

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**El papel del C-terminal de SltF en la biogénesis
flagelar de *Rhodobacter sphaeroides*.**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Mariela García Ramos

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. Georges Dreyfus Cortés
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dr. Rodolfo García Contreras
Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

OFICIO CPCB/023/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. EN C. IVONNE RAMÍREZ WENCE
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina en su sesión ordinaria del día 29 de octubre de 2018, aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna, **GARCÍA RAMOS MARIELA** con número de cuenta **307014434** con la tesis "El papel de la C-terminal de SlfF en la biogénesis flagelar de *Rhodobacter sphaeroides*", realizada bajo la dirección del **DR. GEORGES DREYFUS CORTÉS**.

Presidente: DR. JOSE LUIS PUENTE GARCÍA
Vocal: DR. LORENZO PATRICK SEGOVIA FORCELLA
Secretario: DRA. BERTHA MARÍA JOSEFINA GONZÁLEZ PEDRAJO
Suplente: DR. OTTO GEIGER
Suplente: DR. ADRIÁN FERNANDO ÁLVAREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 07 de enero de 2019


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Indice

AGRADECIMIENTOS.....	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
El flagelo bacteriano.....	8
El cuerpo basal.....	9
Gancho.....	22
Filamento.....	26
Quimiotaxis.....	29
Regulación flagelar.....	31
Biogénesis flagelar.....	33
Modelo experimental: <i>Rhodobacter sphaeroides</i>.....	36
ANTECEDENTES PARTICULARES.....	40
El eje	40
Pared de peptidoglicano.....	47
Enzimas líticas en sistemas de transporte macromolecular.....	49
Enzimas líticas.....	49
Transglicosilasas líticas.....	50
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	56
HIPÓTESIS.....	57
OBJETIVOS.....	58
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
RESULTADOS.....	69

El C-terminal no conservado de SltF.....	68
Purificación de la proteína SltF silvestre y las mutantes SltFΔ95, SltFΔ47 y SltFΔ48	69
Purificación de los componentes del eje flagelar: FliE, FlgB, FlgC, FlgF, FlgG y FlgJ.	73
Interacción física entre los componentes del eje flagelar y SltF.....	74
Ensayos de la actividad enzimática de SltF en presencia de los componentes del eje flagelar.....	78
DISCUSIÓN.....	90
CONCLUSIONES.....	94
PERSPECTIVAS.....	95
BIBLIOGRAFÍA.....	97

Agradecimientos

- Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Georges Dreyfus Cortés en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular.
- Agradezco la asesoría prestada y la estrecha colaboración brindada por la Dra. Laura Camarena del Instituto de Investigaciones Biomédicas durante la entera realización de este trabajo.
- A mi comité tutorial por la mejoría que otorgaron a este proyecto con sus comentarios y asesorías, al Dr. Rodolfo García Contreras y a la Dra Bertha María Josefina González Pedrajo.
- Al Dr. Javier de la Mora Bravo por la asesoría técnica y académica prestada durante la realización de este proyecto.
- A la Q.F.B Teresa Ballado por su invaluable asesoría técnica y académica durante el desarrollo de este trabajo.
- Al laboratorio del Dr. Antonio Peña, a la Dra. Martha Calahorra Fuertes y a la M. en C. Norma Silvia Sánchez Sánchez.
- Agradezco a los miembros de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
- A los miembros de la biblioteca “Armando Gómez Puyou” del Instituto de Fisiología Celular, UNAM por todas las facilidades otorgadas.
- A la M. en C. Mariana Servín Pastor por la asesoría brindada para la realización de las pruebas estadísticas
- Agradezco a los miembros del jurado por la revisión de esta tesis: Dr. Adrián Fernando Álvarez, Dr. José Luis Puente García, Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella, Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo y al Dr. Otto Geiger.
- Al CONACyT por otorgarme la beca de posgrado para llevar a cabo los estudios de maestría.

- Al PAEP por el apoyo económico otorgado para asistir al V Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias de la Sociedad Mexicana de Bioquímica.
- Este trabajo se realizó gracias a el financiamiento otorgado por CONACyT (CB-235996) y por el donativo PAPIIT (IN-204317).

Resumen

El flagelo es el organelo de motilidad bacteriano por excelencia. Se trata de un sistema de locomoción que les permite desplazarse en ambientes líquidos, viscosos o sobre superficies sólidas. El ensamblaje del flagelo es un proceso altamente regulado en el que participan cerca de 50 genes expresados jerárquicamente. Históricamente y para facilitar su estudio se divide al flagelo en tres partes: **El cuerpo basal**, que se encuentra embebido en la superficie celular, y que alberga al motor y al aparato de exportación, **el gancho** que acopla la rotación y **el filamento** que recibe el torque e impulsa a la bacteria.

Durante la biogénesis flagelar, la pared de peptidoglicano debe ser degradada para permitir el paso del eje. En la bacteria modelo *Salmonella enterica* la proteína FlgJ es bifuncional o bidominio: posee un dominio de ensamblaje en la región N-terminal cuya función es permitir la asociación de los componentes del eje y en la región C-terminal un dominio de β -N-acetilglucosaminidasa, el cual le permite degradar enzimáticamente a la pared de peptidoglicano.

En la α -proteobacteria *Rhodobacter sphaeroides* la proteína FlgJ es monodominio, únicamente contiene el dominio de ensamblaje y es incapaz de romper la capa de peptidoglicano al carecer de el dominio enzimático apropiado para hacerlo. La pared de peptidoglicano debe ser degradada y para ello la estructura se vale de una enzima lítica. La proteína SltF es la transglicosilasa lítica responsable por la degradación local de la pared de peptidoglicano en el sitio de formación del flagelo al interactuar con FlgJ.

A la proteína SltF la caracterizan algunas particularidades que la distinguen de otras transglicosilasas líticas, la más notoria es su C-terminal, esta región está compuesta por aproximadamente 95 aminoácidos que no alinean con ninguna proteína conocida pero que juegan un papel fundamental en la biogénesis flagelar ya que su eliminación ocasiona la pérdida de la motilidad. Estudios previos en el laboratorio sugieren que en la región C-terminal de SltF hay al menos dos dominios funcionales distinguibles, el primero de ellos es crucial para su interacción con FlgJ, mientras que el segundo juega un papel importante en su estabilidad. Dado que SltF es exportado a su sitio de acción (el periplasma), por una vía independiente a la flagelar, se propone que la interacción con FlgJ es fundamental para que esta enzima se ubique en su sitio de acción. Adicionalmente, estudios recientes sugieren que SltF es también capaz de interactuar con al menos dos componentes del eje y que dicha interacción podría además tener un papel en la regulación de su actividad enzimática.

En este trabajo se evaluó la interacción de SltF silvestre y de las versiones mutantes en el C-terminal con los componentes del eje flagelar. Se determinó que SltF es capaz de interactuar con todos los componentes del eje y que además su C-terminal no conservado es crucial para el reconocimiento de estos componentes. Adicionalmente se determinó que la proteína FlgJ inhibe la actividad de SltF, pero esta inhibición se suprime en presencia de cualquiera de los componentes estructurales del eje, y se determinó que la actividad enzimática de SltF es estimulada en presencia de FlgB.

Los resultados presentados en este trabajo sugieren la existencia de un mecanismo fundamental para el funcionamiento de SltF, los componentes estructurales del eje (FliE,

FlgB, FlgC, FlgF y FlgG) y FlgJ actúan colectivamente para controlar su estricta localización y la regulación de su actividad lítica previniendo la lisis celular.

Este trabajo resuelve las interacciones que mantiene SlfF con otros componentes flagelares que son cruciales para su localización y para la regulación de su actividad lítica y nos permite proponer un modelo para su funcionamiento contribuyendo al modelo de la biogénesis del cuerpo basal en *R. sphaeroides* y otorgan un parámetro para el estudio de FlgJ monodominio en otros modelos flagelares.

Abstract

The bacterial flagellum is the main organelle for motility among bacteria. It is a locomotion system that allows bacteria to travel through liquid environments or solid surfaces. Structurally, the flagellum can be divided into three substructures: **a basal body** acting as a molecular motor embedded in the cell surface, **a filament** acting as a screw extending into the environment and **a hook** acting as a universal joint by linking the filament to the basal body.

Bacterial flagella span the bacterial cell wall, therefore, during rod formation the cell wall barrier must be penetrated. In *Salmonella enterica* the proteic component FlgJ is bifunctional or bidomain: in the N-terminus it contains the assembly domain that assists rod proteins during their assembly and in the C-terminus it contains an enzymatic domain that penetrates the cell wall.

In *Rhodobacter sphaeroides* FlgJ possesses a single domain, that only encodes the assembly domain and it is not incapable of breaking the cell wall. SltF is the lytic transglycosylase responsible for the local cell wall degradation during flagellar biosynthesis by interacting with FlgJ.

SltF is characterized by a long and non-conserved C-terminus, which is 95 amino acids long and although the domain does not resemble any known protein it is crucial for flagellar biogenesis. Previous studies show that the C-terminus has two functional domains. The first domain is relevant for protein stability and the second one is crucial for the recognition of FlgJ. SltF is exported to the periplasm via the SecA pathway. Therefore, an interaction with FlgJ is imperative in order for SltF to open the gap in the cell wall where the flagellum is being assembled. Additionally, recent studies suggest that SltF is also capable of interacting with two rod components and that both could regulate the enzymatic activity of SltF.

In the present work we evaluated the interaction of SltF and the C-terminal mutants with the rod structural components. We were able to determine that SltF interacts with all of the rod components and that the non-conserved C-terminus is crucial for such interactions. We also show that FlgJ inhibits the enzymatic activity of SltF, but such inhibition is suppressed by the structural components of the rod. We also demonstrated that the enzymatic activity of SltF is enhanced by the presence of FlgB.

Our results show the existence of a mechanism for the functioning of SltF. The structural components of the rod (FliE, FlgB, FlgC, FlgF y FlgG) and FlgJ, work together to control the localization and enzymatic activity of SltF preventing cell lysis.

This work suggests that the interactions that SltF has with flagellar components are crucial for its localization and for the regulation of the enzymatic activity. Our results allow us to propose a model for the functioning of the system, contributing to the flagellar biogenesis model of *R. sphaeroides*. Therefore, bringing a parameter for the study of FlgJ monodomain in other flagellar systems.

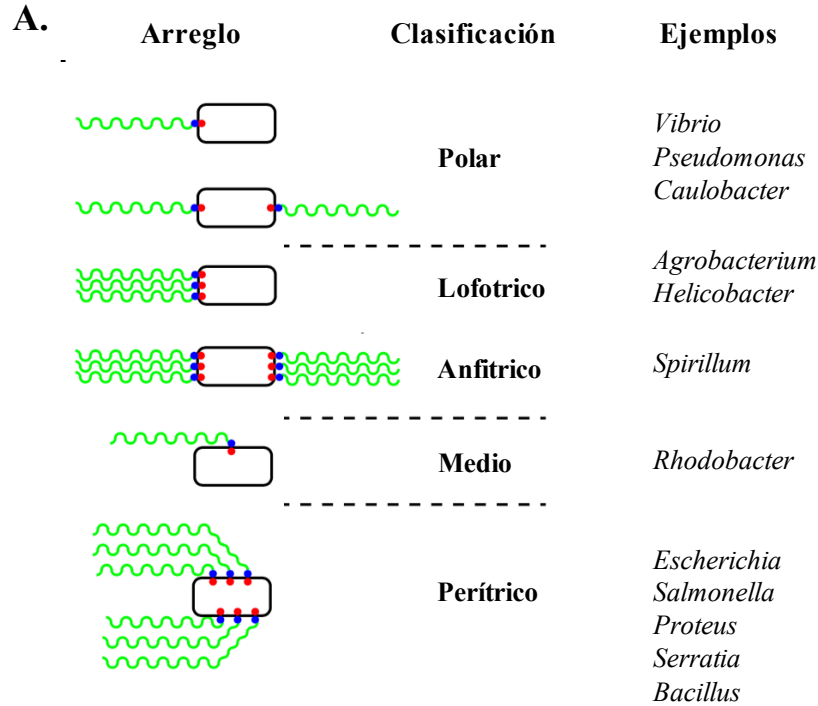
Introducción

La motilidad es una adaptación benéfica para los seres vivos que son capaces de realizarla. Las bacterias no son la excepción y han desarrollado una serie de adaptaciones estructurales únicas que les permiten migrar dentro de su propio nicho, la capacidad para desplazarse es una de las más importantes, pues les permite alejarse de ambientes desfavorables y explorar el medio en busca de condiciones propicias para la sobrevivencia (Hottes, et al. 2013).

El flagelo es el organelo de motilidad más importante en bacterias, es un complejo proteico que funciona gracias a la acción de un motor rotatorio impulsado por el potencial electroquímico.

Aproximadamente el 70% de las bacterias conocidas son flageladas y por lo tanto son capaces de nadar en superficies líquidas (Aizawa, 2014). La posición y el número de flagelos que puede tener una célula son cuestiones que van a variar dramáticamente según la especie que se observe. Dependiendo de la posición que tenga el flagelo respecto a la célula, va a recibir diferentes nombres: polar (un flagelo en uno o ambos polos), anfítrico (múltiples flagelos en uno o ambos polos), medio (cerca del polo) y perítrico (múltiples flagelos en un arreglo espacial aleatorio) (**Figura 1**) (Aizawa, 2014; Guttenplan, et al. 2013).

Tener un flagelo es suficiente para nadar en medios líquidos, sin embargo, tener múltiples flagelos le permite a las bacterias que los presentan nadar mejor en ambientes viscosos y/o sólidos por lo que tenerlos podría representar una ventaja adaptativa según el medio en el que vivan estas bacterias (Kearns, 2010).



B.

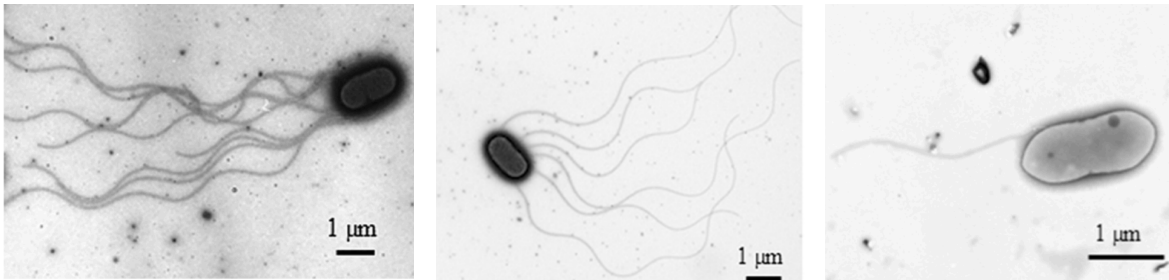


Figura 1. Arreglo espacial del flagelo bacteriano. **A.** La disposición polar indica un único flagelo en uno o ambos polos celulares. La disposición lofótrica y anfítrica indica múltiples flagelos en uno o ambos polos. La disposición media indica un único flagelo emergiendo del cuerpo celular. La disposición peritrica indica la existencia de múltiples flagelos en el cuerpo celular. Se esquematiza el cuerpo basal en color rojo, el gancho en color azul y el filamento en color verde. **B.** Microscopia electrónica de transmisión de células de: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Rhodobacter sphaeroides*. Se observan ejemplos de flagelos peritricos y de un flagelo medio (Guttenplan, *et al.* 2013; Aizawa, 2014).

El flagelo bacteriano

Históricamente y para facilitar su estudio, el flagelo bacteriano se divide en tres componentes principales: el **cuerpo basal** que además de albergar el aparato de exportación, funciona como un motor rotatorio y está compuesto por una serie de anillos embebidos en la envoltura celular, el **gancho** que funciona como una articulación capaz de transmitir el torque del motor al resto de la estructura y el **filamento** que realiza un trabajo mecánico sobre el medio para permitir al cuerpo celular desplazarse (**Figura 2**).

Figura 2. El flagelo bacteriano. Se muestra un esquema representativo del flagelo indicando los componentes estructurales de cada una de las partes. El flagelo se ensambla desde la membrana interna, cruza la pared celular, llega hasta la membrana externa y finalmente se extiende hasta el espacio extracelular (Evans, *et al.* 2014).

Cuerpo basal

El cuerpo basal es un complejo protéico que se extiende desde la membrana citoplásmica hasta la membrana externa. De acuerdo con lo descrito en las bacterias modelo el cuerpo basal está compuesto por los **anillos C, MS, P y L**, el **eje axial** y el **aparato de exportación flagelar tipo III** (Fujii, *et al.* 2017).

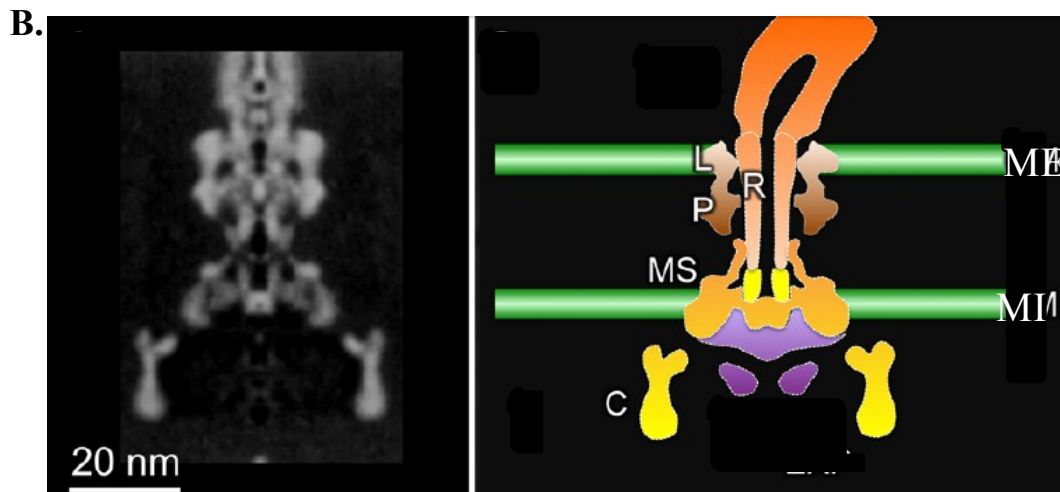
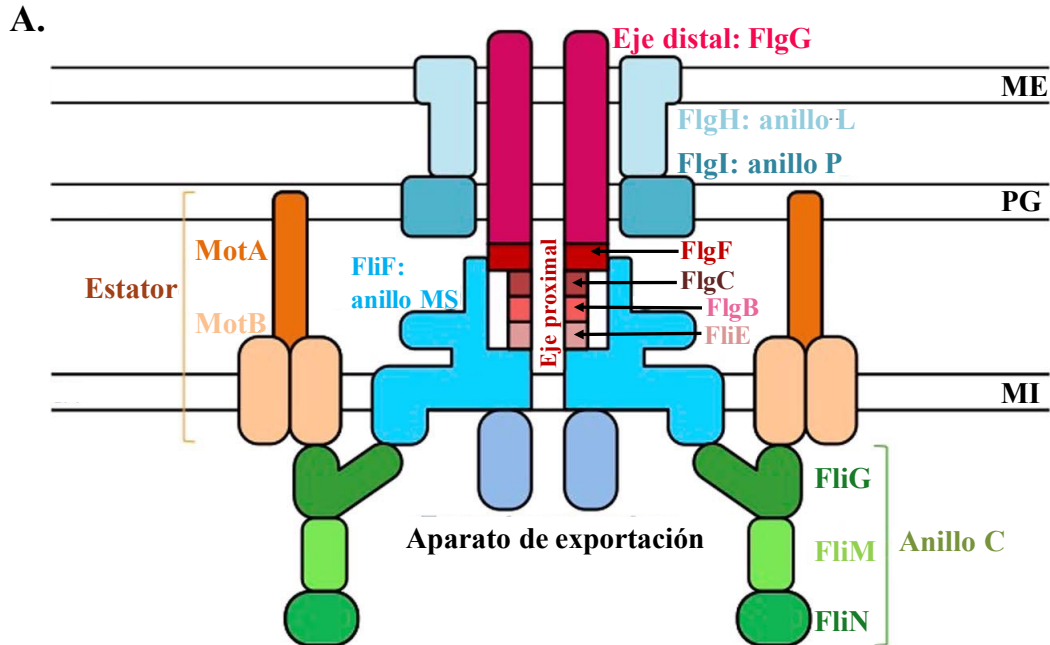


Figura 3. El cuerpo basal. **A.** Se esquematizan los componentes principales del cuerpo basal (Komatsu *et al.* 2016). **B.** (Izquierda) Se muestra el cuerpo basal de *S. enterica* determinado por criomicroscopía electrónica. (Derecha) Se esquematizan las estructuras del cuerpo basal de *S. enterica*, se resaltan los anillos C, MS, P y L además del eje (con una R) en el centro de la estructura (Zhao, *et al.* 2014). ME: membrana externa, PG: peptidoglicano, MI: membrana interna.

El anillo C

Se trata de un anillo citoplásmico que mide aproximadamente 45 nm de ancho y está íntimamente involucrado en la generación del torque y en la regulación de la conmutación del motor flagelar al funcionar como un complejo de *switch* (por lo que también se le suele denominar de esta manera). En algunas especies bacterianas, este complejo puede rotar en dos direcciones posibles: en sentido de las manecillas del reloj o en sentido contrario a las manecillas del reloj (clockwise (CW) y counterclockwise (CCW) respectivamente) (Lynch et al. 2017). Las reversiones reguladas por el complejo de *switch* son responsables por el movimiento celular dirigido.

Estructuralmente, el complejo está formado por las proteínas FliG, FliM y FliN.

FliG funciona directamente en la generación del torque (interaccionando con el estator que será descrito más adelante) y se ubica en la parte superior del anillo, es decir, la parte más proximal a la membrana, debajo de esta yace FliM y finalmente se encuentra FliN (**Figura 4**).

Figura 4. Arquitectura molecular del anillo C o complejo de *switch*. Organización del complejo de *switch* en *S. enterica* (FliG, FliM y FliN). Los modelos atómicos de los componentes fueron ajustados en un mapa de densidad electrónica (Zhao, et al. 2014).

El anillo MS

El anillo MS (**M**embrane **S**upramembrane) se localiza en la membrana interna, es la primera de las estructuras anulares que se ensambla durante la biogénesis flagelar por lo que funciona como una base para el ensamblaje. Este anillo está compuesto por 25 subunidades de la proteína FliF. FliF es una proteína integral de membrana con extensos dominios periplásmicos, su carboxilo terminal le permite adherirse al anillo C al interactuar con el amino terminal de FliG en una estequiometría de 1:1. (Lynch, et al. 2017).

El anillo P

El anillo P (en referencia al **p**eptidoglicano) es una formación periplásmica que interacciona con la pared celular. Se trata de una estructura homopolimérica que se ensambla alrededor del eje flagelar y que está compuesta por 26 subunidades de la proteína FlgI (Jones et al. 1990). Establecer este anillo requiere la presencia de FlgA, quien parece funcionar como una chaperona periplásmica que asiste a FlgI durante la polimerización necesaria para formar el anillo P (Nambu, et al. 2000).

El anillo L

El anillo L (en referencia al **l**ipopolisacárido) es una estructura que está conservada en bacterias Gram-negativas, se trata de un anillo que se ubica en la membrana externa. Este anillo se ensambla de forma que rodea la parte más distal del eje creando un poro por el cual se puede elongar el flagelo, la formación de este poro es crucial para que la polimerización del gancho pueda comenzar (Cohen, et al. 2014).

El anillo L está compuesto por aproximadamente 26 subunidades de la lipoproteína FlgH, se ha demostrado que bajo condiciones fisiológicas la lipoilación del amino terminal de esta proteína es necesaria para su funcionamiento y entonces se sugiere que este es el dominio que permite a las subunidades de FlgH anclarse a la membrana externa y parece hacerlo en virtud de las cadenas acilo, esto podría contribuir a la formación de una estructura muy estable que puede resistir la fuerza de rotación generada mientras la célula se mueve a través del medio (Schoenhals, et al. 1996).

El carboxilo terminal se extiende hacia el periplasma y aunque no tiene un motivo de asociación al peptidoglicano, sí es capaz de interactuar con la proteína FlgI del anillo P, de esta forma ambas estructuras anulares forman un complejo denominado anillo LP, este complejo forma una estructura rígida que sirve como un buje para el eje flagelar que se encuentra rotando, este complejo es exclusivo de bacterias Gram- negativas (Büttner, 2012).

El eje

El eje es la porción más proximal de las estructuras flagelares axiales y funciona como un eje de transmisión, es una estructura recta, hueca y rígida que cruza el espacio periplásmico con una arquitectura sencilla, (**Figura 5**) todos los componentes del eje son exportados a través de la membrana citoplásmica gracias al sistema de secreción flagelar tipo III (Macnab, et al. 2004).

En la parte más distal de la estructura y rodeada por los anillos L y P se encuentra su diámetro máximo con 13 nm, esto es interesante dado que en la región más proximal únicamente mide aproximadamente 7 nm y es ahí el sitio de unión con FliF en el anillo MS. De largo, se estima que esta estructura alcanza hasta 25 nm.

El eje es el componente responsable de la estabilidad de la estructura mientras el flagelo rota a muy altas velocidades (300 Hz en *S. enterica* y en *E. coli* y hasta 1,700 Hz en los *Vibrios marinos*). Su rigidez asegura la estabilidad de la posición axial aún cuando la rotación cambia de dirección (evento que ocurre en 1 milisegundo). El eje rota a velocidades muy altas mientras se encuentra dentro de los anillos L y P, esta rotación ocurre sin ningún lubricante entre ambas superficies de contacto (Fujii, et al. 2017).

En *S. enterica*, el eje está compuesto por cinco proteínas: FliE, FlgB, FlgC, FlgF y FlgG. Se propone que la proteína FliE es el componente más proximal del eje pues se localiza sobre el anillo MS, sin embargo, hay autores que proponen que FliE podía no ser parte del eje sino más bien un adaptador entre el anillo MS y el eje.

Las proteínas FlgB y FlgC (15 y 14 kDa respectivamente) forman el delgado eje proximal con un largo de 4.5 nm y un diámetro de 6 nm.

Las proteínas FlgF y FlgG (26 y 29 kDa respectivamente) forman la porción más ancha y distal del eje con aproximadamente 20 nm de largo y 13 nm de diámetro, FlgG corresponde a la parte más distal del eje. Las estequiometrias de FlgB, FlgC, FlgF y FlgG se han estimado bioquímicamente y se propone que son de 6, 6, 6 y 26 subunidades respectivamente (Apel, et al. 2008; Fujii, et al. 2017)

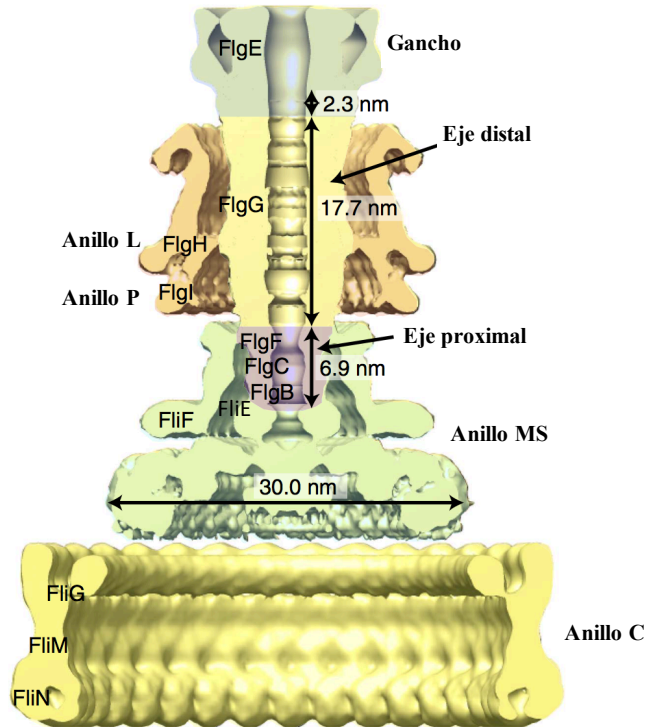


Figura 5. El cuerpo basal de *Salmonella enterica*. Se muestra un mapa de densidad de criomicroscopía electrónica de 3D, se esquematizan sus partes con diferentes colores y se indican las dimensiones que ya se han determinado experimentalmente. Se muestra con claridad el eje, sus respectivos componentes y las medidas en nm (Fujii, *et al.* 2017).

Las proteínas flagelares axiales comparten un motivo estructural de dominios múltiples que son lineales y están conectados, además de tener una forma relativamente elongada. Estos dominios están dispuestos radialmente, por ejemplo, los tres dominios (D0, D1 y D3) de la proteína del gancho FlgE están dispuestos radialmente desde la parte interna hasta la parte externa de la estructura tubular del gancho. Las proteínas axiales también son muy similares a nivel de secuencia primaria, sugiriendo un origen evolutivo en común, los N- y C-terminales están sumamente conservados y contienen una repetición heptada de residuos hidrofóbicos, adicionalmente, las predicciones de estructura secundaria sugieren que forman α -hélices *coiled coil*. El eje no es la excepción, las proteínas estructurales que lo componen comparten la misma dinámica de plegamiento durante su ensamblaje para poder formarlo, comparten características fisicoquímicas similares, y sus extremos tienen repeticiones de residuos hidrofóbicos que son clave para la construcción de una estructura estable (Saijo, *et al.* 2004).

Si bien existe el debate sobre si los componentes estructurales del eje son cuatro o son cinco (por incluir o no a FliE) es relevante mencionar que en la biogénesis del eje flagelar existe un sexto participante, este participante no forma parte estructural del eje ni del cuerpo basal pero su presencia es fundamental para que este pueda formarse: esta es la proteína FlgJ.

FlgJ en *S. enterica* es una proteína con dos dominios, su N-terminal está compuesto por un

dominio de andamio requerido para la polimerización del eje mientras que su C-terminal está compuesto por un dominio enzimático, específicamente una β -N-acetilglucosaminidasa que se requiere para la formación de un hueco en la pared celular. Una vez que se ha abierto el espacio en la pared celular, 26 subunidades de la proteína FlgG son secretadas y ensambladas en dos pilas debajo de FlgJ. (Cohen, *et al.* 2014; Hershey, *et al.* 2014). Aunque los dominios de FlgJ están claramente definidos y caracterizados, esta proteína es aún un misterio, se desconoce si FlgJ es necesaria para el ensamblaje de todas las proteínas del eje o si solamente es necesaria para ensamblar a la parte más distal. (Ambas posibilidades continúan a discusión.) (Cohen, *et al.* 2014; Minamino, *et al.* 2000; Zhang, *et al.* 2011)

Una vez que se ha completado la polimerización del eje, se forma un hueco en la membrana externa para la posterior formación del gancho y del filamento, que son extracelulares. Para que esto ocurra y como ya se describió, las proteínas necesarias para formar a los anillos L y P (FlgA, FlgH y FlgI) son secretadas al espacio periplásmico por el sistema de secreción tipo III. Una vez ensamblados los anillos L y P y completada la formación del poro en la membrana externa, comienza la polimerización del gancho. Para que la formación del gancho ocurra, es necesario que la proteína de andamio del eje (FlgJ) sea remplazada con la proteína de andamio del gancho (FlgD) (**Figura 6**) (Cohen, *et al.* 2014).

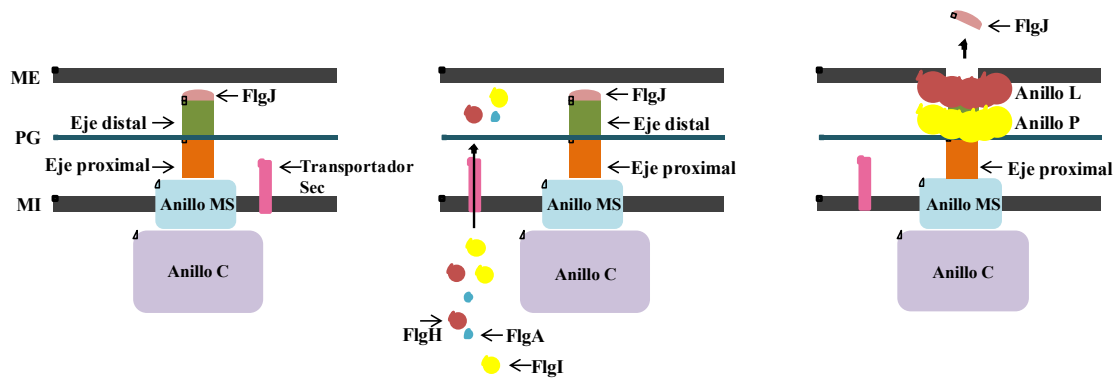


Figura 6. Modelo para el cambio entre eje y gancho durante la biogénesis flagelar. El proceso es jerárquico. En algún punto, la proteína de andamio FlgJ se asocia con el eje durante su ensamblaje para asistirlo, el dominio enzimático le permite cruzar la pared de peptidoglicano. El eje distal deja de ensamblarse cuando este ha alcanzado a la membrana externa. Una vez que se han secretado sus respectivos componentes, se forman los anillos P y L. Cuando se completa la formación del anillo L, que rodea al eje distal, se forma un poro en la membrana externa, esto ocasiona que FlgJ se disocie de la punta del eje y salga hacia el espacio extracelular (Modificada de Cohen, *et al.* 2014). ME: membrana externa, PG: peptidoglicano, MI: membrana interna.

El motor flagelar

El motor flagelar se localiza en la base del flagelo y es energizado por un gradiente de protones o de sodio, este motor es entonces una nanomáquina molecular capaz de convertir la energía electroquímica (el potencial electroquímico del gradiente de H^+ o Na^+) en trabajo mecánico (torque) (Schmitt, 2003).

El torque es generado por dos componentes flagelares: El complejo de *switch* (anillo C) y los estatores asociados a la membrana celular (Thormann, *et al.* 2010) (**Figura 7**).

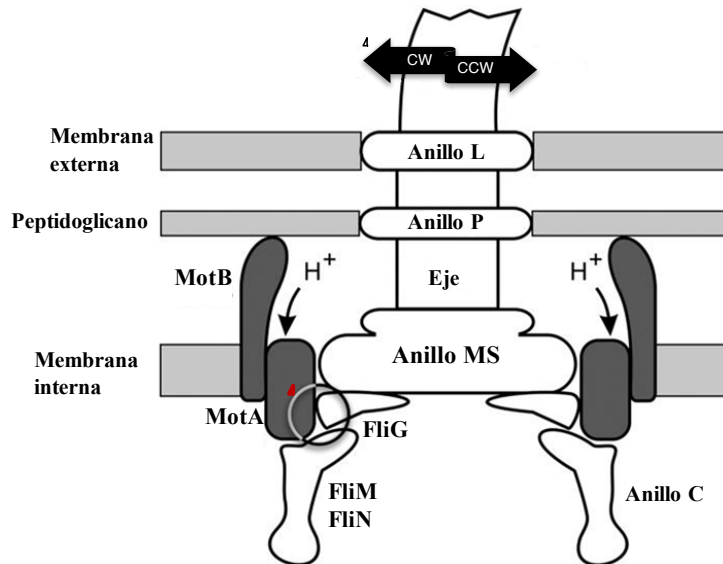


Figura 7. Representación esquemática del cuerpo basal destacando el motor flagelar. La parte central (en color blanco) es capaz de rotar mientras que los canales de protones MotA-MotB (en gris oscuro) están anclados en la capa de peptidoglicano de la envoltura celular. En este ejemplo, el torque es generado por el flujo de protones vía MotA-MotB a través de la membrana citoplásmica y por interacciones entre MotA (estator) y FliG (rotor) señaladas con un círculo color rojo. La mayoría de los motores flagelares pueden cambiar la rotación de CCW a CW (Schmitt, 2003).

El estator está compuesto por dos subunidades diferentes: MotA y MotB (en los estatores dependientes de protones) o PomA y PomB (en los estatores dependientes del ion sodio). Los componentes del estator se encuentran en una estequiometría 4:2 (A_4B_2). Se propone que dos subunidades de A y una subunidad de B forman un canal iónico, de esta manera cada complejo estator tiene dos canales.

Las subunidades A tienen cuatro dominios transmembranales con una estructura tipo α -hélice, también presentan un bucle citoplásmico que conecta los dominios transmembranales 2 y 3 y que parece ser relevante para la interacción con FliG en el complejo de *switch*.

La subunidad B es principalmente periplásmica, tiene un dominio transmembranal y un motivo de unión al peptidoglicano en el C-terminal que le permite adherirse a la pared celular (Berg, 2003; Thormann, *et al.* 2010) (**Figura 8**).

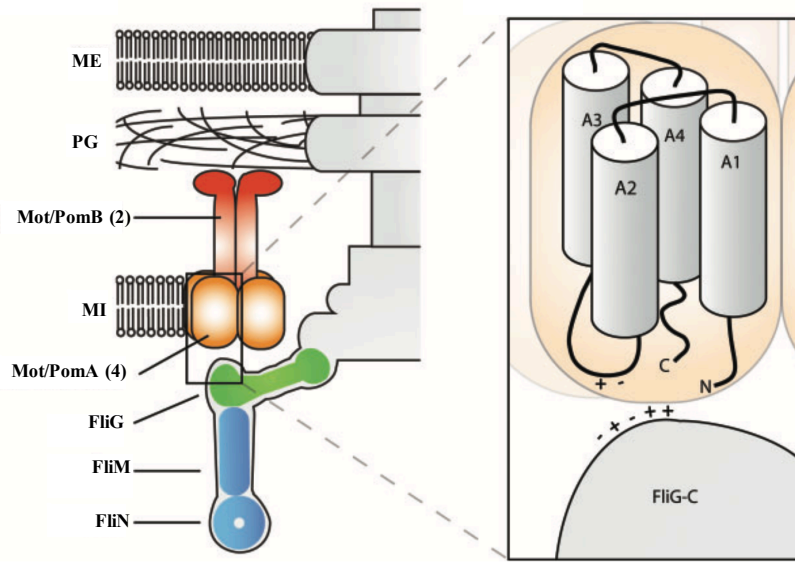


Figura 8. Interacción rotor-estator. Los estatores son capaces de interactuar con el complejo de *switch*, este complejo está compuesto por las proteínas FliG, FliM y FliN. Cada complejo estator consta de 4 subunidades A y 2 subunidades B (izquierda). Cada subunidad de MotA tiene cuatro dominios transmembranales (A1-A4), se propone que los aminoácidos cargados en el C-terminal de FliG y los aminoácidos cargados en el bucle que conecta A2 y A3 interactúan electrostáticamente (derecha) (Thormann, *et al.* 2010). ME: membrana externa, PG: peptidoglicano, MI: membrana interna.

Aunque se han realizado muchos estudios para caracterizar a los residuos de interés en el segmento citoplásmico de MotA y en el carboxilo terminal de FliG, las interacciones parecen más bien robustas ya que no parece existir un residuo crítico en ninguno de estos dos componentes, y estudios comparativos demuestran que la interacción PomA-FliG es similar a la interacción MotA-FliG, sin embargo parece que PomA es menos sensible a mutaciones en los residuos conservados con carga, entonces se sugiere que los motores de sodio son mucho más robustos que los de protones (Yakushi, *et al.* 2006), esto podría atribuirse a que en este tipo de motores existe el anillo T.

El anillo T está compuesto por las proteínas MotX y MotY, se ha reportado que ambas proteínas son esenciales para la motilidad y se sugiere que esto se debe a que ambas son cruciales para el reclutamiento y/o estabilidad de los estatores en el motor (Terashima, *et al.* 2006).

Claro está entonces que, aunque ambos tipos de motores son similares presentan algunas diferencias de interés. En la **Figura 9** se muestra un esquema representativo que incluye la información relevante descrita para ambos tipos de motor flagelar.

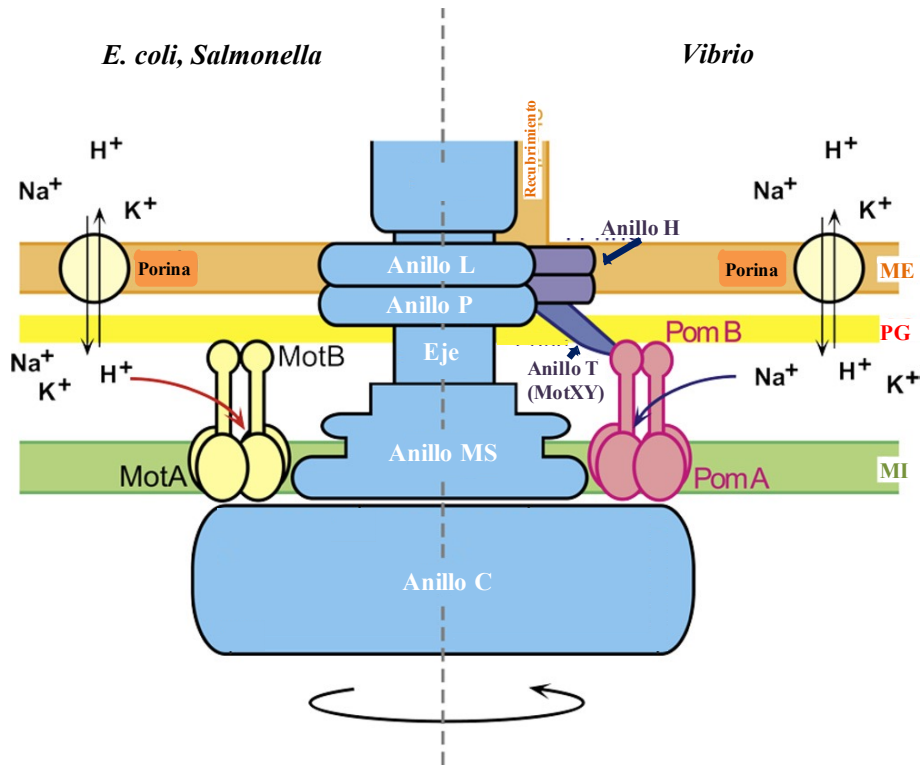


Figura 9. Esquema representativo de los dos tipos de motor flagelar. Se muestra un modelo para el motor de protones característico de *Salmonella* y *E. coli* (izquierda) y el motor de sodio de *Vibrio* (derecha) que está recubierto de membrana. La fuente de energía para el funcionamiento del flagelo es el resultado del gradiente electroquímico. Las unidades funcionales del estator: MotA₄MotB₂ o PomA₄PomB₂. ME: membrana externa, PG: peptidoglicano, MI: membrana interna (Yonekura, *et al.* 2011).

Los detalles del mecanismo mediante el cual el motor flagelar genera la rotación flagelar aún están por resolverse, sin embargo, se sugiere que los aminoácidos cargados en FliG y los aminoácidos cargados en el bucle de MotA interactúan electrostáticamente (**Figura 8**) de la siguiente manera: La unión de un recién llegado protón al canal ocasiona que el Asp32 de MotB (quien parece ser el único residuo esencial para la rotación) sea capaz de inducir un cambio conformacional en MotA, el cambio en la disposición espacial de MotA permite que los residuos con carga en su asa citoplásmica interactúen con los residuos cargados de FliG, esta interacción resulta en una repulsión de cargas que provoca el movimiento del rotor y la posterior transmisión de la torca hacia el resto de la estructura (Zhou, *et al.* 1998^a; Zhou, *et al.* 1998^b).

El aparato de exportación flagelar tipo III.

Por definición, cualquier estructura que se encuentre fuera de la membrana citoplásmica se considera como externa, y ya que la mayoría de las subunidades del flagelo bacteriano se encuentran en el exterior de la célula, es necesario exportarlas.

Existen al menos 15 proteínas necesarias para formar la porción externa del flagelo. El eje proximal: FliE, FlgB, FlgC y FlgF, el eje distal: FlgG y la proteína de andamio del eje: FlgJ. El gancho: FlgE, la proteína de andamio del gancho: FlgD y la regla molecular del gancho: FliK. Las proteínas de unión gancho-filamento: FlgK y FlgL. El filamento: FliC y la proteína de andamio del filamento: FliC. Además de la proteína reguladora: FlgM. Todas las proteínas mencionadas cruzan la membrana citoplásmica y todas, excepto por los componentes de los anillos L y P, utilizan el sistema de secreción flagelar tipo III (Chevance, et al. 2008).

El aparato de exportación flagelar forma una estrecha compuerta central de aproximadamente 2 nm (Yonekura, *et al.* 2003) por la que se transloca selectivamente a las proteínas desde el citoplasma hasta el exterior en un estado no plegado o parcialmente plegado. Las proteínas en cuestión se caracterizaron inicialmente por la falta de secuencia señal por lo que se propuso a la estructura tridimensional de sus N- terminales como la región relevante para su reconocimiento y su posterior secreción (Minamino, *et al.* 1999).

Este sistema de secreción se encuentra en el poro central del anillo MS y requiere de al menos 11 componentes protéicos y 6 de ellos son proteínas membranales: FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ y FliR. También hay tres componentes solubles que forman el complejo ATPasa: La ATPasa que impulsa la secreción: FliI, un regulador negativo de la ATPasa: FliH y una chaperona general: FliJ (**Figura 10**). También se reporta la existencia de las proteínas citoplásmicas FlgN, FliA, FliS y FliT. Estas proteínas funcionan como chaperonas específicas que facilitan la exportación de los sustratos flagelares (Macnab, 2004).

Las proteínas integrales de membrana FlhA y FlhB también tienen dominios citoplásmicos. Estas regiones funcionan como sitios de acoplamiento para las proteínas FliI, FliH y FliJ. La proteína FlhA provee sitios de unión para cada una de las diferentes chaperonas. La proteína FlhB actúa como un interruptor que controla el proceso de exportación según la etapa de ensamblaje del flagelo. Un cambio en la conformación del dominio citoplásmico de FlhB resulta en un cambio en la especificidad de sustratos a exportar: de gancho a filamento (Williams, *et al.* 1996). El cambio en la conformación de FlhB es ocasionado por la proteína de control de la longitud del gancho: FliK (Samatey, *et al.* 2004).

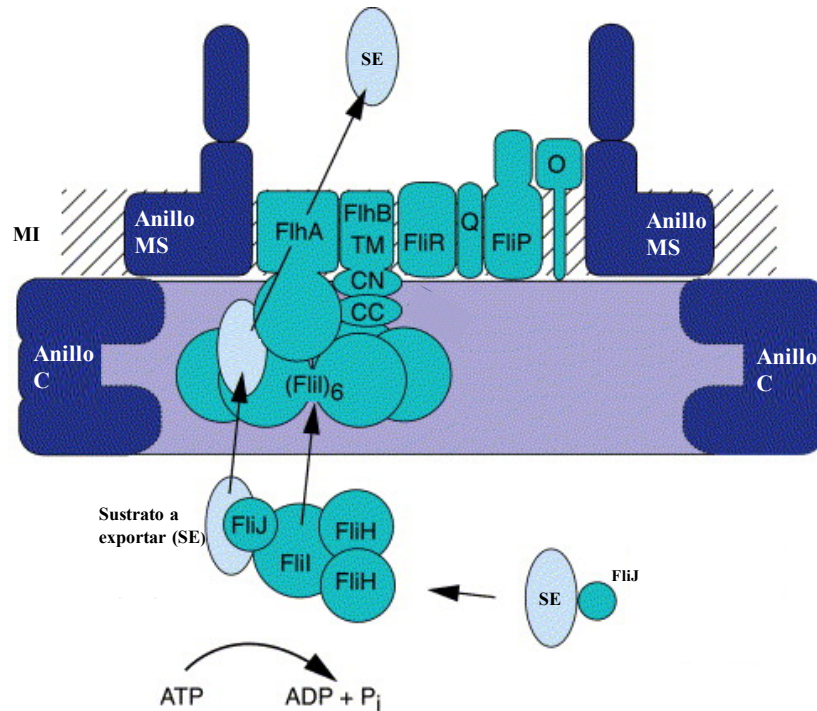


Figura 10. Representación esquemática del sistema de secreción flagelar tipo III. Las proteínas FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ y FliR son los componentes integrales de membrana del aparato de secreción flagelar. Los componentes de membrana se ensamblan en el poro central del Anillo MS. Los componentes que forman el complejo ATPasa: FliH, FliI y FliJ son solubles. FliI forma un heterotrímero junto al homodímero FliH en el citoplasma. La translocación de proteínas es dependiente de la fuerza protón motriz y los sustratos a secretar deben hacerlo en un estado desplegado por lo que se propone que FliI facilita el desplegamiento de las proteínas en un proceso dependiente de ATP. Se esquematiza la exportación de un sustrato (SE). MI: membrana interna (Macnab, 2004).

La proteína (ATPasa) FliI forma un complejo con la proteína FliH, esta unión forma al heterotrímero: FliH₂FliI. La proteína FliH regula negativamente la actividad enzimática de FliI (Minamino, *et al.* 2011). La chaperona general FliJ previene que los sustratos a exportar se degraden en el citoplasma. FliJ es capaz de interactuar con el complejo FliH-FliI y con los dominios citoplásmicos de las proteínas compuerta FlhA y FlhB (Ibuki, *et al.* 2013. Minamino, *et al.* 2000).

Durante un largo tiempo, se consideraba que al FliI ser una ATPasa, esta energizaba el proceso de transporte transmembranal, sin embargo, ya se ha demostrado que la hidrólisis de ATP es relevante pero no indispensable. Se propone que el gradiente electroquímico es el elemento responsable de proveer la energía necesaria para poder movilizar a las proteínas a través del sistema de exportación (Minamino, *et al.* 2008).

Para poder exportar a las subunidades flagelares sintetizadas en el citoplasma, estas deben dirigirse hacia la maquinaria de exportación (**Figura 11**). Inicialmente, las subunidades interactúan con el complejo ATPasa donde sufren un desplegamiento (este podría solamente ser parcial), posteriormente, las subunidades son presentadas a la región de

exportación hacia la compuerta membranal. Las subunidades acompañadas por su respectiva chaperona se asocian al C-terminal de FlhA, las subunidades requieren de las chaperonas para poder establecer interacciones de alta afinidad con los componentes del sistema de secreción. Las afinidades reflejan el orden en el que las subunidades se van a ensamblar en el flagelo naciente.

Figura 11. Interacciones secuenciales de las subunidades flagelares con la maquinaria de exportación. El complejo ATPasa se asocia con el anillo C. Y el tetrámero FliN vía FliH. El complejo chaperona-sustrato se acopla inicialmente al complejo ATPasa antes de entrar a la región de exportación (FlhA) y posteriormente pasa a la compuerta de exportación FlhB. Las subunidades son translocadas a través de la membrana celular (Evans, *et al.* 2014).

Este sistema de secreción coordina la exportación de las proteínas con el ensamblaje flagelar. En conclusión, este sistema está compuesto por una compuerta de exportación energizada por la fuerza protón motriz y por un complejo ATPasa. El proceso está estrictamente regulado por interacciones cooperativas y dinámicas entre los componentes de exportación, las chaperonas involucradas y los sustratos a exportar. (Minamino, 2014).

Diversidad en el cuerpo basal

Hasta este momento se han descrito componentes prominentes del cuerpo basal de las bacterias modelo. Sin embargo, el flagelo aún guarda secretos que ha sido posible descubrir gracias al desarrollo de la técnica de criomicroscopía electrónica. A continuación, se mencionan algunos componentes novedosos “recientemente” descritos.

En la **Figura 12** se muestran las estructuras comunes como el anillo MS, el anillo C, el aparato de exportación, el eje, los anillos L y P y el gancho. Lo más interesante en esta sección corresponde a las estructuras adicionales: el anillo H, el anillo T, el anillo O, el disco basal, el medio y el proximal además del collar.

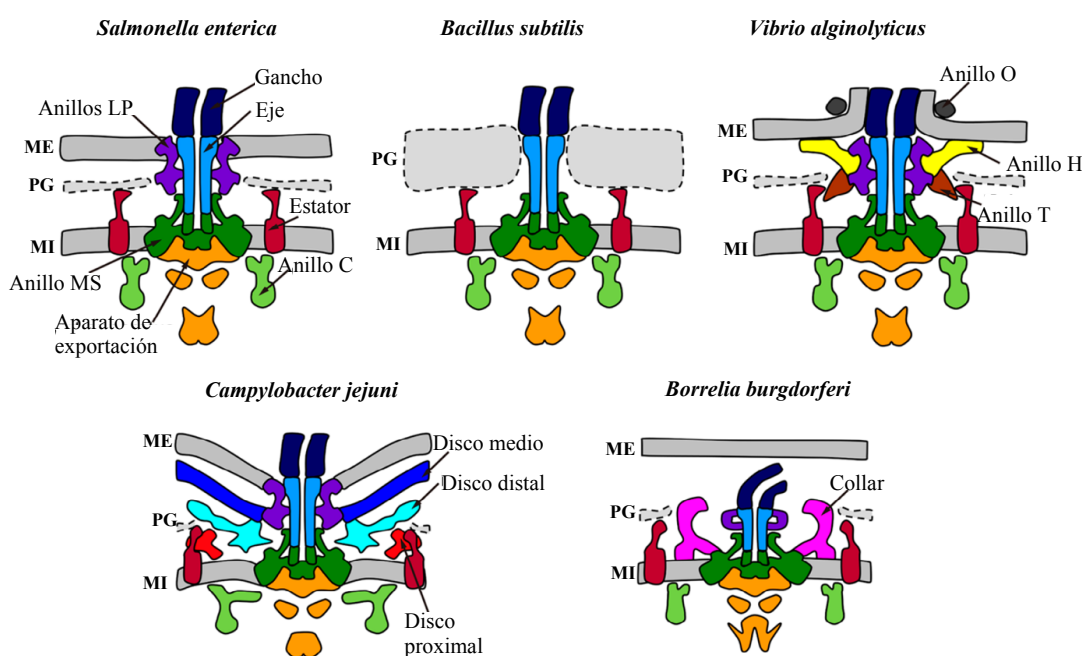


Figura 12. Diferencias estructurales en el cuerpo basal flagelar entre especies bacterianas. Se muestran esquemas correspondientes a: *S. enterica*, *B. subtilis*, *V. alginolyticus*, *C. jejuni* y *B. burgdorferi*. (Therashima, et al. 2017).

Los estudios estructurales del flagelo bacteriano han revelado una diversidad considerable en las estructuras del cuerpo basal de diferentes especies bacterianas, esto nos sugiere que los cuerpos basales se han adaptado para funcionar en los diferentes contextos de las diversas bacterias. Las caracterizaciones funcionales y estructurales de los cuerpos basales de distintas bacterias nos permiten tener una visión más amplia del funcionamiento y los procesos evolutivos flagelares.

Gancho

El gancho flagelar es una estructura flexible y tubular con un diámetro de aproximadamente 18 nm, está formado por aproximadamente 130 subunidades de la proteína FlgE y alcanza un largo de hasta 55 ± 6 nm. Las interacciones que permiten empacar a todas estas subunidades son únicas y le otorgan al gancho tanto la flexibilidad para doblarse como la rigidez necesaria para poder rotar, estas características le permiten al gancho trabajar como una articulación capaz de transmitir la torca generada en el motor flagelar hacia el filamento (Kitao, *et al.* 2017; Fujii, *et al.* 2017).

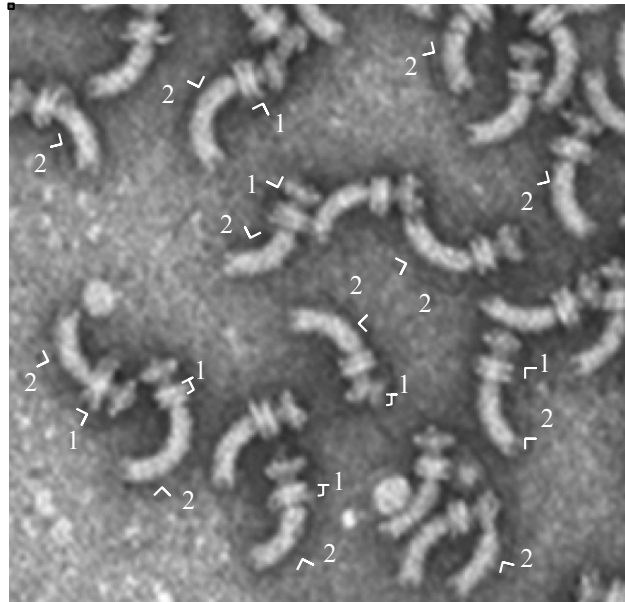


Figura 13. El gancho flagelar. Microscopia electrónica de complejos aislados de cuerpo basal-gancho. Se identifica el cuerpo basal (número 1) y al gancho (número 2) en los complejos (Aizawa, 2014).

La arquitectura básica del gancho es un arreglo helicoidal que se organiza en 11 protofilamentos. La estructura cristalográfica se logró obtener al eliminar los C- y N-terminales, esta estructura tridimensional permitió establecer que la proteína FlgE está compuesta por tres dominios: D0, D1 y D2 (Samatey, *et al.* 2004).

El dominio D0 se encuentra desordenado en solución pero cuando este se encuentra en estado polimerizado adquiere una conformación tipo α -hélice y se encuentra al centro de la estructura tubular. El dominio D1 y el dominio D2 están poco empacados lo que sugiere el porque de la flexibilidad del gancho, las interacciones intermoleculares que ocurren entre ambos dominios tienen como resultado cambios conformacionales que son capaces de otorgar a cada protofilamento la capacidad de extenderse y de comprimirse aproximadamente 9 Å, el resultado de la flexibilidad descrita es permitirle a la estructura adquirir una conformación curva. Los cambios en la extensión y en la compresión deben ocurrir en cada vuelta que de la estructura al rotar (es decir, aproximadamente 300 veces por segundo) (Samatey, *et al.* 2004).

Figura 14. La estructura del gancho flagelar. **A.** Modelo esquemático del cuerpo basal-gancho enfatizando la curvatura del gancho, destacando el acercamiento que se muestra en la Figura B. ME: membrana externa, PG: peptidoglicano, MI: membrana interna. **B.** Acercamiento a la curvatura del gancho apreciando la extensión y compresión de los protofilamentos que forman el gancho, destacando el poro central formado por el dominio D0 de la proteína FlgE indicado con líneas punteadas (Samatey, et al. 2004). **C.** Vista superior del mapa de densidad en tercera dimensión del gancho ajustado al modelo atómico. El diámetro del gancho es de 180 Å, mientras que el canal interno mide 18 Å (Fujii, *et al.* 2009).

La proteína FlgE requiere forzosamente de la asistencia de la proteína FlgD para lograr ensamblarse. FlgD es un componente que funciona como una proteína de andamiaje que promueve la polimerización de las subunidades del gancho evitando que estas difundan en el medio extracelular al ser exportadas (Moriya, *et al.* 2011).

El largo del gancho está determinado por un mecanismo de control propio. Esta estructura se extiende a partir de la membrana externa hasta alcanzar un largo de 55 ± 6 nm, una vez alcanzada dicha longitud, una señal se transduce hacia FlhB en el aparato de exportación y esta señalización ocasiona un cambio en la especificidad de sustratos a exportar (de sustratos tempranos tipo eje-gancho a sustratos tardíos tipo filamento).

La proteína FliK es secretada en intervalos aleatorios y es ella quien determina el largo fisiológico del gancho durante el ensamblaje del cuerpo basal y del gancho. Por lo tanto, se propone que la proteína FliK funciona como una regla molecular que mide el largo de las

estructuras eje-gancho (**Figura 15**) (Erhardt, 2017).

Figura 15. Modelo representativo para el control del largo del gancho y de la especificidad de exportación mediadas por la regla molecular FliK. **A.** Durante el armado del gancho flagelar, la exportación de las subunidades de FlgE es interrumpida por la exportación de FliK. El amino terminal de FliK interacciona con la proteína de andamio del gancho (FlgD) en la punta del gancho en formación. **B.** Una vez que el gancho alcanza su longitud madura, el carboxilo terminal de FliK se expone y permanece en el citoplasma el tiempo suficiente para formar una interacción con FlhB ocasionándole un cambio conformacional (FlhB*). **C.** El cambio en la especificidad permite la exportación y subsecuente ensamblaje de las subunidades que forman el filamento (Evans, *et al.* 2014).

Proteínas asociadas al gancho (HAPs)

Entre el gancho y el filamento existe un pequeño segmento que puede distinguirse en fotografías de microscopía electrónica (**Figura 16**). Esta región está compuesta por dos proteínas asociadas al gancho o HAPs por las siglas en inglés '*hook associated proteins*': HAP1 (FlgK) y HAP3 (FlgL), con un largo de aproximadamente 10 nm.

Las proteínas HAP1 y HAP3 forman una estructura de unión entre el gancho y el filamento, se considera que este segmento funciona como una zona de amortiguamiento que conecta dos estructuras con características físicas y mecánicas diferentes. El gancho es flexible con una curvatura con un radio pequeño y está compuesto principalmente por dominios de hojas beta mientras que el filamento es mucho más rígido, tiene una curvatura radial larga y está dominado por interacciones α -hélice. Las proteínas HAP actuarían para desbastar las diferencias estructurales entre las partes centrales del gancho y el filamento y para prevenir que la actividad polimórfica en el gancho sea transmitida al filamento (Namba, *et al.* 1997).

En la parte distal del filamento se encuentra una estructura tipo tapa compuesta por la proteína HAP2 (FliD). Esta proteína se asocia en un pentámero que facilita la elongación y la polimerización del filamento que está compuesto por la proteína FliC o flagelina (Yonekura, *et al.* 2000). La unión FliC-FliD es bastante estable y el complejo raramente se disocia, sin embargo los monómeros de flagelina se incorporan constantemente durante la elongación de la estructura. En ausencia de HAP2 los monómeros de flagelina (o FliC) son incapaces de incorporarse y simplemente difunden en el medio extracelular (Homma, *et al.* 1984; Namba, *et al.* 1997).

Figura 16. Proteínas asociadas al gancho. Se muestra una imagen de microscopía electrónica de un flagelo aislado de *R. sphaeroides* (cepa WS8), se muestra el cuerpo basal, el gancho y el filamento. Se destaca con una flecha la región de las proteínas asociadas al gancho. Barras de escala: 50 nm.

Filamento

La porción mayoritaria del flagelo es el filamento pues este representa el 99% de su totalidad, tiene una forma cilíndrica además de helicoidal y es rotado por el ya descrito motor que se encuentra en la base del flagelo. Esta estructura es el componente que realiza el trabajo hidrodinámico sobre el medio para poder propulsar a la célula. Se trata de un cilindro largo y delgado, tiene una longitud de aproximadamente 15 μ m pero un diámetro de tan solo 20nm. La estructura está formada por 30,000 monómeros de la proteína FliC o flagelina (O'Brien, *et al.* 1972).

El filamento se organiza en una hélice conformada por 5.5 subunidades de flagelina por cada vuelta, también se describe como una estructura compuesta por 11 protofilamentos empacados de forma longitudinal en un arreglo del tipo helicoidal de las subunidades de flagelina (O'Brien, *et al.* 1972; Yamashita, *et al.* 1998).

El filamento está caracterizado por el fenómeno de polimorfismo, es decir, puede adoptar diferentes formas helicoidales (Asakura, 1970). Se han identificado dos tipos de filamentos rectos con simetrías helicoidales distintas, En el tipo R (por *right* en inglés) todos los protofilamentos se encuentran inclinados hacia la derecha y en el tipo L (por *left* en inglés) todos los protofilamentos se encuentran inclinados hacia la izquierda. Si algún protofilamento se encuentra en estado L y el resto en estado R, se logra realizar una curvatura tal que en conjunto dan lugar a formas superenrolladas. Si la mayoría de los protofilamentos se encuentra en estado L, la hélice que se forma es izquierda, por el contrario si los protofilamentos se disponen en estado R, la hélice resultante será una hélice derecha (Callidine, 1978) (**Figura 17. C**).

Figura 17. Estructura del filamento y los polimorfismos que este presenta. **A.** Esquema de una célula flagelada, se muestra el gancho en color verde y se destaca el filamento en color amarillo (Ramos, *et al.* 2004). **B.** Diagrama del filamento, se trata de una vista distal realizada con proteínas modeladas tridimensionalmente (diagrama de listones), se muestran las 11 subunidades (Yonekura, *et al.* 2003). **C.** Modelo polimórfico del filamento. En el panel superior se muestra la morfología del filamento completo, mientras que en el panel inferior únicamente se muestra un segmento del filamento. De izquierda a derecha: un filamento recto tipo L, un filamento normal superenrollado en una hélice izquierda, un filamento tipo curly superenrollado en una hélice derecha y un filamento recto tipo R. El color amarillo indica a los protofilamentos en estado L, el color rojo indica el estado R (Vonderviszt, 1997).

Cuando los 11 protofilamentos mencionados se disponen en una conformación similar, el resultado es un filamento macromolecular recto, pero cuando coexisten mezclas de ambos tipos de filamentos, se producen hélices macromoleculares (**Figura 17 C**), estas funcionan como un propulsor generando el trabajo mecánico sobre el medio, el resultado de este trabajo es el desplazamiento del cuerpo celular (Calladine, *et al.* 1978).

La estructural cristalográfica existente de la proteína FliC pertenece a *S. enterica*, y es el resultado de una versión carente de los extremos N- y C- terminales, la estructura determinó la existencia de tres dominios que componen a la flagelina: D1, D2 y D3. El dominio D1 se encuentra en el N-terminal e incluye un fragmento de el C-terminal, esta compuesto principalmente por estructuras tipo α -hélice y es una región que se encuentra sumamente conservada. El dominio D2 también está compuesto por dos fragmentos y la estructura proteica predominante es del tipo hojas β -plegadas. El dominio D3 está conformado por la región central de la secuencia protéica y la estructura secundaria predominante es del tipo hojas β -plegadas, los dominios D2 y D3 no son cruciales para la polimerización, esto se ha demostrado al generar mutantes en estos sitios sin ocasionar la pérdida del filamento, ambos dominios componen a la región con mayor exposición al medio extracelular y parece ser la responsable por las propiedades antigénicas que caracterizan a esta molécula, esto podría

explicar la variabilidad tan permisiva que parece tener (Yonekura, *et al.* 2013; Beatson, *et al.* 2006). (Figura 18).

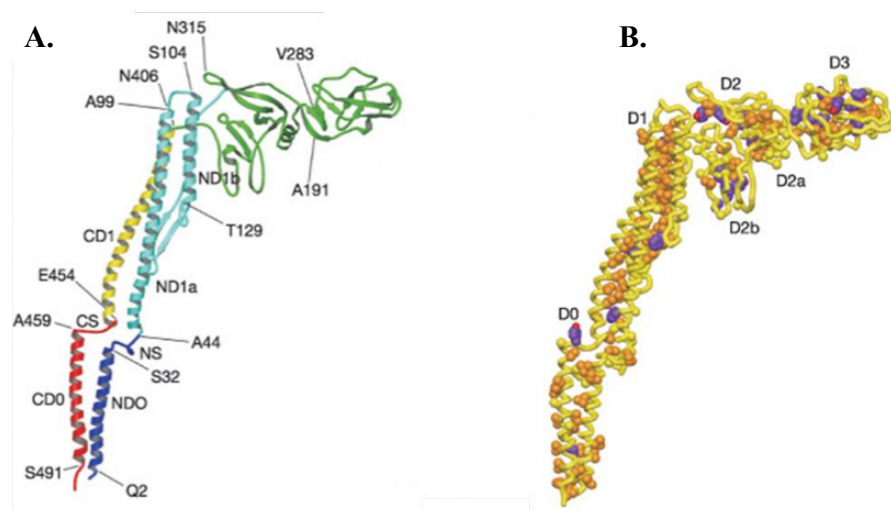


Figura 18. Estructura tridimensional de la proteína FliC (o flagelina). **A.** La estructura tridimensional se encuentra coloreada de la siguiente manera: residuos 1-44 en color azul, residuos 44-179 en celeste, residuos 179-406 en verde, 406-454 en amarillo y del 454-494 en rojo. **B.** Se muestra la distribución de las cadenas hidrofóbicas laterales destacando las regiones que definen a los dominios mencionados: D0, D1, D2 (a y b) y D3, los componentes de la cadena están coloreados de la siguiente manera: Alanina y metionina en amarillo. Leucina, isoleucina y valina en naranja. Fenilalanina, tirosina y prolina, morado y rojo: carbono y oxígeno, respectivamente (Yonekura, *et al.* 2013).

Posteriormente, el modelo de la flagelina terminó por resolverse con ayuda de criotomografía electrónica, esta búsqueda reveló la estructura de los extremos amino y carboxilo de la proteína silvestre. Dichas regiones forman un cuarto dominio, el dominio D0, el cual está compuesto por dos α -hélices entrelazadas, esta región es relevante para la polimerización y la estabilización del filamento, su interacción es esencial durante las transiciones polimórficas, y ambas regiones forman la cara interna de la estructura tubular además de constituir el canal por el cual las nuevas subunidades que se van a incorporar son exportadas.

Como se mencionó anteriormente, la proteína HAP2 o FliD se encuentra en el extremo del filamento y esta es fundamental pues facilita la elongación de la estructura y evita la difusión de los monómeros de flagelina (Yonekura, *et al.* 2000). FliD se asocia en un homopentámero y ya se ha demostrado que su ausencia ocasiona que el filamento sea incapaz de polimerizar y por lo tanto de formarse (Ikeda, *et al.* 1993). El pentámero de HAP2 o FliD interacciona con el dominio D0 de la flagelina (FliC), esta interacción es constante por lo que se ha establecido que el complejo FliC-FliD es bastante estable, y permite la existencia de un orificio al final del filamento. Este orificio es del tamaño de un monómero de flagelina y se propone que este sitio permite el plegamiento de una subunidad de flagelina para que esta pueda ser insertada en la punta del filamento creciente, insertar una subunidad ocasiona que el pentámero sea empujado creando el espacio suficiente para insertar la siguiente subunidad y continuar con la elongación del filamento (Yonekura, *et al.* 2000).

Quimiotaxis

El movimiento bacteriano dirigido por el flagelo no es azaroso, es una respuesta a estímulos ambientales como luz, oxígeno, pH, temperatura, presión y la presencia de diferentes compuestos químicos. La respuesta se conoce con el nombre de taxis, y es lo que le permite a las bacterias migrar hacia condiciones favorables que promueven su crecimiento y reproducción.

La quimiotaxis es el proceso mediante el cual las células son capaces de migrar a través de gradientes de concentración de sustancias químicas que pueden ser repelentes o ser atractivos. La respuesta táctica se basa en el control de la rotación del flagelo y todos los cambios responsables de un determinado comportamiento en el nado están estrictamente regulados por un sistema de transducción de señales.

El sistema de transducción de señales es el encargado de convertir un estímulo extracelular en una señal intercelular para producir una respuesta específica. La cascada de transducción tiene dos componentes principales, una proteína histidina cinasa capaz de autofosforilarse: **CheA**, y una proteína reguladora fosfoactivable: **CheY**.

Los estímulos presentes en el ambiente son detectados por receptores homodiméricos que contienen un dominio sensorial periplásmico y un dominio de señalización citoplásmico unidos por 5 α -hélices transmembranales. Los homodímeros están presentes siempre, aún en ausencia de ligando. Se han identificado varios receptores, cada uno con la capacidad para responder a diferentes ligandos y estímulos. Los receptores se regulan a través de reacciones de metilación por lo que se denominan proteínas MCP (*Methyl-accepting Chemotaxis Proteins*).

La señal que desencadena el proceso de transducción es una disminución en la ocupación del receptor por la salida del ligando, lo cual resulta en un cambio conformacional en el que se transmite la información hacia el dominio de señalización intracelular el cual regula los componentes transductores en citoplasma (González-Pedrajo, et al. 1999).

Existen seis proteínas quimiotácticas en el citoplasma, se denominan Che (*Chemotaxis*): CheA, CheW, CheZ, CheR, CheB y CheY. Estas son las encargadas de transducir la señal desde el receptor hasta el motor del flagelo. El proceso necesita además de metilaciones, fosforilaciones. Las proteínas CheA, CheW y CheZ regulan los niveles de fosforilación de CheY, quien es capaz de interactuar con la proteína de motor FliM modulando así la frecuencia de paro, nado y reorientación. Por otro lado, CheR y CheB modulan el grado de metilación del receptor (**Figura 19**).

Figura 19. Esquema representativo de la ruta quimiotáctica. Una reducción en el quimioatrayente o un aumento en el quimiorepelente es detectado por los receptores membranales activando la fosforilación de CheA y disparando la transfosforilación, el grupo fosfato (P) es cedido a CheY o CheB. CheY fosforilada es capaz de unirse al motor flagelar cambiando su dirección o rotación. CheB fosforilada compite con CheR ocasionando la desmetilación de los receptores reduciendo así su capacidad para activar a CheA (González-Pedrajo, *et al.* 1999).

Regulación flagelar

Ensamblar un flagelo funcional es un proceso costoso pues se estima que hasta un 2% de la energía total de la célula se invierte en la síntesis flagelar (Frye, *et al.* 2006), por esta razón el sistema se encuentra bajo un estricto control sobre la expresión de los genes flagelares.

La expresión de los genes flagelares está estrictamente controlada en un orden jerárquico. En *S. enterica* y *E. coli* el sistema es controlado por la expresión del regulón flagelar, este está compuesto por aproximadamente 50 genes que se encuentran organizados en al menos 17 operones, los operones a su vez se dividen en tres clases según su orden de expresión (Kutsukake, *et al.* 1990). El operón maestro es la primera de las clases y este gobierna la expresión del resto de los operones activándolos en un orden jerarquizado (Aizawa, *et al.* 1996).

Este orden jerárquico está conservado en las bacterias Gram-negativas que presentan flagelos del tipo peritrico, pero hay claras excepciones, en la bacteria *Caulobacter crescentus* el regulón flagelar está acoplado a su ciclo celular, la expresión está gobernada por la fosforilación del regulador del ciclo celular CtrA. En *R. sphaeroides* y *Pseudomonas aeruginosa* existen cuatro y no tres clases que por supuesto respetan un orden de expresión jerárquico, mientras que en el caso de *Sinorhizobium meliloti*, sí existen tres clases de operones pero estos son activados por dos reguladores tipo LuxR: VisN y VisR, y ambos actúan como un heterodímero pero su proceso de activación. (England, *et al.* 2001; McCarter, 2006).

El operón maestro *flhDC* está en la cima de la jerarquía y controla la producción del flagelo. El operón *flhDC* es expresado desde un promotor de clase I. Las proteínas FlhD y FlhC forman un complejo multimérico: FlhD₄C₂ que sirve como un activador transcripcional que promueve la transcripción de genes de clase II dependientes de Sigma⁷⁰. Los promotores de clase II dirigen la transcripción de los genes necesarios para el cuerpo basal y el gancho, una vez que se ha completado el gancho, los promotores de clase III son transcritos por la RNA polimerasa asociada al factor Sigma²⁸, este factor es específico para estos promotores. Durante la construcción del complejo gancho-cuerpo basal, el factor Sigma²⁸ se encuentra inhibido por FlgM (un factor anti-Sigma). Una vez que se ha completado el complejo gancho-cuerpo basal, la proteína FlgM es secretada al exterior de la célula permitiendo la liberación del factor Sigma²⁸ y por lo tanto la transcripción de los genes de clase III. De esta manera, genes como el de la flagelina no se pueden transcribir hasta que exista un motor funcional sobre el cual puedan ensamblarse (Chevance, *et al.* 2008).

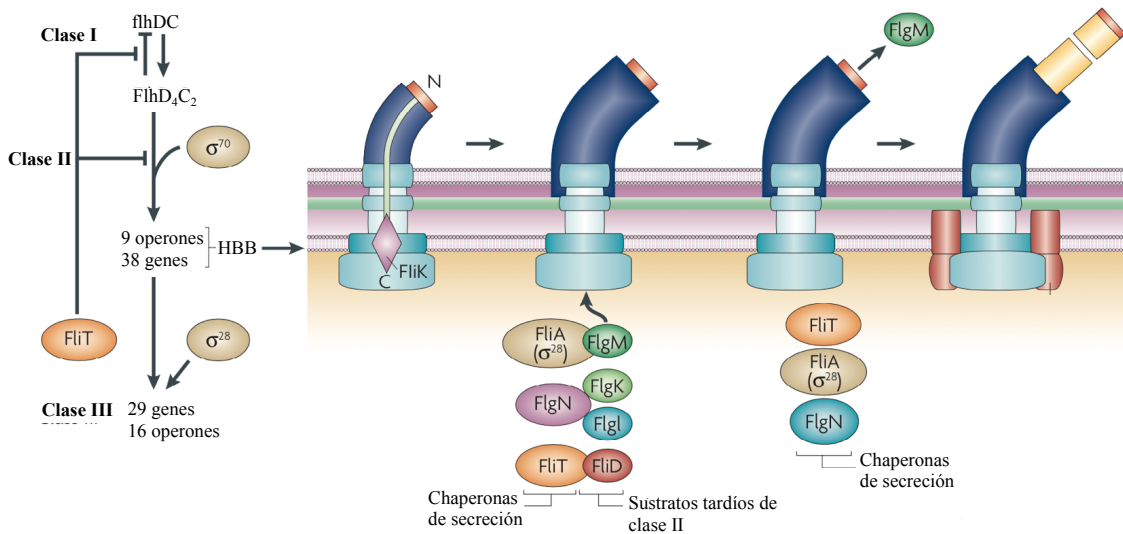


Figura 20. Regulación genética flagelar. El operón *flhDC* (el operón maestro) se encuentra bajo el control de reguladores globales que ocasionan la expresión o inhibición de los genes flagelares. La inducción del operón *flhDC* de clase I, produce FlhD y FlhC, ambas proteínas forman un complejo multimérico: FlhD₄C₂ que actúa para dirigir a Sigma⁷⁰ a transcribir los genes de clase II y reprimir la transcripción de *flhDC* (Clase I: apagada/Clase II: prendida). Los promotores de los genes de clase II dirigen la transcripción de los genes necesarios para la formación de la estructura gancho-cuerpo basal o HBB (por sus siglas *hook-basal body*). Una vez que el HBB está completo, los sustratos de secreción tardía y sus chaperonas cognadas son exportados. FliT es un factor de FlhD₄C₂ que previene su auto-represión y la activación de los promotores de clase II. El factor Sigma²⁸ dirige la transcripción de los promotores de clase III, esto incluye a los genes estructurales del filamento y a los genes quimiotácticos (Clase I: prendida/Clase II: apagada/Clase III: prendida). La activación de la transcripción de clase I reiniciaría al regulón flagelar para una nueva ronda de expresión de los genes flagelares (Chevance, et al. 2008).

Biogénesis flagelar

El 80% de las bacterias conocidas son flageladas (Aizawa, 2014), y aunque existen variaciones en la morfología y en el número de flagelos por célula (según la bacteria), el mecanismo básico es prácticamente el mismo. Construir un flagelo requiere logística en al menos tres escenarios sumamente distintos: el citoplasma, el espacio periplásmico y el medio extracelular. Curiosamente, el flagelo fue disectado y estudiado desde la porción más distal (del filamento hasta las estructuras de la base) pero su orden de ensamblaje ocurre al contrario: el proceso inicia con la adición de los componentes integrales y periféricos de membrana, continúa con los elementos que residen en el periplasma, para seguir con los componentes correspondientes a la membrana externa. El proceso termina con el ensamblaje de los elementos estructurales que residen en el exterior del cuerpo celular. Como se mencionó anteriormente, los modelos más claros y mejor descritos pertenecen a *S. enterica* y a *E. coli* y han servido para describir el proceso (**Figura 20**).

Al inicio parece haber caos, y es que a pesar de que tenemos claros bastante detalles sobre la regulación de los operones flagelares, aún resulta incierto lo que sucede al comienzo.

Se sabe que algunas bacterias requieren la presencia de las proteínas FlhG y FlhF para poder localizar la base de la estructura flagelar en la envoltura celular (Kazmierczak, *et al.* 2013). Entonces, la mayoría de las proteínas estructurales expresadas al comienzo son el resultado de la expresión de genes de segunda clase. FliF es una proteína membranal que se ubica en la membrana interna formando el anillo MS, este complejo se identifica como el inicio de la flagelación y se considera que sirve como una base sobre la cual el resto de los componentes se asocian.

La estructura subsecuente se asocia en la cara citoplásmica del anillo MS y se trata del anillo C. El ya descrito anillo C contiene a los tres componentes del complejo de *switch* (FliG, FliM y FliN), y aunque al inicio del ensamblaje no se requiere de su función como parte del motor, sí es relevante para el ensamblaje de la estructura pues mutantes en los genes del complejo de *switch* ocasionan fallas en la construcción de las estructuras subsecuentes.

La mayor parte de los componentes flagelares yacen fuera de la membrana citoplásmica por lo que es necesario cruzarla. La gran mayoría de los componentes flagelares no tienen una secuencia señal para ser exportadas por la vía primaria de exportación (la vía Sec) así que se exportan por una ruta flagelo-específica: El aparato de exportación flagelar tipo III, por lo que se propone que este complejo es el siguiente en adicionarse al flagelo en construcción.

Una vez establecido el sistema de secreción flagelar se inicia la formación del eje. El primer componente en establecerse es la proteína FliE, esta se sitúa sobre el anillo MS y le siguen las proteínas FlgB, FlgC y FlgF. En la porción más distal se ubica la proteína FlgG, se sabe que esta proteína es la más cercana al gancho. El eje requiere de la proteína FlgJ para poder ensamblarse y penetrar la pared de peptidoglicano (ver **El eje**). Una vez que el eje está maduro es necesario superar la barrera física que representa la membrana externa. En este punto participan componentes secretados convencionalmente (no por el aparato de exportación flagelar tipo III). El componente del anillo P (FlgI) se ensambla cerca de la parte media del eje en forma de collar y posteriormente se asocia el anillo L (FlgH). Ambos anillos parecen estar asociados en un complejo relativamente rígido.

Una vez que se ha completado el cuerpo basal comienza el establecimiento del gancho en la parte exterior de la célula, las subunidades de FlgE que se establecen requieren la presencia de FlgD para polimerizar, FlgD se establece en la punta de la estructura creciente y las

subunidades de FlgE se ensamblan debajo de ella, el gancho requiere además la presencia de FliK que es determinante para el control de su longitud.

Una vez que el gancho se ha ensamblado correctamente, ocurre un cambio en la especificidad del aparato de exportación por los sustratos de filamento, esto le permite al sistema exportar a FlgK, FlgL (HAP1 y HAP3), FliD (HAP2) y FliC (flagelina). Una vez que ocurre el cambio de especificidad, FlgD es sustituida por las recién exportadas FlgK y FlgL (HAP 1 y 3), posteriormente sobre ellas se inserta FliD (HAP2) la cual le permite al filamento polimerizar y elongarse. El proceso de secreción de la flagelina es bastante rápido, se ha determinado que su tasa de secreción corresponde a 10,000 residuos por segundo (Iino, 1969).

Figura 21. Ruta morfológica del ensamblaje flagelar. Los componentes estructurales del flagelo se ensamblan del más proximal al más distal. Al inicio se establece el anillo MS y posteriormente se añade el anillo C (el complejo de *switch*) y el aparato de exportación (no esquematizado), ambos se establecen en la cara citoplásmica del anillo MS actuando como una base logística. Las estructuras subsecuentes que se encuentran afuera del cuerpo celular se forman por la adición secuencial de las subunidades protéicas en el extremo distal que se está elongando. El gancho y el filamento no se ensamblan por si solos, ambas estructuras requieren la asistencia de las proteínas de andamiaje FlgD y FliD respectivamente. ME: membrana externa, PG: peptidoglicano, MI: membrana interna.

Modelo Experimental: *Rhodobacter sphaeroides*.

R. sphaeroides es una bacteria púrpura fotosintética no sulfurosa que pertenece al grupo de las α -proteobacterias, este modelo destaca por su versatilidad metabólica. *R. sphaeroides* puede crecer realizando respiración aeróbica, anaeróbica, fotosíntesis o fermentación. Los compuestos orgánicos se utilizan como fuente de carbono y como fuente reductora para el crecimiento fotoheterotrófico y quimioheterotrófico, el dióxido de carbono se utiliza como la única fuente de carbono durante el crecimiento autótrofo y el hidrógeno se utiliza como fuente de poder reductor durante el crecimiento fotoautotrófico y quimioheterotrófico.

El nicho ecológico de *R. sphaeroides* está determinado por su habilidad para fotoasimilar compuestos orgánicos de bajo peso molecular en presencia de luz o bajo condiciones de oxígeno limitantes o en anaerobiosis. *R. sphaeroides* está perfectamente equipada para crecer en ambientes microaerofílicos pues este contexto le permite transicionar entre crecimiento quimioheterotrófo y fotoautótrofo.

Los componentes genéticos de *R. sphaeroides* están codificados en un genoma que tiene un tamaño de 4.5 Mb ordenado en dos cromosomas (CI de 2.9 Mb y CII de 0.9 Mb) y cinco replicones (Mackenzie, *et al.* 2001).

La formación, función y regulación del aparato fotosintético está muy bien caracterizado. En respuesta a un decremento en la concentración de oxígeno, *R. sphaeroides* desarrolla membranas intracitoplásmicas o ICM (por sus siglas *Intracytoplasmic membranes*). Se trata de invaginaciones de la membrana citoplásmica que contienen a el aparato fotosintético, a los complejos protéicos de pigmentación y a los acarreadores de electrones.

La capacidad motil observada en esta especie se debe a un único flagelo subpolar que se expresa en condiciones de laboratorio (Mackenzie, *et al.* 2007).

R. sphaeroides posee un flagelo subpolar (Fla1) que se expresa en condiciones de laboratorio, posee además un segundo sistema flagelar (Fla2) cuya expresión ocurre solamente en ausencia del sistema Fla1, siendo estos mutuamente excluyentes (**Figura 22**). El sistema Fla2 parece ser el sistema endógeno mientras que el sistema Fla1 es el resultado de la transferencia horizontal de genes provenientes de una Gamma-proteobacteria ancestral (Vega-Baray, *et al.* 2015).

R. sphaeroides ha resultado un excelente modelo de estudio para más de una aproximación, pues su versátil metabolismo la ha convertido en un importante modelo en la rama de la bioenergética y sus interesantes sistemas flagelares han despertado el interés de varios grupos de investigación interesados en la motilidad bacteriana.

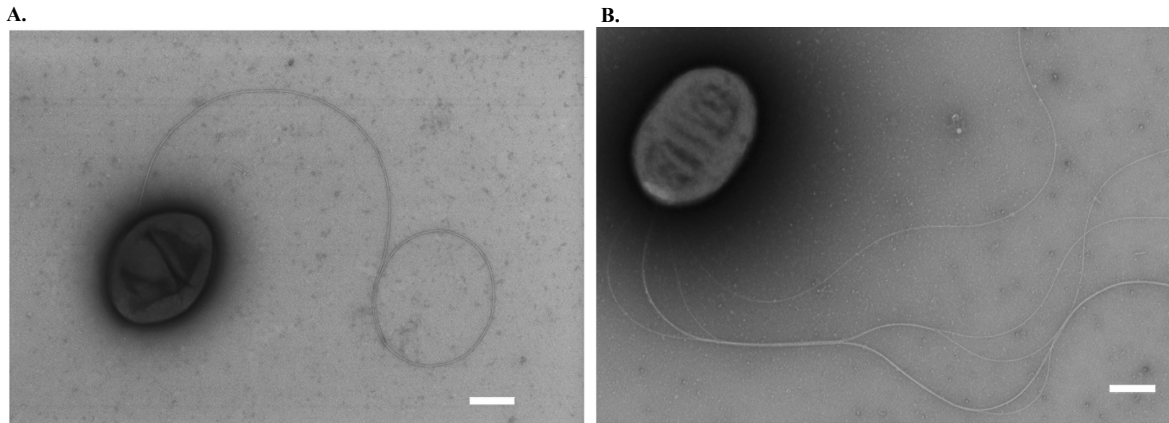


Figura 22. *R. sphaeroides*. **A.** *R. sphaeroides* expresando el sistema flagelar 1, se trata de un único flagelo de ubicación subpolar. **B.** *R. sphaeroides* expresando el sistema flagelar 2, se trata de múltiples flagelos polares. Barras de escala 500 nm. (de la Mora, *et al.* 2015).

El sistema flagelar 1 (en el cual se centran los detalles de este trabajo) es estructuralmente y funcionalmente similar al paradigma que son *S. enterica* y *E. coli*. Aún así, este presenta una serie de diferencias que vale la pena destacar.

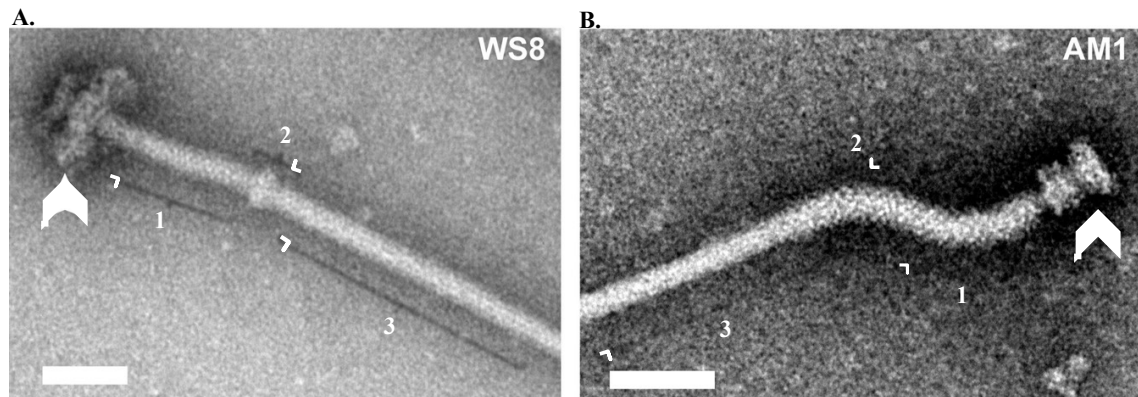


Figura 23. Estructura flagelar de *R. sphaeroides* (Fla1 y Fla2). **A.** Microscopía electrónica del flagelo 1 de *R. sphaeroides* (cepa WS8), se observa el cuerpo basal indicándolo con una flecha color blanco, el gancho (1), la interfase gancho-filamento (2) y el filamento (3). **B.** Se muestra una imagen de microscopía electrónica del flagelo 2 de *R. sphaeroides* (cepa AM1). Se muestra el cuerpo basal indicándolo con una flecha color blanco, el gancho (1), la interfase gancho-filamento (2) y el filamento (3). Barras de escala: 50 nm (Modificado de la Mora, *et al.* 2015).

FlgK.

La proteína HAP1 (FlgK) de *R. sphaeroides* no presenta homología con ninguna otra FlgK conocida y resalta que tiene un tamaño significativamente mayor al de *S. enterica*, tal es así que en preparaciones donde se logra aislar complejos gancho-cuerpo basal, se observa que la interfase entre el gancho y el filamento, que está constituida por las proteínas HAP1 y HAP3, es más abultada que la de *S. enterica* (**Figura 23**).

El gancho.

Al observar las fotografías de microscopía electrónica, la siguiente diferencia a destacar es bastante obvia: el gancho. El gancho del flagelo 1 tiene una forma recta, esto es contrario a lo que se observa en *S. enterica* o en el flagelo 2 de *R. sphaeroides*. La proteína FlgE del flagelo 1 de *R. sphaeroides* tiene un extremo N-terminal enriquecido con 12 prolinas, la presencia de este aminoácido hidrofóbico ocasiona la existencia de ganchos rectos. Este detalle no es trivial ya que tener un gancho de este tipo es relevante para bacterias que presentan un único flagelo pues parece ser trascendental para su correcto funcionamiento (Ballado, *et al.* 2001).

Regulación genética flagelar.

La regulación genética del flagelo en *R. sphaeroides* es absolutamente diferente al comparar con el modelo descrito para *S. enterica*. En la cima de la regulación se encuentra el operón maestro que contiene al gen *rpoN2*, este gen es un factor Sigma⁵⁴ específico para la expresión de los genes flagelares. Los genes *rpoN1* y *rpoN3*, son necesarios para transcribir genes necesarios durante la fijación de nitrógeno y para el control de los operones quimiotácticos. Todo comienza con FleQ, este funciona como un activador transcripcional uniéndose al factor Sigma⁵⁴ (RpoN2) promoviendo la expresión de los genes necesarios para la formación del aparato de exportación y del activador transcripcional FleT. Las proteínas FleQ y FleT forman un multímero capaz de activar la transcripción de los componentes necesarios para formar a el cuerpo basal, el gancho y dos genes reguladores fundamentales: *fliA* y *flgM*. La proteína FliA es un factor Sigma alternativo (o Sigma²⁸) que puede activar la transcripción de los genes que codifican para las proteínas HAP y flagelina (o FliC). La proteína FlgM es un factor anti-Sigma²⁸ que es capaz de inhibir la actividad de FliA hasta que el cuerpo basal esté completo.

La expresión de los genes necesarios para formar a el flagelo 1 están divididos en cuatro clases:

La clase I contiene al gen que codifica para *fleQ*, el resultado de esta expresión es el inicio de la biosíntesis del sistema.

Las clases II y III contienen a los genes necesarios para formar a el aparato de exportación y a el cuerpo basal.

La clase IV contiene a los genes que se requieren para formar tanto a la interfase gancho-filamento como a el filamento (**Figura 234**).

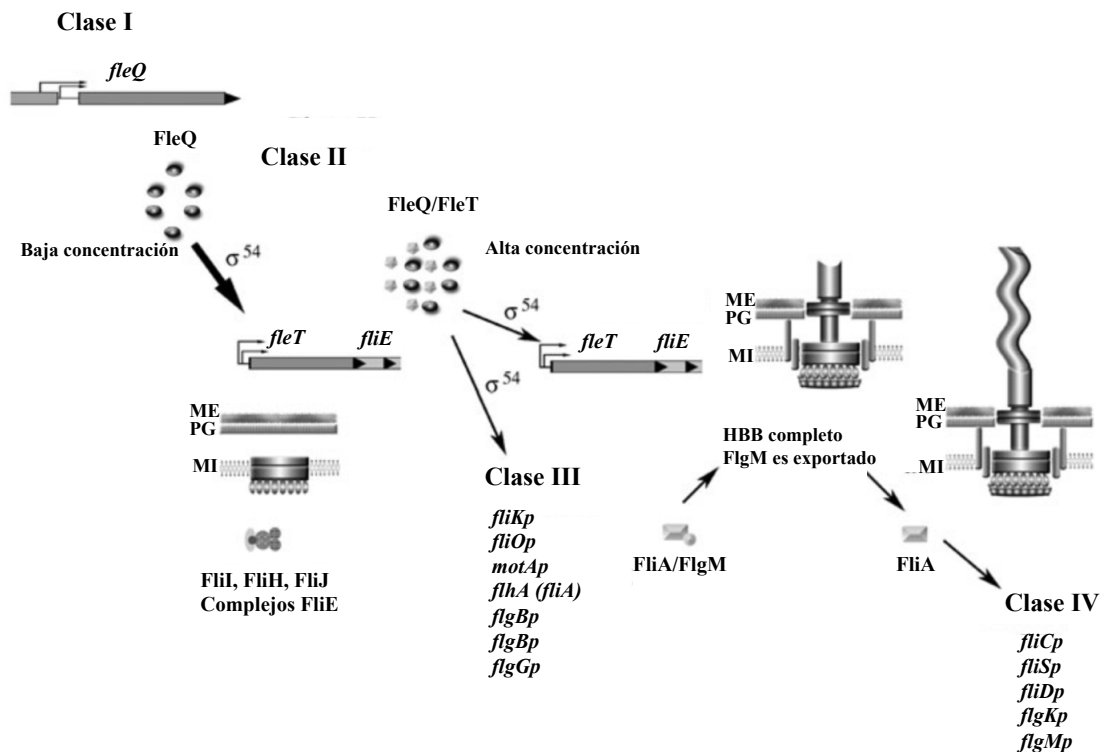


Figura 24. Representación esquemática de los pasos regulatorios durante la biogénesis flagelar (Fla1) en *R. sphaeroides*. Representación esquemática donde se muestran los pasos regulatorios para la síntesis de un flagelo funcional en *R. sphaeroides*. La expresión se divide en cuatro clases. ME: membrana externa, PG: peptidoglicano, MI: membrana interna (Poggio, *et al.* 2005).

La regulación genética del flagelo 2 también es diferente. La expresión de los genes necesarios para codificarlo está regulada por el sistema CckA, ChpT y CtrA. Este sistema ya se ha observado en otras α -proteobacterias donde CtrA es capaz de ocasionar la activación. Por otro lado, la transcripción de *cckA* es fuertemente reprimida por la presencia de ácidos orgánicos en el medio pero se induce fuertemente en presencia de bajas concentraciones de ácido succínico (100 μ M) y de casaminoácidos (0.2%), reprimir a *cckA* ocasiona la reперsión del sistema flagelar 2, lo interesante en este modelo es que estos datos son contrarios a lo reportado para *Rhodobacter capsulatus* donde *ctrA* está altamente expresado cuando las células se encuentran en un medio mínimo con ácido málico. La expresión de *cckA* no está conservada entre *R. sphaeroides* y *R. capsulatus*. El control del sistema flagelar 2 es relevante pues nos hablaría de un mecanismo adicional desarrollado por *R. sphaeroides* para controlar a este sistema después de haber adquirido al sistema flagelar 1 explicando el porque estos flagelos son mutuamente excluyentes (Vega-Baray, *et al.* 2015).

Antecedentes particulares

El eje.

El flagelo de *R. sphaeroides* tiene algunas diferencias respecto a las bacterias modelo y el eje es una de las diferencias más importantes.

En un trabajo previo se realizaron análisis de afinidad para buscar establecer con claridad el orden de ensamblaje de los componentes del eje en *R. sphaeroides*. Los resultados confirmaron interacciones ya identificadas como la interacción entre FliE y FlgB e interacciones nunca antes reportadas como la interacción entre FlgB-FlgF y FlgC-FlgG, esto permitió sugerir el modelo que se muestra en la **Figura 25**. (Osorio, *et al.* 2016).

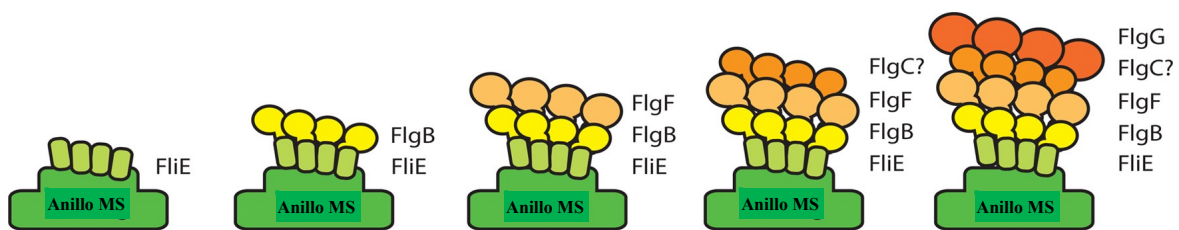


Figura 25. Modelo del ensamblaje del eje en *R. sphaeroides*. Las subunidades de FliE se ensamblan sobre el anillo MS, el resto del orden indicado para los componentes responde a evidencia de interacción entre los componentes según se indica. El signo de interrogación indica que no se pudo detectar la interacción de FlgF con FlgC (Osorio, *et al.* 2016).

El modelo propone que las proteínas se incorporan en el siguiente orden durante la formación del eje flagelar: para el eje proximal: FliE, FlgB, FlgF y FlgC, para el eje distal: FlgG.

Como se mencionó anteriormente, durante la formación del eje flagelar existe un sexto participante, este componente no forma parte estructural del eje pero su presencia es fundamental para que este pueda formarse: FlgJ.

FlgJ en *R. sphaeroides* es muy diferente a la que se describió para *S. enterica*. Primeramente es una proteína mucho más pequeña. FlgJ en *S. enterica* tiene 316 aminoácidos mientras que en *R. sphaeroides* tiene 100 aminoácidos. FlgJ de *R. sphaeroides* únicamente contiene a el dominio ensamblador, mientras que el dominio enzimático que le permite cruzar la pared de peptidoglicano al eje, está ausente, por ello se le denomina una FlgJ monodominio (**Figura 26**). Dado que el flagelo de *S. enterica* es el mejor caracterizado, inicialmente se describió a FlgJ como un componente bidominio, sin embargo gracias a los análisis filogenéticos realizados, se determinó que la forma monodominio de FlgJ es la forma más ancestral de esta proteína y que la fusión con una enzima lítica es un evento que ocurrió posteriormente en su historia evolutiva (Nambu, *et al.* 2006).

Figura 26. Representación esquemática y comparativa de FlgJ en *S. enterica* y en *R. sphaeroides*. *S. enterica* tiene una proteína FlgJ bidominio: en el N-terminal posee el dominio ensamblador (color verde) para el armado del eje y en el C-terminal posee un dominio enzimático (color rojo) que le permite hidrolizar la capa de peptidoglicano para poder penetrarla. *R. sphaeroides* tiene una proteína FlgJ monodominio: únicamente posee el dominio ensamblador (color verde) para el armado del eje, el dominio enzimático que le permite romper la pared de peptidoglicano está ausente. Escala: 10 aminoácidos.

La capa de peptidoglicano representa una barrera física para una estructura macromolecular, por lo que penetrarla es imperativo para poder ensamblar al flagelo de manera eficiente ¿Cómo se rompe entonces la pared de peptidoglicano durante la biogénesis flagelar en *R. sphaeroides*?

La respuesta se encuentra 5 kb río abajo del gen de *flgJ* (**Figura 27**), en este sitio se encontró un marco de lectura abierto (posteriormente denominado *sltF*) que presentaba una serie de particularidades que nos permitieron responder a la pregunta planteada. La primera de ellas es que la proteína codificada por este gen, se identificó por secuencia como una enzima lítica, específicamente una transglicosilasa lítica, la segunda es que en el N-terminal presenta una secuencia señal canónica para la vía primaria de exportación (la vía Sec), y la tercera es que el C-terminal es inusualmente largo con una secuencia que no es parte del dominio enzimático. Las tres particularidades mencionadas se han estudiado en nuestro laboratorio y han revelado interesantes cualidades sobre SlfF.

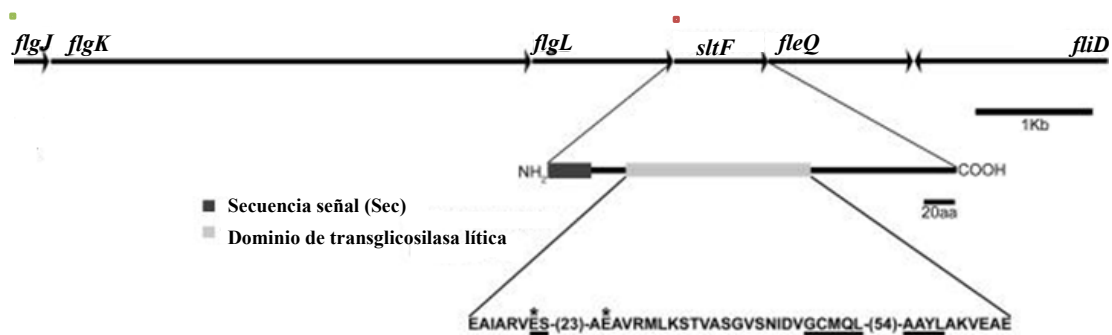


Figura 27. Contexto genético de *flgJ* y de *sltF*. Se muestra el contexto genético en el cual están codificados *flgJ* (color verde) y *sltF* (color rojo). Se esquematiza que la proteína codificada (SlfF) presenta una secuencia señal de exportación no flagelar y un dominio de transglicosilasa lítica soluble o Slf (por sus siglas *soluble lytic transglycosylase*), se subrayan los dominios conservados y se muestra con asteriscos los residuos catalíticos relevantes.

La actividad enzimática de SlfF se confirmó analizando los productos de la reacción que la involucra. Se confirmó que no es una enzima del tipo hidrolasa y que los productos resultantes son el 1,6-anhidromurámico y la *N*-acetilglucosamina confirmando experimentalmente que SlfF sí es una transglicosilasa lítica (Herlihey, *et al.* 2016). SlfF es exportada por la vía Sec y no por la vía específica flagelar. Adicionalmente se demostró que es capaz de interactuar con FlgJ por lo que se propuso que FlgJ es el componente que le permite localizar su sitio de acción durante la formación del eje (de la Mora, *et al.* 2007).

El C-terminal de SlfF ha sido estudiado extensamente y esto ha revelado su enorme versatilidad, en el C-terminal se han identificado 95 aminoácidos no conservados que no pertenecen al dominio enzimático ni presentan similitud con ninguna otra proteína conocida (**Figura 28**) por lo que se propuso que esta región podría tener un papel relevante para su funcionamiento y así fue.

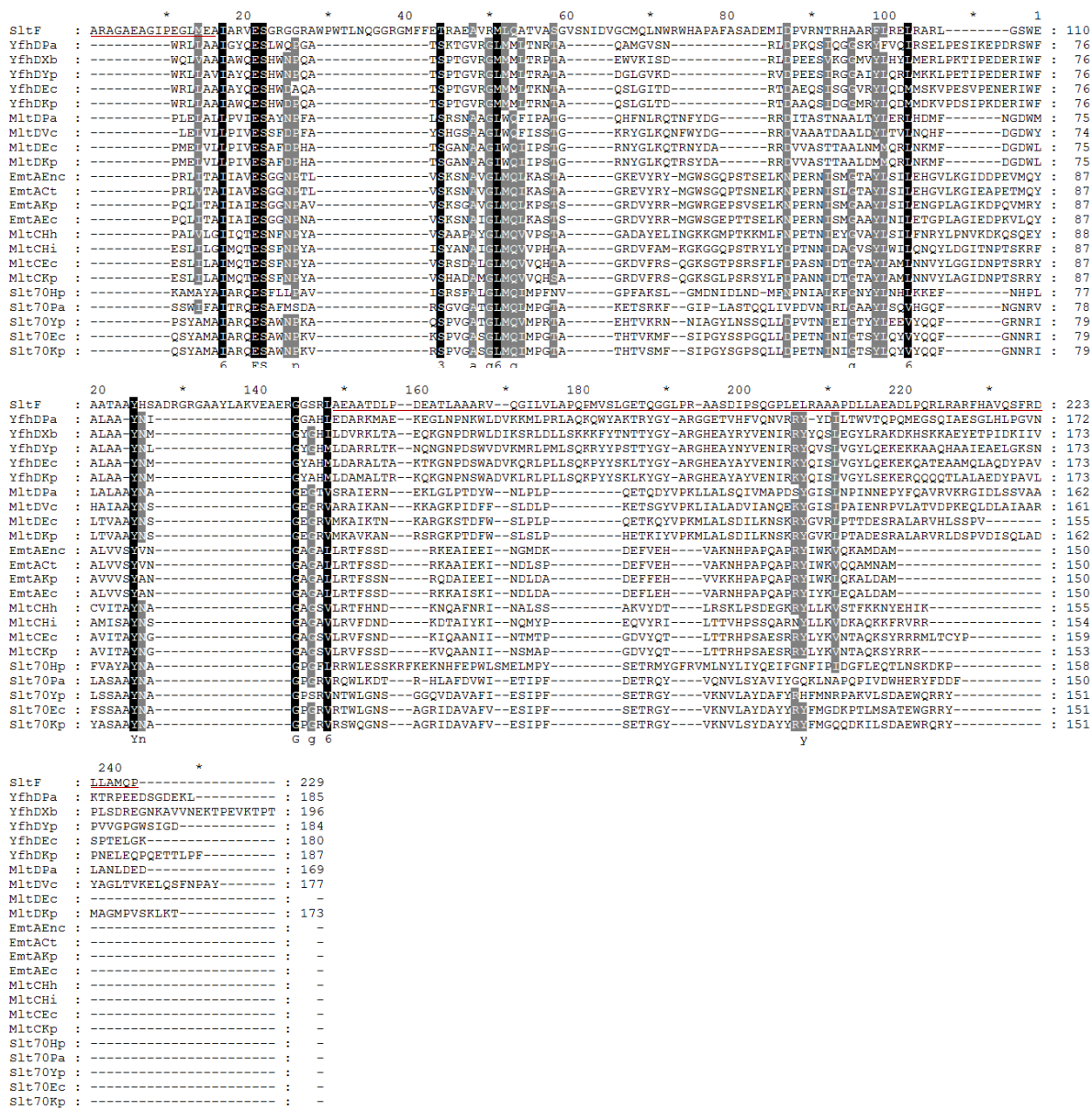


Figura 28. Alineamiento múltiple del dominio de transglicosilasas líticas. Se incluye la secuencia de la proteína SltF de *R. sphaeroides* (sin secuencia señal) y 22 transglicosilasas líticas. La proteína SltF se agrupa en la familia 1 de las transglicosilasas líticas y se agrupa como un miembro de la subfamilia 1D o MltD. El resto de las transglicosilasas líticas incluidas en el alineamiento también pertenecen a la familia 1. Se incluyeron secuencias para a cada una de las subfamilias que la componen. Las secuencias incluidas para la subfamilia 1A o Slt son transglicosilasas líticas de *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis*, *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Para la subfamilia 1B o MltC de *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *H. haemolyticus* y *K. pneumoniae*. Para la subfamilia 1C o EmtA de *K. pneumoniae*, *Cupriavidus taiwanensis*, *Enterobacter cloacae* y *E. coli*. Para la familia 1D o MltD de *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *E. coli* y *K. pneumoniae*. Finalmente para la familia 1E o YfhD de *P. aeruginosa*, *Xanthomonas beticola*, *Y. pestis*, *E. coli* y *K. pneumoniae*. Se marcan en color negro y gris los

aminoácidos más conservados. El alineamiento fue realizado en el programa MUSCLE. Se muestra en color rojo los 95 aminoácidos no conservados del C-terminal y los 17 aminoácidos del N-terminal.

En un primer trabajo se caracterizó a los 48 aminoácidos del C-terminal que están más distales al dominio lítico, se realizaron mutantes de esta región, se evaluó su capacidad para complementar a una cepa sin *sltF* y se determinó si las proteínas mutantes eran capaces de interactuar con FlgJ. Los resultados de este trabajo se muestran en la **Figura 29**.

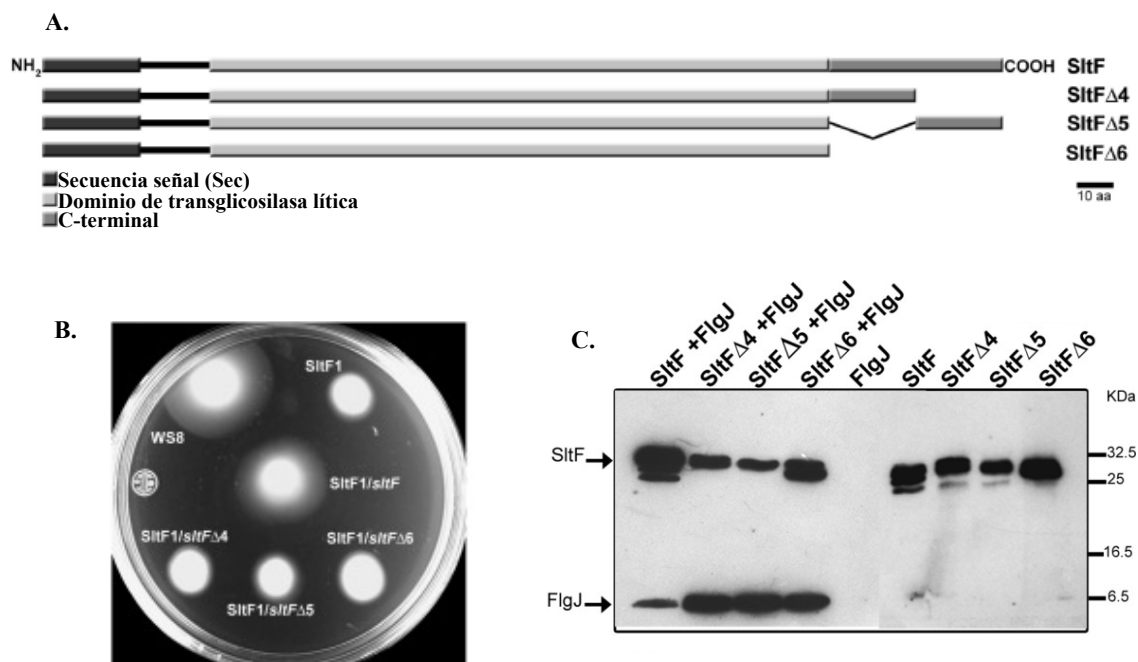


Figura 29. **A.** Representación esquemática de SltF silvestre y tres mutantes (SltFΔ4, SltFΔ5 y SltFΔ6). Se muestra la secuencia señal, el dominio de transglicosilasa lítica y el C-terminal no conservado. Se destacan los cambios realizados en las mutantes caracterizadas (SltFΔ4: deleción de 48 aminoácidos, SltFΔ5: deleción de 24 aminoácidos más distales y SltFΔ6: deleción de 24 aminoácidos más proximales). **B.** Análisis fenotípico, los alelos de *sltF* fueron clonados en el vector pRK415 y se utilizaron para complementar una mutante cromosomal de *sltF* (SltF1), el nado de las cepas mutantes fue probado en agar suave (al 0.25%) demostrando la incapacidad de las mutantes para restaurar el fenotipo de nado. **C.** Ensayo de coimmunoprecipitación (anti-His). Las proteínas mutantes se sobreexpresaron y se purificaron y con ellas se realizó el ensayo de coimmunoprecipitación: gamma globulinas anti-SltF fueron acopladas a perlas de sefarosa y las proteínas se incubaron según se indica, el resultado demuestra que las mutantes interactúan más fuertemente con FlgJ que con la proteína SltF silvestre (Modificado de la Mora, *et al.* 2012).

Estos resultados demuestran que las mutantes en estos 48 aminoácidos del C-terminal son incapaces de complementar el fenotipo de nado en una mutante en *sltF*, y adicionalmente demostraron que en ensayos de interacción *in vitro* las mutantes reconocen con mayor intensidad a FlgJ.

Este trabajo concluyó que los últimos 48 aminoácidos del C-terminal no son fundamentales para el reconocimiento de FlgJ pero sí son determinantes para modular la temporalidad de esta interacción protéica sugiriendo que esta región del C-terminal previene que se unan fuertemente haciendo a la interacción únicamente transitoria.

Posteriormente se prosiguió el estudio el C-terminal deletándolo por completo, es decir, eliminando a los 95 aminoácidos que lo componen y a la región aún no caracterizada de 47 aminoácidos. Nuevamente se evaluó su capacidad para complementar el fenotipo de nado en una cepa sin *sltF* y se determinó si las proteínas mutantes eran capaces de interactuar con FlgJ *in vitro*. Los resultados de este trabajo se muestran en la **Figura 30**.

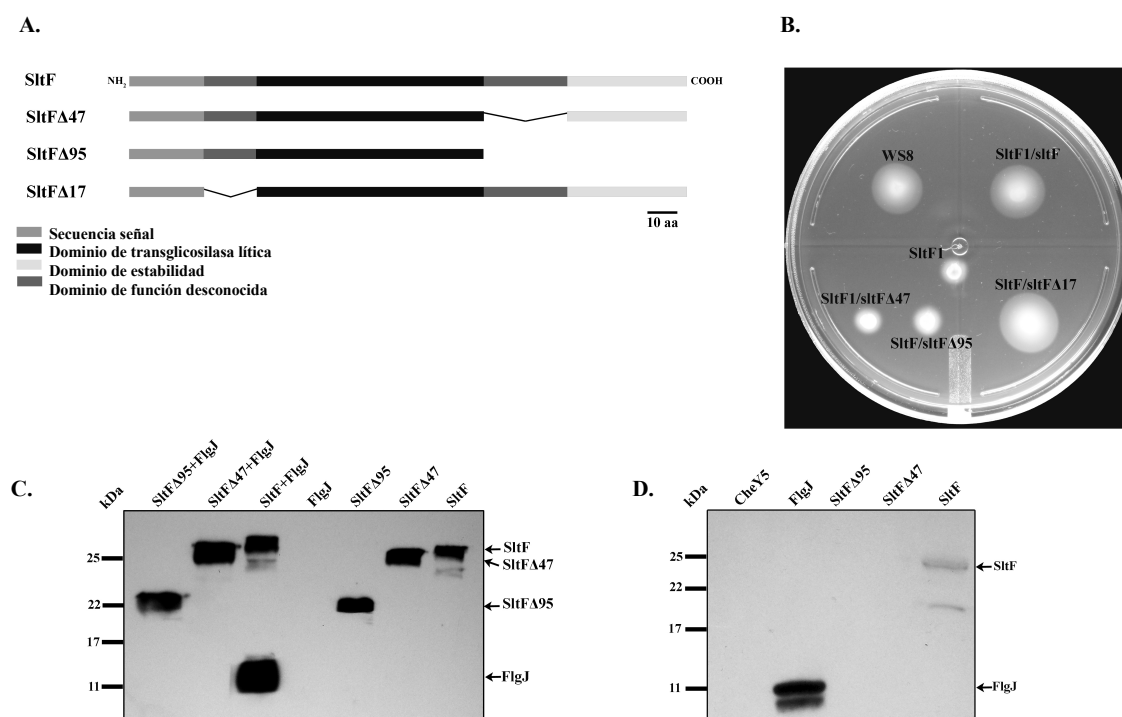


Figura 30. **A.** Representación esquemática de SltF silvestre y tres mutantes SltFΔ95, SltFΔ47 y SltFΔ17. Se muestra la secuencia señal, el dominio de transglicosilasa lítica, el dominio de estabilidad y la región del C-terminal no conservado y aún no caracterizado. Se destacan los cambios realizados en las mutantes (SltFΔ47: deleción de los 47 aminoácidos más proximales al dominio lítico, SltFΔ95: deleción de los 95 aminoácidos del C-terminal, SltFΔ17: deleción de 17 aminoácidos no conservados en el N-terminal). **B.** Análisis fenotípico, los alelos de *sltF* fueron clonados en el vector pRK415 y se utilizaron para complementar una mutante cromosomal de *sltF* (SltF1), el nado de las cepas mutantes fue probado en agar suave (al 0.25%) demostrando la incapacidad de las mutantes en el C-terminal para restaurar el fenotipo de nado. La mutante del N-terminal sí complementa el fenotipo. **C.** Ensayo de coimmunoprecipitación. Las proteínas mutantes se sobreexpresaron y se purificaron, con ellas se realizó el ensayo de coimmunoprecipitación: gamma globulinas anti-SltF fueron acopladas a perlas de sefarosa y las proteínas se incubaron según se indica, el resultado demuestra que las mutantes del C-terminal son incapaces de interactuar con FlgJ. (Modificado García-Ramos, *et al.* 2018).

Interesantemente, en este trabajo se identificó a la región necesaria para el reconocimiento de FlgJ y efectivamente se encuentra albergada en el C-terminal.

Estos trabajos demuestran que el C-terminal de SltF es relevante no solamente para reconocer a FlgJ sino también para regular la temporalidad de esta interacción.

Por último, existe un trabajo donde se estudia el papel de las proteínas del eje FlgB y FlgF sobre la actividad de SltF (Figura 31).

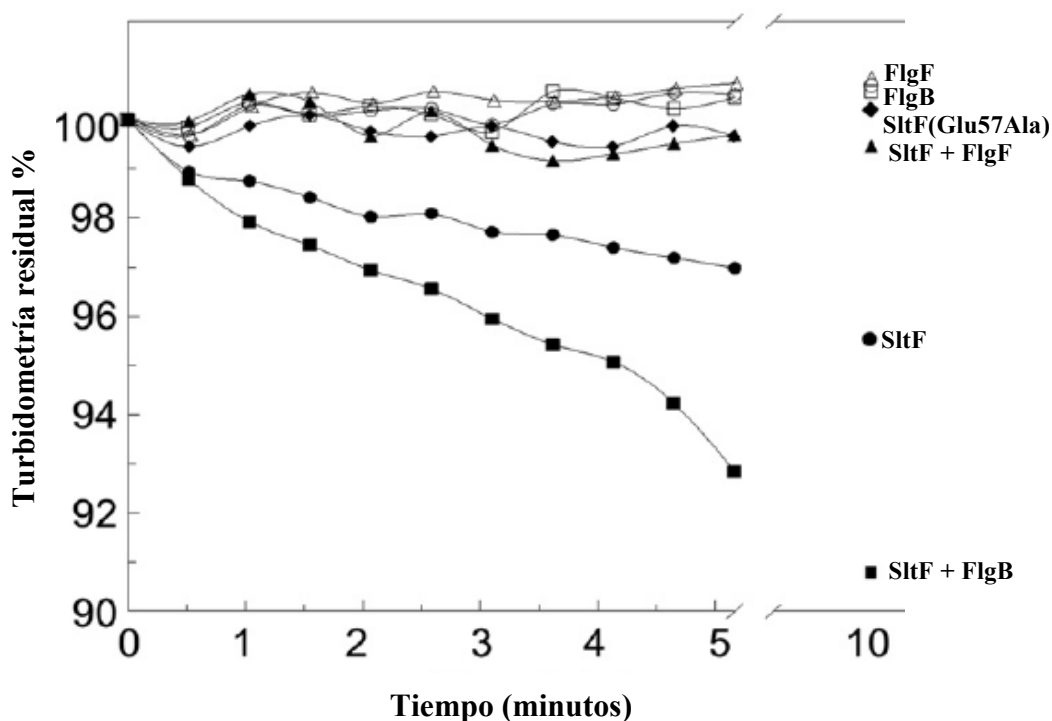


Figura 31. Actividad lítica de SltF. La proteína SltF fue incubada a temperatura ambiente con células leofilizadas de *M. lysodeikticus* en 50 mM de amortiguador (pH 7.0). Las proteínas se utilizaron a una concentración de 2 μ M. Se muestran curvas representativas para el progreso de la lisis monitoreado por análisis turbidométrico a una densidad óptica determinada (OD_{595}) (Herliey, *et al.* 2016).

Este trabajo sugiere un posible sistema de regulación, donde los componentes del eje regulan positivamente y negativamente la actividad enzimática de SltF durante el armado del eje. Los porcentajes (Figura 31) resultaron un poco desalentadores en el sentido de que únicamente se observa una activación del 7%, y una inhibición relativamente modesta, del 3%. Es probable que se deba a que no se consideró a FlgJ y algunos detalles experimentales podrían abordarse de manera diferente. El trabajo aquí presentado atiende estos detalles ampliando las observaciones.

Pared de peptidoglicano

El peptidoglicano es el componente esencial de la pared celular bacteriana, se ubica en la parte exterior de la membrana citoplásmica y está presente en prácticamente todas las bacterias. La pared celular es un componente esencial para la arquitectura celular, esta le confiere forma a la célula, previene la lisis bajo fluctuaciones en la presión turgente y sirve como andamio para componentes de pared celular (por ejemplo, proteínas) (**Figura 32**).

La pared de peptidoglicano es un polímero sumamente dinámico, es capaz de crecer, remodelarse y hasta de separarse. El crecimiento y la división celular están acompañadas de modificaciones a nivel estructural. Estas modificaciones pueden ocurrir a nivel de la síntesis de peptidoglicano, de la incorporación de nuevos componentes a la estructura existente, del reciclamiento y de la degradación de la pared (Dik, *et al.* 2017).

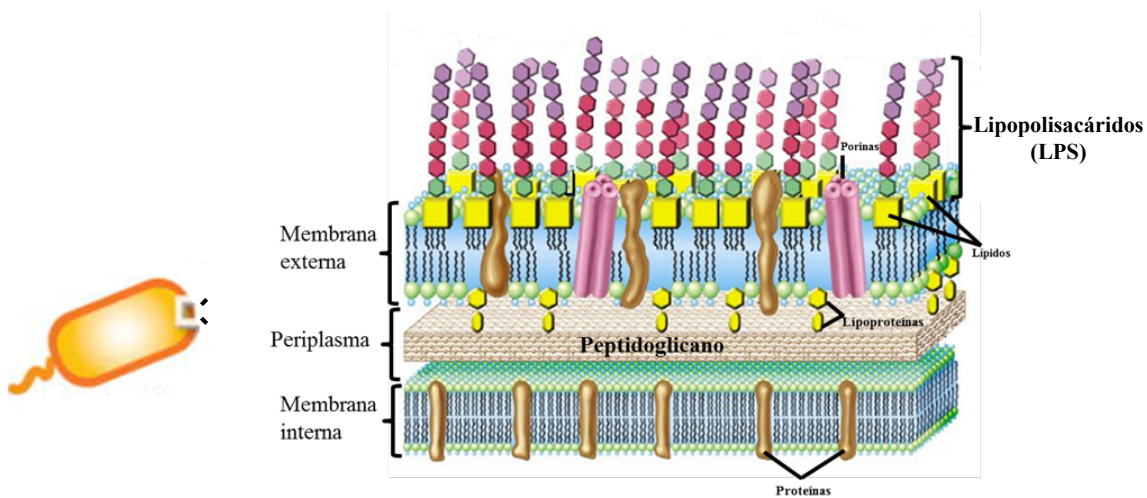


Figura 32. Arquitectura de la envoltura celular. Se esquematizan los componentes estructurales de la envoltura celular en las bacterias Gram-negativas o didérmicas. Se muestran las membranas externa e interna con sus respectivas bicapas lipídicas y el periplasma donde se ubica la pared celular o de peptidoglicano (Modificado Madigan, *et al.* 2012).

Las características estructurales que definen al peptidoglicano son las hebras lineales de polisacáridos entrecruzadas por péptidos cortos (Vollmer, *et al.* 2008). Las hebras de polisacáridos están formadas por dos residuos dispuestos alternadamente: *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico unidos por un enlace β -1 \rightarrow 4. El grupo *D*-lactilo de cada ácido *N*-acetilmurámico es sustituido por un péptido cuya composición suele ser L-Ala - γ -D-Glu-*meso*-A₂pm (o L-Lys) -D-Ala -D-Ala (A₂pm 2,6- ácido diaminopimérico). Estas características estructurales están presentes en básicamente todas las especies bacterianas conocidas, sin embargo, existen niveles de variación en los péptidos, las hebras de polisacáridos o en la composición de los puentes interpeptídicos (**Figura 33**).

Figura 33. Estructura de la pared de peptidoglicano en *E. coli*. Se muestra la estructura que consta de residuos alternados de *N*- acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico unidos por un enlace tipo β -1 \rightarrow 4 con una terminación 1,6 anhidromurámico. La parte sombreada en color amarillo corresponde a la unidad estructural del peptidoglicano (monómero), y a un costado se indica la nomenclatura en forma abreviada (Vollmer, *et al.* 2008).

La síntesis de peptidoglicano requiere la actividad protagónica de un par de enzimas: las glicosiltransferasas (GTasas): que polimerizan las cadenas de glúcidos y las DD-transpeptidasas (DD-TPasas) que unen a los péptidos y también se denominan PBPs (por las siglas *Penicillin-Binding Proteins*). La adición de nuevo material a la estructura de peptidoglicano por únicamente reacciones de transpeptidación provocaría un aumento en el grosor del mismo sin lograr la elongación requerida, por lo que para que la pared se pueda extender es necesario romper los enlaces covalentes y de esta manera se puede incorporar el material recién sintetizado en la misma capa sin aumentar el grosor de esta. Curiosamente, la degradación del peptidoglicano es fundamental para el crecimiento y la división celular (Typas, *et al.* 2012).

Enzimas líticas en sistemas de transporte macromolecular

Enzimas líticas

La pared celular representa una barrera física para poder ensamblar a los sistemas de secreción puesto que impide el transporte de proteínas que excedan los 50,000 Da, es por ello que se propone la existencia de enzimas especializadas que facilitan la apertura regulada de huecos en la pared celular (García-Gómez, et al. 2011).

Se han identificado enzimas que pueden romper cada uno de los enlaces covalentes presentes en el peptidoglicano (**Figura 34**).

Figura 34. Enzimas líticas. Se esquematiza el sitio de acción de las enzimas líticas sobre la estructura del peptidoglicano. Los puntos coloreados en las tonalidades de verde representan a los péptidos unidos a la cadena, M: ácido *N*-acetilmurámico. G: *N*-acetilglucosamina. Las flechas en color rojo indican los sitios de corte de las enzimas líticas: **1.** Glucosaminidasas: hidrolizan el enlace glicosídico entre la *N*-acetilglucosamina y el *N*-acetilmurámico. **2.** Transglicosilasas líticas: cortan el enlace glicosídico entre el ácido *N*-acetilmurámico y la *N*-acetilglucosamina sin la participación de una molécula de agua **3.** Endopeptidasas y Carboxipeptidasas: rompen enlace amida entre el ácido *N*-acetilmurámico y la L-Ala e hidrolizan los entrecruzamientos peptídicos respectivamente. **4.** Amidadas: rompen el enlace amida entre el ácido *N*-acetilmurámico y la L-Ala (Uehara, et al. 2011).

Transglicosilasas líticas

Las transglicosilasas líticas tienen la capacidad de degradar el peptidoglicano, son enzimas que cortan el enlace glicosídico $\beta 1 \rightarrow 4$ entre los residuos *N*-acetilglucosamina y *N*-acetilmurámico, y a diferencia de la lisozima, su sustrato no es hidrolizado utilizando una molécula de agua, la reacción resulta en la formación de un anillo intramolecular entre el carbono 1 y 6 del *N*-acetilmurámico que resulta en un residuo 1,6 anhidromurámico (**Figura 35**). La actividad catalítica característica de esta enzima es conferida por un ácido glutámico en el centro activo de la enzima (Koraimann, 2003).

Figura 35. La reacción característica de las transglicosilasas líticas. Las transglicosilasas líticas catalizan la escisión del peptidoglicano entre los residuos *N*-acetilmurámico y *N*-acetilglucosamina formando concomitantemente un residuo terminal 1,6 anhidromurámico (Dik, *et al.* 2017).

Las transglicosilasas líticas están presentes en todos los grupos de bacterias (con la excepción de los micoplasmas) y se distinguen por su gran variedad, por lo que para facilitar su estudio, se ha propuesto una clasificación que agrupa a las enzimas en seis diferentes familias (descritas más adelante). Se han identificado al menos seis plegamientos catalíticos en las transglicosilasas líticas que pertenecen a las bacterias Gram-negativas, y cada uno está descrito y reportado como un dominio conservado (**Figura 36**). Estas enzimas también pueden ser organizadas según su sitio de corte, presentando actividad exolítica o endolítica. La actividad exolítica escinde el disacárido *N*-acetilmurámico y *N*-acetilglucosamina en la parte terminal del final de la hebra. La actividad endolítica escinde las cadenas de manera interna resultando en productos que son de al menos de cuatro sacáridos de largo (Dik, *et al.* 2017).

Familia 1. Esta es la familia de transglicosilasas líticas más grande. Está compuesta por cuatro subfamilias solubles: 1A, 1F, 1G y 1H, y por cuatro subfamilias membranales: 1B, 1C, 1D y 1E, cada una de las proteínas tiene un dominio catalítico conservado que está compuesto principalmente por α -hélices. La familia 1 está definida por cuatro motivos. El motivo I está definido los residuos **E-S** (ácido glutámico-serina), el ácido glutámico corresponde al residuo catalítico, este motivo es prácticamente invariable con la excepción de SltF y de las transglicosilasas líticas flagelares putativas, esta variación es: **E-T** (ácido glutámico-treonina) (García-Ramos, *et al.* 2018). El motivo II (G-L-M-Q), el motivo III

(A/G/R-Y-N), y el motivo IV es un único residuo sumamente conservado (Y) flanqueado por un residuo hidrofóbico.

Familia 2. Se trata de una familia mucho más reducida, la conservación a nivel de secuencia es mucho menos evidente que en la familia 1, pero se han identificado seis motivos consenso. El motivo I (Q-G-X₈-G), el motivo II (G), el motivo III (sin residuos conservados), el motivo IV (N-X₅-F), el motivo V (P-X₅-A-X₁-D) y el motivo VI (D-X₁-G-X₁-A-X₆-D-X₃-G-X₃-G-X₂-A-G).

Familia 3. Esta familia abarca tanto a componentes solubles, como a componentes membranales que poseen un rango muy amplio de funciones celulares. Esta familia básicamente comparte los motivos consenso con la familia 1, pero se han identificado numerosas inserciones dentro del módulo catalítico y esto la distingue estructural y funcionalmente. Los motivos que la caracterizan son: motivo I (V-X₁₁-E-S), motivo II (L); motivo III (G-S-X₁-A-X₁-A-X₁-G-X₃-F), motivo IV (E-F) (D), y el motivo V (S-X₂-N-X₅-G-W). Las diferentes inserciones en los motivos conservados resultan en diferencias estructurales y mecánicas que caracterizan a esta familia.

Familia 4. Los miembros de esta familia son enzimas que pertenecen a los bacteriófagos, y estas participan en el ensamblaje de un sistema de secreción que facilita la patogenicidad de la célula huésped, suelen tener un único dominio y cuatro motivos consenso. El motivo I (A-X₇-S-E), el motivo II (Y-X₄-G-X₅-D-X-S-S-H-P), el motivo III (S-T-X₄-G-R-Y-Q-X₅-W) y el motivo IV (W-X-S). En contraste con la familia 1, el ácido glutámico es precedido por una serina (motivo I).

Familia 5. Esta familia contiene el primer ejemplo de una transglicosilasa lítica presente en bacterias Gram-negativas y en Gram-positivas, se presume que funciona durante la terminación de una cadena durante la biosíntesis de la cadena de peptidoglicano. La caracterizan siete motivos consenso. El motivo I (K-X₇-G-T-Y), motivo II (L-X₄-G-K-E-X-Q-X₆-E-G); motivo III (E-G-X₃-P-X-T-X₂-Y-X₅-D-X₃-L-X), motivo IV (A-S-I-X-E-K-E-G) (D), el motivo V (E-R-X₂-V-X-S-V-F-X₂-N-R-L-X₃-M-X-L-Q-T-D-V-I-Y-G-X-G), el motivo VI (G-X₅-D-L-X-Y-N-T-Y-X-I-X-G-L-P-P) y el motivo VII (L-X-A-X-A-X-P-X₂-T-X₃-Y-F-V-A-D-G-X₃-G-G-H-X-F-X-L-X₂-H-N). El ácido glutámico conservado es precedido por el par EK y es seguido por una treonina.

Familia 6. Esta familia posee tres aspartatos conservados, y al menos dos de ellos parecen estar involucrados en la catálisis. Esta familia posee cuatro motivos consenso. El motivo I (T-X₂-G-E-X₂-D), el motivo II (A-A-H-X-T-L-P-X-P-SX₄-T-N-X₂-N-G), el motivo III (R-X-N-D-R-G-P) y el motivo IV (R-X-I-X-L-S-X-A-X-A-X₂-L).

Figura 36. Dominios y organización de las familias de transglicosilasas líticas. Se muestra la arquitectura de las transglicosilasas líticas divididas en las seis familias. Los dominios fueron asignados según un análisis consenso de las bases de datos de Pfam y de NCBI (Dik, *et al.* 2017).

Los sistemas de secreción III y IV se caracterizan por ser complejos macromoleculares de gran tamaño involucrados en el proceso del transporte de DNA o de proteína (Roure, *et al.* 2012; Koraimann, 2003). Para poder ensamblar estos complejos macromoleculares de manera eficiente se requiere de al menos una enzima lítica que sea capaz de degradar al peptidoglicano localmente y así promover la formación de estos complejos. La actividad de las enzimas líticas debe ser estrictamente regulada para evitar brechas en el peptidoglicano y la lisis celular, y además debe ser espacialmente controlada para generar el espacio suficiente en el sitio de ensamblaje del complejo. La activación espacial de las transglicosilasas líticas especializadas es asegurada por el reclutamiento de esta al sitio de ensamblaje a través de

interacciones con uno o varios componentes del complejo (Santin, *et al.* 2016).

En el grupo de las Enterobacterias, se sabe que los sistemas de secreción tipo III tienen una transglicosilasa lítica. Y hasta ahora, se ha descrito la existencia de una enzima lítica en al menos un ejemplo en los sistemas de secreción II, III y IV, además de los sistemas de competencia. Para los sistemas I y V no hay ninguna enzima lítica involucrada descrita aún.

Análisis filogenéticos del dominio catalítico de las transglicosilasas líticas flagelares sugieren que estas están más cercanamente relacionadas con las transglicosilasas líticas necesarias para el ensamblado del injectisoma. Las transglicosilasas líticas flagelares se establecen como un grupo monofilético destacando que a pesar de ser un análisis de únicamente el dominio enzimático. En la **Figura 37** se muestra el resultado del análisis filogenético. Este dominio enzimático está presente en varias proteínas multidominio y esto sugiere que estas enzimas evolucionaron y se especializaron para la realización de diferentes tareas. Las transglicosilasas líticas flagelares forman un grupo filogenético (1F) y un subgrupo (1F'). Interessantemente, las transglicosilasas líticas flagelares fusionadas a FlgJ se agruparon con las transglicosilasas líticas de la familia 1A, que no está involucrada en la biogénesis flagelar y podría deberse a que la fusión de la enzima con FlgJ ocasiona la especificidad que esta pudiera tener cuando se encuentran por separado, también se propone que FlgJ puede fusionarse con cualquier enzima lítica. Cerca de la familia 1F se observa a la familia 1G, que está compuesta por enzimas involucradas en los sistemas de secreción tipo III (como EtdA), sugiriendo fuertemente la posibilidad de un ancestro común entre ambos tipos de transglicosilasas líticas (García-Ramos, *et al.* 2018).

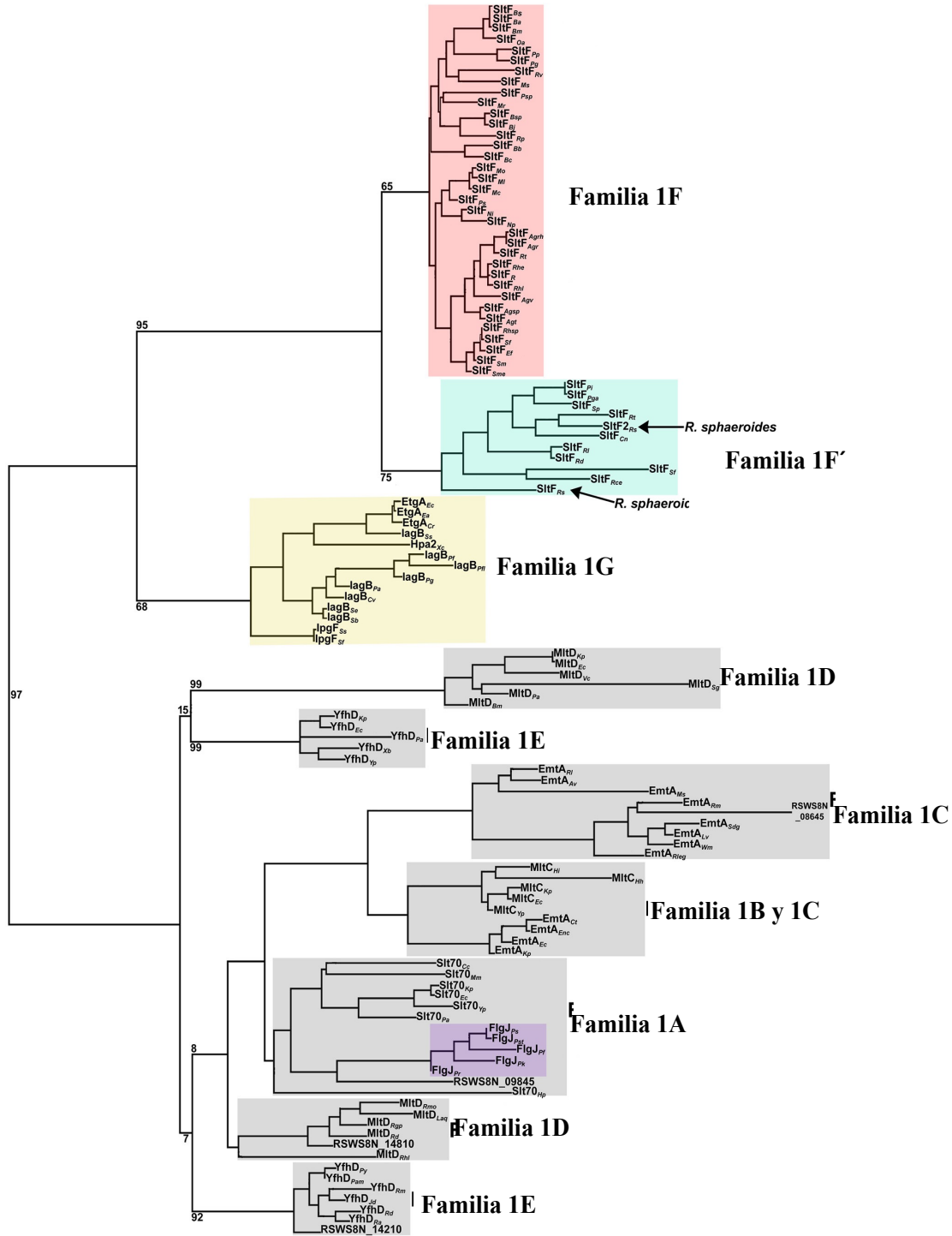


Figura 37. Análisis filogenético de transglicosilasas líticas. El análisis incluye transglicosilasas líticas de la familia 1 (A-E) y las diferentes agrupaciones de cada una de estas familias se muestra en color azul, transglicosilasas líticas flagelares, la familia 1F destacadas en color rosa, la familia 1F' destacada en color verde y transglicosilasas líticas involucradas en el ensamblado del injectisoma, coloreadas en color amarillo. Destacando en color morado a las transglicosilasas líticas flagelares fusionadas a FigJ, estas no se agrupan

con el resto de las transglicosilasas líticas flagelares. El análisis se realizó únicamente con el dominio enzimático de cada una de las proteínas. El alineamiento se realizó con el programa MUSCLE y se refinó manualmente eliminando las regiones más divergentes con el programa gBlocks. Se realizó un árbol filogenético de máxima verosimilitud con el programa PhyML, se utilizó un modelo de sustitución con un *bootstrap*:100 (García-Ramos, *et al.* 2018).

Planteamiento del problema

Establecer un flagelo funcional es un proceso jerárquico que requiere la expresión regulada de al menos 50 genes. Durante el establecimiento del cuerpo basal la estructura necesita de atravesar la pared de peptidoglicano, y dado que el peptidoglicano es una estructura que representa una barrera física, su ruptura es fundamental para la formación del eje. Establecer un eje funcional requiere de las cinco proteínas estructurales que lo componen (FliE, FlgB, FlgC, FlgF y FlgG) y la presencia de la proteína de andamiaje FlgJ.

En *S. enterica*, la proteína FlgJ está compuesta por dos dominios, en el C-terminal posee un dominio enzimático que le permite hidrolizar la pared de peptidoglicano mientras que en el N-terminal posee un dominio ensamblador para las proteínas del eje. Este modelo no aplica para *R. sphaeroides* pues esta bacteria posee una FlgJ del tipo monodominio.

La proteína SltF es la enzima responsable de realizar el hueco en la pared durante el ensamblado del flagelo en *R. sphaeroides*, SltF es exportada por la vía general Sec por lo que se sugiere que por su capacidad para interactuar con FlgJ, esta debe ser al menos uno de los componentes flagelares con los que es capaz de interactuar y por lo tanto encontrar su sitio de acción. Adicionalmente, se ha identificado que el C-terminal no conservado de SltF es crucial para que esta pueda reconocer a FlgJ y que además pueda hacerlo de forma transitoria únicamente.

Recientemente se ha sugerido que SltF es capaz de interactuar con al menos dos componentes estructurales del eje (FlgB y FlgF) lo que sugiere que hay más de un participante en el flagelo con el que esta enzima es capaz de interactuar, adicionalmente se propone que estos componentes pueden tener un papel regulatorio sobre la actividad enzimática de SltF.

Estos antecedentes sugieren que es relevante seguir explorando a los componentes del eje con los que SltF pueda interactuar y determinar si el C-terminal participa en estas interacciones de igual manera que lo hace con FlgJ. Adicionalmente es necesario determinar si todos los componentes del eje tienen un papel sobre la actividad de SltF y realizar las pruebas pertinentes en presencia de FlgJ. Considerando que durante la biogénesis del eje flagelar estos tres componentes (SltF-FlgJ-eje) se encuentran simultáneamente en el periplasma es necesario determinar si la formación de este complejo afecta la actividad enzimática de SltF.

Hipótesis

Si el C-terminal de SlfF es fundamental para su interacción con las proteínas del eje, mutarlo ocasionará que SlfF pierda la capacidad para interactuar con los componentes estructurales del eje.

Objetivos

General

- . Describir los detalles de la interacción entre SlfF y los componentes del eje.

Particulares

- Caracterizar la interacción de la transglicosilasa lítica flagelar (SlfF) con los componentes del eje flagelar.
- Proponer un modelo para el funcionamiento de SlfF en función de los resultados obtenidos.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas.

Cepas	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i>		
M15[pREP4]	thi lac ara ⁺ gal mlt F' recA ⁺ uvr ⁺ Ion ⁺ . Plásmido pREP4 Kan ^r .	Qiagen
BL21(DE3)pLysS	F' ompT hsdS _{SB} (rB- mB-) gal dcm (DE3)/pLysS Cm ^r .	Novagen
JM109 Top 10	hsdR17 ₋ (lac-pro) F-traD36 <i>proAB</i> lacIqz_M15 F'mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80 lacZ ΔM15 ΔlacX74	Ausubel, et al 1987 Invitrogen

Kan (kanamicina). Cm (Cloranfenicol).

Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio LB (Tabla 2) o en medio 2YT (Tabla 3) según se indica a 37°C con una agitación de 250 rpm

Medios de cultivo

Tabla 2. Medio LB

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

*Únicamente para cultivos sólidos

Tabla 3. Medio 2YT

Triptona	1.5%
Extracto de levadura	1%
NaCl	0.5%
Agar*	2%

*Únicamente para cultivos sólidos

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

Ampicilina: 200 µg/ml

Kanamicina: 25 µg/ml
 Cloranfenicol: 34 µg/ml

Plásmidos

Los plásmidos utilizados se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Plásmidos.

Plásmidos	Características generales	Referencia
pQE30	Vector de sobreexpresión. Amp ^r . N-Hisx6.	Qiagen
pQE60	Vector de sobreexpresión. Amp ^r . C-Hisx6.	Qiagen
pET19-b	Vector de sobreexpresión. Amp ^r . NHisx10.	Novagen
pTZ19R/SltF	Derivado de pUC. Contiene lacZ ⁺ . Amp ^r Contiene SltF (sec+) – 95 pb y + 550 pb	de la Mora, 2012
pQE30sltF(sec-)	N-Hisx6. Sin secuencia señal. Amp ^r .	García, et al 2018
pQE30sltFΔ95(sec-)	N-Hisx6. <i>sltFΔ(510-795)</i> . Amp ^r .	García, et al 2018
pQE30sltFΔ47(sec-)	N-Hisx6. <i>sltFΔ(510-651)</i> . Amp ^r .	García, et al 2018
pQE30sltFΔ48(sec-)	N-Hisx6. <i>sltFΔ(651-795)</i> . Amp ^r .	de la Mora, 2012
pQE60flgJ	C-Hisx6. Sitios. Amp ^r .	de la Mora, 2012
pQE30fliE	N-Hisx6. Sitios SacI/HindIII. Amp ^r .	Osorio, et al 2017
pQE30flgB	N-Hisx6. Sitios BamHI/HindIII. Amp ^r .	Osorio, et al 2017
pET-19bflgC	N-Hisx10. Sitios NdeI/BamHI. Amp ^r .	Osorio, et al 2017
pQE30flgF	N-Hisx6. Sitios KpnI/HindIII. Amp ^r .	Osorio, et al 2017
pQE30flgG	N-Hisx6. Sitios NdeI/BamHI. Amp ^r .	Osorio, et al 2017
pQE30cheY5	N-Hisx6. Sitios Amp ^r .	Martinez, et al 2011

Amp (ampicilina)

Transformación de *E. coli* (Ausubel, et al.1987)

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

Sobreexpresión y purificación de proteína.

Sobreexpresión y purificación de las proteínas del eje: FliE, FlgB y FlgC

Estas proteínas se expresan en dos cepas de *E. coli*: M15[pREP4] con los plásmidos pQE30/*fliE*, pQE30/*flgB* o pQE30/*flgF* y BL21(DE3)pLysS con los plásmidos pET-19b/*flgC* o pQE30/*flgG*. Las cepas se crecieron a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.5, en este punto se añadió el inductor IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopironósido) a una concentración de 0.1 mM y se incubó durante 3 horas excepto a FlgC que se incubó durante 1 hora.

La purificación de FliE, FlgB y FlgC se realizó en condiciones desnaturizantes (amortiguador 20 mM Tris-HCl, 6 M GuHCl (hidrocloruro de guanidina) pH 8.5), después de sonicar se incubó en agitación por 1 hora a 4°C. En todos los casos se recuperó el sobrenadante y se incubó en agitación constante con 500 μl de resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen) durante 2 horas 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. Las fracciones que contienen a la proteína purificada se dializaron en amortiguador 20 mM Tris-HCl pH 8.5, en el caso de FlgB se añadió NaCl a una concentración final de 250 mM al amortiguador de diálisis. Finalmente, las proteínas se concentraron utilizando el sistema Amicon (Millipore MWCO (Molecular weight cut-off) 3,000 ó 10,000).

Sobreexpresión y purificación de las proteínas del eje: FlgF y FlgG

Estas proteínas se expresan en la cepa de *E. coli*: BL21(DE3)pLysS con los plásmidos pET-19b/*flgC* o pQE30/*flgG*. Las cepas se crecieron a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.8, en este punto se añadió el inductor IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopironósido) a una concentración de 0.1 mM y se incubaron durante 4 horas.

Los cultivos se centrifugaron a 3,500 x g por 15 minutos y el botón de células se resuspendió en amortiguador 20 mM Tris-HCl pH 8.5, se sonicó 6 veces durante 1 minuto manteniendo a las células en hielo. El extracto se centrifugó a 12,000 x g durante 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante para incubarse con 500 μl de resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen) durante 2 horas 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, las fracciones que contienen a la elución se dializaron en amortiguador 20 mM Tris-HCl pH 8.5 y finalmente se concentraron utilizando el sistema Amicon (Millipore MWCO (Molecular weight cut-off) 10,000).

Sobreexpresión y purificación de la proteína SltF y SltFA48

Las cepas de *E. coli* M15[pREP4] que contienen el plásmido pQE30/*sltF* y también el plásmido pQE30/*sltFA48* (ambos sin secuencia señal) se crecieron a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (OD_{600nm}) de 0.5 y (OD_{600nm}) de 0.8 respectivamente, en este punto se añadió el inductor (IPTG) a una concentración final de 1 mM y se incubaron durante 4 horas a 25°C, el cultivo se centrifugó a 3,500 x g por 15 minutos.

Los botones de células se resuspendieron en amortiguador (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl pH 7.6) con una pastilla inhibidora de proteasas (*Roche*). Las células se sonicaron en un baño de hielo (Sonicador marca *Branson* modelo 250) 5 veces durante 1 minuto cada una. Las muestras se centrifugaron a 20,000 x g durante 10 minutos a 4°C, se recuperó el extracto celular y se ultracentrifugó a 25,000 x g durante 1 hora; Se recuperó el sobrenadante y se incubó a 4°C durante 2 horas con 300 µl de resina de agarosa Ni-NTA (*Qiagen*). Las proteínas contaminantes se removieron de la resina mediante lavados con amortiguador 50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl pH 7.6 y concentraciones crecientes de imidazol (5, 10, 15, 20, 25, 30 y 100 mM). La fracción 100 mM de imidazol se dializó en amortiguador (50 mM Na₂HPO₄ pH 7.6) durante la noche, y se concentró utilizando el sistema Amicon (*Millipore MWCO (Molecular weight cut-off 10,000)*).

Sobreexpresión y purificación de SltFΔ47 y SltFΔ95

La cepa de *E. coli* M15[pREP4] con el plásmido pQE30/*sltFΔ47* y pQE30/*sltFΔ95* (ambos sin secuencia señal) se crecieron a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (OD_{600nm}) de 0.6, en este punto se añadió el inductor (IPTG) a una concentración final de 0.1 mM y se incubaron durante 4 horas a 37°C, los cultivos se centrifugaron a 3,500 x g por 15 minutos.

Los botones de células se resuspendieron en amortiguador (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl pH 7.6), y se sonicaron en un baño de hielo (Sonicador marca *Branson* modelo 250) 5 veces durante 1 minuto cada una, se centrifugó la muestra a 14,000 x g durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el botón con los cuerpos de inclusión.

Purificación de las proteínas a partir de cuerpos de inclusión (Wessel, et al. 1984).

Se resuspendieron los cuerpos de inclusión para lavarlos en 10 ml de amortiguador PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.6 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.3) y Tritón X-100 al 0.5%, se centrifugó la muestra a 14,000 xg durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el botón. Se lavó la muestra dos veces con 25 y 30 ml de agua desionizada fría y filtrada, se centrifugó ambas veces a 14,000 x g durante 10 minutos a 4°C. Nuevamente se resuspendió la muestra en 20 ml de amortiguador PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.6 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7,3) y tritón X-100 al 0.5%, se centrifugó la muestra a 14,000 xg durante 10 minutos a 4°C. Se lavó tres veces más con 25, 20 y 20 ml de agua desionizada fría y filtrada, se centrifugó las tres veces a 14,000 xg durante 10 minutos a 4°C descartando el sobrenadante.

El botón se resuspendió nuevamente en amortiguador (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl y 6 M GuHCl pH 7.6) y se incubó a 4°C durante 1 hora, se centrifugó a 3,500 xg durante 10 minutos y se recuperó el extracto celular para ultracentrifugar a 25,000 xg durante 1 hora, se recuperó el sobrenadante, y se incubó a 4°C durante 12 horas con 500 µl de resina de agarosa Ni-NTA (*Qiagen*). Las proteínas contaminantes se removieron de la resina mediante lavados con amortiguador (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 6 M GuHCl pH 7.6) y concentraciones crecientes de imidazol (15 y 250 mM) ambas proteínas eluyen en 250 mM de imidazol, por lo que dicha elución se renaturalizó en el amortiguador de diálisis (50 mM Na₂HPO₄ pH 6.5 ó pH 7.6) durante la noche, y posteriormente se concentró utilizando el sistema Amicon (*Millipore MWCO (Molecular weight cut-off) 3,000*).

Sobreexpresión y purificación de la proteína FlgJ

La cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS con el plásmido pQE60/*flgJ* se creció a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (OD_{600nm}) de 0.6, a partir de este punto se dejó crecer durante 8 horas a 37°C y el cultivo se centrifugó a 3,500 xg por 15 minutos.

El botón de células se resuspendió en amortiguador (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl pH 7.6) y las células se sonicaron (Sonicador marca *Branson* modelo 250) utilizando un baño de hielo, la muestra se centrifugó a 14,000 x g durante 10 minutos, se resuspendió el botón en amortiguador (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl y 1 M GuHCl pH 7.6) y se incubó a 4°C en agitación constante durante 1 hora. Posteriormente la muestra se centrifugó a 14,000 xg durante 10 minutos, se resuspendió el botón en amortiguador (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl y 6 M GuHCl pH 7.6), se incubó a 4°C en agitación constante durante 1 hora y finalmente la muestra se ultracentrifugó a 25,000 x g durante 1 hora; Se recuperó el sobrenadante y se incubó a 4°C durante 2 horas con 300 µl de resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen). Las proteínas contaminantes se removieron de la resina mediante lavados con amortiguador (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl y 6 M GuHCl pH 7.6) y concentraciones crecientes de imidazol (15 y 100 mM). La fracción 100 mM de imidazol se dializó en amortiguador (50 mM Na₂HPO₄ pH 6.5) durante la noche, y se concentró utilizando el sistema Amicon (*Millipore MWCO (Molecular weight cut-off) 5,000*).

Sobreexpresión y purificación de la proteína CheY5

La cepa de *E. coli* JM109 con el plásmido pQE30/*cheY5* se creció a 37°C en medio 2YT hasta alcanzar una densidad óptica (OD_{600nm}) de 0.8, en este punto se añadió el inductor (IPTG) a una concentración final de 1 mM y se incubó durante 4 horas a 30°C, se centrifugó los cultivos a 3,500 xg por 15 minutos.

El botón de células se resuspendió en amortiguador TMNDG (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1 mM DTT y 10% v/v de glicerol pH 8) y las células se sonicaron (Sonicador marca *Branson* modelo 250) utilizando un baño de hielo, la muestra se centrifugó a 30,000 xg durante 40 minutos, se recuperó el sobrenadante, y se incubó a 4°C durante 1 hora con 500 µl de resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen). Las proteínas contaminantes se removieron de la resina mediante lavados con amortiguador TMNDG y concentraciones crecientes de imidazol (15 y 100 mM). La fracción 100 mM de imidazol se dializó en amortiguador (33 mM HEPES, 50 mM KCl, 5mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0.1 mM DTT, 0.1 mM EDTA y 10% v/v de glicerol pH 7.5) durante la noche, y se concentró utilizando el sistema Amicon (*Millipore MWCO (Molecular weight cut-off) 3,000*).

Cuantificación de proteína

Para determinar la concentración de proteína obtenida se utilizó el método de TCA-Lowry. Las proteínas problema y la albúmina sérica bovina (SIGMA) para la curva estándar se disolvieron aforando a 1 ml con H₂O. Se añadieron 100 µl de deoxicolato de sodio al 0.15% m/v y 100 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 72% m/v, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 8,500 xg durante 10 minutos, el sobrenadante se resuspendió en 1 ml de solución (0.04 mM CuSO₄, 0.7 M Na₃C₆H₅O₇, 190 mM Na₂CO₃ y 100 mM NaOH), se añadieron 100 µl de solución de Folin al 50% v/v y se

incubó durante 20 minutos. Se determinó la absorbancia a 750 nm (Peterson, 1977).

Precipitación de proteína

Las muestras de proteína problema se disolvieron en 300 µl de H₂O, 400 µl de metanol y 100 µl de cloroformo, las mezclas se resuspendieron utilizando un vórtex y se centrifugaron a 16,000 xg durante 7 minutos, se desechó la fase superior y se resuspendió el resto en 300 µl de metanol con ayuda de un vórtex y las muestras se centrifugaron a 16,000 xg durante 4 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió a la muestra remanente en 20 µl de buffer de carga (65 mM de Tris-HCl, 10% de glicerol v/v, 2% m/v de SDS y 0.01% m/v de azul de bromofenol) (Wessel, et al. 1984).

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE

Se realizó la separación de las proteínas por peso molecular en geles SDS 15% y 17.5% m/v de poliacrilamida, se utilizó como estándar marcador de peso preteñido (Color Plus). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie, con plata o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Towbin, et al. 1979).

Tinción con azul de Coomassie R-250

La tinción con Coomassie se realiza para visualizar los geles SDS-PAGE. En este caso, la tinción con el color azul se realizó con Coomassie R-250 (0.2% m/v de coomassie R250, 50% v/v de metanol y 10% v/v de ácido acético). Para desteñir se utiliza la solución desteñidora (50% v/v de metanol y 10% v/v de ácido acético).

Tinción con plata

La tinción con plata es tan sensible que puede detectar proteína en concentraciones del orden de ng por lo que se utiliza para detectar proteínas a concentraciones tan bajas que no pueden ser detectadas por la tinción con Coomassie.

Una vez realizada la electroforesis de proteínas, el gel se incubó durante 30 minutos en una solución fijadora (metanol 40% v/v y formaldehído al 5% v/v) y se realizaron dos lavados de 5 minutos con abundante H₂O.

Pretratamiento: El gel se incubó durante 1 minuto con una solución Na₂S₂O₅•5H₂O y posteriormente esta se enjuagó con abundante agua.

Tinción: Se preparó una solución de nitrato de plata (AgNO₃) al 0.02% m/v y con ella se realizó una incubación de 15 minutos que posteriormente se enjuagó con agua.

Revelador: Se añadió la solución reveladora (Na₂CO₃ al 3% m/v, formaldehído al 0.05% v/v y Na₂S₂O₅•5H₂O al 0.0004% m/v).

Fijador: Finalmente se fijó el gel con una solución 1.15 M de ácido cítrico (C₆H₈O₇).

Inmunoréplica tipo *Western blot*

Una vez realizada la electroforesis de proteínas, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa 0.2 nm, se utilizó amortiguador de carbonatos (10 mM NaHCO₃, 30 mM Na₂CO₃ y 20% v/v de metanol) y se realizó en una cámara de transferencia húmeda a 350 mA durante 1 hora.

Se incubó la membrana para bloquearla durante 1 hora en una solución al 5% m/v de leche libre de grasas (*Svelty light*) en amortiguador TTBS (0.5 M NaCl, 2.4 mM Tris-HCl y 0.01% v/v de Tween-20 pH 7.5), se realizaron 3 lavados con 50 ml de amortiguador TTBS durante 15, 10 y 5 minutos. El anticuerpo primario de interés se incubó durante 1 hora a temperatura según la dilución reportada en cada caso y nuevamente se realizaron los 3 lavados en las mismas condiciones, posteriormente se incubó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa (Amersham) en una dilución 1:10,000 y se realizaron los 3 lavados ya descritos. Se reveló mediante una reacción quimioluminiscente y se registró la señal en placas radiográficas.

Ensayos de interacción

Ensayos de interacción proteína-proteína por inmunoréplica de afinidad

Se cargó 5 µmoles de cada proteína purificada en geles SDS 17.5% m/v de acrilamida y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon incubándolas en una solución al 5% m/v de leche baja en grasas (*Svelty light*) en amortiguador TTBS (0.5 M NaCl, 2.4 mM Tris-HCl y 0.01% de Tween-20 pH 7.5) durante 1 hora y se realizaron 3 lavados con 50 ml de amortiguador TTBS durante 15, 10 y 5 minutos. Se incubaron durante 1 hora con la proteína prueba purificada, esta se añadió directamente en el amortiguador TTBS a una concentración final de 3 µg por ml de TTBS. Se retiró el exceso de proteína soluble mediante lavados de 50 ml del mismo amortiguador (15, 10 y 5 minutos) posteriormente se incubó 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal anti-SltF 1:10,000. Finalmente se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa (Amersham) en una dilución 1:10,000 y se realizaron los 3 lavados ya descritos. Se reveló por una reacción quimioluminiscente y se registró la señal en placas radiográficas.

Ensayo de coimmunoprecipitación (2 proteínas)

Se prepararon viales (tubos *Eppendorf*) con 25 µl de resina acoplada a proteína A (SIGMA) y 5 µg de las siguientes γ -inmunoglobulinas: anti-FliE, anti-FliB, anti-FlgC, anti-FlgF o anti-FlgG según se indica en cada ensayo en 1 ml de amortiguador (20 mM Tris pH 7.6), se incubaron en agitación a 4°C durante 14 horas, se centrifugaron a 12,000 xg durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se incubaron 0.30 µM de cada una de las proteínas en 1 ml de amortiguador durante 1 hora a 4°C, transcurrido el tiempo se agregó la proteína incubada a la resina y se incubó durante 1 hora a 4°C. Se centrifugó la mezcla a 12,000 xg durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante, para lavar la resina se agregó 1ml de amortiguador y se repitió el lavado de 4 a 6 veces. Se resuspendió el paquete de resina de cada tubo en 30 µl de buffer de carga (65 mM Tris-HCl, 10% glicerol v/v, 2% SDS m/v y 0.01% m/v de azul de bromofenol), las muestras se hirvieron a 95°C durante 7 minutos, se

cargaron en un gel 17.5% m/v de acrilamida y el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para realizar una inmunoréplica tipo *Western blot* utilizando anti-histidinas (Pierce chemicals) 1:10,000. Se reveló mediante una reacción quimioluminiscente y se registró la señal en placas radiográficas.

Ensayo de coimmunoprecipitación (3 proteínas)

Se prepararon viales (tubos *Eppendorf*) con 25 μ l de resina acoplada a proteína A (SIGMA) y 3 μ g de γ -inmunoglobulinas: anti-SltF en 1 ml de amortiguador (50 mM Na₂HPO₄), se incubaron en agitación a 4°C durante 14 horas, se centrifugaron a 12,000 xg durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se incubaron 0.15 μ M de cada proteína en 1 ml de amortiguador durante 1 hora a 4°C, transcurrido el tiempo se agregó a las proteínas incubadas a la resina y se incubó durante 1 hora a 4°C. Se centrifugó la mezcla a 12,000 xg durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante, para lavar la resina se agregó 1ml de amortiguador y se repitió el lavado de 4 a 6 veces. Se resuspendió el paquete de resina de cada tubo en 30 μ l de buffer de carga (65 mM Tris-HCl, 10% glicerol v/v, 2% SDS m/v y 0.01% m/v de azul de bromofenol), las muestras se hirvieron a 95°C durante 7 minutos, se cargaron en un gel 15% m/v de acrilamida y el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para realizar una inmunoréplica tipo *Western blot* utilizando anti-histidinas (Pierce chemicals) 1:10,000. Se reveló mediante una reacción quimioluminiscente y se registró la señal en placas radiográficas.

Ensayos de actividad enzimática

Lisoplato de actividad

Este es un ensayo cualitativo de actividad enzimática, un resultado se interpreta como positivo si se observa que la proteína es capaz de romper el sustrato al generar un halo transparente.

Se prepararon cajas Petri con 15 ml de amortiguador (50 mM Na₂HPO₄ pH 6.7) con 1% m/v de agarosa y 0.05% m/v de células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato. Se añadió a cada una de las proteínas problema a una concentración final de 5 μ g. Se incluyó como control positivo 0.05 μ g de lisozima de huevo (SIGMA) y como control negativo, se incluyeron 5 μ g de la proteína quimiotáctica CheY5. Cada una de las cajas Petri se incubó a 30°C durante 16 horas.

Ensayo turbidométrico

Se prepararon tubos con 2 ml de amortiguador (50 mM Na₂HPO₄ pH 6.7) y 0.2 μ g/ml de células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* (SIGMA) como sustrato y posteriormente se colocaron en celdas de 3 ml. La celda con el amortiguador y el sustrato se mantuvo en agitación constante a 30°C en un espectrofotómetro y aproximadamente a los 40 segundos se agregó 0.5 μ moles de cada una de las proteínas problema. Los tratamientos que se realizaron corresponden a la inyección de amortiguador, de SltF y de SltF en presencia de las diferentes proteínas del eje (o bien, tratamientos). Se registraron los datos de absorbancia a 450 nm cada segundo durante un total de 600 segundos (10 minutos). Nuevamente se incluyó como control positivo 0.5 μ g de lisozima de huevo (SIGMA). Los datos de absorbancia obtenidos se

graficaron contra el tiempo y para ello se utilizó el programa Excel. En cada uno de los casos tratamientos, se muestran las gráficas resultantes de obtener el promedio de tres experimentos para cada uno de los puntos.

Se trata de un ensayo cualitativo de actividad enzimática. El sustrato es insoluble, pero gracias al sistema de agitación constante utilizado se puede mantener una mezcla uniforme hasta la adición de una enzima lítica que puede disminuir la turbidez (absorbancia) ya que los productos de la hidrólisis son solubles.

Pruebas estadísticas

Para realizar las pruebas estadísticas se utilizó el programa R (R project), utilizando las pendientes de las tres repeticiones de cada tratamiento se realizó un modelo lineal siendo la pendiente la variable de respuesta y el tratamiento la variable explicativa. Para cada modelo se calculó el ANOVA y si este indicaba diferencias significativas entre los grupos, se estimaron las diferencias entre cada uno de los pares utilizando la función *summary*. Adicionalmente, con el programa R se obtuvieron gráficas de pendientes contra tratamientos que permiten observar si existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Resultados

El C-terminal no conservado de SltF

Una de las características más sobresalientes de la proteína SltF de *R. sphaeroides* es su C-terminal. En este extremo se encuentran 95 aminoácidos no conservados que indudablemente la distinguen del resto de las transglucosilasas líticas. En el laboratorio nos hemos dado a la tarea de estudiar esta región no conservada y hemos logrado establecer que esta región es fundamental para su estabilidad y para su interacción con FlgJ. Actualmente continuamos trabajando para resolver el papel del C-terminal de SltF, ahora involucrando el estudio de las proteínas del eje.

Para poder continuar la caracterización del papel del C-terminal de SltF con las proteínas del eje, se utilizaron las mutantes del C-terminal que se muestran en la **Figura 38**. Se trata de tres mutantes en el C-terminal. La mutante SltF Δ 95 carece de los 95 aminoácidos no conservados del C-terminal, mientras que las mutantes SltF Δ 47 y SltF Δ 48 parten el C-terminal por la mitad (47 y 48 aminoácidos respectivamente).

Figura 38. Representación esquemática de las construcciones mutantes de SltF. Se muestra una representación esquemática de las construcciones mutantes de SltF. La mutante SltF Δ 95 elimina los 95 aminoácidos que componen al C-terminal no conservado, la mutante SltF Δ 48 elimina los 48 aminoácidos más distales del C-terminal y la mutante SltF Δ 47 elimina los 47 aminoácidos más proximales al dominio enzimático. El dominio enzimático se muestra en color negro y el C-terminal en color gris. Escala: 10 aminoácidos. (Modificado García-Ramos, et al. 2018).

Purificación de la proteína SltF silvestre y las mutantes SltF Δ 95, SltF Δ 47 y SltF Δ 48.

Los genes correspondientes para codificar a SltF silvestre, a SltF Δ 95, a SltF Δ 47 y a SltF Δ 48 están clonados sin secuencia señal en el vector de sobreexpresión pQE30, este vector añade un epítipo de 6 histidinas en el N-terminal. Estos vectores fueron transformados en la cepa de *E. coli* M15[pREP4], a partir de la cual son sobreexpresados, inducidos y la proteína es posteriormente purificada.

Las proteínas SltF y SltF Δ 48 se purifican en condiciones nativas, en ambos casos se rompen las células por sonicación, se centrifugan y los sobrenadantes se incuban con resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen). Posteriormente se realizan lavados con concentraciones crecientes de imidazol y las fracciones resultantes se precipitan y analizan por electroforesis en geles desnaturizantes SDS-PAGE (**Figura 39 A y D**).

En ambos casos, la fracción que contiene a la proteína de interés (fracción 100 mM) se dializó contra amortiguador (50 mM Na₂HPO₄) para retirar el imidazol (**Figura 38 A y D**).

Las proteínas SltF Δ 95 y SltF Δ 47 forman cuerpos de inclusión por lo que en ambos casos las células se rompen por sonicación y la solución se centrifuga para recuperar los cuerpos de inclusión en el botón resultante, los cuerpos de inclusión se lavan como se describe en los materiales y métodos con H₂O filtrada, amortiguador PBS y tritón X-100, finalmente se solubilizan con cloruro de guanidina. Los sobrenadantes se incuban con resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen). Posteriormente se realizaron lavados con concentraciones crecientes de imidazol y las fracciones resultantes se precipitaron y se analizaron por electroforesis en geles desnaturizantes SDS-PAGE (**Figura 39 B y C**). En ambos casos, la fracción que contiene a la proteína de interés (fracción 250 mM) se dializó contra amortiguador (50 mM Na₂HPO₄) para renaturalizarla y además retirar el imidazol (**Figura 40 B y C**).

Las bandas correspondientes a las proteínas de interés migran relativamente de acuerdo con las predicciones de masa molecular de cada versión recombinante (SltF:26,365. SltF Δ 95:16,925. SltF Δ 47:22,501. y SltF Δ 48: 23,391).

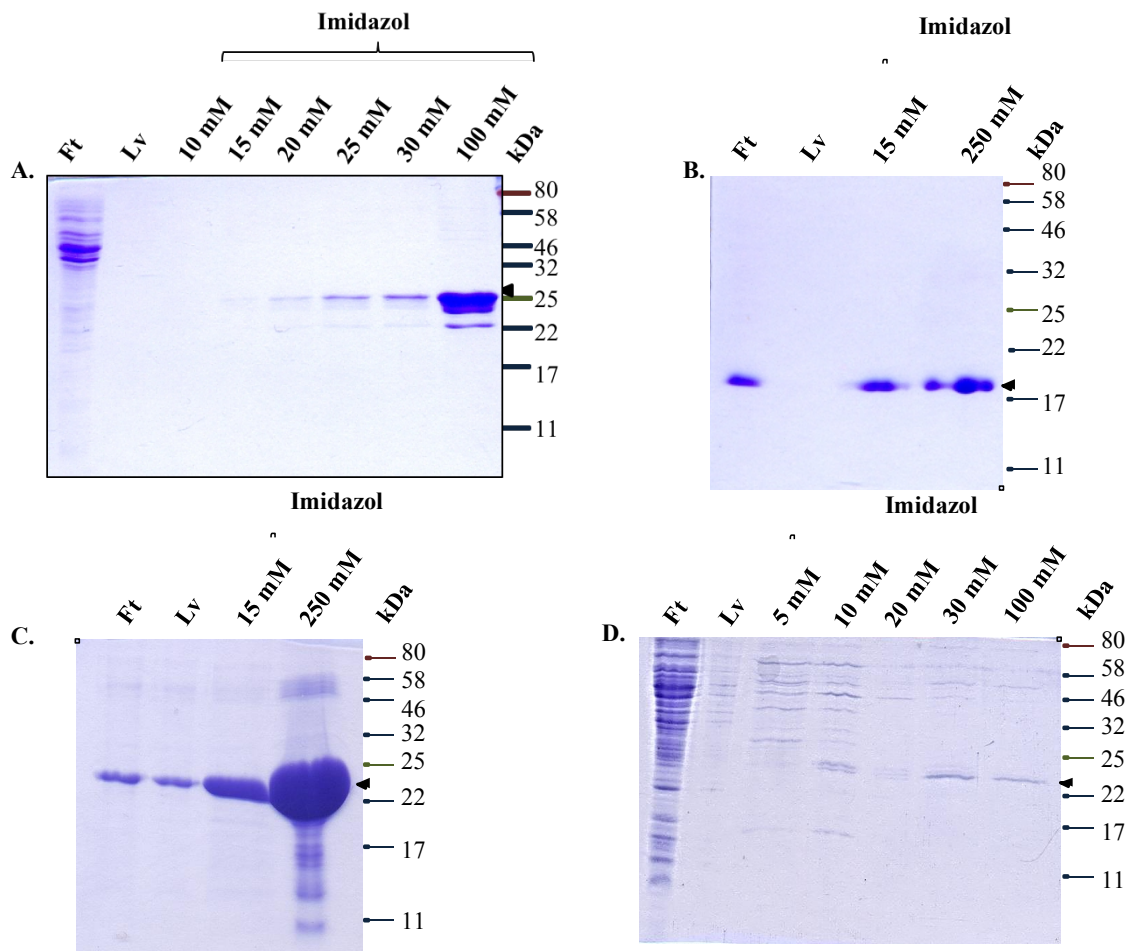


Figura 39. Purificación de proteína SltF silvestre y las mutantes SltF Δ 95, SltF Δ 47 y SltF Δ 48. Se muestran geles SDS-PAGE 17.5% m/v teñidos con azul de Coomassie con las purificaciones realizadas de SltF y sus versiones mutantes. **A.** SltF **B.** SltF Δ 95 **C.** SltF Δ 47 y **D.** SltF Δ 48. Ft: extracto incubado con la resina Ni-NTA. Lv: Lavado con el amortiguador utilizado. 10 a 250 mM corresponde a las concentraciones de imidazol utilizadas para cada una de las fracciones. En cada caso se indica a la proteína de interés con una flecha.

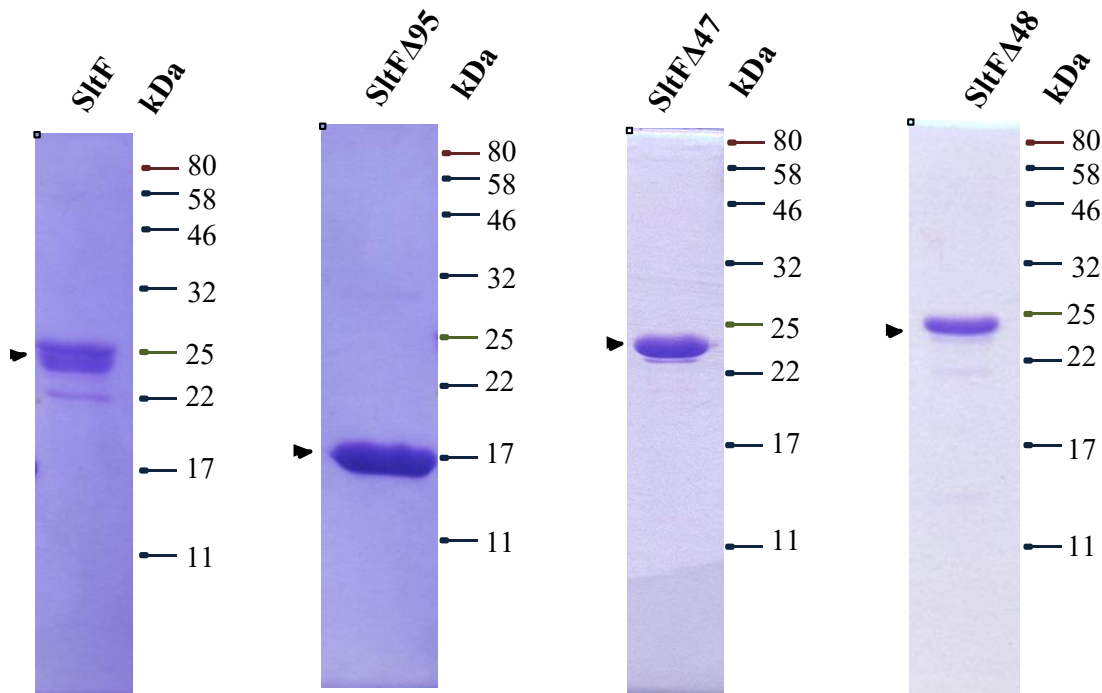


Figura 40. Muestra final de proteína SltF silvestre y las mutantes SltF Δ 95, SltF Δ 47 y SltF Δ 48. Se muestran geles SDS-PAGE 17.5% m/v teñidos con azul de Coomassie con las purificaciones realizadas de SltF y sus versiones mutantes. Se muestra a SltF, SltF Δ 95, SltF Δ 47 y SltF Δ 48. En cada caso se indica la proteína de la banda de interés con una flecha

La proteína SltF es una enzima identificada experimentalmente como una transglucosilasa lítica por lo que es necesario establecer que las mutaciones realizadas no hayan ocasionado la pérdida de su actividad catalítica. Las mutantes perdieron regiones que no pertenecen al dominio catalítico pero que podrían ser relevantes para su plegamiento por lo que es necesario establecer que las enzimas mutantes son capaces de realizar su función, es decir, que mantienen su capacidad lítica. Adicionalmente, es necesario confirmar que en el caso de las proteínas SltF Δ 95 y SltF Δ 47, el proceso de renaturalización haya resultado en un plegamiento exitoso manteniendo su capacidad enzimática. Por lo que para determinar que su actividad no se perdió, se utilizó a las proteínas purificadas para realizar un ensayo de actividad con lisoplatos. Para realizar este ensayo se utilizan cajas Petri que contienen como sustrato células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus*. En este ensayo se puede observar la actividad lítica que tienen las enzimas. Al inicio del ensayo, el lisoplato de actividad se observa turbio, esta característica va a cambiar si se inocula una enzima con actividad lítica pues esta es capaz de generar un halo transparente por la degradación del sustrato. Como se muestra en la **Figura 41**, las enzimas utilizadas mantienen su capacidad para degradar el sustrato y lo hacen de manera similar a la versión silvestre, esto sugiere que las mutantes sí conservan su capacidad enzimática y pueden ser utilizadas para diferentes realizar ensayos de interacción proteína-proteína y determinar las interacciones que estas lleven a cabo con los componentes del eje.

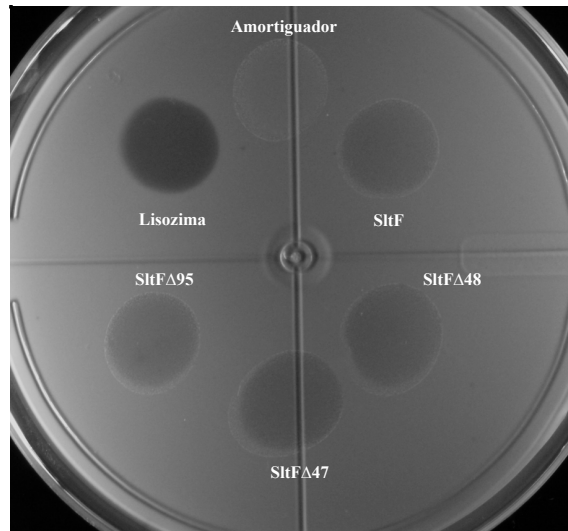


Figura 41. Ensayos de actividad enzimática. Se muestra un lisoplatos de actividad donde células liofilizadas de *M. lysodeikticus* se mezclan con amortiguador (50 mM Na₂HPO₄ pH 6.7) y agar al 1%. Se inoculó 1 µg de lisozima y 15 µl de SlfF, SlfFΔ95, SlfFΔ47 y SlfFΔ48. Se añadió amortiguador para descartar efectos de dilución. Las cajas Petri se incubaron a 30°C durante 16 horas.

Purificación de los componentes del eje flagelar: FliE, FlgB, FlgC, FlgF, FlgG y FlgJ.

Los genes correspondientes para codificar a los componentes del eje se clonaron en los vectores de sobreexpresión pQE30 o pET19-b según se indica, estos vectores añaden un epítoto de 6 o 10 histidinas en el N-terminal respectivamente. Estos vectores fueron transformados en las cepas de *E. coli* M15[pREP4] o BL21(DE3)pLysS, a partir de la cual son sobreexpresados, inducidos y las proteínas son posteriormente purificadas.

Las proteínas FlgF y FlgG se purifican en condiciones nativas, en ambos casos se rompen las células por el método de sonicación con amortiguador (20 mM Tris-HCl), las muestras se centrifugan y los sobrenadantes se incuban con resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen). Posteriormente se realizan lavados con amortiguador y concentraciones crecientes de imidazol, las fracciones resultantes se precipitan y se analizan por electroforesis en geles desnaturizantes SDS-PAGE (**Figura 42 D y E**). En ambos casos, la fracción que contiene a la proteína de interés (fracción 100 mM) se dializó contra amortiguador (20 mM Tris-HCl) para retirar el imidazol.

Las proteínas FliE, FlgB, FlgC y FlgJ forman cuerpos de inclusión y se utilizan un par de estrategias para recuperar a los cuerpos de inclusión. Para recuperar a FliE, a FlgB y a FlgC se rompieron las células por sonicación en amortiguador desnaturizante (20 mM Tris-HCl, 6 M GuHCl), y se incubaron en agitación durante 1 hora a 4°C. Las muestras se incubaron con resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen), y posteriormente se realizaron lavados con amortiguador desnaturizante y concentraciones crecientes de imidazol, las fracciones resultantes se precipitaron y se analizaron por electroforesis en geles desnaturizantes SDS-PAGE (**Figura 42 A, B y C**). La fracción que contiene a la proteína de interés (fracción 100 mM) se dializó contra amortiguador (20 mM Tris-HCl) para renaturalizar y retirar el imidazol.

La proteína FlgJ también forma cuerpos de inclusión, en este caso las células se rompen por sonicación en amortiguador (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl), los cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugación y se incubaron con amortiguadores desnaturizantes. Posteriormente, la muestra se recuperó centrifugando y el sobrenadante se incubó con amortiguador desnaturizante y concentraciones crecientes de imidazol, las fracciones resultantes se precipitaron y se analizaron por electroforesis en geles desnaturizantes SDS-PAGE (**Figura 42 F**). La fracción que contiene a la proteína de interés (fracción 250 mM) se dializó contra amortiguador (50 mM Na₂HPO₄) para renaturalizar y retirar el imidazol.

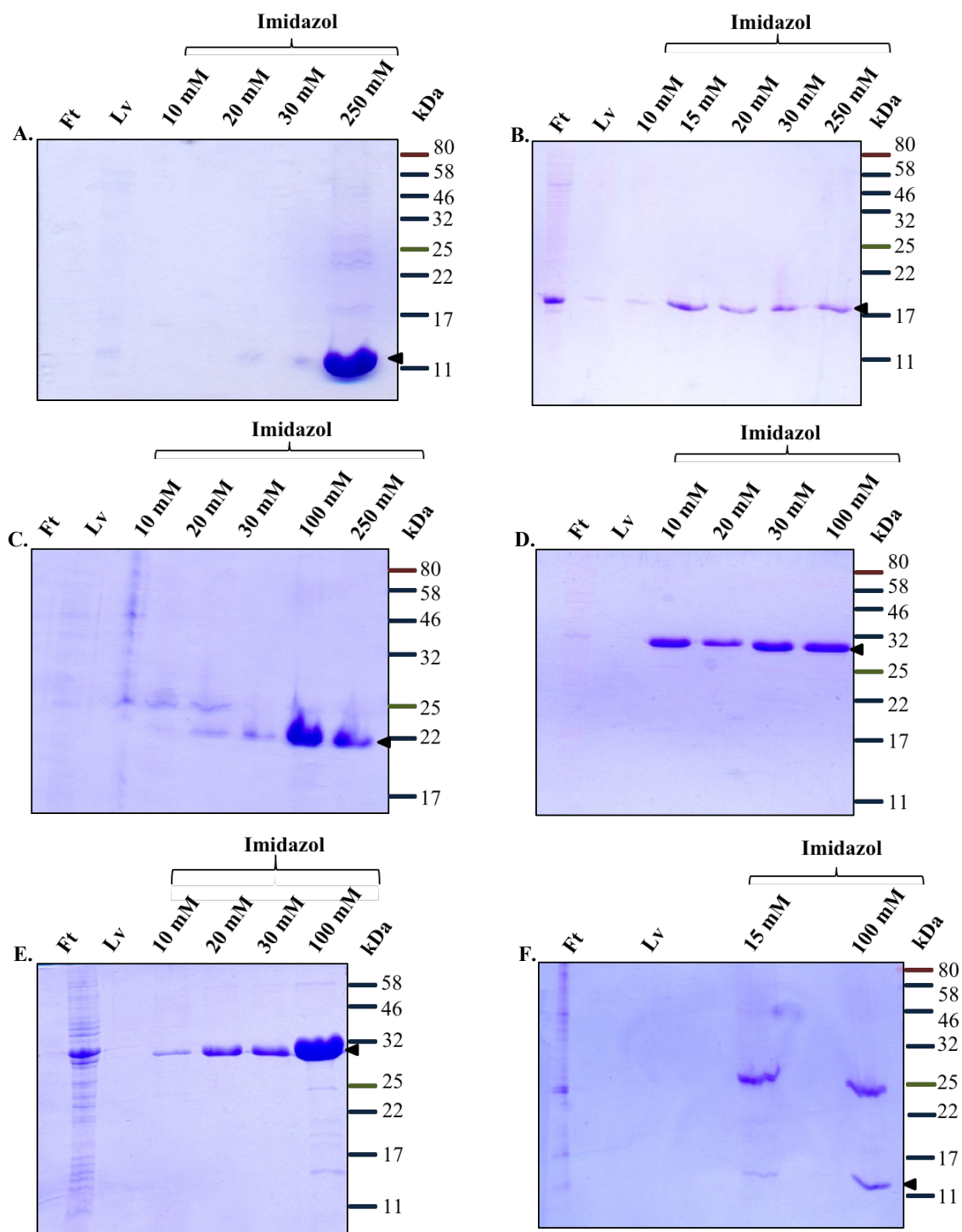


Figura 42. Purificación de las proteínas del eje. Se muestran geles SDS-PAGE 17.5% m/v con las purificaciones realizadas. **A.** FliE **B.** FlgB **C.** FlgC **D.** FlgF **E.** FlgG **F.** FlgJ. En cada caso se indica a la proteína de interés con una flecha. Ft: extracto incubado con la resina. Lv: Lavado con el amortiguador utilizado. 10 a 250 mM corresponde a las concentraciones de imidazol utilizadas para cada una de las fracciones.

A diferencia de SltF, donde se puede confirmar el plegamiento correcto por ensayos de actividad enzimática, los componentes del eje únicamente son estructurales por lo que cuando se estandarizaron los protocolos descritos, se confirmó su plegamiento después de renaturalizarlas evaluando el contenido de estructura secundaria, dicha evaluación demostró que los valores predichos corresponden al promedio (Osorio-Valeriano, et al. 2016).

En la **Figura 43** se muestran las fracciones de proteína obtenidas después del proceso de diálisis. En el caso de SltF, la proteína contaminante de 25 kDa se precipita durante el proceso de diálisis.

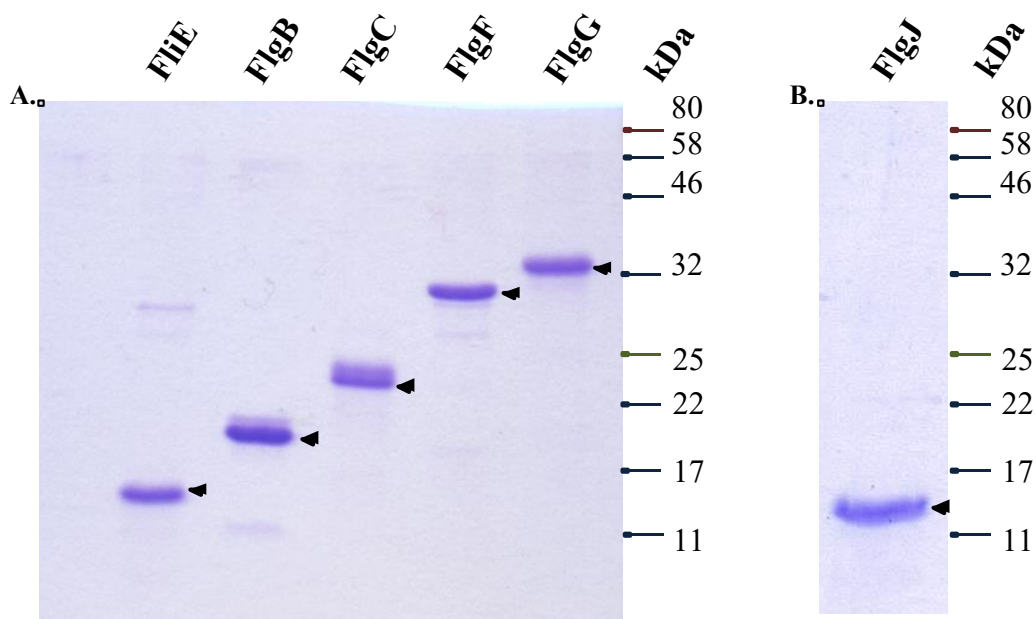


Figura 43. Muestra final de proteína. Se muestran geles SDS-PAGE 17.5% m/v teñidos con azul de Coomassie con las purificaciones realizadas de los componentes estructurales del eje flagelar. **A.** FliE, FlgB, FlgC, FlgF y FlgG. **B.** FlgJ.

Interacción física entre los componentes del eje flagelar y SltF.

Con la intención de determinar la capacidad de SltF y las mutantes del C-terminal para interactuar con los componentes del eje, se realizaron ensayos de inmunoréplica por afinidad. Estos ensayos se realizaron según el protocolo estándar (Hall, 2004). En geles SDS-PAGE se cargaron 5 μ moles de cada una de las proteínas purificadas obtenidas, estos geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa, de esta manera las proteínas del eje se inmovilizan en la matriz que representa la membrana de nitrocelulosa, posteriormente se añade de forma soluble a la proteína de interés, en este caso SltF silvestre y las mutantes, y la proteína se incuba sobre la membrana permitiéndole reconocer e interactuar con una o más de las proteínas inmóviles en la matriz de la membrana. Por último, la membrana se incuba con un anticuerpo que reconoce específicamente a la proteína soluble y la membrana se revela como una inmunoréplica tipo *Western blot*.

Los resultados obtenidos se observan en la **Figura 44**. En el panel **A**, se utilizó SltF silvestre como la proteína soluble que se incubó sobre la membrana y se observa que esta es claramente capaz de reconocer a todos los componentes del eje. Sin embargo, cuando la proteína soluble es SltF Δ 95 (la mutante carente del C-terminal), esta es incapaz de reconocer a los componentes del eje sugiriendo que esta región es relevante para la interacción de SltF con las proteínas del eje (panel **B**). Interesantemente, las mutantes SltF Δ 47 y SltF Δ 48 (panel **C** y **D**) mostraron ser igualmente capaces de reconocer a los componentes proximales del eje FliE y FlgB, pero incapaces de reconocer a FlgC. SltF Δ 47 puede reconocer a FlgF mientras que SltF Δ 48 solamente reconoce a FlgG. Entonces, FlgF y FlgG son los componentes que marcan la diferencia entre la mutante SltF Δ 47 y la mutante SltF Δ 48 en este ensayo de interacción.

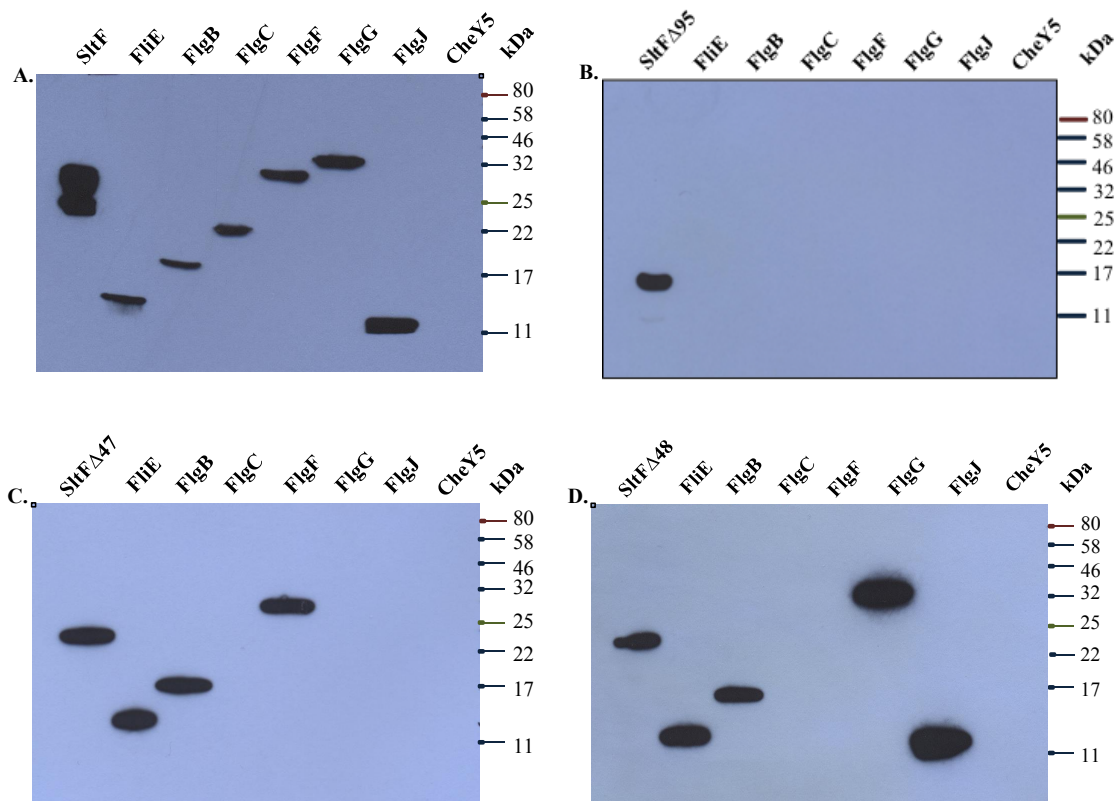


Figura 44. Interacción de SltF silvestre y las mutantes SltFΔ95, SltFΔ47 y SltFΔ48 con las proteínas del eje. Se realizaron ensayos de interacción proteína-proteína por inmunoréplica de afinidad. Las proteínas inmóviles en la membrana se encuentran a una concentración de 5 μ moles cada una. Las proteínas solubles que se probaron fueron: **A.** SltF a una concentración de 3 μ g/ml. **B.** SltFΔ95 a una concentración de 3 μ g/ml. **C.** SltFΔ47 a una concentración de 3 μ g/ml. **D.** SltFΔ48 a una concentración de 3 μ g/ml. En todos los casos se utilizó el anticuerpo policlonal anti-SltF (1:10,000) y un anticuerpo secundario (1:10,000).

Estos resultados permiten sugerir por primera vez que SltF sí interacciona con todos los componentes del eje, y que el C-terminal de SltF sí es relevante para reconocer a las proteínas estructurales del eje y no solamente a FlgJ. Interesantemente, parece que los dos dominios distinguibles del C-terminal también juegan un papel relevante en el reconocimiento de las proteínas del eje. Las mutantes SltFΔ47 y SltFΔ48 se diferencian en su capacidad para interactuar con FlgF y FlgG.

Adicionalmente, se corrieron geles SDS-PAGE idénticos a los que se muestran en la **Figura 44**, pero se les dio un tratamiento distinto. En el panel **A** se muestra el *Western blot* que corrobora que el anticuerpo policlonal utilizado, anti-SltF, no reconoce de manera inespecífica a ninguna de las proteínas utilizadas. En el panel **B** se observa un control de carga, en este se muestra uno de los geles teñido con plata demostrando que las proteínas utilizadas se encuentran en proporciones similares descartando que las interacciones observadas se deban a diferencias en las concentraciones utilizadas (**Figura 45**).

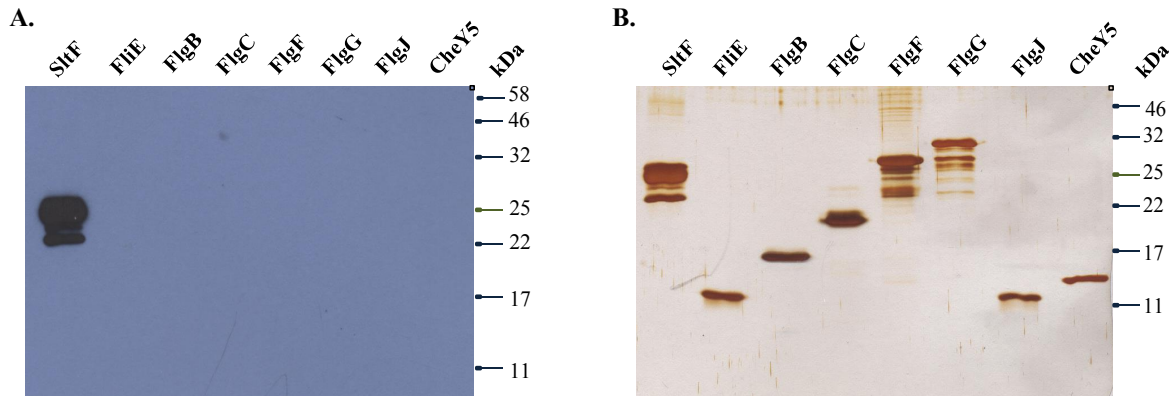


Figura 45. **A.** Inmunoréplica tipo *Western blot*. Se utilizó el anticuerpo policlonal anti-SltF (1:10,000) y un anticuerpo secundario (1:10,000). **B.** Control de carga. Gel SDS-PAGE 17.5% p/v teñido con plata.

Los resultados obtenidos que se muestran en la **Figura 44** sugieren la importancia del C-terminal de SltF en la interacción con las proteínas del eje, por lo que se prosiguió a realizar ensayos que confirmen estos resultados. Se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación, esta aproximación nos permite valorar la capacidad que tienen las diferentes proteínas del eje para interactuar con SltF silvestre y con las mutantes del C-terminal. Para ello se prepararon tubos *Eppendorf* que contienen perlas de sefarosa acopladas a la proteína A (utilizada para el reconocimiento de anticuerpos), estas se incubaron con gamma globulinas anti cada una de las proteínas del eje (FliE, FlgB, FlgC, FlgF y FlgG). Cada uno de los tubos se preparó con la proteína del eje de interés y SltF silvestre y sus versiones mutantes. Durante la realización de este ensayo se probó la capacidad de interacción de cada una de las proteínas del eje frente a SltF y a las mutantes del C-terminal. Los resultados se analizaron por *Western Blot* y se muestran en la **Figura 46**.

Los resultados que se presentan en la **Figura 46** parecen confirmar los datos obtenidos en los ensayos de inmunoréplica de afinidad. En el caso de las proteínas FliE y FlgB se observa que ambas son capaces de reconocer a SltF silvestre y a las mutantes, SltF Δ 47 y SltF Δ 48. La mutante SltF Δ 95 no puede ser reconocida por FliE ni por FlgB. (Panel **A** y **B**). La proteína FlgF (Panel **C**) es capaz de reconocer a SltF silvestre y a la mutante SltF Δ 47, observando una clara disminución en la banda correspondiente a SltF Δ 48 sugiriendo que esta interacción se ve afectada, y esto podría explicar porque esta interacción no se observa en los ensayos de inmunoréplica de afinidad. En el caso de FlgC, se confirma lo esperado, esta proteína solamente es capaz de reconocer a la versión silvestre de SltF (Panel **D**). Finalmente, en el caso de FlgG se observa que este componente es capaz de interactuar con SltF silvestre y con la mutante SltF Δ 48 (Panel **E**).

Figura 46. Interacción de SltF silvestre y las mutantes SltF Δ 95, SltF Δ 47 y SltF Δ 48 con las proteínas del eje. Se realizaron ensayos de interacción proteína-proteína con las proteínas estructurales del eje y las diferentes construcciones de SltF. Se realizó el ensayo de coimmunoprecipitación con las proteínas del eje en presencia/ausencia de las proteínas SltF silvestre y sus versiones mutantes: SltF Δ 95, SltF Δ 47 y SltF Δ 48. En tubos *Eppendorf* se añadieron perlas de sefarosa acopladas a la proteína A, estas se incubaron con anti gamma globulinas: **A.** FliE, **B.** FlgB, **C.** FlgC, **D.** FlgF y **E.** FlgG de manera que todas las proteínas del eje son reconocidas por su respectivo anticuerpo y sí se observa una señal correspondiente a las versiones de SltF, se debe a que estas pueden interaccionar con los diferentes componentes del eje. El análisis se realizó por inmunoréplica tipo *Western blot* con anti-His 1:10,000 dado que todas las proteínas utilizadas cuentan con un epítotope de histidinas.

Ensayos de la actividad enzimática de SltF en presencia de los componentes del eje flagelar.

SltF es una enzima lítica que juega un papel relevante en la biogénesis del flagelo pues le permite a la estructura naciente cruzar la pared de peptidoglicano. En el presente trabajo hemos determinado que SltF no solamente interacciona con FlgJ, sino que también lo hace con todos los componentes estructurales del eje. Indudablemente surge la pregunta sobre la relación que existe entre estos componentes sobre la actividad de SltF.

Para determinar si los componentes del eje afectan la actividad enzimática de SltF se realizaron ensayos de actividad lítica en lisoplatos (**Figura 45**). Como se mencionó anteriormente, en este ensayo se utilizan cajas Petri que contienen como sustrato células liofilizadas de *M. lysodeikticus*. Este ensayo se sustenta en que el peptidoglicano es un polímero insoluble de gran tamaño, si se le añade una enzima lítica capaz de romperlo este se va a descomponer en pedazos pequeños que sí son solubles. Al inicio del ensayo, cada uno de los lisoplatos se observa turbio por la insolubilidad del sustrato que se encuentra fijado en la agarosa.

En cada uno de los lisoplatos analizados, se incluye a la proteína lisozima como control positivo, en cada caso se observa el halo de actividad que la enzima es capaz de generar al estar en contacto con el sustrato. Se incluye a la proteína SltF en presencia de FlgJ, SltF en presencia de cada una de las proteínas del eje y SltF en presencia de FlgJ y de cada una de las proteínas del eje. Cada una de las proteínas se añadió en cantidades equimolares y en el mismo volumen y las cajas Petri se incubaron a 30°C durante 16 horas. El resultado de estos ensayos se muestra en la **Figura 47**.

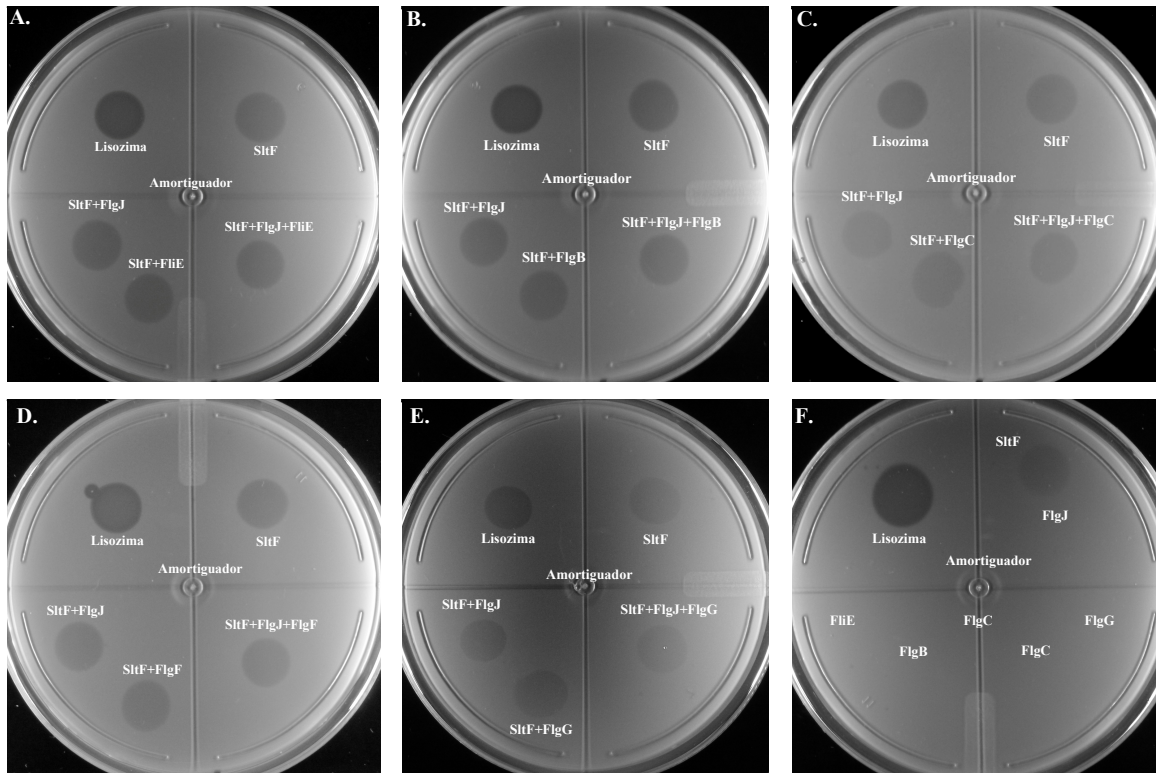


Figura 47. Ensayos de actividad enzimática. Lisoplatos de actividad que contienen extracto de células liofilizadas de *M. lysodeikticus* mezclado con amortiguador (50 mM Na_2HPO_4 pH 6.75) y agar al 1%. En cada caso se inoculó 0.1 μg de lisozima. En cada uno de los paneles se muestra el resultado de inocular a SlfF en presencia de FlgJ, inocular a SlfF en presencia de FlgJ y de cada una de las proteínas del eje y el resultado de inocular a SlfF en presencia de los diferentes componentes del eje. Adicionalmente se presenta en el panel F el resultado de inocular a cada una de las proteínas del eje descartando que estas puedan tener actividad lítica inespecífica. Las cajas Petri se incubaron a 30°C durante 16 horas.

Dado que en este ensayo no parece haber ningún resultado evidente, no se observa ninguna señal de activación o de inhibición al añadir los componentes del eje. Esta aproximación experimental es un ensayo cualitativo de actividad enzimática que no permite apreciar si existen diferencias en los niveles de actividad enzimática de SlfF al incluir a los componentes del eje.

Se prosiguió a realizar ensayos turbidométricos que consisten en realizar un análisis espectrofotométrico que permite observar la actividad lítica de las proteínas al registrar una caída en la absorbancia. Esto se debe a que ocurre una disminución de la turbidez, es decir, en la absorbancia y esto se debe a que los productos de la reacción son solubles. En la **Figura 48** se muestra la adición de amortiguador y de lisozima. En todos los experimentos que se realizaron se adicionó el mismo volumen para considerar en cada caso el factor de dilución.

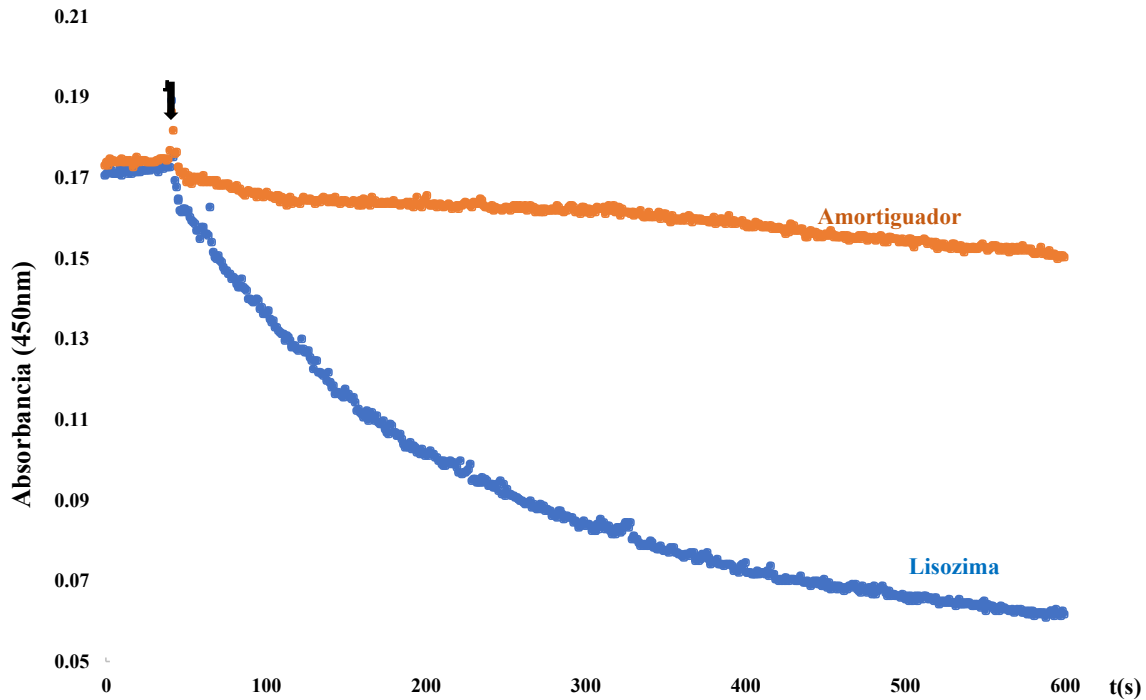


Figura 48. Ensayos turbidométricos de actividad lítica. Se realizó el ensayo de actividad en presencia de lisozima y esta se muestra en color azul, también se realizó en presencia de amortiguador y esta se muestra en color naranja. Se indica con una flecha el momento en que se realizó la adición de las muestras. Absorbancia: 450nm.

Se realizaron las mediciones de la actividad enzimática de SltF en presencia de los componentes estructurales del eje y de FlgJ. En cada uno de los casos presentados, las mediciones se realizaron por triplicado, se obtuvo un promedio de cada uno de los puntos y el resultado se muestra en las gráficas (**Figuras 49-54**). Con la intención de mantener claridad, cada una de las gráficas alude a cada una de las proteínas del eje por lo que hay un total de 6 gráficas donde se muestra a SltF en presencia de FlgJ y en presencia de cada una de las proteínas estructurales del eje y de FlgJ. Las proteínas se mezclan al inicio del ensayo por lo que se incuban durante aproximadamente 1 minuto que es suficiente para observar un efecto sobre la actividad de SltF.

Para realizar estos ensayos se consideró que las proteínas estuvieran presentes a concentraciones equimolares.

Adicionalmente y con la finalidad de determinar las diferencias estadísticamente significativas que existen entre cada una de las pendientes obtenidas se consideró un intervalo de tiempo que busca descartar el efecto que ocasiona la inyección (indicada con una flecha) en cada uno de los casos por lo que para el análisis estadístico no se considera todo el tiempo registrado. Como se mencionó, en las gráficas que se presentan a continuación se muestran los promedios de las repeticiones, pero para las pruebas estadísticas se consideró la pendiente de cada una de las repeticiones realizadas, se obtuvo la pendiente de cada uno de los tratamientos y posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si las diferencias que se observan son estadísticamente significativas.

En la **Figura 49** se muestra el ensayo turbidométrico que corresponde al registro de actividad enzimática de SltF en presencia de FlgJ y por si sola, además del amortiguador utilizado. SltF es capaz de disminuir la turbidez y esto se observa en una caída de la absorbancia, esto no ocurre en presencia de FlgJ, por lo que esto parece sugerir que FlgJ es capaz de inhibir la actividad enzimática de SltF.

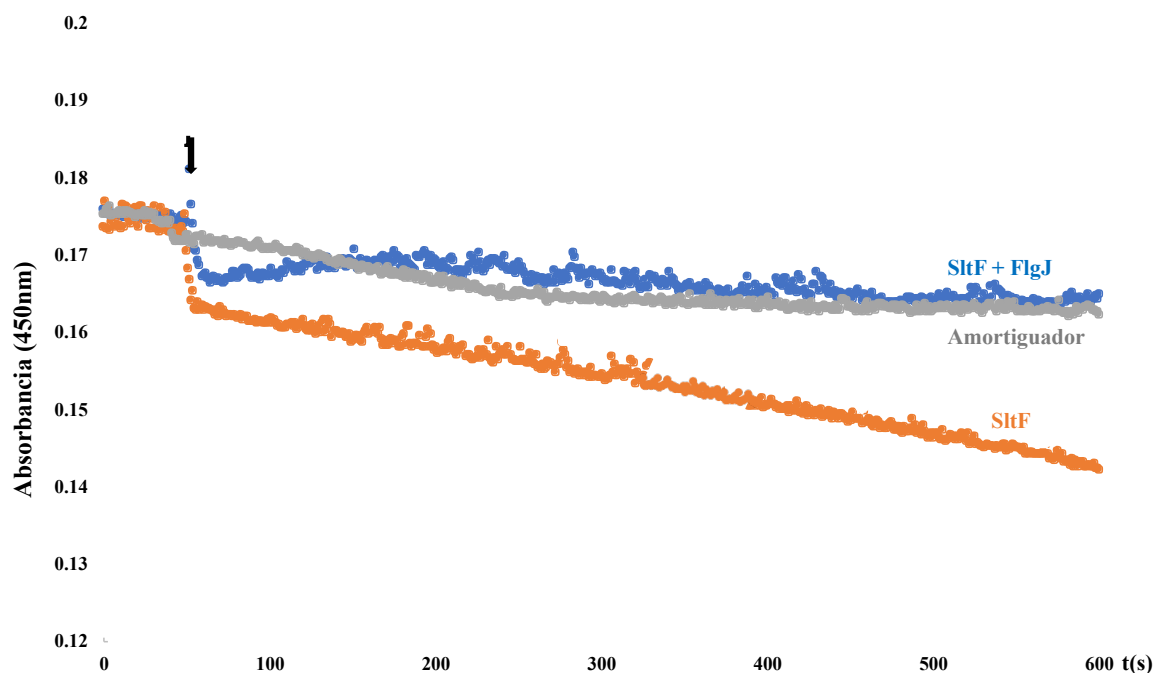


Figura 49. Ensayos turbidométricos de actividad lítica: SltF y SltF+FlgJ. Se realizó el ensayo de actividad en presencia de SltF y SltF+ FlgJ. Se indica con una flecha el momento en que se realizó la adición de las muestras. Absorbancia: 450nm.

Para comprobar esto, se realizó un análisis de varianza calculado para el modelo lineal según los datos obtenidos y que se esquematizan en la **Figura 49**, el modelo sí indica diferencias significativas al comparar todos los tratamientos (SltF, SltF+FlgJ y amortiguador) ($p=0$), posteriormente, al realizar el análisis de varianza considerando a SltF y a SltF+FlgJ, sin incluir a el amortiguador, se vuelve a obtener una diferencia significativa ($p=8 \times 10^{-5}$) lo cual demuestra que FlgJ sí tienen un cambio estadísticamente significativo sobre la actividad de SltF.

Una vez establecido que el sistema funciona y que nos permite registrar la actividad enzimática de SltF y los cambios en ella, se prosiguió a realizar las medidas de absorbancia en presencia de los componentes estructurales del eje y a determinar el papel que tienen estos sobre la actividad enzimática de SltF.

Se realizó el ensayo de actividad en presencia del componente más proximal del eje: FliE, y se realizaron los registros correspondientes. El promedio de cada repetición se registra en los

puntos graficados en la **Figura 50**. En este ensayo se observa que FliE no tiene ningún efecto sobre la actividad de SltF, sin embargo FliE es capaz de bloquear la inhibición que ejerce FlgJ sobre la actividad enzimática de SltF.

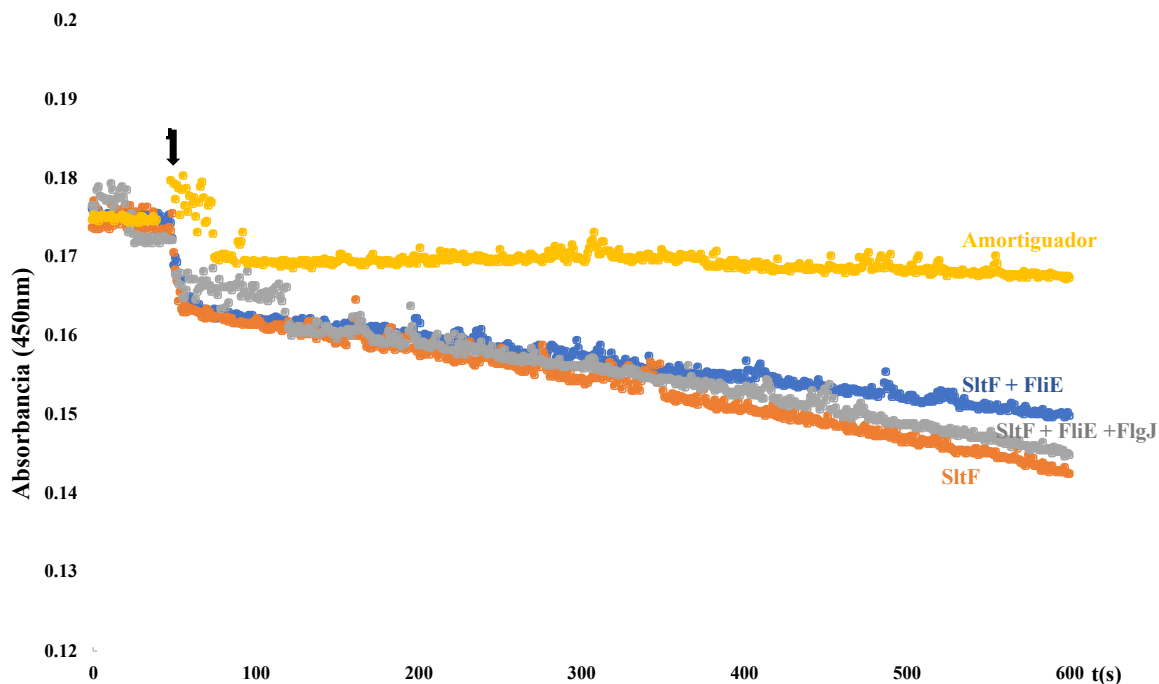


Figura 50. Ensayos turbidométricos de actividad lítica: SltF, SltF+FliE y SltF+FliE+FlgJ. Se realizó el ensayo de actividad en presencia de SltF, SltF+ FliE y SltF+FliE+FlgJ. Todas las proteínas se encuentran en concentraciones equimolares y en el mismo volumen, se indica con una flecha el momento en que se realizó la adición de las muestras. Absorbancia: 450nm.

El análisis de varianza (ANOVA) realizado para el tratamiento de SltF con la proteína más proximal del eje (FliE) y FlgJ sugiere que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($p=0.6$), y apoya la idea de que FliE es capaz bloquear la inhibición que ocasiona FlgJ.

A continuación, se realizaron los ensayos turbidométricos en presencia del siguiente componente: FlgB. En esta serie de ensayos se observa que la actividad enzimática de SltF en presencia de FlgB se activa y nuevamente, la inhibición ocasionada por FlgJ ya no se puede observar (**Figura 51**).

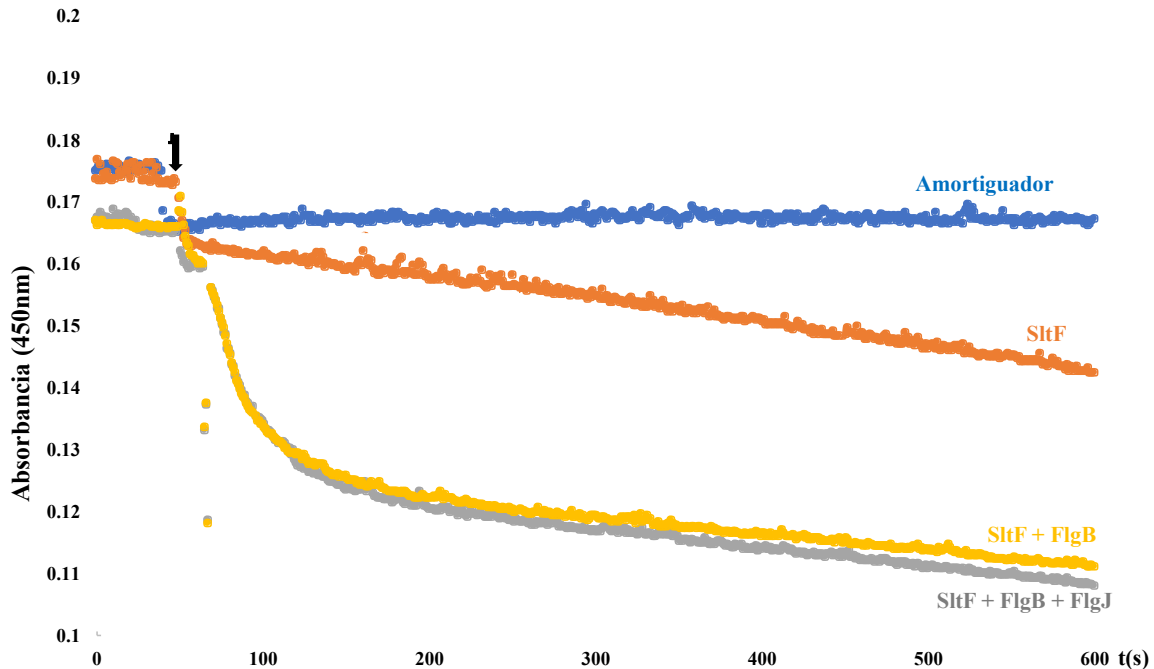


Figura 51. Ensayos turbidométricos de actividad lítica: SltF, SltF+FlgB y SltF+FlgB+FlgJ. Se realizó el ensayo de actividad en presencia de SltF, SltF+ FlgB y SltF+FlgB+FlgJ. Todas las proteínas se encuentran en concentraciones equimolares y en el mismo volumen, se indica con una flecha el momento en que se realizó la adición de las muestras. Absorbancia: 450nm.

A continuación realizó el análisis de varianza (ANOVA) correspondiente que nos permite concluir que efectivamente, esta activación sí es estadísticamente significativa ($p=0.014$) y que además permite enmascarar la inhibición que ocasiona la presencia de FlgJ. Por lo tanto, se demuestra que FlgB activa a SltF y dicha activación es estadísticamente significativa.

Finalmente, se realizaron los ensayos pertinentes con el resto de los componentes estructurales del eje: FlgF (**Figura 52**), FlgC (**Figura 53**) y FlgG (**Figura 54**) incluyendo en cada caso a FlgJ.

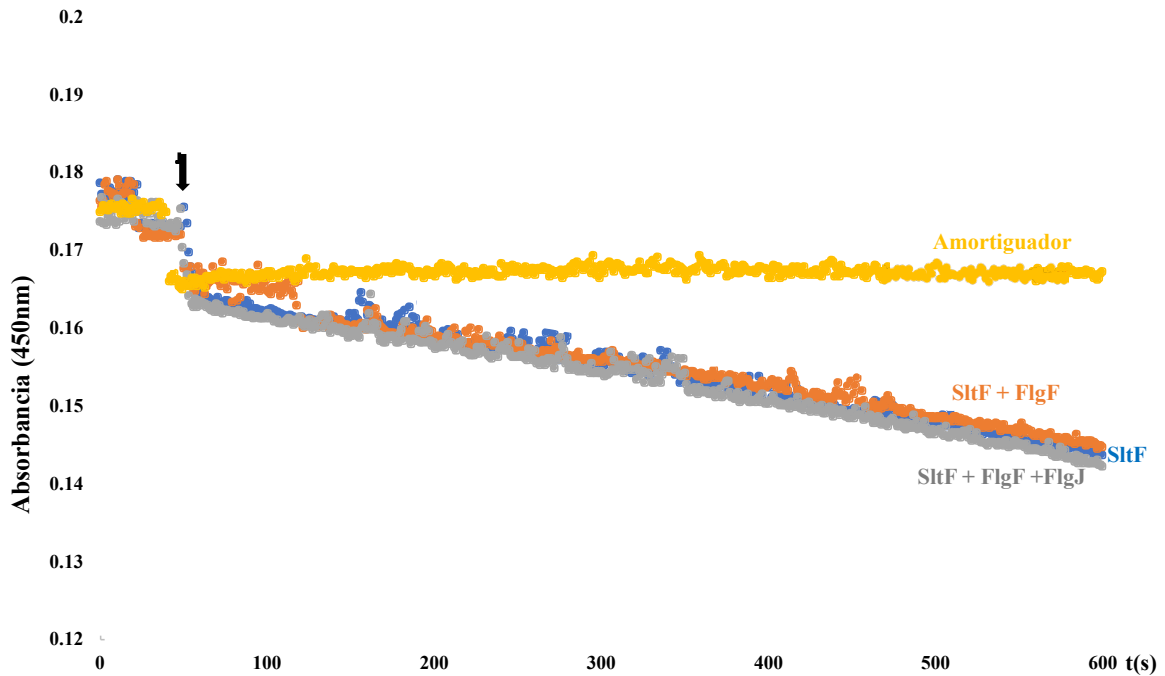


Figura 52. Ensayos turbidométricos de actividad lítica: SltF, SltF+FlgF y SltF+FlgF+FlgJ. Se realizó el ensayo de actividad en presencia de SltF, SltF+ FlgF y SltF+FlgF+FlgJ. Todas las proteínas se encuentran en concentraciones equimolares y en el mismo volumen, se indica con una flecha el momento en que se realizó la adición de las muestras. Absorbancia: 450nm.

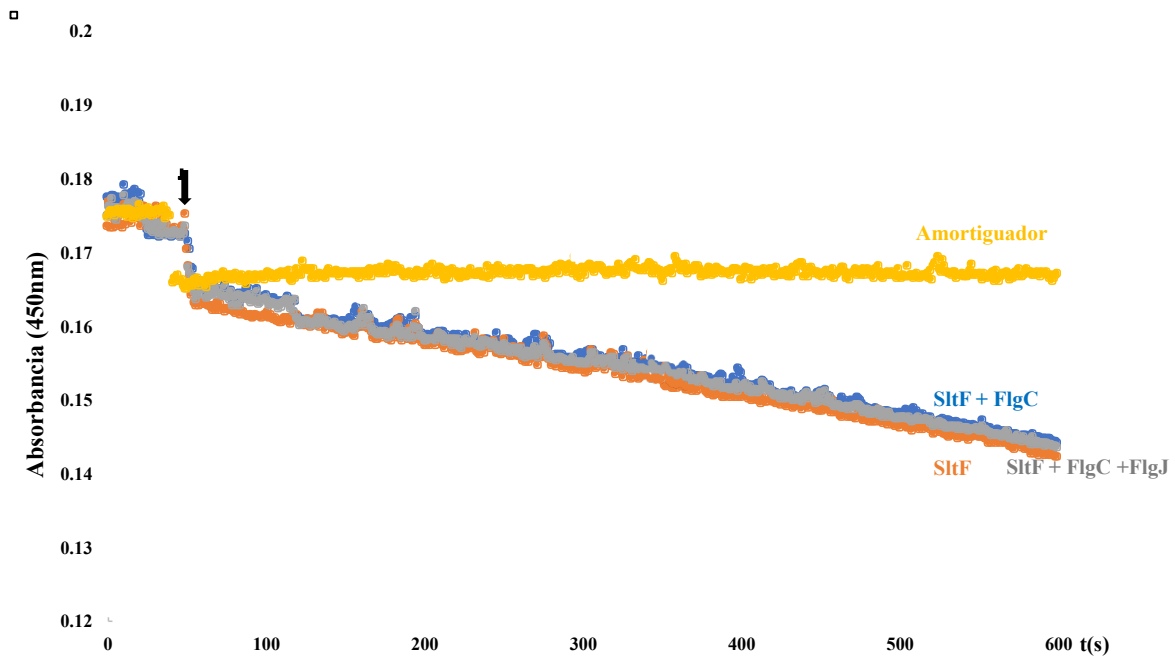


Figura 53. Ensayos turbidométricos de actividad lítica: SltF, SltF+FlgC y SltF+FlgC+FlgJ. Se realizó el ensayo de actividad en presencia de SltF, SltF+ FlgC y SltF+FlgC+FlgJ. Todas las proteínas se encuentran en concentraciones equimolares y en el mismo volumen, se indica con una flecha el momento en que se realizó la adición de las muestras. Absorbancia: 450nm.

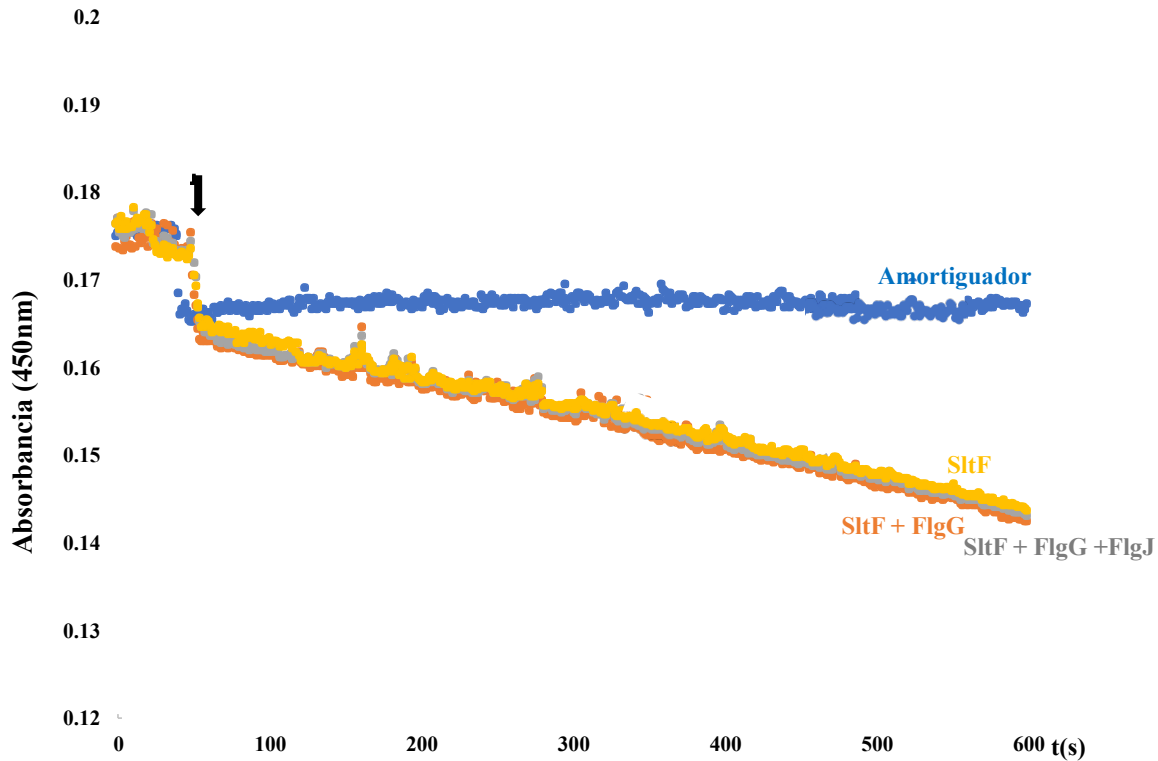


Figura 54. Ensayos turbidométricos de actividad lítica: SltF, SltF+FlgG y SltF+FlgG+FlgJ. Se realizó el ensayo de actividad en presencia de SltF, SltF+ FlgG y SltF+FlgG+FlgJ. Todas las proteínas se encuentran en concentraciones equimolares y en el mismo volumen, se indica con una flecha el momento en que se realizó la adición de las muestras. Absorbancia: 450nm.

Ninguno de estos tres componentes estructurales del eje (FlgF, FlgC y FlgG) parece tener efecto sobre la actividad enzimática de SltF, sin embargo las tres proteínas son capaces de bloquear el efecto inhibitorio que ocasiona la presencia de FlgJ (**Figuras 52-54**). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con la finalidad de confirmar esta conclusión, se realizaron los cálculos pertinentes en cada uno de los casos, FlgC ($p=0.7$), FlgF ($p=0.35$) y FlgG ($p=0.13$) y no se observan diferencias significativas entre los tratamientos probados.

Las gráficas obtenidas y los análisis de varianza realizados sugieren que las proteínas FlgJ y FlgB son los componentes del eje que ejercen un papel sobre la actividad enzimática de SltF.

Los resultados aquí presentados proponen que SltF interacciona con los seis componentes flagelares: FliE, FlgB, FlgC, FlgF, FlgG y FlgJ, esto podría ser relevante para asegurar que SltF sea efectivamente localizada en su sitio de acción. Parece ser que cuando FlgJ interacciona con SltF se inhibe, pero este efecto se anula en presencia de los componentes estructurales del eje. Esto podría sugerir un sistema de regulación en el que si el eje no se está ensamblando la enzima lítica estaría inhibida. En este punto es evidente que surge la pregunta de las interacciones que existen entre los componentes del eje, FlgJ y SltF, ya se ha demostrado que SltF reconoce a todas estas proteínas, que al menos dos de ellas tienen

efectos relevantes sobre su actividad enzimática y que sí existe una dinámica en la que los tres componentes se encontrarían, esto llevó a cuestionar la dinámica de secreción y de asociación de los componentes, por esta razón resultó de interés explorar la manera en que se asocian la enzima SltF, FlgJ y la proteína más proximal del eje: FliE.

Con el propósito de conocer la dinámica de interacción que ocurre en la base del eje nascente, se prosiguió a realizar un ensayo de coimmunoprecipitación en el que se pretende determinar si SltF reconoce mejor a FlgJ que a FliE o viceversa. El resultado del ensayo de coimmunoprecipitación se muestra en la **Figura 55**, se confirma que SltF es capaz de interactuar con FliE y con FlgJ, y se observa que, en presencia de ambos componentes, SltF tiene una clara preferencia por FliE que por FlgJ.

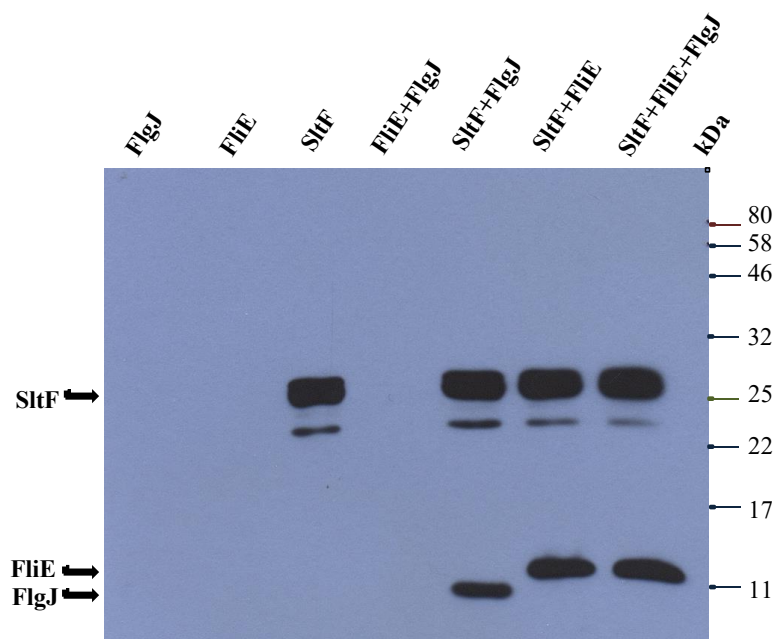


Figura 55. Ensayo de coimmunoprecipitación. Ensayo de coimmunoprecipitación de SltF silvestre en presencia/ausencia de las proteínas FliE y FlgJ. Gel SDS-PAGE 15% p/v. En tubos *eppendorf* se añadieron perlas de sefarosa acopladas a la proteína A, estas se incubaron con anti gamma globulinas: anti-SltF de manera que SltF es reconocida por este anticuerpo y sí se observa una señal correspondiente a FliE y/o FlgJ, se debe a que estas pueden interactuar con SltF. El análisis se realizó por inmunoréplica tipo *Western blot* con anti-His 1:10,000.

Discusión

Los ejes flagelares mejor estudiados y mejor caracterizados pertenecen al modelo clásico de *S. enterica* y a *Borrelia burgdorferi*, ambos sistemas son diferentes al eje de *R. sphaeroides* ya que en ambas se sugiere un orden de armado del eje distinto, además de que *S. enterica* presenta una FlgJ bidominio y en *B. burgdorferi* el sistema flagelar es periplásmico (Saijo-Hamano, et al. 2004. Zhang, et al. 2012). En nuestro modelo: *R. sphaeroides*, SltF ha sido ampliamente estudiada y analizar su C-terminal ha sido bastante informativo pues nos ha permitido determinar que esta región de la proteína es fundamental para interactuar con FlgJ y determinar que esta interacción sea únicamente transitoria (de la Mora, et al. 2012. García-Ramos, et al. 2018).

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que SltF es capaz de interactuar con todos los componentes estructurales del eje (**Figuras 44 y 46**). Solamente dos de estas interacciones ya se habían reportado anteriormente (Herlihey, et al. 2016). En dicho trabajo se sugiere que SltF solamente puede interactuar con FlgB y con FlgF. Nuestros resultados confirman estas interacciones y además complementan a ese trabajo concluyendo que el resto de los componentes del eje también pueden ser reconocidos por SltF, es posible que la diferencia observada se deba a condiciones experimentales, sin embargo, los resultados aquí presentados incluyen a los controles apropiados fortaleciendo nuestra conclusión.

El C-terminal de SltF resalta, pues gracias a los ensayos de interacción realizados con las mutantes del C-terminal fue posible determinar que este dominio no solamente es necesario para reconocer a FlgJ, lo cual ya se había reportado y se confirma claramente en este trabajo (de la Mora, et al. 2012; García-Ramos, et al. 2018), sino que también es crucial para reconocer a todos los componentes estructurales del eje (**Figuras 44 y 46**). Se han reportado un gran número de transglucosilasas líticas que suelen tener, además del dominio enzimático, un dominio relevante para su función. Este segundo dominio puede estar involucrado en la asociación al peptidoglicano o con algún otro componente proteico (Dik, et al. 2017). El C-terminal se perfila sin lugar a duda como un dominio importante para el funcionamiento de SltF. Nuestros resultados sugieren que este dominio no es necesario para la actividad lítica de esta enzima pero que sí lo es para que esta pueda ser reconocida por los componentes flagelares que la van a dirigir con precisión a su sitio de acción. SltF interactúa con al menos seis componentes flagelares según hemos sido capaces de observar, y esto podría sugerir que el sistema se ve beneficiado por la localización precisa de la enzima, además de que este nivel de control podría evitar que esta enzima genere huecos de manera incontrolable y no regulada. Una enzima de este tipo puede ocasionar daños irreparables a la viabilidad de la célula por lo que no sorprende identificar mecanismos que regulen su actividad o su degradación (Dik, et al. 2017; Byun, et al. 2018).

Experimental y funcionalmente, el C-terminal de 95 aminoácidos de SltF se ha dividido en dos partes de 47 y 48 aminoácidos cada una, la primera siendo la más proximal al dominio enzimático. Gracias a la realización de mutantes denominadas SltF Δ 47 y SltF Δ 48, se ha logrado determinar el papel de ambas regiones. La mutante SltF Δ 47 alberga la región determinante para la interacción con FlgJ mientras que la mutante SltF Δ 48 es necesaria para asegurar que esta interacción sea únicamente transitoria. Interesantemente, estas mutantes no se comportan así en presencia de los componentes estructurales del eje, pues ambas son

capaces de interactuar con los componentes más proximales del eje (FliE y FlgB), ninguna es capaz de reconocer a FlgC. FlgF y el componente más distal, FlgG, parecen diferenciarlas (**Figuras 44 y 46**). La explicación que se propone para este fenómeno sugiere que el C-terminal podría permitir la existencia de mutaciones sin perder su capacidad para reconocer a los componentes primigenios del eje, especialmente a FlgB quien parece tener un papel relevante en la activación de la enzima.

Se sabe que las transglicosilasas líticas de los sistemas de secreción están reguladas enzimática y espacialmente, por lo que la activación y el acomodo de las enzimas al sitio de acción está regulado por componentes estructurales del complejo macromolecular al que pertenecen (Satin, *et al.* 2016). Esta propuesta apoya nuestros resultados, ya que además de observar la interacción con todos los componentes del eje flagelar, también observamos el papel que juegan estos sobre la actividad enzimática de SltF y es que aún cuando todos los componentes del eje participan en la localización de SltF, solamente dos de ellos tienen un papel sobre la actividad enzimática de SltF. Según se logró concluir, la actividad enzimática de SltF sí se ve afectada por su interacción con los componentes flagelares. Esta propuesta ya se había realizado y se determinó que FlgF inhibía la actividad de la enzima mientras que FlgB era capaz de activarla (Herlihey, *et al.* 2016). Aunque este trabajo es muy interesante no considera un concepto fundamental: a FlgJ. Resulta inconcebible hablar del eje en construcción sin considerar a la proteína de andamio FlgJ.

Adicionalmente, existe un antecedente que abre el panorama para considerar a más componentes del eje. El inyectisoma de *E. coli*, esta estructura guarda una íntima relación evolutiva con el flagelo y en este sistema el eje interno está compuesto por una única proteína (EscI), mientras que la enzima lítica de la que se vale el sistema es EtgA. EscI y EtgA forman un complejo 1:1, y EscI es capaz de estimular significativamente la actividad enzimática de EtgA (Burkinshaw, *et al.* 2015). El eje flagelar está compuesto por cinco componentes estructurales y por FlgJ, todos estos son capaces de interactuar con SltF por lo que sí es relevante considerar a todos los participantes para determinar los efectos que estos tienen sobre la actividad enzimática de SltF.

Inicialmente utilizamos la aproximación experimental de los lisoplatos de actividad con la intención de observar si existían efectos claros (inhibición o activación) sobre la actividad de SltF (**Figura 45**). No logramos observar ningún efecto claro, la inhibición por ejemplo sería muy sencilla de observar en un ensayo de este tipo. La razón por la que podríamos no observar nada evidente en este ensayo puede deberse a que se realiza en tiempos muy largos y desconocemos si los complejos se disocian o si lo que observamos correspondería a la parte asintótica de la reacción y por ello, todo se observa prácticamente similar.

Nuestros resultados sugieren que FlgJ tiene un papel inhibitorio sobre la actividad de SltF. Sin embargo, esta inhibición parece anularse en presencia de cualquiera de los componentes estructurales del eje (**Figuras 49-54**). Al analizar el papel de FliE sobre la actividad de SltF (**Figura 50**) esta parece sugerir diferencias entre las condiciones presentadas, sin embargo, el análisis estadístico de los datos demuestra que no existen diferencias. Por el contrario, en el caso de FlgB (**Figura 51**) observamos un fenómeno similar al reportado en el inyectisoma con el complejo EscI-EtgA. FlgB parece estimular la actividad de SltF y esto se observa con claridad en la gráfica (**Figura 51**) y se comprueba con la diferencia observada en el análisis estadístico correspondiente, en el reporte previo, la activación que este complejo sugería era

casi despreciable, sin embargo, en este trabajo logramos demostrar una activación que no deja lugar a dudas. Los componentes más distales del eje FlgF, FlgC y FlgG (**Figuras 52, 53 y 54**) no muestran ningún efecto sobre la actividad enzimática de SltF. Cabe destacar que FlgF resalta al diferir a lo reportado anteriormente (Herlihey, *et al.* 2016), pues se había sugerido que esta inhibía la actividad de SltF, pero nosotros no observamos este efecto. Es difícil determinar la razón por la que observamos esta diferencia, pero podría deberse a diferencias experimentales.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren fuertemente que la unión de FlgJ y de FlgB con SltF tiene como resultado un cambio en la capacidad enzimática de SltF. Se demostró además que el C-terminal de SltF es fundamental para que SltF pueda ser reconocida por los componentes del eje. Así que es posible suponer que la unión de estos componentes con el C-terminal ocasione un cambio conformacional tal que la actividad enzimática de SltF se ve modificada.

Es pertinente mencionar que los ensayos de actividad enzimática de SltF presentados en este trabajo no pertenecen a una caracterización enzimática clásica, pero es una aproximación que tiene una pretensión más fisiológica, sugiriendo la dinámica de funcionamiento que podría existir cuando estos componentes se encuentran en el periplasma y el eje se está ensamblando.

Ya han sido reportadas una variedad de enzimas líticas asociadas a sistemas de secreción (Viollier, *et al.* 2003; Burkinshaw, *et al.* 2015; Diepold, *et al.* 2015; Santin, *et al.* 2016; Byun, *et al.* 2018.), y se ha demostrado que estas transglicosilasas líticas suelen estar codificadas en el conjunto de genes que codifican para los componentes estructurales de los complejos macromoleculares. Durante algún tiempo se consideró que, aunque sabíamos que estas enzimas eran relevantes para abrir el hueco en el peptidoglicano por el cual se va a elongar la estructura, parecía que el mecanismo de funcionamiento por el cual se relacionaban con los sistemas macromoleculares no estaba claramente resuelto (Burkinshaw, *et al.* 2015). Nuestros resultados brindan un panorama para el funcionamiento de SltF durante la biogénesis flagelar.

Los trabajos de nuestro laboratorio sobre el C-terminal de SltF que anteceden al presente y los resultados presentados en este trabajo brindan un panorama bastante más claro para el funcionamiento de SltF y su relación directa con la biogénesis del flagelo. Por lo tanto, la información que hemos recopilado sobre el funcionamiento de SltF y los resultados aquí presentados sugieren una dinámica para el funcionamiento y la regulación de SltF en presencia de los componentes del eje. Por ello y en consideración de toda la información que hemos obtenido, se propone el siguiente modelo para el funcionamiento de SltF durante la biogénesis flagelar (**Figura 56**).

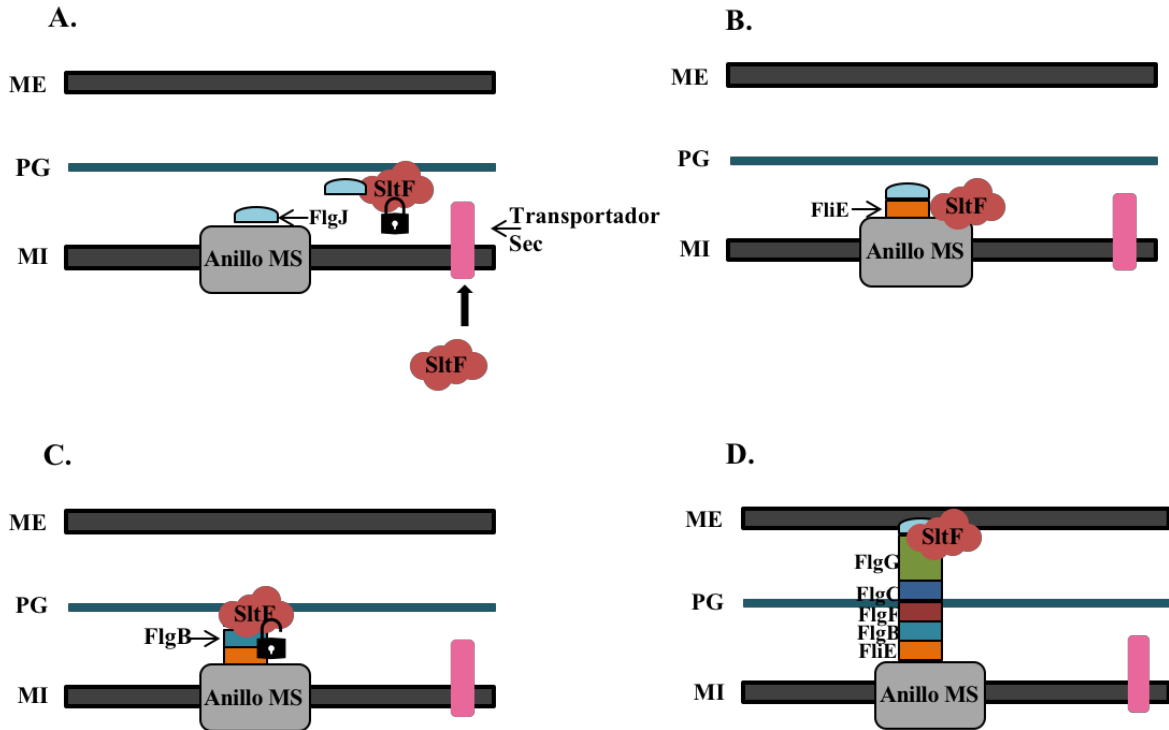


Figura 56. Modelo para el funcionamiento de SltF durante la biogénesis flagelar. Se esquematiza la propuesta para el funcionamiento de SltF durante el ensamblaje del eje flagelar. ME: membrana externa, PG: peptidoglicano, MI: membrana interna. **A.** Al inicio de la biogénesis del eje, la proteína FlgJ es secretada. SltF también es translocada al periplasma, y esto ocurre por medio de la vía Sec. Gracias a su C-terminal, SltF esta es capaz de encontrar a FlgJ en el periplasma, mientras se forma este complejo la actividad enzimática de SltF está inhibida (candado cerrado). **B.** Una vez que el primer componente estructural del eje: FliE es secretado, esta proteína también es capaz de interactuar con SltF asegurando que esta se encuentre en la proximidad del eje nascente. **C.** Posteriormente, el segundo componente es secretado. Este segundo componente es FlgB, y una vez que esta proteína interacciona físicamente con SltF, la actividad enzimática de SltF es activada (candado abierto) y esto le va a permitir hacer un hueco en la pared de peptidoglicano por el cual el eje puede cruzar la barrera física que representa esta pared. **D.** En la parte final de la biogénesis del eje flagelar, los componentes del eje siguen interactuando con SltF aún cuando la pared de peptidoglicano ya fue cruzada, esta interacción requiere del C-terminal de SltF. Las interacciones posiblemente ocurren para asegurar que esta enzima lítica no “escape” y que ocasione otros huecos en la pared que podrían comprometer la viabilidad de la célula. Esto sugiere la posibilidad de que una vez que FlgJ es secretada, SltF también lo será alejándose así de la pared de peptidoglicano.

Conclusiones

- La transglicosilasa lítica flagelar SltF de *R. sphaeroides* es capaz de interactuar con todos los componentes estructurales del eje.
- El C-terminal no conservado de SltF es crucial para el reconocimiento de todos los componentes estructurales del eje.
- La actividad enzimática de SltF se inhibe en presencia de FlgJ.
- La inhibición ocasionada por FlgJ puede ser mitigada por cualquiera de los componentes estructurales del eje.
- La proteína estructural del eje FlgB activa significativamente la capacidad enzimática de SltF.
- El eje flagelar y FlgJ son fundamentales para el funcionamiento de SltF localizándola a su sitio de acción y regulando su actividad enzimática.

Perspectivas

- Cuantificar las interacciones protéicas que se identificaron en este trabajo. Sería relevante determinar constantes de asociación y/o disociación para determinar los detalles de las interacciones que ya se establecieron.
- Realizar ensayos de coimmunoprecipitación con la mutante SlfF Δ 48 en presencia de los componentes del eje que reconoce y en presencia de FlgJ. Dado que se ha reportado que esta mutante interacciona fuertemente con FlgJ, sería interesante explorar la dinámica que esta tendría principalmente en presencia de FliE pues la versión silvestre de SlfF la reconoce mejor que a FlgJ.
- Reconstruir el eje en condiciones *in vitro*, esta propuesta ya se ha planteado a realizarse en *S. enterica* sin embargo los resultados no han sido favorables pues no ha sido posible conseguir la reconstrucción. Nosotros podríamos intentar dicha reconstrucción dado que tenemos a todos los componentes estructurales del eje y a FlgJ en condiciones solubles por lo que sería totalmente viable intentar la reconstrucción.
- Realizar ensayos de turbidometría con al menos dos componentes estructurales del eje: FliE y FlgB en presencia de FlgJ considerando que esta dinámica podría existir *in vivo* y que sería interesante determinar el efecto que este puede tener sobre la actividad de SlfF.
- Realizar ensayos de turbidometría de la mutante SlfF Δ 95 en presencia de FlgJ y FlgB, en ambos casos se supone que no habría efecto por la incapacidad que estas tendrían para reconocer a SlfF, sin embargo, esto nos podría permitir asegurar que sin C-terminal estos componentes no pueden ocasionar el cambio conformacional que es necesario para afectar la capacidad enzimática de SlfF, ya sea que se trate de inhibición o de activación.
- Realizar ensayos de turbidometría de la mutante SlfF Δ 48, sabemos que esta mutante interacciona fuertemente con FlgJ. Es posible que la inhibición que esta interacción ocasiona se mantenga pero es necesario corroborarlo. También sería relevante incluir a FlgB y observar como sucede esta dinámica si la interacción tan fuerte que tiene con FlgJ impide que ocurra el desplazamiento de esta en presencia de los componentes estructurales del eje (como se observa en el caso de SlfF silvestre).
- Estudiar las interacciones de los componentes del eje con otros elementos proximales en el flagelo: el anillo MS (FliF), las proteínas del estator (MotA y MotB) y los anillos L y P (FlgH y FlgI).

- Sobre expresar el dominio del C-terminal de SlfF para analizarlo en interacciones proteína-proteína con los componentes del eje, esto con la finalidad de responder si este dominio es suficiente para interactuar con los componentes estructurales del eje y con FlgJ.
- Realizar ensayos de secreción con la intención de detectar en sobrenadante a SlfF y a FlgJ. Este experimento podría fortalecer la propuesta de que una vez que FlgJ es secretada al medio extracelular esta lleva consigo a SlfF asegurando que esta no ocasione daños al permanecer en el periplasma.
- Los genes codificantes para el sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides* también parecen contar con su propia SlfF. Esta SlfF2 también tiene un C-terminal no conservado, aunque es un poco más corto. Resultaría interesante caracterizar a esta SlfF y estudiar su C-terminal con la intención de establecer el papel que este puede tener en la interacción con los componentes del eje.

Bibliografía

- Aizawa S. 1996. Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol Micro*. **19**(1):1-5.
- Aizawa S. 2014. The Flagellar World. *Academic Press ELSEVIER*.
- Apel D., Surette M. G. 2008. Bringing order to a complex molecular machine: The assembly of the bacterial flagella. *Biochim Biophys Acta*. **1778**:1851-1858.
- Asaka S. 1970. Polymerization of flagellin and polymorphism of flagella. *Adv Biophys*. **1**:99-155.
- Ausubel F.M. R., Brent E., Kingston D. D., Moore J. G., Seidman J. A., Struhl. 1987. Current protocol in molecular biology. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience John Wiley and Sons, New York.
- Ballado T., Camarena L., Pedrajo-González B., Silva-Herzog E. Dreyfus G. 2001. The hook gene (*flgE*) is expressed from the flgBCDEF operon in *Rhodobacter sphaeroides*: study of an flgE mutant. *J Bacteriol*. **183**(5):1680-1687.
- Beatson S.A., Minamino T., Pallen M.J. 2006. Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure. *Trends Microbiol*. **14**:151-155.
- Berg H. C. 2003. The rotatory motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem*. **72**:19-54.
- Burkinshaw B. J., Deng W., Lameignere E., Wasney G. A., Zhu H., Worall L. J., Finlay B. B., Strynadka N. C. J. 2015. Structural analysis of a specialized type III secretion system peptidoglycan-cleaving enzyme. *J Biol Chem*. **290**(16):10406-10417.
- Büttner D. 2012. Protein Export According to Schedule: Architecture, Assembly, and Regulation of Type III Secretion Systems from Plant- and Animal-Pathogenic Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. **76**(2):262-310.
- Byun B., Mahasenan K., Dik D. A., Marous D. R., Speri E., Kumarasiri M., Fisher J. F., Hermoso J. A. and Mobashery S. 2018. Mechanism of the *Escherichia coli* MltE lytic transglycosylase, the cell-wall-penetrating enzyme for Type VI secretion system assembly. *Sci Rep*. **8**(14110):1-8.
- Chevance F. F. and Hughes K. T. 2008. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol*. **6**(6):455-465.
- Cohen E. J., Hughes K. T. 2014. Rod-to-hook transition for extracellular flagellum assembly is catalyzed by the L-ring-dependent rod scaffold removal. *J Bacteriol*. **196**(13):2387-2395.
- de la Mora J., Uchida K., Martinez del Campo A., Camarena L., Aizawa S., Dreyfus G. 2015. Structural Characterization of the Fla2 Flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol*. **197**(17):2859-2866.

de la Mora J., Ballado T., González-Pedrajo B., Camarena L., Dreyfus G. 2012. The flagellar muramidase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* **189**(22):7998-8004.

de la Mora J., Osorio-Valeriano M., González-Pedrajo B., Ballado T., Camarena L., Dreyfus G. 2012. The C terminus of the flagellar muramidase SltF modulates the interaction with FlgJ in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **194**(17):4513-4520.

Diepold A. and Armitage J. P. 2015. Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **370**(1679):1-19.

Dik D. A., Marous D. R., Fisher F. F., Mobashery S. 2017. Lytic transglycosylases: concinnity in concision of the bacterial cell wall. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **52**(5):503-542.

Erhardt M. Mertens M.E. Fabiani F.D. and Kelly T. Hughes. 2014. ATPase- Independent Type-III Protein Secretion in *Salmonella enterica* *PLoS Genetics* **10**(11): e1004800.

Erhardt M. 2017. Fluorescent Microscopy Techniques to Study Hook Length Control and Flagella Formation. In: Minamino T., Namba K. (eds) *The Bacterial Flagellum. Methods in Molecular Biology*, vol. 1593. Humana Press, New York, NY.

England J. C., Gober J. W. 2001. Cell cycle control of cell morphogenesis in *Caulobacter*. *Curr Opin Microbiol.* **4**(6):674-680.

Evans L. D., Hughes C., Fraser G. M., 2014. Building a flagellum outside the bacterial cell. *Trends Microbiol.* **22**:566-72.

Frye J., Karlinsey J. E., Felise H. R., Marzolf B., Dowidar N., McClelland M., Hughes K. T. 2006. Identification of new flagellar genes of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J Bacteriol.* **188**(6):2233-2243.

Fujii T., Kato T., Hiraoka D. K., Miyata T., Minamino T., Chevance V. F. F., Hughes T. L., Namba K. 2017. Identical folds used for distinct mechanical functions of the bacterial flagellar rod and hook. *Nat Commun.* **8**:14276.

Fujii T., Kato T., Namba K. 2009. Arrangement of alpha-Helical Coiled Coils in the Core Domain of the Bacterial Flagellar Hook for the Universal Joint Function. *Structure.* **17**(11):1485-1493.

García-Gómez E., González-Pedrajo B. 2011. Transglicosilasas líticas asociadas a los sistemas de secreción en bacterias Gram negativas. *REB.* **30**(2):45-55.

García-Ramos M., de la Mora J., Ballado T., Camarena L., Dreyfus G. 2018. Biochemical and phylogenetic study of a flagellar lytic transglycosylase SltF from *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* **200**(20):1-12.

González-Pedrajo B., Dreyfus G. 1999. Motilidad, biogénesis flagelar y quimiotaxis bacteriana. *Boletín de Educación Bioquímica* **18**(4):142-152.

Guttenplan S. B., Shaw S., Kearns D. B. 2013. The cell biology of peritrichous flagella in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **87**(1):211-229.

Hall R. A. 2004. Studying protein-protein interactions via blot overlay of Far Western Blot. *Methods Mol Biol*. **261**:167-174.

Herlihey F. A., Moynihan P. J., Clarke A.J. 2014. The Essential Protein for Bacterial Flagella Formation FlgJ Functions as a β -N-Acetylglucosaminidase. *J Biol Chem*. **289**: 31029-31042.

Herlihey F. A., Osorio-Valeriano M., Dreyfus G., Clarke A. J. 2016. Modulation of the lytic activity of the dedicated autolysin for flagellum formation SlfF by flagellar rod proteins FlgB and FlgF. *J Bacteriol*. **198**(13):1847-1856.

Homma M., Fuhita H., Yamaguchi S., Lino T. 1984a. Excretion of unassembled flagellin by *Salmonella typhimurium* mutants deficient in hook-associated proteins. *J Bacteriol*. **159**:1056-1059.

Hottes A. K., Freddolino P.L., Khare A., Donnell Z. N., Liu J.C., Tavazoie S. 2013. Bacterial adaptation through loss of function. *PLoS Genet*. **9**(7):3617.

Ibuki T., Uchida Y., Hironaka Y., Namba K., Minamino T. 2013. Interaction between FliJ and FlhA, Components of the Bacterial Flagellar Type III Export Apparatus. *J Bacteriol*. **195**(3):466-473.

Iino T. 1969. Polarity of flagellar growth in *Salmonella*. *J Gen Microbiol*. **56**:227-239.

Ikeda T., Yamaguchi S., Hotani H. 1993. Flagellar growth in a filamentless *Salmonella* fliD mutant supplemented with purified hook associated protein. *J Biochem*. **114**(1):39-44.

Jones C. J., Macnab R. M. 1990. Stoichiometric analysis of the flagellar hook (basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*, *J Mol Biol*. **212**:377-387.

Kazmierczak B.I., Hendrixson D.R. 2013. Spatial and numerical regulation of flagellar biosynthesis on polarly flagellated bacteria. *Mol Microbiol*. **88**(4):655-663.

Kearns, D.B. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol*. **8**:634-644.

Kitao A., Hata H. 2017. Molecular dynamics simulation of bacterial flagella. *Biophys Rev*. doi: 10.1007/s12551-017-0338-7.

Komatsu H., Hayashi F., Sasa M., Shikata K., Yamaguchi S., Namba K., Oosawa K. 2016. Genetic analysis of revertants isolated from the rod fragile fliF mutant of *Salmonella*. *Biophys Physicobiol*. **28**(13):13-25.

- Koraimann G. 2003. Lytic transglycosylases in macromolecular transports in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell Mol Life Sci.* **60**(11):2371-2388.
- Kutsukake K., Ohya Y., Iino T. 1990. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* **172**:741-747.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* **227**(5259):680-685.
- Liao Y. H., Brown M. B., Martin G. P. 2000. Turbidimetric and HPLC assays for the determination of formulated lysozyme activity. *J Pharm Pharmacol.* **53**(4):549-554.
- Lynch M. J., Levenson R., Kim A. E., Sircar R., Blair F. D., Dahlquist W. F., Crane R. B. 2017. Co-Folding of a FliF-FliG Split Domain Forms the Basis of the MS:C Ring Interface within the Bacterial Flagellar Motor. *Structure.* **25**(2):317-328.
- Mackenzie C., Choudhary M., Larimer F.W., Predki P.F., Stilwagen S., Armitage J.P., Barber R.D., Donohue T.J., Hosler J.P., Newman J.E., Shapleigh J.P., Sockett R.E., Zeilstra-Ryalls J., Kaplan S. 2001. The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Photosynt Res.* **70**:19-41.
- Mackenzie C., Eraso J. M., Choudhary M., Roh J. H., Zeng X., Bruscella P., Puskás A., Kaplan S. 2007. Postgenomic Adventures with *Rhodobacter sphaeroides*. *Annu Rev Microbiol.* Vol. 61:283-307.
- Macnab R. M. 2004. Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim. Biophys. Acta.* **1694**:200-217.
- McCarter L. L. 2006. Regulation of flagella. *Curr Opin Microbol.* **9**(2):180-186.
- Minamino T. 2014. Protein export through the bacterial flagellar type III export pathway. *Biochim Biophys Acta.* **1843**(8):1642-1648.
- Minamino T., Chu R., Yamaguchi S. and Macnab R.M. 2000. Role of FliJ in Flagellar Protein Export in *Salmonella*. *J Bacteriol.* **182**(15):4207-4215.
- Minamino, T., Macnab, R. M. 1999. Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J. Bacteriol.* **181**:1388–1394.
- Minamino T., Namba K. 2008. Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature.* **451**:485-489.
- Minamino T., Yamaguchi S., Macnab M. R. 2000. Interaction between FliE and FlgB, a proximal rod component of the flagellar basal body of *Salmonella*. *J. Bacteriol.* **182**(11):3029-3036.

Moriya N., Minamino T., Imada K. and Namba K. 2011. Genetic analysis of the bacterial hook-capping protein FlgD responsible for hook assembly. *Microbiology*. **157**(5):1354-1362.

Namba K., Vonderviszt F. 1997. Molecular architecture of bacterial flagellum. *Q Rev Biophys*. **30**:1-65.

Nambu T., Kutsukake K. 2000. The Salmonella FlgA protein, a putative periplasmic chaperone essential for flagellar P ring formation. *Microbiology*. **146**(Pt5):1171-1178.

O'Brien E. J., Bennett P. M. 1972. Structure of straight flagella from a mutant *Salmonella*. *J Mol Biol*. **70**(1):133-152.

Osorio-Valeriano M., de la Mora J., Camarena L., Dreyfus G. 2016. Biochemical Characterization of the Flagellar Rod Components of *Rhodobacter sphaeroides*: Properties and Interactions. *J Bacteriol*. **198**(3):544-552.

Peterson G. L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**(2):346-356.

Poggio S., Osorio A., Dreyfus G., Camarena L. 2005. The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer binding proteins. *Mol Microbiol*. **58**(4):969-983.

R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

Ramos Cruz H., Rumbo M., Sirard J. 2004. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol*. **12**(11):509-517.

Roure S., Bonis M., Chaput C., Ecobichon C., Mattox A., Barrière C., Geldmacher N., Guadagnini S., Schmitt C., Prévost M. C., Labigne A., Backert S., Ferrero R. L., Boneca I. G. 2012. Peptidoglycan maturation enzymes affect flagellar functionality in bacteria. *Mol Microbiol*. **86**(4):845-856.

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**(2):423-435.

Samatey F.A., Imada K., Nagashima S., Vonderviszt F., Kumasaka T., Yamamoto M., Namba K. 2001. Structure of the bacterial flagella protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature*. **410**(6826):331-337.

Samatey F.A. Matsunami H. Imada K. Nagashima S. Shaikh T.R. Thomas D.R. Chen J.Z. Derosier D.J. Kitao A. and Namba K. 2004. Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. *Nature*. **431**(7012):1062-1068.

Santin Y. G., Cascales E. Domestication of a housekeeping transglycosylase for assembly of a Type VI secretion system. *EMBO reports*. **18**(1):138-149.

Schmitt R. 2003. Helix rotation model of the flagellar rotary motor. *Biophys J*. **85**(2):843-852.

Schoenhals G. J., Macnab R. M. 1996. Physiological and Biochemical Analyses of FlgH, Lipoprotein Forming the Outer Membrane L Ring of the Flagellar Basal Body of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*. **178**(14):4200-4207.

Terashima H., Fukuoka H., Yakushi T., Kojima S., Homma M. 2006. The *Vibrio* motor proteins, MotX and MotY, are associated with the basal body of Na⁺-driven flagella and required for stator formation. *Mol Microbiol*. **62**(4):11710-1180.

Terashima H., Kawamoto A., Morimoto V. Y., Imada K., Minamino T. 2017. Structural differences in the bacterial flagellar motor among bacterial species. *Biophysics and Physicobiology*. **14**:191-198.

Thormann K. M., Paulick A. 2010. Tuning the flagellar motor. *Microbiology*. **156**(Pt5):1275-1283.

Typas A., Banzhaf M., Gross C. A. Vollmer W. 2012. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol*. **10**:123-136.

Towbin H.T., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**(9):4350-4354.

Uehara T., Bernhardt T. G. 2011. More than just lysins: peptidoglycan hydrolases tailor the cell wall. *Curr Opin Microbiol*. **14**(6):689-703.

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**(5):833-47.

Viollier P. H. and Shapiro L. 2003. A lytic transglycosylase homologue, PleA, is required for the assembly of pili and the flagellum at the *Caulobacter crescentus* cell pole. *Mol Microbiol*. **49**(2):331-345.

Vollmer W., Blanot D., De Pedro M. A. 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev*. **32**(2):149-167.

Wagenknecht T., DeRosier, D. J., Aizawa S.I., and Macnab R. M. 1982. Flagellar hook structures of *Caulobacter* and *Salmonella* and their relationship to filament structure. *J Mol Biol* **162**:69-87.

Wessel D., Flugge U. I. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem.* **138**(1):141- 143.

Williams A.W. Yamaguchi S. Togashi F. Aizawa S.I. Kawagishi I. and Macnab R.M. 1996. Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* **178**(10):2960-2970.

Yakushi T., Yang J., Fukuoka H., Homma M., Blair D. F. 2006. Roles of charged residues of rotor and stator in flagellar rotation: comparative study using H⁺-driven and Na⁺ driven motors in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **188**:1466–1472.

Yonekura K., Maki S., Morgan D. G., DeRosier D. J. Vonderviszt F., Imada K., Namba K. 2000. The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science.* **290**:2148-2152.

Yonekura K., Yonekura-Maki S., Homma M. 2011. Structure of the Flagellar Motor Protein Complex PomAB: Implications for the Torque-Generating Conformation. *J Bacteriol.* **193**(15):3863-3870.

Yonekura K., Yonekura-Maki S. Namba, K. 2003. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature.* **424**:643–650.

Zhang K., Tong B. A., Liu J., Li C. 2011. A single domain FlgJ contributes to flagellar hook and filament formation in the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol.* **194**(4):866-874.

Zhao X., Norris S. J., Liu J. 2014. Molecular Architecture of the Bacterial Flagellar Motor in Cells. *Biochemistry.* **23**(27):4323-4333.

Zhou J., Lloyd S. A., Blair D. F. 1998a. Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**:6436-6441.

Zhou J., Sharp L. L., Tang H. L., Lloyd S. A., Billings S., Braun T. F., Blair D. F. 1998b. Function of protonatable residues in the flagellar motor of *Escherichia coli*: a critical role for Asp 32 of MotB. *J Bacteriol.* **180**:2729-2735.