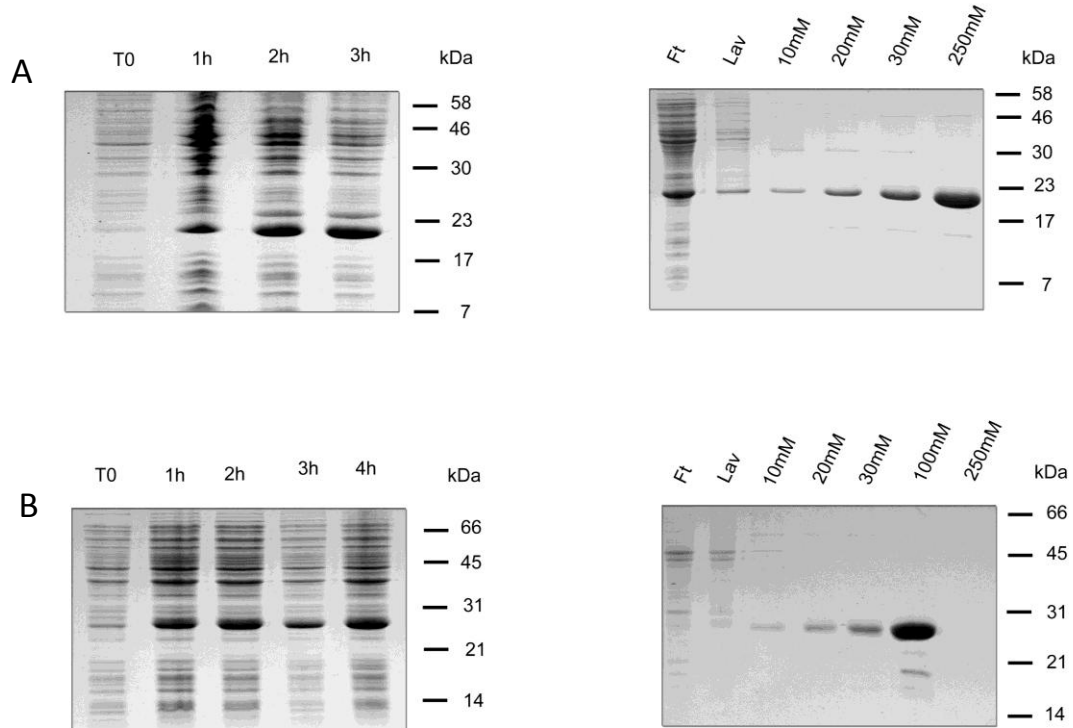
ANEXOS

Anexo 1. Porcentajes de elementos de estructura secundaria teóricos y calculados a partir del análisis por dicroísmo circular.

Proteína	% hélice- α			% lámina- β			% giro- β			% segmento al azar		
	Predicho	- NaCl	+NaCl	Predicho	NaCl	+NaCl	Predicho	- NaCl	+NaCl	Predicho	NaCl	+NaCl
FliE	59.02	20.4	15.8	0	27.3	33.6	0	20	21.3	40.98	41.2	47.7
FlgB	54.29	nd	21.7	0	nd	26.1	0	nd	19.8	42.14	nd	49
FlgC	38.27	16.6	15.7	20.37	32.5	33.9	0	21.2	21.4	48.77	46.1	47.6
FlgF	33.21	17.1	18	13.06	31.8	30.5	0	20.7	20.4	52.99	47.6	46.4
FlgFAD0	5.49	17	18.1	24.73	32	30.7	0	20.9	20.6	62.09	46.6	45.6
FlgG	14.74	15.9	17.9	27.02	33.6	30.7	0	21.3	20.5	55.44	48	46.1
FlgGAD0	2.93	15.5	15.1	40.98	34.3	34.9	0	21.5	21.7	55.61	47.9	47.9

Los valores predichos que se muestran corresponden al promedio de los resultados obtenido con diferentes programas. Los datos experimentales se obtuvieron al deconvolucionar los espectros de dicroísmo circular con el programa CDNN 2.1 (Böhm et al., 1992). Las proteínas se utilizaron a una concentración de 20 μ M (ver materiales y métodos).

Anexo 2. Sobreexpresión y purificación de las proteínas mutantes FlgF Δ D0 y FlgG Δ D0.



Anexo 2. Inducción y purificación de las proteínas mutantes FlgF Δ D0 y FlgG Δ D0 **A**) Inducción (izquierda) y purificación (derecha) de FlgF Δ D0. **B**) Inducción (izquierda) y purificación (derecha) de FlgG Δ D0. Geles SDS, acrilamida 17.5%, teñidos con azul de Coomassie. Las concentraciones que e indican en la parte superior de los geles de la columna derecha corresponden a las concentraciones de Imidazol utilizadas en cada lavado y elución.

REFERENCIAS

- Aizawa SI, Vonderviszt F, Ishima R, Akasaka K (1990) Termini of *Salmonella* flagellin are disordered and become organized upon polymerization into flagellar filament. J Mol Biol 211: 673-7
- Altegoer F, Schuhmacher J, Pausch P, Bange G (2014) From molecular evolution to biobricks and synthetic modules: a lesson by the bacterial flagellum. Biotechnol Genet Eng Rev 30: 49-64
- Armitage JP (1999) Bacterial tactic responses. Adv Microb Physiol 41: 229-89
- Ausubel FM (1987) Current protocols in molecular biology. In Brent R (ed) Wil
- Beatson SA, Minamino T, Pallen MJ (2006) Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure. Trends Microbiol 14: 151-5
- Belas R (2014) Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. Trends Microbiol 22: 517-27
- Berg HC, Anderson RA (1973) Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. Nature 245: 380-2
- Bertani G (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol 62: 293-300
- Brown PN, Mathews MA, Joss LA, Hill CP, Blair DF (2005) Crystal structure of the flagellar rotor protein FliN from *Thermotoga maritima*. J Bacteriol 187: 2890-902
- Böhm G, Muhr R, Jaenicke R (1992) Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. Protein Eng 5: 191-5
- Castillo DJ, Ballado T, Camarena L, Dreyfus G (2009) Functional analysis of a large non-conserved region of FlgK (HAP1) from *Rhodobacter sphaeroides*. Antonie Van Leeuwenhoek 95: 77-90
- Chevance FF, Hughes KT (2008) Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. Nat Rev Microbiol 6: 455-65

Chevance FF, Takahashi N, Karlinsey JE, Gnerer J, Hirano T, Samudrala R, Aizawa S, Hughes KT (2007) The mechanism of outer membrane penetration by the eubacterial flagellum and implications for spirochete evolution. *Genes Dev* 21: 2326-35

Cohen SN, Chang AC, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69: 2110-4

de la Mora J, Uchida K, Martínez Del Campo A, Camarena L, Aizawa SI, Dreyfus G (2015) Structural characterization of the Fla2 flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol*

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

DePamphilis ML, Adler J (1971b) Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 105: 384-95

Duan Q, Zhou M, Zhu L, Zhu G (2013) Flagella and bacterial pathogenicity. *J Basic Microbiol* 53: 1-8

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

Evans LD, Hughes C, Fraser GM (2014) Building a flagellum outside the bacterial cell. *Trends Microbiol* 22: 566-72

Fabela S, Domenzain C, De la Mora J, Osorio A, Ramirez-Cabrera V, Poggio S, Dreyfus G, Camarena L (2013) A distant homologue of the FlgT protein interacts with MotB and FliL and is essential for flagellar rotation in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 195: 5285-96

Francis NR, Sosinsky GE, Thomas D, DeRosier DJ (1994) Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J Mol Biol* 235: 1261-70

Fujii T, Kato T, Namba K (2009) Specific arrangement of alpha-helical coiled coils in the core domain of the bacterial flagellar hook for the universal joint function. *Structure* 17: 1485-93

- Goodsell DS, Olson AJ (2000) Structural symmetry and protein function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 105-53
- Hall RA (2004) Studying protein-protein interactions via blot overlay or Far Western blot. *Methods Mol Biol* 261: 167-74
- Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Hirano T, Minamino T, Namba K, Macnab RM (2003) Substrate specificity classes and the recognition signal for *Salmonella* type III flagellar export. *J Bacteriol* 185: 2485-92
- Hirano T, Yamaguchi S, Oosawa K, Aizawa S (1994) Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 176: 5439-49
- Hizukuri Y, Kojima S, Yakushi T, Kawagishi I, Homma M (2008) Systematic Cys mutagenesis of FlgI, the flagellar P-ring component of *Escherichia coli*. *Microbiology* 154: 810-7
- Homma M, DeRosier DJ, Macnab RM (1990) Flagellar hook and hook-associated proteins of *Salmonella typhimurium* and their relationship to other axial components of the flagellum. *J Mol Biol* 213: 819-32
- Homma M, Fujita H, Yamaguchi S, Iino T (1984) Excretion of unassembled flagellin by *Salmonella typhimurium* mutants deficient in hook-associated proteins. *J Bacteriol* 159: 1056-9
- Homma M, Kutsukake K, Hasebe M, Iino T, Macnab RM (1990) FlgB, FlgC, FlgF and FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* 211: 465-77
- Homma M, Kutsukake K, Iino T, Yamaguchi S (1984) Hook-associated proteins essential for flagellar filament formation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 157: 100-8
- Ikeda T, Asakura S, Kamiya R (1985) "Cap" on the tip of *Salmonella* flagella. *J Mol Biol* 184: 735-7
- Ikeda T, Homma M, Iino T, Asakura S, Kamiya R (1987) Localization and stoichiometry of hook-associated proteins within *Salmonella typhimurium* flagella. *J Bacteriol* 169: 1168-73

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

Jones CJ, Homma M, Macnab RM (1987) Identification of proteins of the outer (L and P) rings of the flagellar basal body of *Escherichia coli*. J Bacteriol 169: 1489-92

Jones CJ, Macnab RM, Okino H, Aizawa S (1990) Stoichiometric analysis of the flagellar hook- (basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*. J Mol Biol 212: 377-87

Kearns DB (2010) A field guide to bacterial swarming motility. Nat Rev Microbiol 8: 634-44

Kojima S, Blair DF (2001) Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor. Biochemistry 40: 13041-50

Kubori T, Shimamoto N, Yamaguchi S, Namba K, Aizawa S (1992) Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. J Mol Biol 226: 433-46

Kubori T, Yamaguchi S, Aizawa S (1997) Assembly of the switch complex onto the MS ring complex of *Salmonella typhimurium* does not require any other flagellar proteins. J Bacteriol 179: 813-7

Kuwajima G (1988) Construction of a minimum-size functional flagellin of *Escherichia coli*. J Bacteriol 170: 3305-9

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-5

Lee LK, Ginsburg MA, Crovace C, Donohoe M, Stock D (2010) Structure of the torque ring of the flagellar motor and the molecular basis for rotational switching. Nature 466: 996-1000

Levenson R, Zhou H, Dahlquist FW (2012) Structural insights into the interaction between the bacterial flagellar motor proteins FliF and FliG. Biochemistry 51: 5052-60

Macnab RM (2003) How bacteria assemble flagella. Annu Rev Microbiol 57: 77-100

Martínez-del Campo A, Ballado T, Camarena L, Dreyfus G (2011) In *Rhodobacter sphaeroides*, chemotactic operon 1 regulates rotation of the flagellar system 2. J Bacteriol 193: 6781-6

McCarter LL (2004) Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. J Mol Microbiol Biotechnol 7: 18-29

Mimori-Kiyosue Y, Vonderviszt F, Yamashita I, Fujiyoshi Y, Namba K (1996) Direct interaction of flagellin termini essential for polymorphic ability of flagellar filament. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 15108-13

Minamino T, Imada K (2015) The bacterial flagellar motor and its structural diversity. Trends Microbiol 23: 267-274

Minamino T, Imada K, Kinoshita M, Nakamura S, Morimoto YV, Namba K (2011) Structural insight into the rotational switching mechanism of the bacterial flagellar motor. PLoS Biol 9: e1000616

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

Minamino T, Yamaguchi S, Macnab RM (2000) Interaction between FliE and FlgB, a proximal rod component of the flagellar basal body of *Salmonella*. J Bacteriol 182: 3029-36

Monlezun L, Liebl D, Fenel D, Grandjean T, Berry A, Schoehn G, Dessein R, Faudry E, Attree I (2015) PscI is a type III secretion needle anchoring protein with in vitro polymerization capacities. Mol Microbiol 96: 419-36

Moriya N, Minamino T, Imada K, Namba K (2011) Genetic analysis of the bacterial hook-capping protein FlgD responsible for hook assembly. Microbiology 157: 1354-62

Müller V, Jones CJ, Kawagishi I, Aizawa S, Macnab RM (1992) 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 174: 2298-304

Nybo SE, Khan NE, Woolston BM, Curtis WR (2015) Metabolic engineering in chemolithoautotrophic hosts for the production of fuels and chemicals. Metab Eng 30: 105-20

- Ohnishi K, Ohto Y, Aizawa S, Macnab RM, Iino T (1994) FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol 176: 2272-81
- Okino H, Isomura M, Yamaguchi S, Magariyama Y, Kudo S, Aizawa SI (1989) Release of flagellar filament-hook-rod complex by a *Salmonella typhimurium* mutant defective in the M ring of the basal body. J Bacteriol 171: 2075-82
- Pallen MJ, Matzke NJ (2006) From The Origin of Species to the origin of bacterial flagella. Nat Rev Microbiol 4: 784-90
- Pallen MJ, Penn CW, Chaudhuri RR (2005) Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era. Trends Microbiol 13: 143-9
- Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Anal Biochem 83: 346-56
- Porter SL, Wilkinson DA, Byles ED, Wadhams GH, Taylor S, Saunders NJ, Armitage JP (2011) Genome sequence of *Rhodobacter sphaeroides* Strain WS8N. J Bacteriol 193: 4027-8
- Raman S, Vernon R, Thompson J, Tyka M, Sadreyev R, Pei J, Kim D, Kellogg E, DiMaio F, Lange O, Kinch L, Sheffler W, Kim BH, Das R, Grishin NV, Baker D (2009) Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta. Proteins 77 Suppl 9: 89-99
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. Nat Protoc 5: 725-38
- Saijo-Hamano Y, Matsunami H, Namba K, Imada K (2013) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a core fragment of FlgG, a bacterial flagellar rod protein. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 69: 547-50
- Saijo-Hamano Y, Namba K, Oosawa K (2000) A new purification method for overproduced proteins sensitive to endogenous proteases. J Struct Biol 132: 142-6
- Saijo-Hamano Y, Uchida N, Namba K, Oosawa K (2004) In vitro characterization of FlgB, FlgC, FlgF, FlgG, and FliE, flagellar basal body proteins of *Salmonella*. J Mol Biol 339: 423-35

Samatey FA, Imada K, Nagashima S, Vonderviszt F, Kumasaka T, Yamamoto M, Namba K (2001) Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature* 410: 331-7

Samatey FA, Imada K, Vonderviszt F, Shirakihara Y, Namba K (2000) Crystallization of the F41 fragment of flagellin and data collection from extremely thin crystals. *J Struct Biol* 132: 106-11

Samatey FA, Matsunami H, Imada K, Nagashima S, Namba K (2004a) Crystallization of a core fragment of the flagellar hook protein FlgE. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60: 2078-80

Samatey FA, Matsunami H, Imada K, Nagashima S, Shaikh TR, Thomas DR, Chen JZ, Derosier DJ, Kitao A, Namba K (2004b) Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. *Nature* 431: 1062-8

Shaikh TR, Thomas DR, Chen JZ, Samatey FA, Matsunami H, Imada K, Namba K, Derosier DJ (2005) A partial atomic structure for the flagellar hook of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1023-8

Sistrom WR (1962) The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas spheroides*. *J Gen Microbiol* 28: 607-16

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

Terashima H, Koike M, Kojima S, Homma M (2010) The flagellar basal body-associated protein FlgT is essential for a novel ring structure in the sodium-driven *Vibrio* motor. *J Bacteriol* 192: 5609-15

Terashima H, Li N, Sakuma M, Koike M, Kojima S, Homma M, Imada K (2013) Insight into the assembly mechanism in the supramolecular rings of the sodium-driven *Vibrio* flagellar motor from the structure of FlgT. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 6133-8

Thomas DR, Francis NR, Xu C, DeRosier DJ (2006) The three-dimensional structure of the flagellar rotor from a clockwise-locked mutant of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 188: 7039-48

Thomas DR, Morgan DG, DeRosier DJ (1999) Rotational symmetry of the C ring and a mechanism for the flagellar rotary motor. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 10134-9

Ueno T, Oosawa K, Aizawa S (1992) M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF. J Mol Biol 227: 672-7

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

Uratani Y, Asakura S, Imahori K (1972) A circular dichroism study of *Salmonella* flagellin: evidence for conformational change on polymerization. J Mol Biol 67: 85-98

Vega-Baray B, Domenzain C, Rivera A, Alfaro-López R, Gómez-César E, Poggio S, Dreyfus G, Camarena L (2015) The flagellar set Fla2 in *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the CckA pathway and is repressed by organic acids and the expression of Fla1. J Bacteriol 197: 833-47

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

Vonderviszt F, Ishima R, Akasaka K, Aizawa S (1992) Terminal disorder: a common structural feature of the axial proteins of bacterial flagellum? J Mol Biol 226: 575-9

Vonderviszt F, Kanto S, Aizawa S, Namba K (1989) Terminal regions of flagellin are disordered in solution. J Mol Biol 209: 127-33

Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33: 103-19

Yonekura K, Maki S, Morgan DG, DeRosier DJ, Vonderviszt F, Imada K, Namba K (2000) The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. Science 290: 2148-52

Yonekura K, Maki-Yonekura S, Homma M (2011) Structure of the flagellar motor protein complex PomAB: implications for the torque-generating conformation. J Bacteriol 193: 3863-70

Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K (2003) Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. Nature 424: 643-50

Yorimitsu T, Homma M (2001) Na⁽⁺⁾-driven flagellar motor of *Vibrio*. *Biochim Biophys Acta* 1505: 82-93

Zhao R, Amsler CD, Matsumura P, Khan S (1996) FliG and FliM distribution in the *Salmonella typhimurium* cell and flagellar basal bodies. *J Bacteriol* 178: 258-65

Zhao R, Pathak N, Jaffe H, Reese TS, Khan S (1996) FliN is a major structural protein of the C-ring in the *Salmonella typhimurium* flagellar basal body. *J Mol Biol* 261: 195-208

Zhao X, Zhang K, Boquoi T, Hu B, Motaleb MA, Miller KA, James ME, Charon NW, Manson MD, Norris SJ, Li C, Liu J (2013) Cryoelectron tomography reveals the sequential assembly of bacterial flagella in *Borrelia burgdorferi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 14390-5