

03081

4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL  
Y DEL POSGRADO DEL CCH  
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

Biogénesis del flagelo bacteriano: caracterización  
de los operones *fliK* y *flgG*

Tesis que para obtener el grado de doctora en

**Investigación Biomédica Básica presenta:**

M. en IBB Bertha María Josefina González Pedrajo

MEXICO, D. F.

2000

279175



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

### *Miembros del Jurado*

Dr. Edmundo Calva Mercado  
Dra. Laura Camarena Mejía  
Dra. Marina Gavilanes Ruiz  
Dra. Alicia González Manjarrez  
Dra. Imelda López Villaseñor  
Dr. Antonio Peña Díaz  
Dr. Alejandro Zentella Dehesa

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Georges Dreyfus, y con el apoyo de CONACYT (4739-N9406 y 3290P-N9607) y DGAPA (IN204595).

El trabajo con *Salmonella typhimurium* se llevó a cabo durante una estancia doctoral en el laboratorio del Dr. Robert Macnab en el Departamento de Biofísica y Bioquímica Molecular de la Universidad de Yale.

## *Dedicatoria*

A mi adorada mamá por ser la mejor amiga y la mujer más maravillosa.

Porque cada uno de mis logros son tan sólo el producto de todo tu esfuerzo y amor, porque te debo todo lo que soy, va para ti ma, con todo mi agradecimiento y todo mi amor.

## *Agradecimientos*

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi querido tutor de siempre por los 11 años de enseñanzas, desde la licenciatura, el servicio social y las tres tesis! Gracias Jorge por dirigirme hasta aquí, por todo tu gran apoyo, por los regañones, por la confianza, los consejos, el interés, por impulsarme al paso siguiente, pero sobre todo, gracias por tu amistad.

A todos los doctores que participaron directamente en mi formación con sus enseñanzas en clases, tutoriales, congresos y seminarios, especialmente al Dr. Diego González Halphen, Dr. Heliodoro Celis, Dr. Adolfo García Sainz, Dr. Ruy Pérez, Dr. Roberto Coria, Dra. Alicia González, Dra. Laura Camarena, y a quienes en el instituto han sido siempre un ejemplo a seguir: Dr. Armando Gómez Puyou, Dra. Marietta Tuena y al Dr. Antonio Peña.

A los miembros del jurado por su cuidadosa revisión, por las sugerencias y los comentarios que hicieron para mejorar el trabajo.

A los integrantes de mi comité tutorial, los doctores Roberto Coria y Alicia González, por todas sus valiosas aportaciones al proyecto.

Al Dr. Robert Macnab, a May Macnab y Tohru Minamino por todo lo que aprendí durante la estancia doctoral, por las facilidades para que pudiera regresar a recibirme y por toda su ayuda en el inicio de mi posdoctorado.

A la excelente ayuda técnica de la Q.F.B. Teresa Ballado Nava para la elaboración de este trabajo, por su gran disposición para colaborar y todas sus enseñanzas, por mantener el laboratorio funcional.

La excelente ayuda técnica del Q. Francisco Javier de la Mora fue indispensable para la realización de este trabajo. Javier participó activamente tanto con la parte experimental como teórica del proyecto. Realizó además muchas de las figuras que aquí se presentan.

A la Biól. Marcela Sosa, Biól. Guadalupe Códiz y Dra. Laura Ongay de la Unidad de Biología Molecular del IFC por la síntesis de oligonucleótidos y la secuenciación nucleotídica.

A la excelente ayuda técnica de Jorge Sepúlveda, Rodolfo Paredes y Mark West de la Unidad de Microscopía del IFC.

A la unidad de cómputo del IFC, por todas las facilidades. Especialmente a Juan Barbosa por su siempre buena disposición para ayudar.

Al eficiente apoyo secretarial de Domi y Lupita que siempre me ayudan con todo.

Al Instituto de Fisiología Celular y su personal, por las facilidades que brinda para el desarrollo de la investigación.

A la Facultad de Ciencias en donde aprendí muchas cosas importantes, además de Biología, y a la Facultad de Medicina en donde conocí el gusto por enseñar.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, máxima casa de estudios y a quienes han luchado a través del tiempo para que siga siendo de todos, por una universidad pública y una educación gratuita, para que se conserve este maravilloso espacio plural.

Durante la realización de este trabajo conté con una beca otorgada por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, así como con la beca Fulbright para estancia doctoral.

## *Agradezco*

A mis queridísimas hermanas a quienes amo y admiro mucho, por estar siempre, por su apoyo incondicional.

A Pamela, la reina de la familia, por todo lo que he disfrutado verte crecer, por tu ternura e inocencia y todos los sentimientos nuevos que generaste.

A mi querido papá por todo tu apoyo y amor, por mantenerte cerca y darnos siempre lo mejor.

A mi familia por sus porras e interés: los Alfaro, los Cocos, Goya, y por supuesto a mi tío Jorge que tanto quiero y al piiiimo Jorgitito.

A mi vida, por la ilusión y tanto amor. ... *sin perder la ternura jamás* ...

Son muchos los amigos que me acompañaron y ayudaron en este tiempo; sin embargo, quisiera agradecer especialmente a quien ha sido la mejor amiga, por todo lo que hemos compartido, por los viajes, por tu cariño y solidaridad, gracias Luchi.

A Miguel, Clau y Erick porque a pesar de la distancia, siempre están. Gracias güero por seguir siendo mi gran amigo.

A Cucho (por regresar) Maqui y Sofia, por su amistad y por darme la oportunidad de tener esa ahijada tan preciosa.

A Maru, Jaime, Mónica, Carlos, Peña y Gina por haber formado parte de diferentes etapas importantes y aún estar.

A los amigos que hicieron posible que pudiera seguir escribiendo en la distancia y que lograra recibirme así:

Teresita, mi maestra de tantos años, excelente compañera de laboratorio y una muy buena amiga. Gracias Terechú por toda toda toda tu ayuda, por aguantarme tanto tiempo y por quererme. También al Peksi y a la Malila con mucho cariño.

A Sole, la nueva prima, por tanta ayuda con todos los trámites, por todo lo buena onda que has sido, por tus consejos y amistad.

Al camarada Javier porque te puliste con tantísima ayuda con las figuras de la revisión, de la tesis, con el proyecto, por todas las discusiones y las muchas y muchas platicas vespertinas, comidas, etc., mil gracias!



A los chavalines Lauris y Manu quienes me dieron (literalmente) las llaves de su casa. Muchísimas gracias por su amistad, por dejarme usar su computadora y por toda su gran ayuda en este inicio del posdoc, se han portado de maravilla!

A mis compañeros de laboratorio y del instituto (los actuales y los pasados) por hacer agradable la estancia diaria en el IFC y por su ayuda:

A la Uge por todas las nutridas discusiones, al Hilarito por tantas y tantas ayudas, por el maravilloso café que tanto extraño y por tu amistad, a Axelle, la nueva integrante del equipo.

A la Dra. Iiirma Romero, Miriam, Xochitl, Ariane, Robert, Marce, Emma, Ma. Elena, Edgar, Ernie, Gerardo, Salvador N., Lety Z., Jorge R., Mark.

A las voces del instituto que se hicieron sonar, por las despedidas, las chelas y todo lo que aprendí en las asambleas y reuniones: Fer, Quique, Octavio, Silvana, Lemus, Chelito, Yuriria, Gaby, Santiago, Velia, Tatiana, Ricardo, Adriana, Erendira, Amaranta, Martín, Rodolfo y los que me falten.... y por supuesto, muy especialmente a Benito por ser un gran cuate.

A Agus por haber estado en los momentos más difíciles y aguantar tanto llanto, por toda tu ayuda y por supuesto también por las comidas, los bailes y los viajes.

A la Dra. Miss Ember, la ganadora oficial de las porras que tanto me ayudaron a seguir y superar el miedo a terminar finalmente con esta etapa.

Al Dr. J. J., gran amigo de muchos años, quien también supo mantenerse cerca en la distancia, por todos tus consejos.

Al Dr. Carlos García, por ayudarme a entender.

A Nayar con mucho cariño por todo lo que fuiste y lo que en mi dejaste.

# INDICE

<i>Resumen</i> .....	1
<i>Introducción</i> .....	3
<i>Objetivos</i> .....	37
<i>Metodología</i> .....	39
<i>Resultados</i> .....	45
<i>Discusión</i> .....	68
<i>Referencias</i> .....	83
<i>Apéndices</i> .....	96

## RESUMEN

El tipo más común de movilidad bacteriana es llevada a cabo por el flagelo, un largo filamento helicoidal o propela, que es impulsado por un motor rotatorio embebido en la superficie celular. La estructura básica del flagelo: filamento, gancho y cuerpo basal, varía muy poco dentro del reino procarionte. Estos organelos, aislados de especies tan diversas como arqueobacterias, espiroquetas y eubacterias Gram (-) y Gram (+), conservan todos la misma estructura general.

Las bacterias al nadar cambian aleatoriamente de dirección en pocos segundos; sin embargo, si se encuentran frente a un gradiente de concentración de alguna sustancia, la frecuencia de cambio de dirección puede ser alterada para que la trayectoria se dé en un sentido favorable. La modulación de la dirección (o en algunos casos de la velocidad) de la rotación flagelar constituye la base de la quimiotaxis.

Se requieren aproximadamente 50 genes para la construcción de un flagelo totalmente funcional y su expresión está estrictamente controlada en un orden jerárquico. La morfogénesis de la estructura flagelar se encuentra acoplada a la regulación de la transcripción dentro del regulón flagelar.

En el presente trabajo se realizó la caracterización molecular de dos operones que participan en la biogénesis del flagelo de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides* WS8. Utilizando el transposón *TnphoA* se llevó a cabo el aislamiento de dos mutantes no móviles afectadas en los productos génicos FliK (proteína encargada de regular la longitud del gancho, así como el cambio de especificidad en la exportación de proteínas flagelares), y FlgI (proteína estructural del anillo P). Posteriormente, se llevó a cabo la clonación y secuenciación de las regiones cromosomales que contienen a los genes afectados (*fliK* y *flgI*), y se encontró que éstos forman parte de una unidad transcripcional que comprende a los genes *fliKLMN* y *flgGHIJKL*, respectivamente.

Una caracterización parcial de la proteína FliK se realizó en la bacteria entérica *Salmonella typhimurium* y se demostró que este polipéptido es exportado durante el proceso de ensamblaje flagelar.

## ABSTRACT

The most common type of bacterial motility is achieved by means of the flagellum, in which a long helical filament, the propeller, is driven by a rotary motor embedded in the cell surface. The basic flagellar structure: filament, hook and basal body, varies very little throughout the prokaryotic kingdom. The isolated organelles from species as diverse as archaebacteria, spirochaetes, and Gram (-) or Gram (+) eubacteria all have the same general structure.

Free swimming bacteria randomly change direction every few seconds, but if a substance gradient is encountered, the direction-changing frequency can be biased to move in a favorable direction. Modulation of the direction (or in some cases of the speed) of flagellar rotation is the basis of chemotaxis.

Approximately 50 genes are required for the construction of a fully functional flagellum and their expression is strictly controlled in a hierarchical order. Morphogenesis of the flagellar structure is coupled to regulation of transcription in the flagellar regulon.

In this work, we have accomplished the molecular characterization of two operons that are involved in the flagellum biosynthesis of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* WS8. Using the transposon *TnphoA* we have isolated two non-motile mutants disrupted in the gene products FliK (the protein responsible for the control of the hook length as well as switching of export specificity), and FlgI (the structural protein for the P ring). We next cloned and sequenced the chromosomal region containing the mutated genes (*fliK* and *flgI*), and we have found that they form part of a transcriptional unit that comprises the *fliKLMN* and *flgGHIJKL* genes, respectively.

A partial characterization of the FliK protein was performed in the enteric bacterium *Salmonella typhimurium*, and it was demonstrated that this polypeptide is exported during the flagellar assembly process.

# INTRODUCCION

## *Movilidad bacteriana*

La movilidad se encuentra ampliamente distribuida en el reino procarionte y le confiere a las bacterias una clara ventaja adaptativa para la supervivencia en su ambiente natural. Estos organismos tienen la capacidad de vivir en diferentes condiciones ambientales, debido a lo cual se han podido aislar bacterias móviles de habitats tan diversos como las ventosas hipertérmicas del océano, las aguas superficiales, el suelo, los contenidos del rumen, la mucosa gástrica, o bien, la placa dental (Ottemann y Miller, 1997).

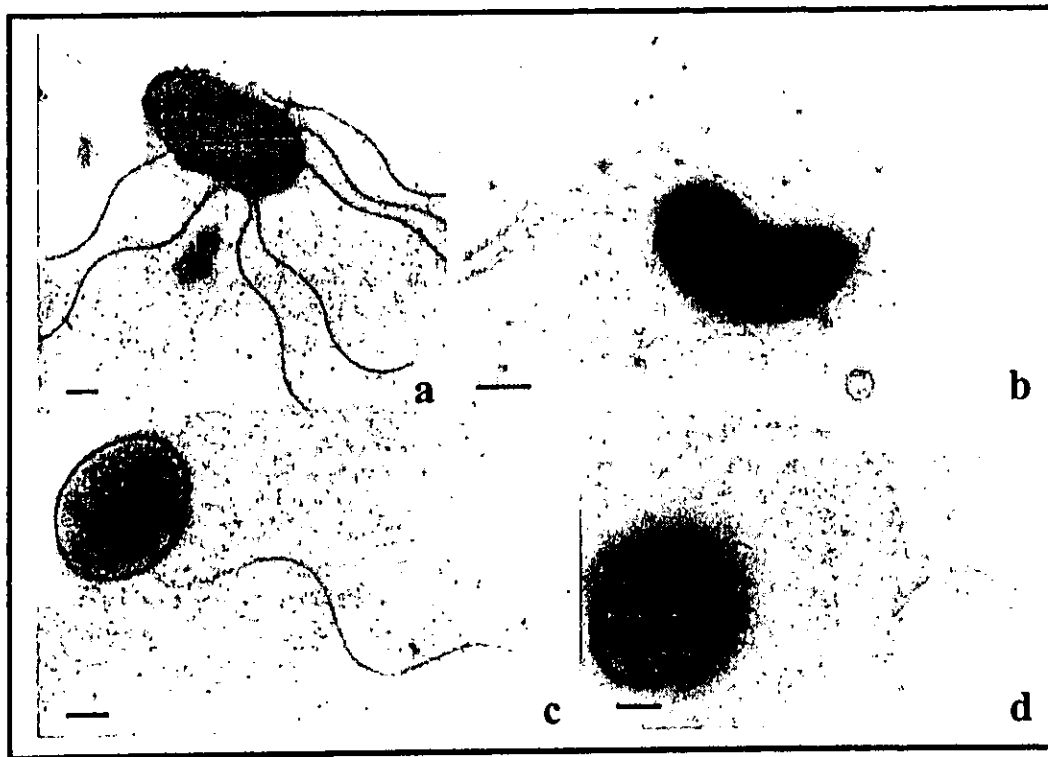
Las bacterias nadan libremente en medio líquido; sin embargo, en la naturaleza, la actividad microbiana está frecuentemente asociada a superficies; de hecho, una de las características principales de estos microorganismos es su capacidad de formar estructuras asociadas a una determinada superficie sólida, generando consorcios cooperativos denominados biopelículas (Costerton y cols., 1995).

El movimiento bacteriano puede darse a través de diferentes mecanismos. Por una parte, el llamado deslizamiento implica un desplazamiento lento (1-60  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) que se da sobre superficies sólidas y se ha caracterizado principalmente en Myxobacterias, Cianobacterias y Flavobacterias (Hartzell y Youderain, 1995). Hasta ahora, el aparato responsable de este tipo de movilidad no ha sido bien caracterizado; sin embargo, se sabe que participan sistemas especializados de secreción de mucopolisacáridos, así como de reconocimiento de componentes extracelulares a través de receptores transmembranales (Youderain, 1998).

Por otra parte, la movilidad bacteriana que se debe a la rotación de organelos especializados denominados **flagelos**, se da a través del mecanismo de nado (en el caso de medio líquido) y del denominado enjambre (*del inglés "swarming"*) para superficies sólidas. Durante el nado, las bacterias alcanzan grandes velocidades, entre 20 y 120  $\mu\text{m}/\text{seg}$ , lo que equivale a una velocidad de hasta 60 cuerpos celulares por segundo (Armitage, 1992).

El "swarming" es una forma de diferenciación bacteriana que se caracteriza por la producción de células hiperflageladas, alargadas y multinucleadas que tienen la capacidad de migrar rápidamente sobre superficies sólidas. Es un fenómeno social que involucra un movimiento altamente coordinado, así como el contacto entre bacterias vecinas. Este fenómeno se descubrió originalmente en el género *Proteus*, pero ha sido descrito ya para una gran cantidad de especies (Harshey, 1994).

Existen diferentes patrones flagelares y el número y la localización de los mismos puede variar entre especies (*Figura 1*).



**Figura 1.** Fotografías al microscopio electrónico de bacterias con diferentes patrones flagelares. a) peritrico en *Salmonella typhimurium* b) anfitrico en *Rhodospirillum rubrum* c y d) monotrico en *Rhodobacter sphaeroides*. Las barras corresponden a 500 nm.

Hay bacterias monoflageladas (patrón denominado monotrico), como *Rhodobacter sphaeroides* con un flagelo de localización subpolar (Armitage y Macnab, 1987), *Vibrio parahaemolyticus* (McCarter, 1995), *Caulobacter crescentus* (Brun y cols., 1994) y *Campylobacter jejuni* (Power y cols., 1992) que presentan un solo flagelo polar. Hay también bacterias con varios flagelos, ya sea de localización polar como *Bartonella bacilliformis* (patrón lofotrico); en ambos polos (patrón anfitrico) como *Rhodospirillum rubrum* (Cohen-Bazire y London, 1967) y alrededor del cuerpo celular (patrón peritrico)

como en *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Rhizobium meliloti* (Jones y Aizawa, 1991; Gotz y Schmitt, 1987). A su vez, hay bacterias como *Helicobacter pylori* o *Halobacterium salinarium* que tienen sus flagelos envueltos por una membrana (O'Toole y cols., 1994; Kupper y cols., 1994) y también las espiroquetas como *Treponema phagedenis* y *Borrelia burgdorferi* que presentan flagelos periplásmicos, insertados entre las membranas interna y externa (Canale-Parola, 1978). Cabe mencionar que el flagelo no es consitutivo, se induce dependiendo de las condiciones ambientales (ver más adelante).

La capacidad de las bacterias de moverse en forma dirigida, ya sea por señales físicas o químicas, confiere a estos microorganismos beneficios potenciales entre los que se encuentran tener una mayor eficiencia en la búsqueda de nutrientes, evadir sustancias tóxicas, establecer relaciones simbióticas, así como alcanzar los sitios óptimos de colonización en el caso de bacterias patógenas (Ottemann y Miller, 1997).

La movilidad juega un papel importante en varios tipos de interacciones bacteria-hospedero. Entre los ejemplos en los que se ha demostrado experimentalmente la importancia de la movilidad está el calamar *Euprymna scolopes*, que presenta un órgano que emite luz, pues en su interior habita la bacteria luminiscente *Vibrio fischeri*. Esta relación simbiótica presenta beneficios para los dos organismos; el calamar la utiliza como protección nocturna contra depredadores, mientras que las bacterias reciben nutrientes de los microvellos de la superficie epitelial de dicho órgano. El proceso de adquisición de simbiontes por el calamar ha sido reproducido experimentalmente en condiciones de laboratorio y se observó que la colonización del órgano se elimina completamente al incubarse *E. scolopes* con bacterias mutantes no móviles (Graf y cols., 1994). A su vez, se ha demostrado que la movilidad es importante en la eficiencia de nodulación de *Rhizobium meliloti* sobre plantas de alfalfa (Malek, 1992). Estos son algunos ejemplos de la función de la movilidad en el establecimiento de infección positiva o simbiosis.

Por otra parte, se ha demostrado que las mutantes no móviles de *Helicobacter pylori* son incapaces de colonizar el tracto gastrointestinal humano (Eaton y cols., 1996). En la actualidad, existe amplia evidencia experimental en cuanto a la importancia de la movilidad y la quimiotaxis en las etapas iniciales de infección bacteriana por una gran cantidad de especies como *Salmonella typhi*, *Campylobacter jejuni* etc., (Armitage, 1992).

## *El flagelo procarionte*

Existen grandes diferencias entre el flagelo de los organismos procariontes y eucariontes. El filamento bacteriano (20 nm de diámetro) se encuentra formado por miles de subunidades de un solo tipo de proteína, mientras que el flagelo eucarionte (200 nm de diámetro) presenta una compleja arquitectura: está formado por más de 200 diferentes polipéptidos. Las principales diferencias entre éstos se refieren al mecanismo de movimiento y a la fuente de energía utilizada. El axonema flagelar eucarionte está constituido por una estructura de nueve pares de microtúbulos que rodean a un par central (9 + 2 microtúbulos), así como por ATPasas conocidas como brazos de dineína. A diferencia del flagelo eucarionte, que gracias al deslizamiento entre estos microtúbulos, se mueve como látigo para impulsar al organismo, el flagelo bacteriano rota; por lo tanto no realiza un trabajo quimiomecánico *per se*, sino que es pasivamente dirigido por un motor de rotación bidireccional. La fuerza de rotación o torca, tanto en la dirección a favor como en contra de las manecillas del reloj, se genera en la base del flagelo y se transmite hacia las estructuras extracelulares.

Por otro lado, en los organismos procariontes, la fuente de energía para la rotación flagelar no involucra la hidrólisis de ATP, como es el caso del flagelo eucarionte, sino un gradiente iónico transmembranal, ya sea de protones o de iones sodio en el caso de especies alcalófilas. Por lo tanto, el motor de rotación del flagelo bacteriano es un transductor energético que convierte la energía del gradiente electroquímico en trabajo mecánico (Blair y Dutcher, 1992).

## *Estructura flagelar*

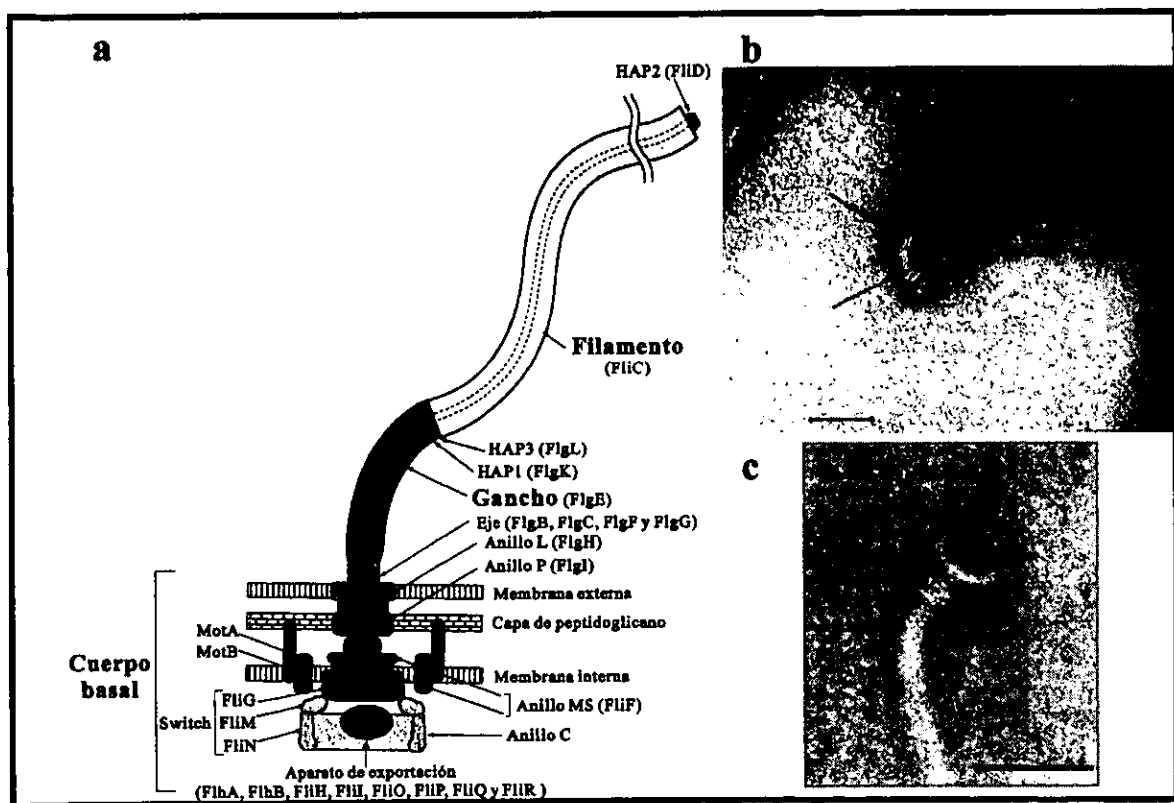
El flagelo es una de las estructuras más complejas de la célula bacteriana, ya que constituye parte integral de sus diferentes compartimentos como la membrana celular, el espacio periplásmico, la pared celular o capa de peptidoglicano y la membrana externa; presentando también componentes de localización tanto citosólica, como extracelular (Jones y Aizawa, 1991). La mayoría del trabajo experimental para el estudio del flagelo se ha realizado en las bacterias entéricas *E. coli* y *S. typhimurium*, por lo que la presente introducción incluye los datos obtenidos para estos organismos; sin embargo, la estructura



general y el funcionamiento del flagelo se encuentran altamente conservados en el reino procarionte.

Estructuralmente, el flagelo está constituido por un gran número de proteínas denominadas “Flg”, “Flh”, “Fli”, “Flj” y “Mot”. La asignación de las letras depende de la localización cromosomal de los genes que las codifican.

El flagelo se puede dividir en tres segmentos principales que se distinguen claramente al microscopio electrónico (*Figura 2*). Este diseño básico: filamento, gancho y cuerpo basal varía muy poco y se conserva en especies tan distantes como arqueobacterias, espiroquetas y eubacterias Gram (-) y Gram (+).

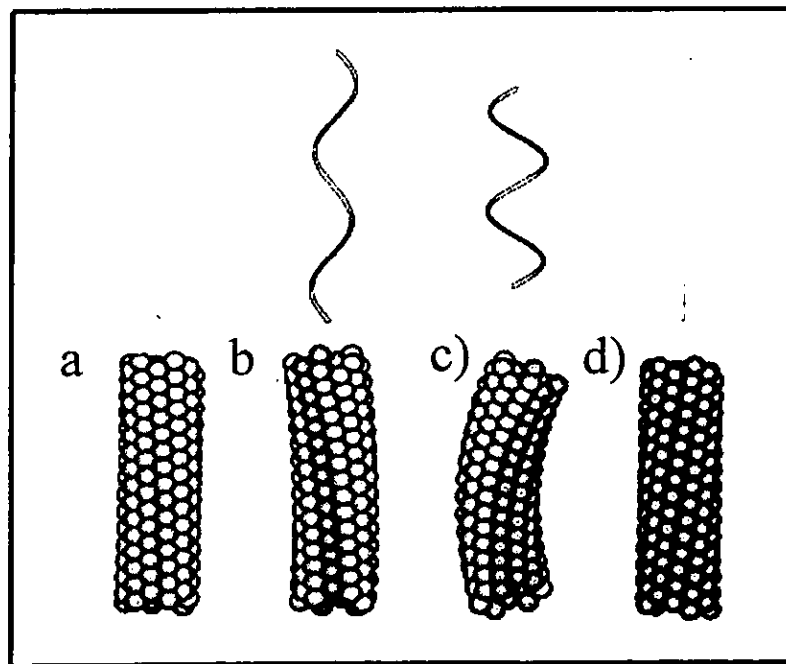


**Figura 2.** a) Esquema del flagelo bacteriano (Namba y Vonderviszt, 1997) b) Fotografía al microscopio electrónico del flagelo de *Salmonella typhimurium* que muestra el filamento, el gancho (delimitado por dos flechas) y el cuerpo basal (anillo MS, eje y anillos L y P) tomada de Macnab, 1987a. c) Fotografía al microscopio electrónico del flagelo de *S. typhimurium* en la que se muestra un cuerpo basal que incluye el anillo C tomada de Khan y cols., 1992. Las barras corresponden a 100 nm

a) **El Filamento.** Esta es una estructura helicoidal de localización extracelular, que constituye el componente propulsor del flagelo que genera el trabajo hidrodinámico en el

medio. Esta propela es una estructura rígida (aproximadamente 2 órdenes de magnitud más dura que la actina), que varía entre 5 y 15  $\mu\text{m}$  de longitud, con 0.023  $\mu\text{m}$  de diámetro. Es un homopolímero constituido por miles de subunidades de la proteína denominada flagelina (FliC), por lo que representa el componente mayoritario del flagelo en términos de masa y por lo tanto, de alto costo biosintético (Macnab, 1996; Namba y Vonderviszt, 1997). El diseño estructural del filamento no implica la simple unión de moléculas iguales de forma regular, cuya consecuencia inevitable sería la generación de una estructura tubular. Por el contrario, las subunidades de flagelina se organizan de manera no equivalente formando una hélice izquierda, lo que permite que la fuerza rotacional o torca se convierta en una fuerza de traslación que genere un “empuje mecánico”.

¿Cómo un monómero puede generar polímeros con estructura helicoidal? La respuesta es que los monómeros pueden polimerizar en una de dos diferentes conformaciones (L o R), lo que produce que una hebra (o protofilamento) sea más larga que otra (Trachtenberg y DeRosier, 1987) (*Figura 3*).



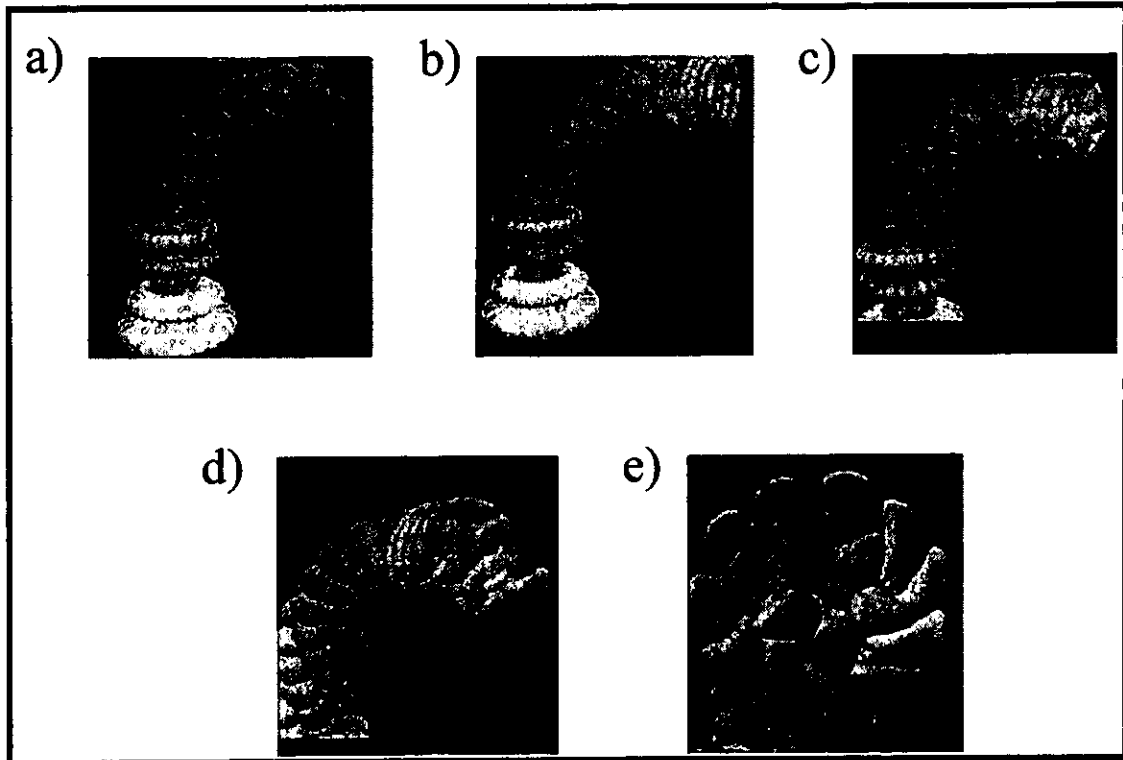
**Figura 3.** Formas polimórficas del filamento. En la parte superior se muestra la morfología de los filamentos y en la inferior el ordenamiento de las subunidades de flagelina en un determinado segmento. a) Filamento recto con la conformación de la flagelina tipo L b) Filamento normal, hélice izquierda c) Filamento rizado que resulta del aumento de protofilamentos en estado R d) Filamento recto con la conformación de la flagelina tipo R (tomada de Namba y Vonderviszt, 1997).

Es decir, el filamento presenta polimorfismo, lo que implica que se pueden generar una gran variedad de formas helicoidales, las cuales se han podido observar al modificar las condiciones físicas del medio como el pH o la fuerza iónica. Para formar el filamento se ensamblan 5.5 subunidades de flagelina por vuelta, lo que da lugar a 11 protofilamentos casi paralelos al eje del filamento. Estas hebras o protofilamentos difieren entre ellas, existiendo una distancia entre subunidades menor de un lado del filamento que del otro; y es esta variación de longitud la que introduce la helicoidalidad macroscópica indispensable para su función como propela. Cuando todas las subunidades presentan una misma conformación, la morfología del filamento es recta (*Figura 3* a y d). Por otro lado, si algunos de los protofilamentos se encuentran en la conformación alterna, habrá una menor distancia entre subunidades, lo que generará una curvatura que resulta en una forma superenrollada (*Figura 3* c). La *Figura 3* b representa la estructura normal de una hélice izquierda en *S. typhimurium*, es la forma más estable en condiciones fisiológicas y la que se utiliza en la propulsión (Namba y Vonderviszt, 1997). La estructura de filamentos rectos ha sido resuelta por criomicroscopía electrónica y reconstrucción de imágenes a una resolución de  $\sim 10 \text{ \AA}$  y se ha podido delimitar la presencia de un conducto central con un diámetro de  $\sim 30 \text{ \AA}$  (Yamashita y cols., 1998).

La flagelina es una proteína de tres dominios (Namba y cols., 1989). Los extremos amino y carboxilo terminales están conservados entre diferentes especies y son los responsables de las interacciones cuaternarias de las subunidades; se localizan hacia la parte interna del filamento. Por su parte, el dominio central es variable y no tiene un papel estructural; de hecho, puede ser eliminado sin que se afecte el ensamblaje o la función (Ku wajima, 1988). Este dominio se proyecta hacia afuera del filamento y contiene todos los potentes epítopes antigénicos. El filamento es también importante en la medicina, debido a su potencia y variabilidad antigénica (Macnab, 1996).

b) **El Gancho.** Esta es una estructura flexible de acoplamiento y de localización extracelular, que conecta el filamento con el motor celular (*Figura 2*). La flexibilidad de dicho conector universal permite que se transmita la fuerza de rotación al filamento en un amplio intervalo de direcciones. El gancho es estructuralmente similar al filamento, siendo un homopolímero compuesto por 120 a 130 copias de la proteína denominada FlgE (o proteína del gancho) que se ensambla de forma helicoidal, siguiendo el mismo patrón de 11 protofilamentos antes descrito (*Figura 4* a) (Morgan y cols., 1993). La proteína del gancho

tiene la capacidad de autoensamblarse *in vitro* (Kato y cols., 1982) y los ganchos resultantes muestran transiciones polimórficas al variar las condiciones experimentales (Kato y cols., 1984). Este polímero presenta también un conducto central a la estructura con un diámetro de 25Å (Morgan y cols., 1993). A diferencia del filamento, esta estructura presenta una longitud bien determinada, siendo en *S. typhimurium* de  $55 \pm 6$  nm (Hirano y cols., 1994).



**Figura 4.** a) Modelo teórico que representa el ensamblaje de las subunidades de la proteína FigE b) Incorporación de las proteínas HAP1 y HAP3 en la parte distal del gancho c y d) Incorporación de la proteína HAP2 e) Conformación final de la proteína FliD (HAP2) junto con las subunidades de flagelina en el extremo distal del filamento (Namba y Vonderviszt, 1997).

A pesar de que el gancho y el filamento están estructuralmente relacionados, las propiedades mecánicas de ambos son diferentes, por lo que existen entre éstos, proteínas que funcionan como adaptadores de unión, denominadas HAPs (del inglés *hook associated proteins*) o proteínas asociadas al gancho (ver [Figura 2](#) y [Figura 4](#) b). Esta zona de amortiguamiento entre el gancho (flexible) y el filamento (rígido), está formada por las proteínas: HAP1 (FlgK) y HAP3 (FlgL), que se identificaron originalmente como componentes minoritarios en preparaciones de gancho (Ikeda y cols., 1987). La importancia de este segmento se puso de manifiesto al generar mutantes en la proteína HAP3 con las

que se demostró que la capacidad del filamento para resistir el estrés mecánico, depende de la proteína a la que éste se encuentra anclado en su base (FlgL) (Fahrner y cols., 1994).

La proteína HAP2 (FliD) se localiza en la parte distal del flagelo y funciona como una tapa del filamento denominada proteína de coronamiento, la cual se requiere para el correcto ensamblaje de los monómeros de flagelina. Sin esta proteína, las subunidades no polimerizan, sino que se liberan en forma soluble al medio extracelular (Homma y cols., 1984; Homma y cols., 1986). Aproximadamente 10 moléculas de FliD se autoensamblan *in vitro* en una simetría pentagonal en forma de estrella (*Figura 4* c, d, e). Se ha postulado que HAP2 pudiera ser una chaperona que induce en la flagelina los cambios conformacionales necesarios para polimerizar, o bien simplemente una tapa que previene que las subunidades escapen hasta que asuman su conformación adecuada (Ikeda y cols., 1996).

c) **El Cuerpo Basal.** Es un complejo multiproteico embebido en la membrana celular y que contiene el motor flagelar. Esta estructura consiste en un eje central y 4 complejos en forma de anillos (*Figura 2* a y b). El anillo MS, junto con la parte proximal del eje, está formado por subunidades de la proteína FliF (Ueno y cols., 1992); se encuentra localizado en la membrana citoplásmica y se ha propuesto que constituye parte del rotor del motor flagelar. Funciona como una estructura de montaje de los componentes esenciales para la generación de la torca. Los anillos externos P (proteína FlgI) y L (proteína FlgH), se encuentran localizados en el mismo plano de la capa de peptidoglicano y de la membrana externa de lipopolisacáridos, respectivamente, formando un cilindro que genera un espacio que permite a la estructura del eje rotar libremente evitando la fricción (DePamphilis y Adler, 1971). Dicha función de rodamiento o forro, mantiene al eje en su lugar y le permite penetrar la pared celular. Los organismos Gram (+) carecen de este par de anillos ya que no presentan membrana externa. Existe otra proteína denominada FlgA que se requiere para que se lleve a cabo el ensamblaje de las subunidades que conforman el anillo P (Kutsukake y cols., 1994).

El eje está formado por varias subunidades de cuatro diferentes proteínas: FlgB, FlgC y FlgF en su porción proximal y la parte distal está compuesta por subunidades de FlgG (Homma y cols., 1990). Esta estructura funciona como una flecha conductora que se une al rotor y que se encarga de transmitir la torca, generada por el motor, hacia las estructuras extracelulares: gancho y filamento. Por lo tanto, el anillo MS, el eje, el gancho y el filamento constituyen una sola unidad rotatoria, mientras el par de anillos L y P forman

la parte estacionaria (Macnab, 1996). La proteína FliE forma parte del cuerpo basal, aunque su localización precisa se desconoce. Se cree que puede funcionar como un adaptador estructural entre el anillo MS (con simetría anular) y el eje (que se supone tiene una simetría helicoidal) (Müller y cols., 1992). Recientemente se describió la función de la proteína FlgJ, que presenta una actividad enzimática de muramidasa y se encarga de hidrolizar la capa de peptidoglicano para permitir el paso del eje hacia el espacio periplásmico (Nambu y cols., 1999).

En la Tabla 1 (localizada al final de la introducción), se resume la localización celular y la función de las proteínas flagelares que se van describiendo en el texto.

### *Motor flagelar*

Existen dos proteínas necesarias para la rotación del motor, **MotA** y **MotB** (Armstrong y Adler, 1967), que se localizan en la membrana celular rodeando al anillo MS. La supresión de cualquiera de los genes *mot* da lugar a un fenotipo paralizado, es decir, se sintetiza el flagelo, pero no rota. MotB presenta un solo cruce transmembranal (Chun y Parkinson, 1988) y su dominio periplásmico se une a la capa de peptidoglicano; debido a esto, se le ha asignado una función de anclaje o elemento estator del motor flagelar. Por su parte, MotA presenta cuatro cruces transmembranales, dos asas periplásmicas y un dominio citoplásmico (Dean y cols., 1984). Esta proteína, junto con MotB, forma el canal de protones que permite el acoplamiento entre el gradiente electroquímico y la rotación (Blair y Berg, 1990; Garza y cols., 1995). Hay varias evidencias que sugieren que estas proteínas están asociadas en un complejo, por lo que MotA también forma parte del estator. A su vez, se ha visto que ambas son necesarias para la conducción de protones del espacio periplásmico al citoplasma (Stolz y Berg, 1991).

Por otra parte, dicho motor tiene la capacidad de rotar en dos direcciones: a favor de las manecillas del reloj (CW) y en la dirección contraria (CCW). Las proteínas responsables del cambio de dirección en la rotación flagelar (FliG, FliM y FliN), forman parte de un complejo denominado el “interruptor” (**switch**). Se ha demostrado que las mutaciones en los genes *fliG*, *fliM* y *fliN* pueden dar lugar a diferentes fenotipos: no flagelado (Fla<sup>-</sup>), paralizado (Mot<sup>-</sup>) o quimiotáctico (Che<sup>-</sup>), este último presentando una rotación del motor preferencial o dirigida ya sea en sentido CW o CCW (Irikura y cols., 1993). Por lo tanto,

estas 3 proteínas tienen múltiples funciones: son esenciales para el ensamblaje flagelar, controlan el cambio de dirección de rotación del motor, principalmente FliM (Sockett y cols., 1992) y participan en la generación de la torca (principalmente FliG que interactúa tanto con el anillo MS como con MotA). En *S. typhimurium* se aisló una mutante en la que la proteína FliG se encuentra traduccionalmente fusionada a FliF (anillo MS). Dicha mutante es móvil, lo que implica que estas proteínas funcionan en asociación cercana; de hecho, la proteína FliG ha sido localizada en la cara citoplásmica del anillo MS (Francis y cols., 1992), formando también parte del rotor.

El conocimiento de la estructura flagelar ha tenido un progreso considerable en los últimos años gracias al desarrollo de nuevos procedimientos de purificación, así como a los avances en las técnicas de microscopía electrónica y de reconstrucción de imágenes. Debido a esto, se han podido identificar otros importantes componentes del cuerpo basal que se localizan en el citoplasma. Hasta hace algunos años, utilizando métodos más delicados para la purificación del cuerpo basal, se logró identificar una estructura en forma de campana que se proyecta desde el anillo MS hacia el citoplasma (*Figura 2 a*) (Khan y cols., 1992; Francis y cols., 1994). Esta extensión cilíndrica se denominó anillo C o citoplásmico y su estudio inmunológico reveló que está constituido por las tres proteínas mencionadas del motor/interruptor. El cuerpo basal extendido (con anillo C), ha sido purificado y su estructura se muestra en la *Figura 2 c*.

Se han propuesto muchos modelos para explicar el proceso mediante el cual el motor flagelar convierte la fuerza proto-motriz en la generación de torca, varios de ellos se basan en la interacción electrostática de los protones que pasan a través de canales en la membrana con las cargas fijas en la circunferencia del rotor (Berry, 1993; Walz y Caplan, 1998). La producción de la fuerza de rotación involucra interacciones de los componentes del rotor y del estator; las proteínas que participan principalmente en la generación de torca son FliF, FliG, MotA y MotB. Los estudios de mutaciones en la proteína del rotor FliG y la del estator MotA muestran que ambas presentan residuos cargados que son esenciales para que el motor rote, y se demostró también que existe interacción de estos aminoácidos funcionalmente importantes de ambas proteínas (Zhou y cols., 1998). También se han descrito supresores extragénicos de mutaciones en *motB*, que mapean en *fliG*. En conclusión, el motor molecular del flagelo bacteriano, al igual que los motores constituidos

de materiales metálicos, presentan un motivo estructural común basado en que la rotación ocurre entre un rotor y un estator.

Como algunas otras propiedades de este motor rotatorio de interés bioenergético, cabe mencionar la alta eficiencia, que lo hace operar muy cercanamente al equilibrio termodinámico. A su vez, la velocidad de rotación es muy alta, sobrepasa los 100 Hz (~15,000 rpm) y se requiere un número fijo de protones de alrededor de 1000 por cada revolución (Berg, 1995).

### *Aparato de exportación*

Las proteínas axiales del flagelo se sintetizan en el citoplasma, pero deben llegar a sus destinos finales, ya sea la membrana celular o incluso el exterior. Exceptuando las proteínas de los anillos L y P, así como la proteína FlgA, que contienen una secuencia señal en el extremo amino terminal (Jones y cols., 1989; Kutsukake y cols., 1994), las demás proteínas flagelares no presentan esta secuencia líder N-terminal, por lo que no se exportan a través de la vía común Sec, misma que constituye el mecanismo general de secreción de proteínas bacterianas (Pugsley, 1993). Debido a esto, se propuso la existencia de una vía de exportación específica para el flagelo en la que las subunidades proteicas se transportaran por el interior de la estructura misma, difundiendo dentro del conducto hasta su localización distal. Las principales evidencias que apoyan esta idea son las siguientes: a) las proteínas exportadas (del eje, gancho, HAPs y la flagelina entre otras) no poseen un péptido señal, b) se ha demostrado que las subunidades se ensamblan en el extremo distal de la estructura naciente, por lo que otro mecanismo de exportación sería muy complejo, ya que éste implicaría que las subunidades de flagelina recorrieran 10  $\mu\text{m}$  a través del medio sin difundir, y por último, c) la existencia de un conducto central que ha sido identificado por la reconstrucción de imágenes, tanto del gancho como del filamento y que se supone debe existir a su vez en el eje (Macnab, 1996). Como se mencionó anteriormente, las dimensiones de dicho conducto en el gancho y el filamento son entre 25 y 30 Å, por lo que se ha postulado que las subunidades se exportan en una conformación extendida. Son 12 las proteínas que se sabe son secretadas a través de esta vía de exportación flagelar tipo III: FliE, FlgB, FlgC, FlgF, FlgG, FlgE, FlgD, FlgK, FlgL, FliC, FliD y FlgM (Minamino y Macnab, 1999a) (ver *Tabla 1*). Recientemente, se describieron otros dos sustratos de





La proteína FliJ es necesaria para la exportación de cuando menos algunos sustratos como la proteína del gancho (FlgE), y se ha propuesto que puede funcionar como una chaperona citoplásmica, ya que comparte las propiedades generales de otras chaperonas antes descritas (Minamino y Macnab, 1999). A su vez, cabe mencionar que estos polipéptidos muestran una alta similitud con proteínas de otros sistemas de secreción bacteriana como el de exportación de factores de virulencia en bacterias patógenas, conocido como sistema de exportación tipo III (Hueck, 1998).

De las proteínas del aparato exportador, FliI es homóloga a la subunidad catalítica  $\beta$  de la  $F_0F_1$  ATPasa y se ha demostrado que une ATP (Dreyfus y cols., 1993) y que lo hidroliza (Fan y Macnab, 1996). Posteriormente, se demostró que esta ATPasa flagelar interactúa con los principales componentes del flagelo que se exportan como son: la proteína del gancho (FlgE) y la flagelina (FliC) y que dicha interacción incrementa la actividad hidrolítica de la enzima. Por lo tanto, se ha propuesto que el proceso de exportación es activo, siendo la hidrólisis de ATP la que proporciona la energía que requiere el aparato exportador (Silva-Herzog y Dreyfus, 1999).

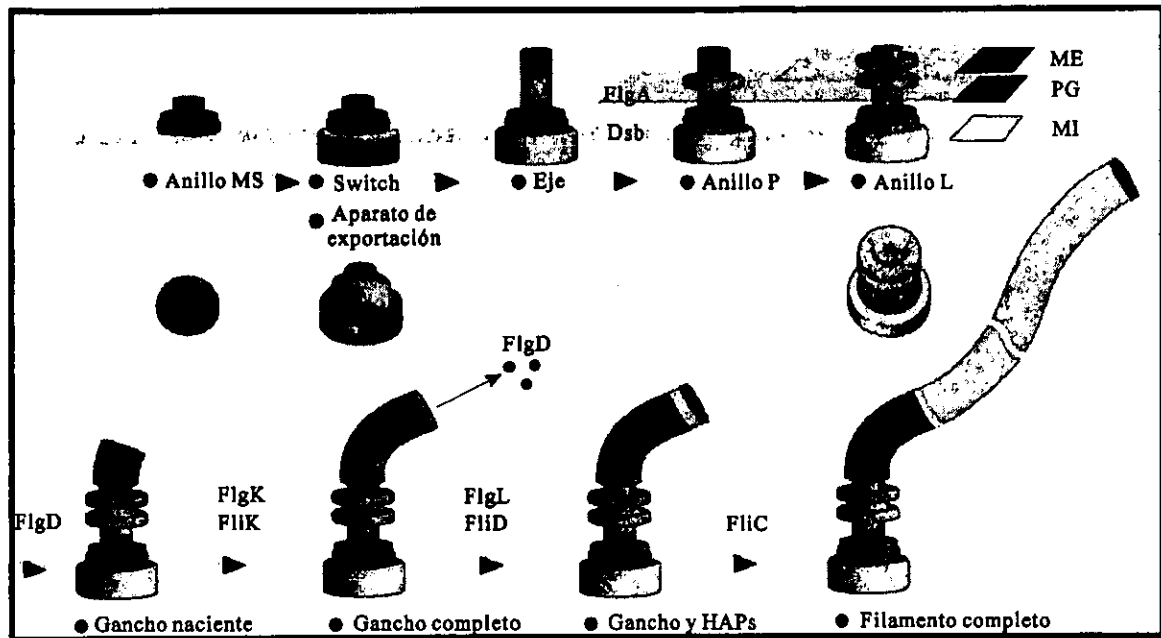
Los estudios recientes están enfocados a la caracterización estructural del aparato exportador y se ha demostrado que existen interacciones entre los componentes identificados, por lo que se sugiere que debe ser un sistema altamente dinámico (Minamino y Macnab, 1999a).

### *Biogénesis flagelar*

Con la generación de una gran cantidad de mutantes en genes flagelares, así como con el aislamiento de las estructuras intermedias que éstas forman y su análisis a través de microscopía electrónica (Kubori y cols., 1992), se logró elucidar la vía morfogenética en la síntesis del flagelo que se muestra en la (*Figura 6*). El ensamblaje procede en una secuencia lineal del extremo proximal al distal y se lleva a cabo con la adición de monómeros y no de estructuras preformadas, como sucede en el caso de los bacteriófagos (Aizawa, 1996).

El ensamblaje de la proteína FliF marca el inicio de la biosíntesis flagelar, este anillo MS es la estructura estable más temprana, se inserta en la membrana citoplásmica y forma el núcleo sobre el que se acoplarán todos los demás componentes que se requieren en

la construcción; sin embargo, se desconoce cómo se determina el número y la localización de el (los) flagelo (s). La siguiente estructura que se puede detectar por microscopía electrónica es el anillo C, formado por el complejo del interruptor (Khan y cols., 1992). En seguida se incorpora el eje que es el primer componente externo a la membrana citoplásmica. Como se mencionó, las diferentes proteínas que constituyen la estructura del eje no presentan un péptido señal, por lo que antes de llegar a este punto del camino biosintético, se requiere ya de la formación y correcta localización de las proteínas que integran el aparato exportador específico del flagelo.



**Figura 6.** Vía de morfogénesis flagelar. La formación del anillo P requiere de la proteína FlgA, así como del sistema de formación de puentes disulfuro. El ensamblaje del gancho requiere de la proteína FlgD que es posteriormente reemplazada por la primera proteína de unión HAP1 (FlgK). FliK determina la correcta longitud del gancho, señal que permite la exportación y ensamblaje de las proteínas tardías (modificada de Aizawa, 1996). ME, membrana externa, PG, capa de peptidoglicano y MI, membrana interna.

Las cuatro proteínas que forman el eje (FlgB, FlgC, FlgF y FlgG) se exportan al espacio periplásmico y deben estar presentes de forma simultánea, pues si falta alguna, el eje no se forma (Kubori y cols., 1992). A su vez, la proteína FliE se requiere para que el eje se ensamble, aunque se desconoce su localización. En este momento actúa la proteína FlgJ, cuya actividad hidrolítica permite que el eje pueda atravesar la pared celular (Nambu y cols., 1999).

A continuación, el gancho comienza a crecer sobre el extremo distal del eje hasta ser obstruido físicamente por la membrana externa. Para sobrepasar dicha barrera, se tienen que ensamblar los anillos L y P que generan un hueco en la membrana por el que pasarán las subunidades de la proteína del gancho (FlgE). Este par de anillos externos se unen a través de un mecanismo desconocido, formando un complejo cilíndrico rígido y muy estable (Akiba y cols., 1991). Como se mencionó, las proteínas FlgH y FlgI, a diferencia de las demás proteínas flagelares que atraviesan la membrana citoplásmica, se exportan a través del sistema general de secreción en el que participan las proteínas Sec. El ensamblaje del anillo P requiere además de la proteína FlgA, que se cree puede funcionar como una chaperona (Kubori y cols., 1992). La formación de este anillo también requiere de la elaboración de un puente disulfuro interno en FlgI, cuya formación está mediada enzimáticamente por el sistema Dsb (siglas del inglés *disulfide bond*); las proteínas DsbA y DsbB se requieren para la formación de puentes disulfuro en varias proteínas de *E. coli* (Dailey y Berg, 1993).

Posteriormente, se continúa construyendo el gancho, cuya formación requiere de la proteína FlgD, que se incorpora en el extremo distal del eje y acompaña el ensamblaje de esta estructura. Este polímero puede autoensamblarse *in vitro*, pero *in vivo* requiere de FlgD que ayuda a que las subunidades se ensamblen correctamente. Sin embargo, FlgD no forma parte de la estructura final del flagelo, sino que es reemplazada por la primera proteína accesoria de unión HAP1 (Ohnishi y cols., 1994). El gancho se alarga hasta un tamaño determinado, siendo la proteína FliK la encargada de regular la longitud de este polímero. Mutaciones en el gen *fliK* generan ganchos de tamaños anormalmente grandes denominados "poliganchos" (Patterson-Delafield y cols., 1973; Susuki e Iino, 1981).

Por último, se exportan las llamadas proteínas tardías: HAPs (FlgK, FlgL, FliD) y la flagelina. Los monómeros de FliC se incorporan en el extremo distal (Iino, 1969) y se autoensamblan *in vitro*, pero *in vivo* se requiere de la proteína FliD. Los extremos terminales de la molécula de flagelina presentan héptadas repetidas de aminoácidos hidrofóbicos, lo cual se presenta también en las otras proteínas axiales del flagelo (eje, gancho, HAPs) y es característico de la formación de  $\alpha$ -hélices "coiled-coils" (Homma y cols., 1990b). A su vez, las regiones terminales de la flagelina monomérica (Vonderviszt y cols., 1989) y del gancho (Vonderviszt y cols., 1992), están desordenadas en cuanto a estructura secundaria se refiere. Estos motivos estructurales que son comunes en las

proteínas axiales son muy importantes en el proceso de biogénesis, ya que determinan las interacciones entre las subunidades.

El límite en la longitud del filamento parece estar definido por una disminución exponencial de la tasa de alargamiento mientras éste crece. De la tasa máxima de crecimiento del filamento *in vivo*,  $0.55 \mu\text{m min}^{-1}$ , se ha estimado que el tiempo requerido para el ensamblaje de una subunidad es de 0.05 s (Iino, 1974).

En cuanto a las proteínas Mot, éstas pueden incorporarse tardíamente cuando el flagelo está ya completo, lo que se ha demostrado en experimentos en los que se controla la inducción de la expresión de los genes *mot* (Block y Berg, 1984).

Para que este proceso biosintético proceda correctamente debe existir un control tanto en el orden de exportación de las diferentes proteínas, como en el número de subunidades a ser secretadas. Una parte de este control se da a nivel de la expresión génica; sin embargo, por mencionar un ejemplo, los genes del eje y del gancho están sujetos al mismo control transcripcional, por lo que debe existir otro mecanismo de regulación. Se ha propuesto que la estructura flagelar naciente es la que determina cuál proteína debe exportarse, sin embargo, aún se desconoce cómo es que el aparato de exportación puede detectar el estado de ensamblaje de la estructura externa del flagelo (Macnab, 1996). Esta es una de las preguntas de mayor interés en el estudio de la biogénesis del flagelo.

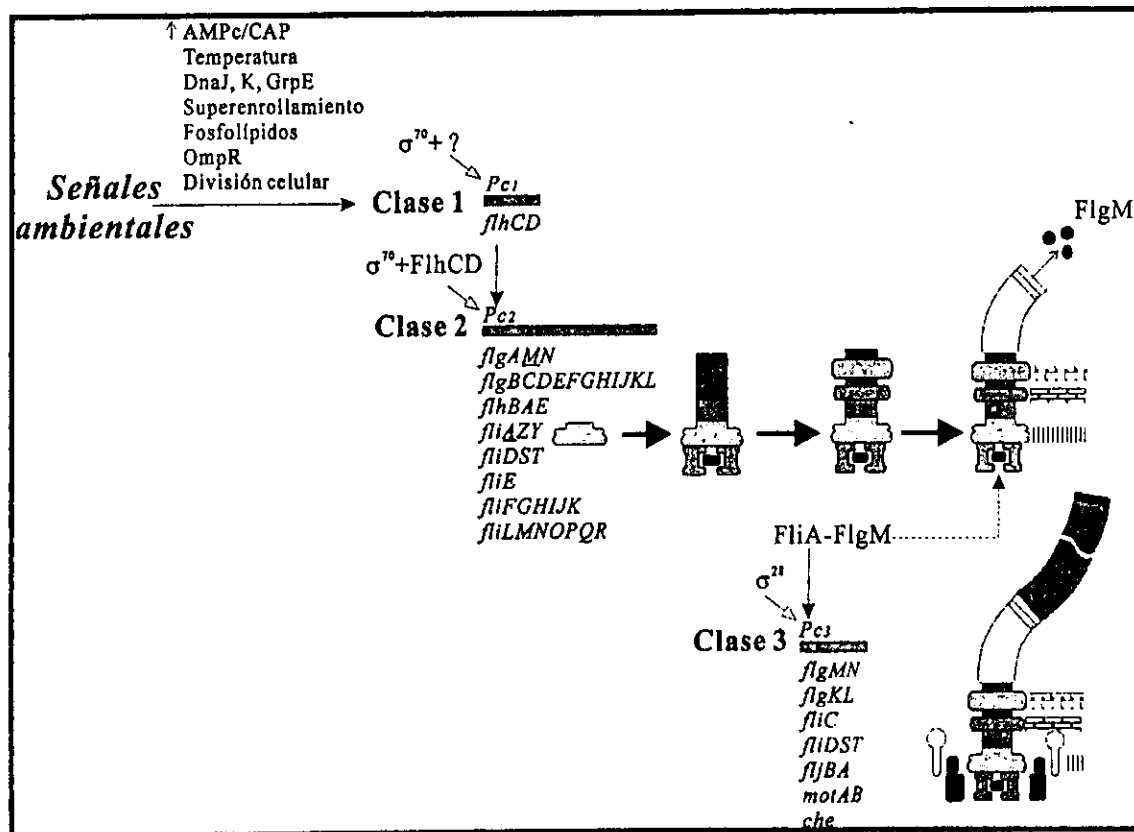
Durante esta vía de morfogénesis flagelar existen varios puntos de regulación; uno de ellos implica a la proteína Flk (Karlinsky y cols., 1997) que actúa durante el ensamblaje de los anillos L y P (ver más adelante) y otro punto de control lo determina el alargamiento del gancho. Como se verá en la siguiente sección, cuando la formación del gancho se completa, existe una señal que llega al aparato de exportación, el cual cambia su especificidad favoreciendo la exportación de las proteínas tardías (Kutsukake y cols., 1994b).

### *Regulación genética: el regulón flagelar*

Debido a la complejidad estructural y funcional del flagelo, existen más de 50 genes que participan en los diferentes procesos de ensamblaje, estructura, regulación, función (rotación flagelar) y taxis (recepción y transducción sensorial). La complejidad de este sistema se pone de manifiesto si se le compara con el sistema ribosomal bacteriano, que es

el único que contiene un mayor número de genes. En *S. typhimurium* los genes se encuentran agrupados en diferentes regiones del cromosoma constituyendo 13 diferentes operones (Kutsukake y cols., 1988).

La biosíntesis del flagelo es un proceso de alto costo energético para la célula y es por esto que existe un estricto control de la expresión de los genes flagelares, principalmente a nivel transcripcional. Esta regulación de la expresión génica se encuentra estrechamente acoplada con el proceso de la morfogénesis flagelar (*Figura 7*) (Losick y Shapiro, 1993).



**Figura 7.** Jerarquía transcripcional del regulón de *E. coli* y *S. typhimurium*, que muestra el acoplamiento entre expresión génica y ensamblaje flagelar a través del sistema FliA/FlgM. La expresión de los genes clase 1 está regulada por diversas señales ambientales. La transcripción de los genes de la clase 2, requiere de los productos de la clase 1, y la expresión de los genes clase 3, depende tanto de la clase 1 como de la 2 (tomada de Daughdrill y cols., 1997).

Los genes, organizados en operones, forman un sistema de expresión coordinada, denominado regulón, en el que la jerarquía transcripcional se representa en 3 clases (Macnab, 1992).

**Clase 1.** Contiene los genes del denominado operón maestro (*flhC-flhD*), que constituye el extremo superior de la jerarquía reguladora, y es el responsable de la expresión de todos los genes flagelares. Los productos de los dos genes de este operón forman un complejo heteromultimérico que funciona como activador transcripcional, dirigiendo la transcripción de los promotores de los genes de la clase 2 a través de una ARN polimerasa dependiente del factor  $\sigma^{70}$  (Liu y Matsumura, 1994). Esto explica por qué las proteínas FlhC y FlhD son indispensables para la biosíntesis flagelar. La expresión de los genes clase 1 está regulada por diferentes señales globales como la temperatura, el grado de superenrollamiento del ADN, los fosfolípidos, el producto génico OmpR (que responde a cambios en la osmolaridad), DnaJ, K, GrpE (que responden al choque térmico), la división celular, así como por represión catabólica a través de los niveles de AMPc (ver *Figura 7*). Para ejemplificar la importancia de este tipo de regulación, si la concentración de glucosa es alta, lo que indicaría un ambiente nutritivo, disminuyen los niveles de AMPc, por lo que el operón maestro no se expresa (Komeda y cols., 1975). Es decir, si la movilidad no se requiere, no se sintetizan las 20,000 subunidades de flagelina que se necesitan para construir el filamento (que representan aproximadamente el 8% de la proteína celular total).

**Clase 2.** Contiene los genes que codifican para las proteínas que forman el gancho y el cuerpo basal, además de dos genes reguladores: *fliA* y *flgM*. El gen *fliA* codifica para un factor de transcripción alternativo,  $\sigma^{28}$ , el cual dirige la transcripción de los genes de la clase 3 (Ohnishi y cols., 1990); mientras que el gen *flgM* codifica para un factor anti-sigma<sup>28</sup> (Ohnishi y cols., 1992). Los operones de la clase 2 tienen una secuencia promotora consenso en la región -10, que es específica del flagelo (Kutsukake y cols., 1990), pero carecen de una secuencia -35 conservada.

Son diversos los procesos celulares que se encuentran controlados por factores sigma alternos, que permiten la expresión diferencial de un conjunto de genes en particular; sin embargo, este tipo de expresión génica específica, genera el problema de eliminar o inactivar un factor sigma alternativo cuya función ya no sea necesaria. Recientemente, el concepto de factor anti-sigma surge como parte de un mecanismo general de regulación transcripcional en los sistemas procariontes (Brown y Hughes, 1995). Existen varios factores anti- $\sigma$  caracterizados como el AsiA del bacteriófago T4 que inhibe a  $\sigma^{70}$  de *E. coli*,

SpoIIAB que inhibe los factores  $\sigma^F$  y  $\sigma^G$  específicos de la esporulación en *Bacillus subtilis* y DnaK un regulador general de la respuesta a choque calórico, que inhibe al factor  $\sigma^{32}$ . Esto indica la variedad de los procesos celulares que están regulados por factores anti- $\sigma$ ; entre otros, la esporulación, la respuesta a estrés, la producción de pigmento, el transporte iónico, la virulencia, la biosíntesis flagelar, etc. (Hughes y Mathee, 1998).

En el sistema flagelar, el factor anti-sigma FlgM presente tanto en bacterias Gram (-) como Gram (+), regula negativamente la transcripción de los genes clase 3 uniéndose al factor sigma FliA, previniendo así que éste se asocie con la ARN polimerasa (Ohnishi y cols., 1992; Kutsukake y cols., 1994c), o que se una directamente a un promotor clase 3 (Kutsukake e Iino, 1994). La interacción de FliA-FlgM ha sido extensamente caracterizada y se sabe que el estado nativo de FlgM es el de una conformación no plegada que adquiere estructura secundaria al unirse con  $\sigma^{28}$  (Daughdrill y cols., 1997).

**Clase 3.** En ésta se encuentran los genes que codifican para las proteínas tardías que se requieren para la formación del filamento, así como los que codifican para las proteínas involucradas en la quimiotaxis y aquellas necesarias para la rotación del motor. Dentro de esta clase, existen operones cuya expresión depende tanto del operón maestro como del factor sigma FliA (clase 3a) y otros que requieren únicamente de  $\sigma^{28}$  (clase 3b), como la flagelina.

La expresión de los genes se encuentra coordinada con el ensamblaje del flagelo a través del sistema FliA/FlgM. La supresión de cualquiera de los genes de la clase 2 inhibe la expresión de los genes clase 3, o dicho de otra forma, se requiere de la expresión de todos los genes clase 2 para que se expresen los operones clase 3, así como para que se formen el cuerpo basal y el gancho. Es decir, un defecto en la formación de la estructura flagelar en sus inicios, previene la transcripción del gen *fliC* (flagelina) (Komeda, 1986). La respuesta para esta observación fue durante mucho tiempo un enigma, hasta el descubrimiento de que la proteína FlgM se exporta (Hughes y cols., 1993; Kutsukake, 1994). La vía de exportación específica del flagelo fue adoptada por FlgM para eliminarse de la célula, liberando así a FliA, que puede entonces unirse a los promotores de la clase 3. Este factor anti-sigma se expelle al medio de cultivo en un estado del ensamblaje en particular, cuando concluye la biosíntesis del gancho (ver *Figura 7*). De esta forma, si cualquiera de los genes del gancho y el cuerpo basal es defectuoso, FlgM se queda dentro de la célula inhibiendo a  $\sigma^{28}$ ; mecanismo que evita que la célula desperdicie su energía en



la síntesis de flagelina bajo condiciones en las que ésta no se pueda exportar y/o ensamblar (Brown y Hughes, 1995).

Otro tipo de regulación se da durante el ensamblaje de los anillos L y P (Karlinsky y cols., 1997). La formación de estos anillos externos se encuentra acoplada con la traducción de FlgM, a través de la proteína reguladora Flk. Al detectar el ensamblaje de dichos anillos, Flk inhibe la traducción del ARN mensajero de FlgM, a través de un mecanismo desconocido. Esto incrementa la tasa  $\sigma^{28}$ /FlgM, que da lugar a una transcripción basal de *fliC* (flagelina) mientras el gancho se alarga. Una vez que el gancho se completa, FlgM sale de la célula, permitiendo así la síntesis de la flagelina en su totalidad (Karlinsky y cols., 1998). De esta forma, la regulación de la expresión de los genes flagelares puede ser a nivel traduccional, pero de forma más significativa, a nivel de inicio de la transcripción, estando esto acoplado estrechamente con el proceso biosintético.

### *FliK y FlhB*

Una de las preguntas más interesantes del proceso de biogénesis flagelar es el cómo se regula o determina el tamaño de ciertas estructuras. Con respecto al gancho, se sabe que su longitud es aproximadamente constante con una desviación estándar del 10% (Hirano y cols., 1994). Como se mencionó, se han aislado mutantes que presentan ganchos de tamaños indeterminados (mutantes poligancho) que carecen de filamento, y que por lo tanto son no móviles (Silverman y Simon, 1972; Patterson-Delafield y cols., 1973). El gen *fliK* se identificó como el responsable de generar este fenotipo. A su vez, se han aislado mutaciones supresoras intragénicas en las que permanece el defecto de regulación del tamaño del gancho, pero que son capaces de ensamblar los filamentos en la punta de los poliganchos. Esto indica que FliK tiene una doble función: regular la correcta longitud del gancho y permitir el ensamblaje de la flagelina (Suzuki e Iino, 1981). Posteriormente, se identificaron mutaciones supresoras extragénicas, las cuales generan el mismo fenotipo y mapean en el gen *flhB* (Hirano y cols., 1994; Kutsukake y cols., 1994b). Estas mutantes seudorevertantes tanto intra como extragénicas dan lugar a un fenotipo denominado poligancho-filamento.

FlhB es una proteína integral de membrana cuyo dominio C-terminal se extiende hacia el citoplasma (Minamino y cols., 1994). Forma parte del aparato exportador

(Minamino y Macnab, 1999) y es la proteína responsable del cambio de especificidad en la exportación de los sustratos eje-gancho a los de HAPs-filamento.

La secuencia deducida de aminoácidos de FliK de *S. typhimurium* y *E. coli*, indica que la proteína consta de dos diferentes dominios separados por una región central rica en residuos de prolina. La región carboxilo terminal es la más conservada e importante para la función (Kawagishi y cols., 1996). La mayoría de las mutaciones en *fliK* que dan lugar a un fenotipo poligancho son de cambio de marco de lectura, lo que resulta en la remoción del extremo C-terminal de la proteína. El fenotipo poligancho es el fenotipo nulo del gen (Williams y cols., 1996).

En la biogénesis flagelar, cuando el gancho alcanza su tamaño final, el sistema debe ser capaz de enviar una señal al aparato de exportación para que se detenga la secreción de FlgE, e inicie la del factor anti-sigma FlgM. Esto permite que en el citoplasma se puedan expresar los operones clase 3 y se sintetice el filamento. Sin embargo, las mutantes poligancho no exportan FlgM, por lo que la transcripción de los genes clase 3 permanece inhibida (Kutsukake y cols., 1994b). Debido a esto, se propuso la existencia de una maquinaria encargada del cambio en la especificidad de los sustratos que se exportan. En este modelo se postula que la proteína FlhB regula negativamente la exportación de FlgM antes de que se complete el ensamblaje del gancho, y que al alcanzar éste su tamaño normal, FliK interactúa con FlhB, la cual cambia la especificidad en la exportación, es decir, detiene la salida de FlgE y permite la de FlgM (Kutsukake, 1997). Un modelo muy similar a éste se propuso al analizar mutantes supresoras de *fliK* (Williams y cols., 1996). De acuerdo con estas hipótesis, la proteína FlhB supresora de *fliK* debe ser incapaz de inhibir la exportación de FlgM aún en ausencia de gancho correctamente ensamblado, y es por esto que el filamento puede polimerizar sobre el poligancho.

A diferencia de lo que predice este modelo de "cambio en la especificidad de exportación", una doble mutante *flgE flhB* fue incapaz de exportar FlgM, por lo que se propuso la existencia de un factor adicional que respondiera a la finalización del ensamblaje del gancho permitiendo la exportación de FlgM. Posteriormente se identificaron mutantes en dicho factor y el gen se denominó *rflH* (Kutsukake, 1997). La mutación *rflH* permite que las mutantes *flgE* puedan liberar FlgM al medio, sólo en cepas que tienen mutaciones en *flhB*. Debido a esto, se propone un modelo alternativo en el que tanto FlhB como RflH inhiben la exportación de FlgM a través del cuerpo basal si el gancho no se ha

ensamblado. La proteína RflH también fue identificada por otro grupo durante el mismo año y se nombró Flk (Karlinsky y cols., 1997). Estos autores también sugieren que Flk participa en la transición de la exportación de subunidades del gancho a la de proteínas clase 3.

La pregunta que queda sin respuesta es cómo el sistema percibe que el gancho ha llegado a su tamaño final y cómo esta señal se transmite al interior celular. La proteína FliK no ha sido detectada en la estructura del flagelo y la información del estado de ensamblaje del gancho la puede recibir de forma directa o a través de otra proteína. Recientemente se demostró que FliK requiere ser exportada para ejercer su función; sin embargo, aún no se comprende el mecanismo mediante el cual actúa esta proteína (Minamino y cols., 1999).

Todo este sistema de biogénesis flagelar altamente regulado tiene como fin último conferirle a la bacteria la capacidad de desplazamiento hacia ambientes más propicios.

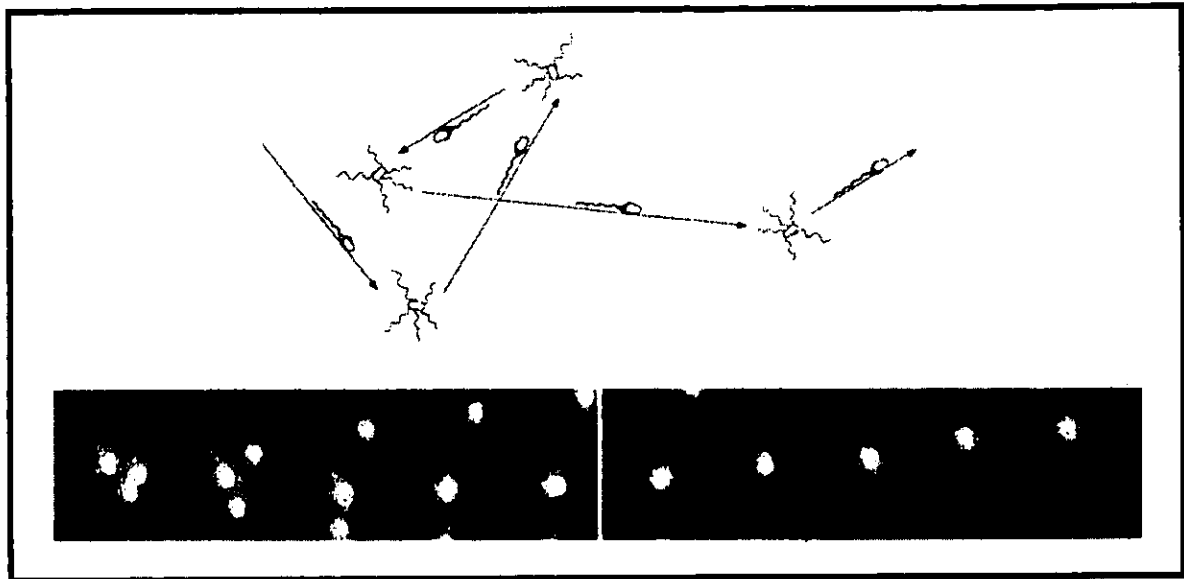
### *Quimiotaxis*

#### ◆ El nado

Las bacterias se mueven a través de una serie de desplazamientos continuos, interrumpidos por períodos de reorientación. En especies multiflageladas como *E. coli* y *S. typhimurium*, el nado es el resultado de la rotación de cada flagelo y se produce cuando los filamentos rotan en contra de las manecillas del reloj (CCW); la reorientación se produce por una rotación de los filamentos a favor de las manecillas del reloj (CW) (Macnab, 1987; Jones y Aizawa, 1991).

Debido a que el flagelo es una hélice izquierda, cuando los filamentos rotan en dirección CCW, se genera una fuerza de propulsión. Los filamentos se ordenan en una trenza unitaria que sirve como propela a la célula, produciéndose el nado en una trayectoria relativamente lineal (Macnab, 1977). Este conjunto de filamentos logra impulsar a la bacteria a velocidades de hasta 40  $\mu\text{m/s}$ , lo que equivale aproximadamente a 20 cuerpos celulares por segundo. Sin embargo, al rotar los filamentos en sentido CW, existen en éstos transiciones polimórficas que deshacen la trenza, llevando a la célula a presentar movimientos al azar en los que se reorienta sin que exista desplazamiento (movimiento de tumbos)(*Figura 8*) (Berg y Brown, 1972).

En la rotación CW, cada filamento trabaja de forma no coordinada, generándose fuerzas en diferentes direcciones, por lo que no hay una velocidad neta. Por lo tanto, ya que la dirección de la rotación flagelar determina si la célula avanza o se reorienta, la frecuencia de cambio de dicha rotación es la base de la respuesta táctica (Larsen y cols., 1974).



**Figura 8.** Rotación bidireccional de los flagelos de *E. coli* y *S. typhimurium*. En la parte superior se muestra un diagrama esquemático de un patrón de nado, y en la zona inferior, una serie de micrografías de campo oscuro de una bacteria nadando y reorientándose. Durante el nado, cuando los flagelos rotan en sentido CCW, se forma la trenza propulsiva. En los periodos de reorientación, cuando los flagelos rotan en sentido CW, la trenza se deshace y el cuerpo celular se reorienta (tomada de Namba y Vonderviszt, 1997).

En el siglo XVII Leeuwenhoek observó al microscopio organismos en movimiento (Armitage, 1992), pero no fue sino hasta finales del siglo XIX, cuando Engelmann y Pfeffer descubrieron que dicha movilidad se encuentra dirigida. Estos investigadores demostraron la taxis a oxígeno, minerales y nutrientes orgánicos; comprobando que las bacterias en suspensión se acumulaban cerca de una burbuja de aire o de alguna sustancia química introducida en algún punto. A su vez, Julius Adler demostró en 1966, que las bacterias se mueven preferencialmente en la dirección de una mayor concentración de fuentes energéticas como galactosa, glucosa, ácido aspártico, treonina y serina (Adler, 1966). También mostró que algunos de estos quimioefectores ejercen una respuesta sin ser transportados al interior de la célula, implicando así la existencia de receptores (Adler, 1969).

En la actualidad, se sabe que el movimiento bacteriano no es azaroso, sino que responde a diversos estímulos ambientales como luz, oxígeno, pH, temperatura, presión,

osmolaridad, viscosidad, el campo magnético y a la presencia de diferentes compuestos químicos (Armitage, 1992). La respuesta a dichos estímulos se conoce con el nombre general de taxis, lo que permite a la bacteria migrar hacia ambientes más favorables. La quimiotaxis es entonces el proceso mediante el cual las células migran a través de gradientes de concentración de sustancias químicas atrayentes o repelentes. Las dimensiones de una bacteria son tan pequeñas, que no pueden sentir una diferencia de concentración a lo largo de su cuerpo celular, por lo que integran la información temporalmente comparando los estímulos sensoriales pasados con los actuales, en este sentido, se dice que presentan una especie de "memoria" a corto plazo (Macnab y Koshland, 1972; Segall y cols., 1986).

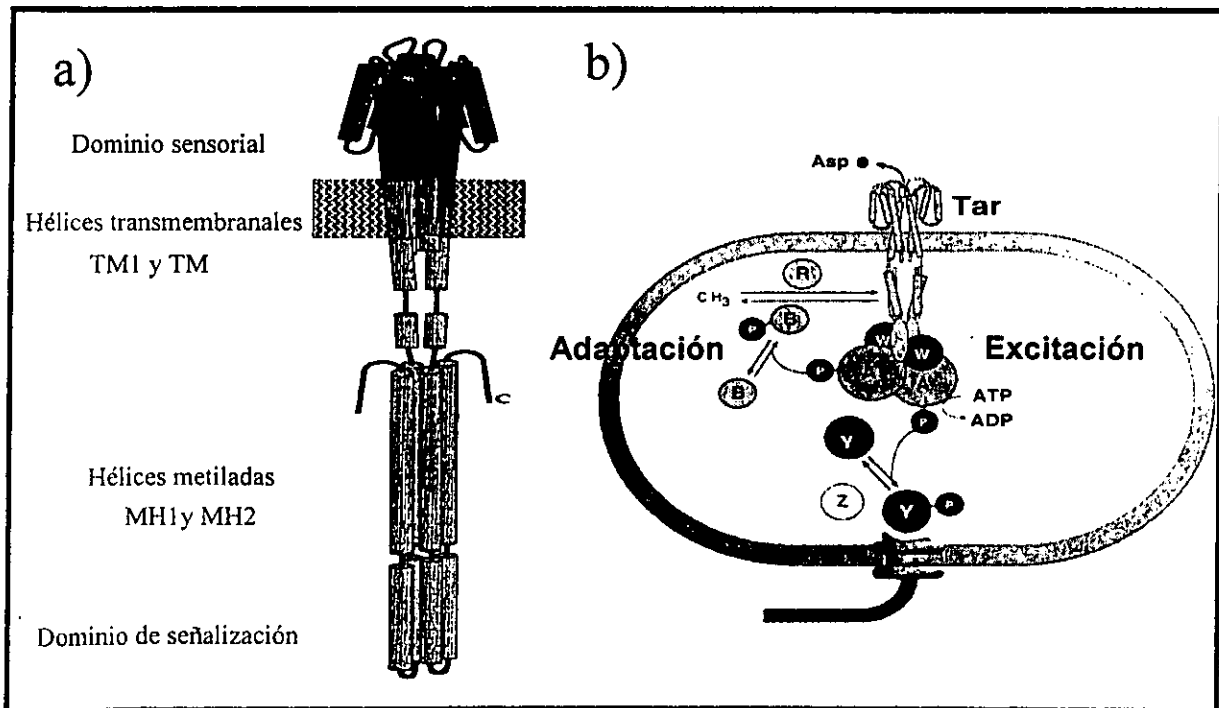
Como se mencionó, la respuesta táctica se basa fundamentalmente en el control de la dirección de la rotación flagelar. Las células no estimuladas alternan entre dos formas de movimiento, el nado en una trayectoria lineal durante aproximadamente un segundo y la reorientación o nado caótico que se da durante una fracción de segundo ( $\sim 0.1$  s) (Berg y Brown, 1972). Sin embargo, si existe un estímulo positivo como una sustancia atrayente, habrá un mayor tiempo de rotación CCW, extendiéndose de esta manera los intervalos de nado y por tanto siendo menos frecuentes los episodios de reorientación; de esta forma se obtiene un desplazamiento neto hacia el ambiente favorable. Por el contrario, en el caso de una sustancia repelente, se incrementa la probabilidad de rotación en sentido CW. Estos cambios en la dirección de rotación del flagelo que producen un determinado comportamiento de nado, se encuentran regulados por un sistema de transducción de señales.

#### ◆ Componentes del sistema de transducción

El sistema de transducción en la quimiotaxis bacteriana, como el de muchos otros sistemas biológicos, se encarga de convertir un estímulo extracelular en una señal intracelular dirigida a producir una respuesta.

Los estímulos ambientales son detectados por receptores homodiméricos que presentan un dominio sensorial periplásmico y un dominio de señalización citoplásmico, unidos a través de 2 regiones hidrofóbicas denominadas TM1 y TM2 formadas por 4  $\alpha$ -hélices transmembranales. El dominio citoplásmico contiene dos hélices de metilación

(Figura 9 a). En *E. coli* y *S. typhimurium* se han identificado 4 y 5 diferentes receptores respectivamente, cada uno con la capacidad de responder a diferentes estímulos y ligandos. Estos se regulan a través de reacciones de metilación, por lo que se han denominado proteínas MCP (proteínas que aceptan grupos metilo) y se encuentran agrupados en los polos de la célula (Parkinson y Blair, 1993). Existen 4 proteínas MCP en *E. coli*: Tar que responde a los atrayentes aspartato y glutamato, funciona también como receptor secundario para maltosa y para los repelentes inorgánicos cobalto y níquel; Tsr, que responde a serina, alanina, glicina y aminoisobutirato; Trg, para ribosa y galactosa y Tap, para dipéptidos. Los quimioefectores se pueden unir directamente al receptor (MCP), o bien a una proteína periplásmica de unión a azúcares, que posteriormente se une al receptor (Stock y Surette, 1996). Por ejemplo, el receptor Trg, sensa la glucosa y la galactosa utilizando como intermediario a la proteína GBP (proteína de unión a glucosa/galactosa) y la ribosa, a través de la proteína periplásmica RBP (de unión a ribosa). Lo mismo sucede en el caso de la maltosa que se une a la proteína MBP para interactuar posteriormente con el receptor Tar (Mowbray y Sandgren, 1998).



**Figura 9.** a) Esquema de la estructura del quimioreceptor Tar (Mikhail y cols., 1998). b) Transducción de la señal quimiotáctica. Eventos que ocurren desde la salida del quimioefector (aspartato) en el receptor, hasta la fosforilación de la proteína que regula la respuesta CheY-P (Y-P), al interactuar con la proteína FliM del "switch" flagelar (Taylor y Zhulin, 1998). Desamidasa y metil esterasa CheB (B), metil transferasa CheR (R), autocinasa de histidina Che A (A), regulador de CheA, CheW (W), fosfatasa de CheY-P, CheZ (Z).

El quimiorreceptor Tar es uno de los más estudiados y su dominio periplásmico o de unión a ligandos ha sido resuelto por cristalografía, tanto en presencia como en ausencia de aspartato, el cual se une en la interfase del dímero (Milburn y cols., 1991). La respuesta es muy eficiente, la unión de muy pocas o incluso una sola molécula de atrayente puede cambiar la dirección de rotación del motor flagelar, lo que implica que hay una gran amplificación posterior de la señal (Block y cols., 1983; Segall y cols., 1986).

La unión del ligando genera un cambio conformacional (desplazamiento de una hélice transmembranal) que se transmite al dominio de señalización en el interior celular, el que a su vez regula las actividades de los componentes transductores solubles (Levit y cols., 1998). Existen seis proteínas citoplásmicas denominadas Che (del inglés *chemotaxis*): CheA, CheW, CheZ, CheR, CheB y CheY, encargadas de transducir la señal desde el receptor hasta el motor flagelar (*Figura 9 b*). Este proceso involucra tanto reacciones de fosforilación como de metilación; CheA, CheW y CheZ regulan el nivel de fosforilación de CheY, que se encarga de interactuar con la proteína FliM del interruptor o “switch” flagelar, modulando las frecuencias de nado y reorientación; mientras que CheR y CheB modulan el grado de metilación del receptor (Blair, 1995; Stock y Surette, 1996; Eisenbach, 1996).

La señal de una disminución en la ocupación del receptor (salida del ligando quimioefector), o bien la presencia de un estímulo repelente, desencadenan el proceso de transducción (Taylor y Zhulin, 1998). En esta vía de excitación, la liberación del aspartato del receptor resulta en la formación de un complejo ternario: Tar-CheW-CheA (dímero de Tar, dímero de CheA y dos monómeros de CheW), que promueve la autofosforilación de CheA, quien a su vez fosforila a CheY en un residuo aspartato (Gegner y cols., 1992). CheY-P interacciona con FliM, lo que induce un cambio en la dirección de rotación del flagelo hacia CW (reorientación celular) (Welch y cols., 1993). Por el contrario, el aumento en la concentración de atrayente disminuye los niveles de CheY-P, por lo que la célula nada (rotación CCW) hacia la condición favorable. La proteína CheZ funciona como una fosfatasa que desfosforila a CheY.

Se han utilizado diferentes enfoques experimentales para investigar los cambios en el receptor Tar asociados con la unión de ligando, sin embargo, éstos son muy sutiles. Recientemente ha adquirido importancia una hipótesis alterna para la señalización

transmembranal que implica el agrupamiento de receptores y la comunicación lateral entre los mismos. Se ha demostrado por microscopía inmunoelectrónica que los receptores se encuentran arreglados en grandes complejos (Maddock y Shapiro, 1993) y el ordenamiento de éstos depende de la formación del complejo ternario con CheA y CheW. De esta forma, se propone que la unión de ligando afecta las interacciones de los receptores. La unión de repelentes promueve la asociación de dímeros de receptores con CheA en una conformación activa, mientras que la unión de atrayente tiene el efecto opuesto (Levit y cols., 1998).

Como se puede ver, este sistema de transducción presenta dos componentes principales: una cinasa de histidinas que se autofosforila (CheA) y una proteína reguladora fosfoactivable (CheY). Este es un mecanismo común en una gran variedad de procesos metabólicos de organismos procariontes y eucariontes, denominado sistema de señalización de dos componentes (Parkinson, 1993).

Por otro lado, para que la célula pueda percibir cambios en los gradientes químicos, se debe adaptar a los niveles existentes de estímulos. Este proceso de adaptación se encuentra asociado a la modificación covalente del receptor a través de metilación. CheR es una metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina que metila al receptor cuando existe atrayente (Springer y cols., 1979) mientras que CheB actúa como una metilesterasa que es activada por fosforilación a través de CheA (ver *Figura 9 b*). La proteína CheB también se encarga de desamidar residuos de glutamina, generando glutamatos que pueden posteriormente aceptar grupos metilo (Kehry y Dahlquist, 1982). La metilación de los receptores promueve un efecto estimulador en CheA, incrementa la tasa de autofosforilación, por lo que se aumenta la señal CW; mientras que la desmetilación tiene el efecto opuesto. Gracias a este sistema, la bacteria es capaz de sentir nuevos estímulos a pesar de haber estado por un determinado tiempo en presencia de ligandos estimuladores, es decir, se habitúa o desensibiliza regresando al comportamiento de nado pre-estímulo (Alon y cols., 1999).

### *El flagelo y la taxis en Rhodobacter sphaeroides*

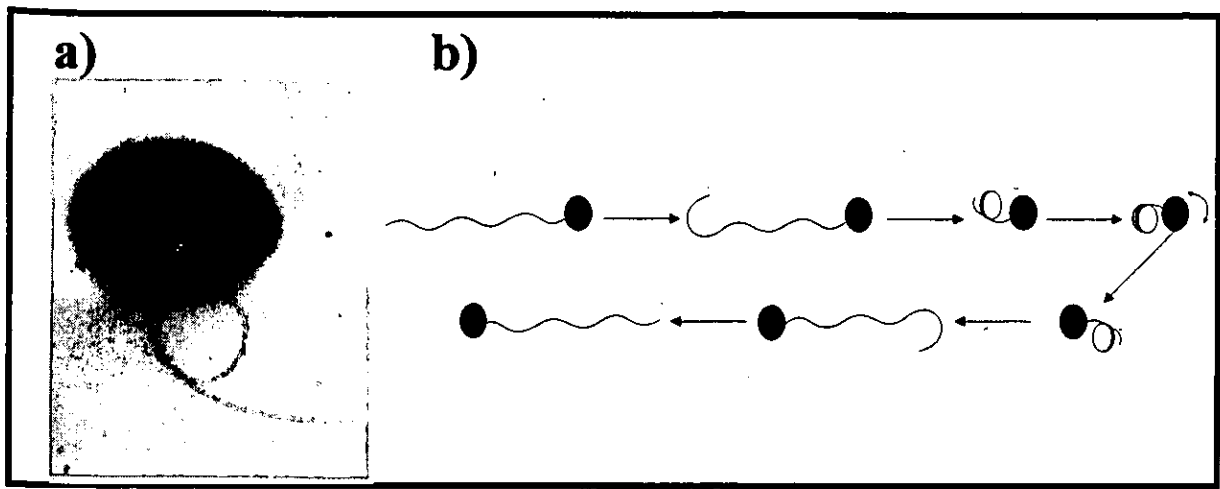
*R. sphaeroides* es una bacteria fototrófica púrpura no sulfurosa perteneciente al subgrupo  $\alpha$  de proteobacterias (Woese y cols., 1984), que es capaz de crecer tanto en



condiciones de anaerobiosis y presencia de luz (fotoheterotróficamente), como en condiciones microaerófilas o aeróbicas en la oscuridad (Pfennig y Truper, 1989). A este subgrupo pertenecen organismos que habitan en muy diferentes ambientes y que presentan una amplia flexibilidad metabólica, como *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Caulobacter* y *Sinorhizobium* (Armitage y Schmitt, 1997). Estos géneros se caracterizan también por presentar un alto contenido de G+C en el ADN, entre 68 y 70%. En particular, el genoma de *R. sphaeroides* consta de 2 cromosomas (3000 y 900 kb), así como de 5 plásmidos endógenos (Suwanto y Kaplan, 1992).

En los años 60 se realizaron los primeros estudios de la estructura del flagelo en bacterias fototróficas; el grupo de Cohen-Bazire aisló y analizó por microscopía electrónica flagelos aislados de *Rhodospirillum rubrum* (Cohen-Bazire y London, 1967). Sin embargo, el estudio de la movilidad en bacterias fotosintéticas no fue a la par del que se realizó en bacterias entéricas, en parte por las dificultades genéticas que estos organismos presentan y en parte porque se supuso que el comportamiento sería el mismo que el descrito para *E. coli*. En 1987, Armitage y Macnab publicaron un trabajo sobre la movilidad de la bacteria monoflagelada *R. sphaeroides*, en el que se demuestra que a pesar de que la estructura básica del flagelo se encuentra conservada, el movimiento y la respuesta a estímulos es completamente diferente (Armitage y Macnab, 1987).

El flagelo de *R. sphaeroides* es de rotación unidireccional, preferencialmente en el sentido de las manecillas del reloj (CW) (Armitage y Macnab, 1987), aunque se han aislado variantes con motores que rotan en sentido CCW (Packer y Armitage, 1993); sin embargo, en cualquiera de los dos casos no ocurre un cambio en la dirección de rotación. El filamento flagelar logra impulsar a la bacteria a grandes velocidades, de hasta  $100 \mu\text{m s}^{-1}$  y los cambios de dirección se dan cuando la rotación se detiene. En este momento, la hélice propulsora se relaja a una forma polimórfica de gran amplitud y longitud de onda corta, la bacteria se reorienta entonces por movimiento Browniano. Se ha observado que esta forma del flagelo, enrollado hacia el cuerpo celular, sigue rotando (aunque lentamente), y que esto contribuye a la reorientación antes de avanzar en una nueva dirección (Armitage y Schmitt, 1997) (*Figura 10*). Esta bacteria muestra también variaciones en la velocidad de nado, incluso bajo condiciones en las que no existe estímulo, acelera y frena cambiando de dirección sin que exista una pausa total (Packer y cols., 1997). La velocidad de nado promedio para *R. sphaeroides* ( $35 \mu\text{m s}^{-1}$ ) es mayor que para *E. coli* ( $20 \mu\text{m s}^{-1}$ ).



**Figura 10.** a) Fotografía al microscopio electrónico de *R. sphaeroides* WS8 en la que se muestra una forma enrollada del flagelo, así como su localización subpolar. b) Esquema que muestra el comportamiento del filamento flagelar durante el nado.

*R. sphaeroides* detecta una gran variedad de estímulos incluyendo, luz, oxígeno, ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares y iones inorgánicos. Todos los quimioatrayentes identificados son metabolitos, lo que concuerda con el hecho de que en esta bacteria se requiere del transporte y metabolismo parcial del quimioefector para obtener una respuesta (Ingham y Armitage, 1987; Poole y cols., 1993). Cabe mencionar que en este organismo no se ha identificado una reacción a repelentes. En esta bacteria también se induce la síntesis del flagelo dependiendo de las condiciones ambientales.

A diferencia de las bacterias entéricas, en las que se altera el cambio de dirección de la rotación en respuesta a diversos estímulos, en este organismo se reduce la frecuencia de paro (o de disminución) de la rotación cuando la bacteria nada en dirección de un gradiente positivo de algún efector táctico. Las células se detienen cuando se quita el atrayente, por lo que *R. sphaeroides* percibe la reducción del efector o la consecuencia metabólica que esto genera (Packer y cols., 1996). Los estudios iniciales para encontrar receptores (MCPs) fueron infructuosos. Anticuerpos policlonales en contra de los receptores Trg y Tar de *E. coli* no dieron señal en *Rhodobacter*. Por otro lado, se realizaron estudios de metilación *in vitro* e *in vivo*, así como de producción de metanol, pero no se pudieron identificar proteínas que se metilaran (Sockett y cols., 1987). Debido a esto, por varios años se consideró que *R. sphaeroides* respondía a los diferentes estímulos de una forma independiente de proteínas MCP, sin embargo, posteriormente se describió un operón quimiotáctico en el que se encontró un gen con homología a la proteína McpA de *Caulobacter crescentus*. Anticuerpos contra la proteína McpA de *C. crescentus* cruzaron

con extractos citoplásmicos de *R. sphaeroides*, indicando la existencia de un receptor citosólico, cuya remoción suprime la quimiotaxis para un amplio intervalo de quimioatrayentes (Ward., y cols., 1995).

Recientemente se identificaron en *R. sphaeroides* los genes *che* homólogos a los de bacterias entéricas: una proteína histidina cinasa (CheA) y dos reguladores de la respuesta (CheY1 y CheY2). Se localizaron también los homólogos de CheW y CheR, proteínas que en bacterias entéricas interactúan con los receptores MCPs (Ward y cols., 1995 b); sin embargo, la proteína CheZ no ha sido identificada. También se clonó un segundo operón con otro grupo de genes quimiotácticos funcionales: *cheA*, *cheW* y *cheR*, así como una tercera copia del gen *cheY* (Hamblin y cols., 1997).

Otro fenómeno descrito para esta bacteria es la quimiocinesis (Brown y cols., 1993). Ciertos quimioatrayentes ocasionan un aumento en la velocidad de nado de hasta 25%, lo que se debe a una más rápida rotación flagelar. Sin embargo, este incremento no conlleva un aumento de la fuerza que dirige la rotación (el gradiente electroquímico de protones  $\Delta p$ ), ni tampoco algún cambio en la tasa de transporte electrónico (Packer y Armitage, 1994). Este efecto sólo se observa para un intervalo limitado de quimioatrayentes, principalmente para ácidos orgánicos y iones como el  $K^+$  y  $Rb^+$ . A diferencia de la quimiotaxis, la quimiocinesis se da también en respuesta a algunos análogos que se transportan pero que no se metabolizan como el malonato. En la quimiocinesis no existe adaptación, las células nadan a mayor velocidad mientras esté presente el efector (Harrison y cols., 1994).

Existen numerosos estudios referentes al sistema quimiotáctico en este organismo, sin embargo, se conoce muy poco sobre la estructura y genética flagelar. La mutagénesis por transposición ha sido utilizada en *R. sphaeroides* para la generación de una mutante paralizada (Armitage y Sockett, 1991), defectuosa en el gen *motB* (Shah y cols., 1995). El gen *motA* fue localizado en la secuencia río arriba formando parte del mismo operón (Shah y Sockett, 1995). Fuera de los genes *che* mencionados, los genes del motor son los únicos reportados para el flagelo de este organismo. En este sentido, nuestro grupo de trabajo se abocó a la identificación, clonación y secuenciación de los genes flagelares de *R. sphaeroides*. Inicialmente se caracterizaron los genes que constituyen el sistema de secreción tipo III en *Rhodobacter* (Ballado y cols., 1996). Actualmente, hemos identificado diferentes operones flagelares que se describen en el presente trabajo.

Por último, en el laboratorio se logró aislar por vez primera un flagelo intacto (que incluye el cuerpo basal) de *R. sphaeroides* WS8 (*Figura 11*) (West y Dreyfus, 1997).



**Figura 11.** Fotografías al microscopio electrónico de flagelos aislados de *R. sphaeroides* WS8.

**Tabla 1.** Proteínas que participan en la biogénesis flagelar y movilidad de *E. coli* y *S. typhimurium* (modificada de Macnab, 1996).

Proteínas estructurales	Localización subcelular	Función
FliF	Membrana celular	Anillo MS del cuerpo basal
FliG	Cara citoplásmica de la membrana celular	Motor/switch, componente del rotor
FliM	Cara citoplásmica de la membrana celular	Motor/switch, blanco para la unión de CheY-P
FliN	Cara citoplásmica de la membrana celular	Motor/switch
MotA	Membrana celular	Rotación del motor, canal de H <sup>+</sup>
MotB	Membrana celular	Rotación del motor, canal de H <sup>+</sup> , anclaje (estator).
FlgB	Periplasma	Eje proximal del cuerpo basal
FlgC	Periplasma	Eje proximal del cuerpo basal
FlgF	Periplasma	Eje proximal del cuerpo basal
FlgG	Periplasma/externo	Eje distal del cuerpo basal
FlgI	Periplasma	Anillo P del cuerpo basal
FlgH	Membrana externa	Anillo L del cuerpo basal

FliE	?	Posible adaptador anillo MS/eje del cuerpo basal
FlgE	Exterior	Proteína estructural del gancho
FlgK	Exterior	HAP1, adaptador estructural gancho-filamento
FlgL	Exterior	HAP3, adaptador estructural gancho-filamento
FliC	Exterior	Flagelina, proteína estructural del filamento
FljB <sub>st</sub>	Exterior	Flagelina, proteína estructural del filamento
FliD	Exterior	HAP2, tapa del filamento; ensamblaje de flagelina
<b>Proteínas que participan en el ensamblaje flagelar</b>		
FliA	Membrana celular	Aparato exportador
FliB	Membrana celular	Aparato exportador; especificidad de sustratos
FliH	Citoplasma	Aparato exportador
FliI	Citoplasma	Aparato exportador
FliJ	Citoplasma	Aparato exportador, chaperona
FliO	Membrana celular	Aparato exportador
FliP	Membrana celular	Aparato exportador
FliQ	Membrana celular	Aparato exportador
FliR	Membrana celular	Aparato exportador
FliS	Citoplasma	Facilita la exportación de la flagelina
FliT	Citoplasma	Chaperona que previene la oligomerización de FliD
FliK	Citoplasma/exterior	Regulación de la longitud del gancho
FlgA	Periplasma	Ensamblaje anillo P
FlgD	Exterior	Ensamblaje del gancho
FlgJ	Periplasma	Muramidasa
FlgN	Citoplasma	Chaperona para la exportación de FlgK y FlgL (HAPs)
<b>Proteínas que participan en el control de la expresión génica</b>		
FliC	Citoplasma	Regulador positivo de la expresión de genes clase 2
FliD	Citoplasma	Regulador positivo de la expresión de genes clase 2
FliA	Citoplasma	Factor $\sigma^{28}$ específico para expresión de genes clase 3
FlgM	Citoplasma/exterior	Factor anti- $\sigma$ , se une a FliA
FljA <sub>st</sub>	Citoplasma	Represor del gen de flagelina
Hin <sub>st</sub>	Citoplasma	Inversión de ADN para regular la expresión de <i>fliC</i>
<b>Proteínas involucradas en la quimiotaxis</b>		
CheZ	Citoplasma	Fosfatasa de CheY
CheY	Citoplasma	Regulador de la respuesta, se une a FliM en el switch
CheB	Citoplasma	Metilesterasa del receptor
CheR	Citoplasma	Metiltransferasa del receptor

CheA		Citoplasma	Fosforila a CheY y CheB
CheW		Citoplasma	Regulador positivo de la fosforilación de CheA
Tap <sub>Ec</sub>		Membrana celular	Quimiorreceptor de dipéptidos
Tar		Membrana celular	Quimiorreceptor de aspartato
<b>Proteínas de función desconocida</b>			
FlhE		?	?

## OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es el estudio del flagelo de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*. Como se mencionó en la introducción, este organismo se mueve de manera "atípica", deteniendo la rotación flagelar. A su vez, presenta un único flagelo con características particulares, como la rotación unidireccional, que lo hacen un modelo interesante de estudio. Este organismo presenta también un sistema complejo de transducción de señales diferente al descrito para las enterobacterias. Es decir, no necesariamente los sistemas que han sido más estudiados son los más representativos dentro del reino procarionte.

Por otra parte, tanto el sistema quimiotáctico, como la respuesta a diversos estímulos, han sido ampliamente estudiados en *R. sphaeroides*; sin embargo, existen muy pocos reportes sobre los genes y la estructura de su flagelo. En este sentido, en el presente estudio nos abocamos a iniciar la caracterización de dicho organelo de movilidad.

El enfoque experimental utilizado fue el de mutagénesis por transposición y selección de las bacterias que fueran incapaces de nadar. El transposón insertado se utilizó posteriormente como sonda para mapear el gen interrumpido. De esta forma, los objetivos planteados fueron la identificación, clonación, secuenciación y caracterización molecular de dos operones flagelares.

De particular interés para nuestro grupo de trabajo es el estudio de la biogénesis flagelar, así como el de la organización y regulación de los genes flagelares. Debido a esto, se estudiaron mutantes no móviles cuyo fenotipo fuera Fla<sup>-</sup>, es decir, aquellas que tuvieran algún defecto en el proceso de biosíntesis del flagelo.

### ♦ *Mutante poligancho (PG)*

En cuanto a la mutante poligancho el objetivo principal consiste en entender el papel de la proteína FliK en la vía de ensamblaje flagelar, que es uno de los puntos de regulación menos entendidos en el proceso morfogenético. Se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Clonación del gen *fliK* y de la región cromosómica en la que éste se localiza
- Secuenciación de *fliK* y los genes aledaños, es decir, la caracterización del operón completo
- Complementación de la mutante PG (restablecimiento del fenotipo silvestre)
- Sobreexpresión de *fliK* en un sistema bacteriano, así como la purificación de la proteína FliK de *R. sphaeroides*
- Estudio sobre la localización y función de la proteína FliK de *S. typhimurium*

♦ *Mutante RsgI*

Con el aislamiento y análisis de una mutante en el anillo P (*flgI*) en *R. sphaeroides* (RsgI), nuestro principal objetivo es el de identificar a los genes que codifican para las proteínas estructurales del flagelo y ver el papel de dichas proteínas en el proceso de biogénesis. Los objetivos planteados son los siguientes:

- Clonación y secuenciación del gen *flgI*, así como la caracterización molecular del operón en el que éste se localiza
- Complementación de la mutante RsgI (restablecimiento del fenotipo silvestre)
- Estudio sobre la regulación de los genes flagelares en *R. sphaeroides*, lo que incluye determinar qué tipo de factores sigma dirigen la transcripción y si existe una cascada reguladora acoplada con el ensamblaje flagelar.



## METODOLOGIA

La parte de materiales y métodos así como las citas a las técnicas generales utilizadas, se encuentran descritas en los artículos de investigación que se presentan en la sección de resultados y en los apéndices I y II. A continuación se presentan algunas de las metodologías adicionales que no están incluidas en los artículos.

### MUTANTE PG

#### *Amplificación del ADN por PCR (reacción de la polimerasa en cadena)*

Las PCRs se realizaron utilizando la enzima *Pfu* polimerasa (Stratagene), la que presenta una alta fidelidad y es ideal para la amplificación de ADNs con un alto contenido de G-C, ya que soporta temperaturas de desnaturalización de hasta 98°C. El ADN plasmídico (100 ng) se desnaturalizó por 5 min a 95°C antes de añadir la enzima. Se realizaron 30 ciclos de amplificación, desnaturalizando durante 1 min a 95°C, alineando a 58°C por 45 seg y con un tiempo de extensión de 2 min por kb de ADN a amplificar. La reacción se realizó con una concentración final de dNTPs de 0.2 mM, 50 pmolas de cada oligonucleótido y en presencia de 10% de DMSO.

Los productos de PCR obtenidos se purificaron después de correrlos por un gel de agarosa con el sistema “Qiaquick Gel Extraction” (Qiagen). Dichos productos se generan con extremos exclusivamente rasos, lo que facilita su posterior clonación. Para verificar que no existieran errores en los fragmentos amplificados, éstos se secuenciaron como se describe más adelante (ver *Secuenciación*).

#### *Expresión de $fliK_{R5}$ en *E. coli* y purificación de $FliK_{R5}$*

Se inocularon 5 ml de un cultivo de 12 hrs de *E. coli* BL21 pLysS (Novagen) con el plásmido pBG0215 (ver *Tabla 2* en sección de resultados), en 100 ml de medio LB; y se incubaron a 37°C hasta una  $DO_{600}$  nm de entre 0.8-1.0. La expresión del plásmido se indujo

con IPTG a una concentración final de 1 mM, durante 5 h a 37°C. Las células se colectaron por centrifugación a baja velocidad y se rompieron por sonicación, centrifugando nuevamente para descartar los restos celulares. Después de una centrifugación a alta velocidad, se recuperó el sobrenadante y se pasó a través de una resina de agarosa acoplada con níquel, Ni-NTA (Qiagen). La columna se equilibró previamente con amortiguador de unión (20 mM Tris-HCl pH 8.0 y 500 mM NaCl) y se lavó con 6 volúmenes de resina del mismo amortiguador más 60 mM de imidazol. Finalmente se eluyó con un gradiente lineal de imidazol de 100 a 600 mM. Las diferentes fracciones se corrieron a través de un gel de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para realizar la inmunoréplica tipo Western utilizando el anticuerpo comercial anti-histidinas India-His (Pierce).

## MUTANTE RsgI

### *Mutagénesis y selección de mutantes no móviles*

La mutante RsgI (Fla<sup>-</sup>) se aisló a través de mutagénesis por transposición, introduciendo el elemento transponible Tn $\phi$ oA a través de conjugación diparental como se describe en los Materiales y Métodos del artículo 1 en la sección de resultados. La selección se llevó a cabo en placas de nado o agar suave que contienen 0.03% de bacto-peptona, 0.03% de extracto de levadura y 0.3% de bacto-agar. En éstas, se inocularon las colonias por punción utilizando un palillo estéril y se incubaron a 30°C durante 3 días. La selección se realizó también observando bacterias de un cultivo líquido por microscopía óptica de campo oscuro de alta intensidad, así como por microscopía electrónica en donde se pueden distinguir diferentes fenotipos, es decir, si las bacterias que no nadan carecen de flagelo (Fla<sup>-</sup>), o bien si presentan un flagelo no funcional (Mot<sup>-</sup> o Che<sup>-</sup>). Las referencias a estas técnicas se encuentran citadas en el artículo.

## *Estrategias de clonación*

Los plásmidos se construyeron utilizando las técnicas estándares de biología molecular descritas en Sambrook y cols., (1989).

Para la construcción de la clona pTngI (ver *Tabla 3* en sección de Resultados), se clonó el ADN adyacente al sitio de inserción del transposón en el cromosoma de la mutante RsgI, utilizando como marcador la resistencia al antibiótico kanamicina que confiere el Tn5 en *TnphoA*. Se digirió el ADN cromosomal de RsgI con la enzima de restricción *SalI*, ya que *TnphoA* contiene un sitio único para dicha enzima y los fragmentos resultantes se clonaron en el vector pTZ18R previamente digerido con la misma enzima. Los productos de la ligación se transformaron en células competentes de *E. coli* JM103 y las colonias transformantes se crecieron en 75 µg/ml de kanamicina para seleccionar el fragmento de ADN que incluyera al transposón. Esta construcción presentó 125 pb del ADN cromosomal adyacente al sitio de inserción del transposón y éstas se secuenciaron utilizando desoxiligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia del extremo 5' de *TnphoA*.

Por otra parte, para la obtención de los plásmidos pBG401, pBG506 y pBG313 se digirió el ADN cromosomal de *R. sphaeroides* WS8 con diferentes enzimas de restricción y se realizó un análisis de hibridación tipo Southern Blot de acuerdo con la técnica descrita por Southern (1975). Las sondas se marcaron radioactivamente con dATP ( $\alpha^{32}\text{P}$ ) a través del sistema de marcaje de "nick translation" (Gibco, BRL). Los fragmentos de ADN que dieron señal positiva en cada uno de los casos, se dividieron en tres grupos que se purificaron por separado de un gel de agarosa utilizando las columnas del sistema "Qiaquick Gel Extraction" (Qiagen) y se sometieron a un segundo experimento de hibridación. Este experimento se realizó para delimitar con mayor precisión la zona que contenía el fragmento de interés, lo cual facilitó grandemente la posterior obtención de clonas positivas. La región de hibridación que continuó dando señal se clonó en el vector pTZ19R y se transformó en células competentes ( $\text{CaCl}_2$ ) de *E. coli* JM103. Las transformantes se analizaron por hibridación tipo Southern; las colonias se parcharon en una membrana de nitrocelulosa, se lisaron y el ADN se fijó con luz ultravioleta. La membrana se hibridó con la sonda marcada como se mencionó anteriormente.

### *Secuenciación*

La secuenciación nucleotídica se realizó de acuerdo con el método enzimático de terminación de la cadena (Sanger y cols., 1977), como se describe en los Materiales y Métodos del artículo 1, en la sección de resultados. Las reacciones se realizaron según el protocolo del sistema Thermo Sequenase<sup>TM</sup> (Amersham, Life Science, Inc.). Los mejores resultados para la secuenciación del ADN rico en G+C de *R. sphaeroides* se obtuvieron al utilizar ADN de cadena sencilla. Para facilitar la secuenciación de los plásmidos obtenidos se hicieron subclonas en el vector pTZ18 ó 19R en las dos posibles orientaciones. De esta forma, los fragmentos de menor tamaño se secuenciaron en cadena sencilla en ambos sentidos utilizando el cebador M13 reverso. La estrategia de secuenciación también involucró el diseño de oligonucleótidos internos.

Las partes de la secuencia que fueron difíciles de leer, generalmente por la existencia de compresiones, se resolvieron por el método de reacción de "big die", en un secuenciador automático ABI prism 310 (Perkin Elmer), en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

### *Complementación*

Los estudios de restablecimiento de la movilidad se realizaron a través de conjugación diparental. La cepa donadora de *E. coli* S17-1 se transformó con el fragmento de ADN a transferir clonado en el plásmido pRK415, cuyos sitios de origen de replicación son reconocidos en *R. sphaeroides*. La conjugación se realizó con la mutante RsgI y las bacterias se seleccionaron por su resistencia a kanamicina (conferida por el transposón), a tetraciclina (resistencia que confiere el vector), así como a ácido nalidíxico para eliminar a *E. coli* que es sensible a este antibiótico.

### *Inmunoréplica tipo Western para la detección de flagelina*

La purificación de la flagelina, así como la preparación de anticuerpos policlonales la realizaron en el laboratorio las estudiantes Helena Zaldívar e Icelini García. La proteína FliC de *R. sphaeroides* se obtuvo por ruptura mecánica de los filamentos, agitando a las

bacterias vigorosamente en un agitador tipo "vortex". Después de varias centrifugaciones de baja velocidad, el sobrenadante final se centrifugó a alta velocidad y la pastilla resultante se sometió a un gradiente de cloruro de cesio (4.9 g en 12 ml). Por su parte, la preparación de los anticuerpos se realizó inoculando un conejo vía intramuscular con 150 µg de flagelina en adyuvante completo de Freund. Se aplicaron 3 refuerzos de 100 µg en adyuvante incompleto con intervalos de tres semanas y después de confirmar la presencia de anticuerpos, el conejo se sangró a blanco. La sangre se dejó coagular y la fracción de gamaglobulinas del suero se purificó precipitando con sulfato de amonio saturado (Harlow y Lane, 1988).

Para la realización de la inmunoréplica tipo Western que se utilizó para verificar la presencia de flagelina tanto intracelular como aquella que es exportada, se crecieron 1.5 ml de un cultivo de la mutante RsgI sola, y complementada, hasta una  $DO_{600\text{ nm}}$  de 1.7. Las células se centrifugaron y se guardaron las fracciones (sobrenadante y precipitado) por separado. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.45 µm y las proteínas se precipitaron con una mezcla de metanol-cloroformo, se centrifugaron y el precipitado se resuspendió en amortiguador reductor de SDS para geles. La pastilla celular se resuspendió en el mismo amortiguador y se calentó durante 5 min a 95°C. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida SDS y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La detección del anticuerpo se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito para el sistema ECL (Amersham).

#### *Aislamiento de la mutante no polar RsgI- $\eta$ p*

Para la construcción de un cassette de resistencia al antibiótico espectinomicina *uidA-aad* (*uidA* codifica para la enzima  $\beta$ -glucoronidasa y *aad* para la aminoglicósido 3 adeniltransferasa que confiere la resistencia a espectinomicina) cuya inserción no tuviera un efecto polar hacia los genes 3', se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación de un fragmento que no contuviera terminadores transcripcionales. La amplificación se realizó utilizando como templado al plásmido pWM5 (Metcalf y Wanner, 1993).

El producto de PCR (1.4 kb) se purificó de un gel de agarosa como se describió anteriormente y se insertó en el sitio *BlnI* del gen *flgI* en la clona pBG401, generando el plásmido pBG514 (ver [Tabla 3](#)). Posteriormente, este fragmento *flgI::uidA-aad* se subclonó

en el sitio *Pst*I del vector suicida pJQ200 (Quandt y Hynes, 1993), generando el plásmido pBG515.

Esta construcción se introdujo en la cepa silvestre de *R. sphaeroides* WS8 a través de conjugación diparental y las colonias exconjugantes en las que ocurrió un evento de recombinación doble (resistencia a espectinomicina y sensibilidad a gentamicina), fueron seleccionadas. La resistencia a espectinomicina se utilizó como marcador para la presencia del cassette y la sensibilidad a gentamicina como indicador de la ausencia del plásmido pJQ200.

# RESULTADOS

## EL OPERON *fliK*: ESTUDIO DE UNA MUTANTE POLIGANCHO

Los resultados relacionados con la caracterización del operón *fliK* se presentan en los siguientes trabajos:

- 1) "Structural and Genetic Analysis of a Mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 Deficient in Hook Length Control".
- 2) "The Flagellar Switch Genes *fliM* and *fliN* of *Rhodobacter sphaeroides* Are Contained in a Large Flagellar Gene Cluster" (se presenta en el apéndice I).
- 3) "FliK, the Protein Responsible for Flagellar Hook Length Control in *Salmonella*, is Exported During Hook Assembly" (se presenta en el apéndice II).

### *Antecedentes y resumen de resultados*

En el primer artículo se muestra el aislamiento y la caracterización de una mutante poligancho (PG) de *R. sphaeroides* WS8. Se utilizaron diferentes ensayos para verificar el nado, que mostraron que la mutante es no móvil y su morfología se analizó por microscopía electrónica. Gracias a que la mutante PG genera ganchos de tamaños anormalmente grandes (hasta 1500 nm), se logró purificar la proteína FlgE cuya secuencia N-terminal mostró la presencia de motivos conservados de esta proteína en diferentes bacterias. La mutante poligancho recupera el fenotipo silvestre al ser complementada con un cósmido de 30 kb (c140) proveniente de una librería genómica de *R. sphaeroides* WS8.

Posteriormente, se clonó y secuenció el gen *fliK*. Al comparar la secuencia de aminoácidos de FliK con el extremo C-terminal de las proteínas homólogas de diferentes especies, se distinguen varios residuos altamente conservados. Se realizaron estudios de complementación de la mutante PG con diferentes subclonas del cósmido c140.

Por otro lado, en el segundo artículo (apéndice I) se describe la clonación y secuenciación de los genes río abajo de *fliK* identificándose el operón *fliK*, *fliL*, *fliM* y *fliN*.

Finalmente, se expresó el gen *fliK* de *R. sphaeroides* y se purificó la proteína FliK<sub>RS</sub>, lo que se muestra en la sección de resultados adicionales.

El tercer artículo (apéndice II) incluye el estudio sobre la localización y función de la proteína FliK, el que se realizó en la bacteria *Salmonella typhimurium*. Se demostró que FliK es secretada al exterior celular a través de la vía de exportación específica del flagelo y se realizaron estudios para determinar la región del extremo N-terminal que se requiere para dicha secreción.

◆ *FliK de Rhodobacter sphaeroides*

Los resultados se muestran en el artículo 1 que se presenta a continuación (ver también el apéndice I).



## Structural and Genetic Analysis of a Mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 Deficient in Hook Length Control

BERTHA GONZÁLEZ-PEDRAJO, TERESA BALLADO, ANDRÉS CAMPOS,  
R. ELIZABETH SOCKETT,† LAURA CAMARENA,‡  
AND GEORGES DREYFUS\*

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular,  
UNAM, México 04510, D.F., México

Received 3 June 1997/Accepted 22 August 1997

Motility in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* is achieved by the unidirectional rotation of a single subpolar flagellum. In this study, transposon mutagenesis was used to obtain nonmotile flagellar mutants from this bacterium. We report here the isolation and characterization of a mutant that shows a polyhook phenotype. Morphological characterization of the mutant was done by electron microscopy. Polyhooks were obtained by shearing and were used to purify the hook protein monomer (FlgE). The apparent molecular mass of the hook protein was 50 kDa. N-terminal amino acid sequencing and comparisons with the hook proteins of other flagellated bacteria indicated that the *Rhodobacter* hook protein has consensus sequences common to axial flagellar components. A 25-kb fragment from an *R. sphaeroides* WS8 cosmid library restored wild-type flagellation and motility to the mutant. Using DNA adjacent to the inserted transposon as a probe, we identified a 4.6-kb *SalI* restriction fragment that contained the gene responsible for the polyhook phenotype. Nucleotide sequence analysis of this region revealed an open reading frame with a deduced amino acid sequence that was 23.4% identical to that of FlkK of *Salmonella typhimurium*, the polypeptide responsible for hook length control in that enteric bacterium. The relevance of a gene homologous to *fliK* in the unflagellated bacterium *R. sphaeroides* is discussed.

Many bacterial species have the ability to move, and they alter the direction of their movement in response to different external stimuli, which enables them to migrate to more favorable environments (33). Swimming motility (as opposed to gliding and other types of motility) involves the function of a complex structure called the flagellum. The flagellum is composed of three main parts, the basal body, the hook, and the filament (for recent reviews, see references 9, 33, and 46). Much of the information generated to date regarding flagellar structure, assembly, function, and genetics has been obtained from the gram-negative organisms *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* (reviewed in references 20 and 32). These enteric bacteria possess between 5 and 10 peritrichous flagella per cell. The flagellum can rotate either counterclockwise, causing the filaments to form a bundle that produces translational motion, or clockwise (CW), causing the cell to tumble and reorient (31, 49).

The filament is connected to the basal body through the hook, which works as a flexible coupling that allows torque generated by the motor to be transmitted to the filament (10, 11). For this purpose, the hook of the bacterial flagellum requires a rather well-defined length (23). A shorter hook would not generate a sufficient bend angle (23), and presumably a long flexible coupling would not permit effectively directed transmission of torque (57). The mean length that has been

established for different bacterial species varies from  $55 \pm 6$  nm for the wild-type hook of *S. typhimurium* (15) to  $69 \pm 8$  nm for *Treponema phagedenis* (29) and up to 105 nm for *Campylobacter coli*, the longest hook yet described (43).

Nonmotile mutants with abnormally long flagellar hooks and without a flagellar filament have previously been isolated and termed polyhook mutants (41, 48). The flagellar gene *fliK* has previously been cloned (16), and its protein product has been identified as being responsible for controlling hook length (41, 55). FlkK has not been detected within the final flagellar structure, and the means by which it regulates hook length is not known (15). Nevertheless, different mechanisms for hook length control have been proposed, based on the identification of pseudorevertants of *fliK* mutants that recovered the ability to assemble filaments on the tips of polyhooks. These pseudorevertants have been called polyhook filament mutants. The reverting mutations have previously been isolated in the *fliK* or *flhB* gene (15, 25, 55). FlhB is an integral membrane protein with a C-terminal cytoplasmic domain (35) that has been proposed to form part of the export apparatus (25) and to participate in the determination of hook length (15, 25). Recently, it has been shown that the negative regulator FlgM (25) and the newly identified protein RfH (26) are also involved in this process of hook length control. In *S. typhimurium*, the assembly of the hook is assisted by a scaffolding protein, FlgD. When the hook reaches its final length, FlgD is replaced by FlgK, the first hook-associated protein (HAP1). In polyhook mutants, this replacement does not occur and FlgD remains at the tip of the polyhook (39).

*Rhodobacter sphaeroides* is a purple nonsulfur photosynthetic bacterium that swims by using a single medially located flagellum that rotates unidirectionally CW. In contrast to the CW-counter clockwise switching swimming behavior of enteric bacteria, a change in the swimming direction in *R. sphaeroides*

\* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apdo. Postal 70-600, 04510 México, D.F., México. Phone: (525) 622-56-03. Fax: (525) 616-2282. E-mail: gdreyfus@ifesun1.ifisiol.unam.mx.

† Permanent address: Department of Life Science, Nottingham University, University Park, Nottingham NG7 2RD, United Kingdom.

‡ Permanent address: Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, 04510 México, D.F., México.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this work

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<b>Strains</b>		
<i>R. sphaeroides</i>		
WS8	Wild type; spontaneous $\text{NaI}^r$	52
PG	WS8 <i>TnphoA</i> derivative; nonmotile; $\text{Km}^r$ $\text{NaI}^r$	This work
PG2	WS8 <i>TnphoA</i> derivative; nonmotile; $\text{Km}^r$ $\text{NaI}^r$	This work
<i>E. coli</i>		
S17-1	Donor for conjugations: $\text{Pro}^-$ $\text{Res}^-$ $\text{Mod}^+$ <i>recA</i> -integrated plasmid (RP4-Tc::Mu) ( $\text{Km}::\text{Tn7}$ ) $\text{Tra}^+$	50
H13101	<i>supE44 hsdS20(r<sub>II</sub> m<sub>II</sub><sup>-</sup>) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 ml-1</i>	44
<b>Plasmids</b>		
pU1800	pSUP203 derivative carrying <i>TnphoA</i> ; $\text{Cm}^r$ $\text{Tc}^r$ $\text{Km}^r$	36
c140	pLA2917 derivative carrying 25 kb of <i>R. sphaeroides</i> WS8 DNA; $\text{Tc}^r$	52
pTuPG	5.7-kb <i>Sall</i> fragment cloned into pUC19 containing 4.6 kb of <i>TnphoA</i> plus 1.1 kb of PG DNA flanking the site of transposon insertion; $\text{Km}^r$ $\text{Amp}^r$	This work
pBG0404	4.6-kb <i>Sall</i> fragment from c140 cloned into pTZ19R; $\text{Amp}^r$	This work
pBG0206	2.4-kb <i>Sall-EcoRI</i> subclone from pBG0404 cloned into pTZ18R; $\text{Amp}^r$	This work
pBG0007	0.7-kb <i>PstI</i> fragment derived from pBG0206 cloned into pTZ18R; $\text{Amp}^r$	This work
pBG0108	pBG0206 with a 0.5-kb <i>Sall-NotI</i> deletion; $\text{Amp}^r$	This work

involves a rotational stop during which Brownian motion reorients the cell prior to renewed swimming (4).

In this work, we report the isolation of a polyhook mutant (PG) of *R. sphaeroides*, a bacterium that, unlike enteric bacteria, possesses a straight hook (53). This mutant was particularly useful for the purification of the hook monomer FlgE. The finding of a polyhook mutant in a uniflagellated bacterium with start-stop swimming behavior indicates that hook length may be regulated by a mechanism shared by many bacterial species.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth.** The bacterial strains and plasmids used in this work are described in Table 1. *R. sphaeroides* cell cultures were grown photoheterotrophically in Sistro's medium (51) under continuous illumination at 30°C in liquid or solid medium (1.5% agar). *E. coli* strains were grown in Luria broth at 37°C with appropriate antibiotic selection (44). The antibiotics used for the selection of *R. sphaeroides* recombinant strains were as follows: kanamycin, 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; tetracycline, 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; and nalidixic acid, 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

**Isolation of the polyhook mutant.** Transposon mutagenesis was performed by introducing the transposable element *TnphoA* on suicide plasmid pU1800 from the donor *E. coli* strain, S17-1, into wild-type *R. sphaeroides* WS8-N by diparental conjugation (36). The mutagenized population was screened for nonmotile mutants by tryptone-yeast extract swarm assays as described previously (53). Cells were also analyzed by high-intensity dark-field microscopy (30) and by electron microscopy.

**Purification of FlgE.** A polyhook mutant (PG) was used for the purification of hook protein FlgE. Early-exponential-growth phase cells were sheared by passing them through a 18- by 38-gauge cannula several times. Whole cells and cell debris were removed by two low-speed centrifugations ( $10,000 \times g$  for 15 min), and the resulting supernatant was subjected to ultracentrifugation ( $100,000 \times g$  for 60 min). The resulting pellet was suspended in  $\text{CsCl}$  ( $0.4 \text{ g ml}^{-1}$ ) and subjected to density centrifugation (2). The purity of the isolated hook protein was assessed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 15.0% polyacrylamide gels (27) and silver stained (38).

Flagellar filaments were also isolated from wild-type cells by shearing, followed by differential centrifugation and cesium chloride gradient centrifugation. Few of the resulting filaments contained a hook attached to the rest of the structure, as observed by negative staining.

For N-terminal sequence analysis of FlgE, protein was transferred to a ProBlot membrane (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) with 100 mM 3-cyclohexylamino-1-propane sulfonic acid buffer (pH 11) by the method of LeGendre and Matsudaira (28). Blotted protein was stained with Coomassie blue and cut from the ProBlot membrane. Amino-terminal sequence analysis was carried out at the W. M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory, Yale University, New Haven, Conn.

**Electron microscopy.** Purified polyhooks, sheared flagella, or bacterial cell suspensions (10  $\mu\text{l}$ ) were applied to Formvar-coated grids. Samples were negatively stained with 1% uranyl acetate and observed with a JEM-1200EXII electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan). Micrographs were taken at an accelerating voltage of 80 kV.

**Recombinant DNA techniques.** The isolation of chromosomal DNA was performed essentially as described elsewhere (44). Plasmid DNA was obtained by standard procedures (44) or with plasmid midprep columns from Qiagen (Chatsworth, Calif.). Restriction enzymes and T4 DNA ligase were used according to the manufacturer's recommendations. Standard methods were used for *E. coli* transformation, restriction endonuclease analysis, ligation, and other related techniques (44).

The dideoxy chain termination method was used for sequencing both single- and double-stranded DNAs (45). The sequencing reactions were carried out with Taqenase as instructed by the manufacturer of the deltaTaq DNA polymerase system (version 2.0; U.S. Biochemical Corp., Cleveland, Ohio). Sequencing of cloned DNA was accomplished with  $^{35}\text{S}$ -dCTP and the analog 7-deaza-dGTP to avoid problems associated with sequencing GC-rich DNA. Subclones for nucleotide sequencing were constructed by using the indicated restriction sites in plasmid pBG0206 (see Fig. 6A) and are described in Table 1.

Southern hybridization was done by the procedure described for the non-radioactive Photogenic detection kit (Gibco, Life Technologies). Probes were labelled with biotin-14-dATP by the nick translation technique according to the protocol provided by the manufacturer (Bionick labelling system; Gibco BRL). Detection of the hybridization signal was done according to the manufacturer's (PhoGene; Gibco BRL) protocol.

**Complementation analysis.** Genetic complementation of the mutant was carried out with a cosmid library of *R. sphaeroides* WS8 total DNA (53). Cosmids were introduced into *R. sphaeroides* mutant strains by diparental conjugation from *E. coli* S17-1. The complemented mutant was selected for its resistance to kanamycin (coded by *TnphoA*) and tetracycline (cosmid encoded) and tested for motility as described above.

**Nucleotide sequence accession number.** The GenBank nucleotide sequence accession number for *R. sphaeroides* *flhK* is U86454.

#### RESULTS

**Isolation and morphological characterization of a polyhook mutant.** Transposon mutagenesis with subsequent motility screening was used to obtain flagellar mutants. A nonmotile mutant was identified in swarm tests on soft agar plates. The mutant was unable to form the diffuse ring that is characteristic of the wild-type strain when it moves away from the inoculation point (Fig. 1). The mutant was also incapable of swimming when a liquid culture was observed by either phase-contrast or dark-field high-intensity microscopy.

Further characterization was carried out by electron microscopy, which revealed an unusually short flagellar structure attached to the cell (Fig. 2a). This mutant structure was compared to the wild-type flagellum in order to establish its composition. Material sheared from wild-type *Rhodobacter* cells was shown to be rich in filaments, many of which possessed hooks. The wild-type flagellum shows a clearly different pattern in the arrangement of subunits between the hook and the filament (Fig. 2b). The filament has a vertical striation along its length, whereas the hook shows a cross-hatched helical pattern. Furthermore, these two structures are separated by a clearly distinguishable region at the interface that probably consists of HAPs (Fig. 2b). The wild-type hook structure had an average length of ca. 100 nm. When mutant cells were observed at a higher magnification, the pattern of their external structures was similar to that of the hook (compare Fig. 2c with b). This structure was longer (ca. 300 nm) than were hooks from wild-type cells, and no HAP proteins or filaments

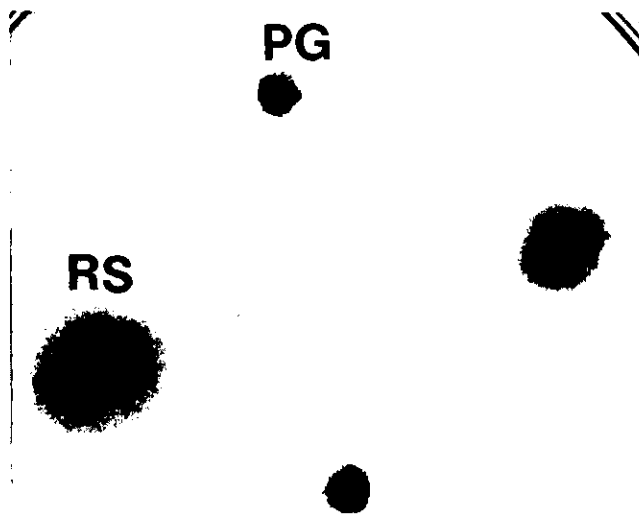


FIG. 1. Swarming assay of mutant and wild-type *R. sphaeroides* WS8. Wild-type *R. sphaeroides* (RS; left and right) and PG mutant (top and bottom) colonies were stabbed into the swarm agar, and the plates were incubated aerobically at 30°C for 48 h. Tryptone-yeast extract agar was composed of 0.03% (wt/vol) Bacto Peptone, 0.03% (wt/vol) yeast extract, and 0.3% (wt/vol) Bacto Agar (Difco Laboratories).

were detected at the tips of these structures. Therefore, based on microscopic analysis, the mutant seems to produce a hook of anomalous length, similar to the polyhooks described previously for enteric bacteria (41, 48).

The structures sheared from mutant cells were also analyzed by electron microscopy. They showed the same subunit pattern as that of the wild-type hook (Fig. 3; compare with Fig. 2b). Mutant polyhooks varied in length (from ca. 200 to 1,500 nm), a range comparable to what has previously been observed for polyhooks in enteric bacteria (15).

**Purification of FigE.** In order to ascertain the protein composition of the flagellar structures of wild-type and mutant strains, we sheared and purified the external flagellar structures of both strains and analyzed them by SDS-PAGE (Fig. 4). Figure 4, lane 2, shows that wild-type filaments are composed mainly of two proteins, one with an apparent molecular mass of 55,000 Da, which has previously been identified as flagellin (FliC) (52), and a minor component with a molecular mass of 50,000 Da. This result suggests that the minor component is the hook protein. Figure 4, lane 3, shows the electrophoretic profile of the sheared external structure from the polyhook mutant. The only protein present has a molecular mass of ca. 50,000 Da. From this analysis, it is clear that the mutant strain lacks flagellin (Fig. 4; compare lanes 2 and 3).

In order to confirm the identity of the protein sheared from the mutant, we performed N-terminal sequence analysis of the 50,000-Da band. Figure 5 shows the sequence alignment of the N termini of hook proteins from various flagellated bacteria. The *R. sphaeroides* sequence contains the N-terminal consensus sequence SGL as well as the three conserved heptad repeats that have previously been argued to be important for quaternary interactions that take place between subunits of axial proteins (17).

**Cloning of the wild-type *fliK* gene.** The *TnphoA* insertion that caused the polyhook phenotype was localized by Southern blot analysis with a 3.3-kb internal *Hind*III fragment from plasmid pU1800 as a probe (Fig. 6A). Chromosomal DNA isolated from the mutant was digested with the restriction enzyme *Sac*I.

Since there is no cleavage site for *Sac*I in *TnphoA*, the single band observed in Southern blot analysis confirmed that there was a single insertion of *TnphoA* in the chromosome (data not shown).

The DNA flanking the site of the *TnphoA* insertion was cloned into pUC19 by selection for the kanamycin resistance conferred by *TnphoA*. One such clone (pTnPG) was found to contain a 5.7-kb DNA fragment that included a 4.6-kb fragment of *TnphoA* DNA plus a 1.1-kb fragment of *R. sphaeroides* DNA fused to the *phoA* end of the transposon (Fig. 6A).

Using an *R. sphaeroides* WS8 genomic cosmid library, we

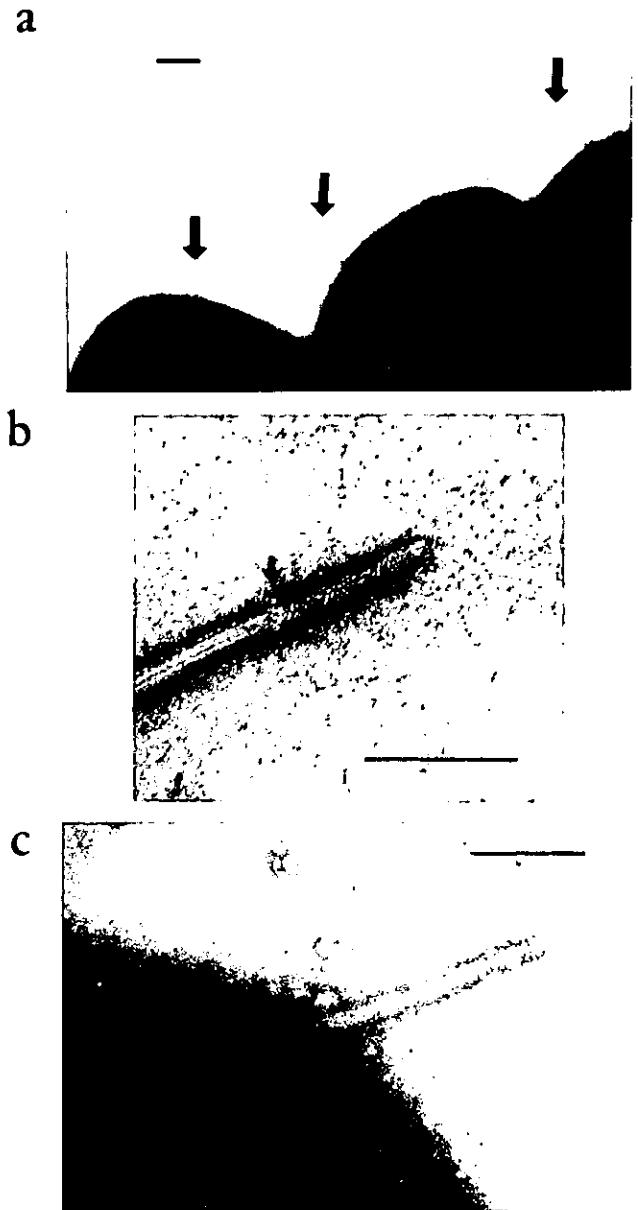


FIG. 2. Negatively stained electron micrographs of hook and polyhook structures. (a) PG mutant. Arrows point to short flagellar structures produced by the mutant. Bar, 200 nm. (b) A sheared flagellar filament from wild-type *R. sphaeroides* WS8 with an associated hook. The arrow points to a region that may be occupied by HAPs. Bar, 100 nm. (c) Higher magnification of the PG mutant. Bar, 100 nm.

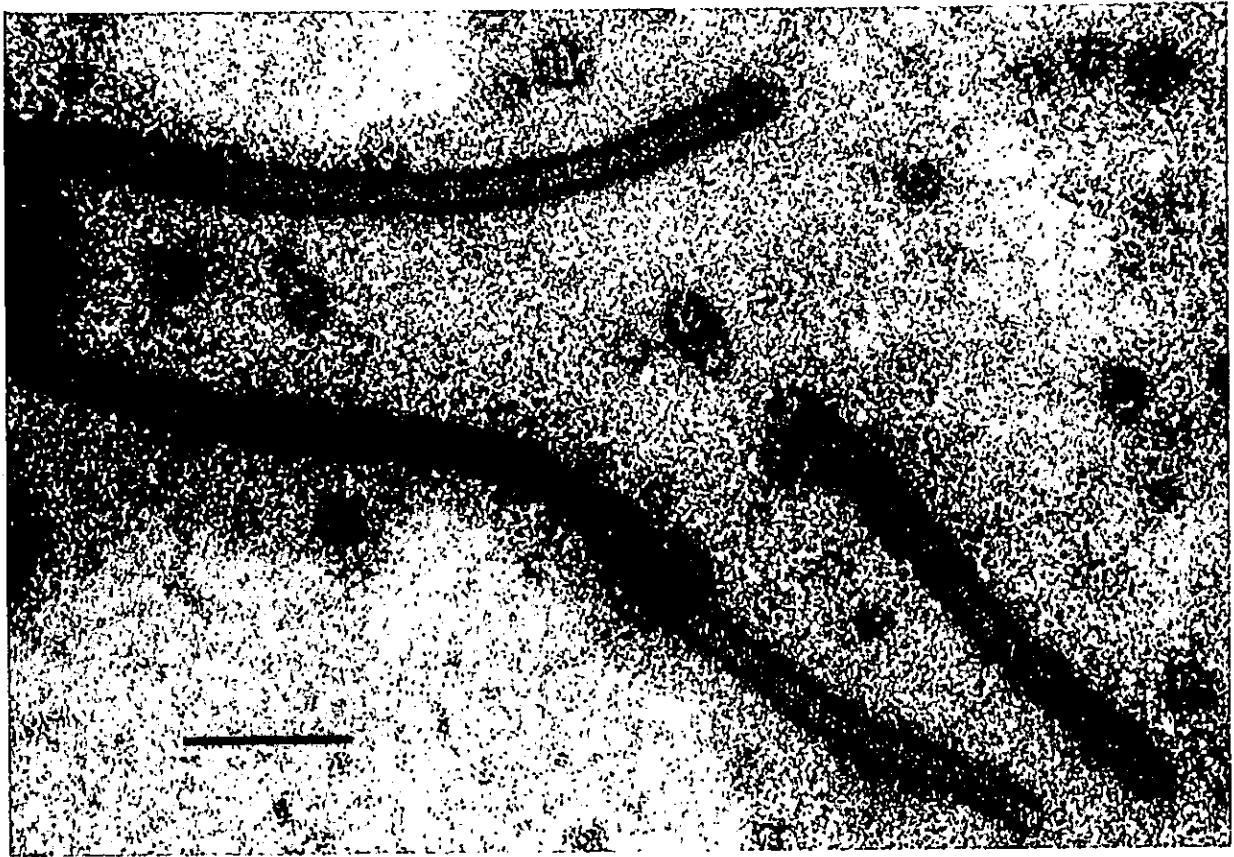


FIG. 3. Electron micrograph of negatively stained, sheared flagellar structures from a culture of the polyhook mutant. Bar, 100 nm.

identified a cosmid clone (c140) that restored motility and the ability to form normal hooks and filaments to the polyhook mutant (data not shown). A 1.4-kb *SalI-DraI* fragment from pTnPG was used to probe Southern blots made with different digests from the cosmid (Fig. 6A). A 4.6-kb *SalI* restriction fragment which hybridized to the probe was identified (Fig. 6B) and cloned into plasmid pTZ19R to generate plasmid pBG0404 (Fig. 6A), which was used for nucleotide sequence analysis.

Sequencing reactions were initially run with pTnPG and both the universal sequencing primer M13 -40 (forward) and a primer complementary to the *phoA* end of the *TnphoA* sequence. In addition, this fragment was sequenced with two internal primers. Sequencing was extended to the 3' end of the cloned gene with plasmid pBG0404 or the subclones listed in Table 1 (pBG0206, pBG0007, and pBG0108).

One complete open reading frame (ORF) of 1,425 bp was identified on the 2.4-kb *SalI-EcoRI* DNA segment from pBG0404. The nucleotide sequence has a GC content of 77%, which is in accord with the high GC bias of this bacterium (42). There is a putative ribosome binding site (GAGG) 11 bp upstream of the initiation codon. *TnphoA* was inserted 1,132 bp downstream from the start codon. We isolated a second mutant whose *TnphoA* insertion was found to be on the same ORF. The *TnphoA* insertion in this mutant (polyhook mutant 2) also generated a polyhook phenotype (data not shown) and was localized 550 bp downstream from the initiation codon. The ORF whose disruption was responsible for the polyhook phenotype of both mutants codes for a polypeptide of 474 residues with a predicted mass of 45,745 Da. A comparison of

the deduced amino acid sequence with the polypeptide sequence of *S. typhimurium* FliK (Fig. 7) showed 23.4% identity and 44% similarity. As noted previously for the FliK sequences from *S. typhimurium* and *E. coli* (23), there is a high proline

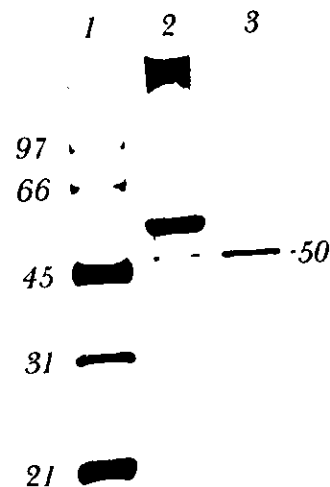


FIG. 4. SDS-PAGE of wild-type filaments and sheared polyhooks. Lane 1, molecular mass markers: phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), and soybean trypsin inhibitor (21 kDa); lane 2, sheared wild-type filaments from *R. sphaeroides* WS (10  $\mu$ g); lane 3, sheared polyhooks (10  $\mu$ g).



<i>Rs</i>	1	M*P*H*W*P*A*L*P*P*D*P*T*E*P*A*P*A*T*V*G*Q*F*A*C*A*L*P*E*D*S*S*G*A*M*P*F*T*P*G*A*A*S*D*P*A*S*L*G*S	50
<i>St</i>	1	.....M*I*T*L*P*Q*L*I*T*T*D*T*M*T*A*G*L*T*S*G*K*T*T*..*G*S	26
	51	A*E*V*R*A*S*D*G*A*P*G*T*A*G*P*A*T*G*T*A*P*S*G*A*S*G*A*G*L*P*L*A*G*M*S*E*L*S*T*S*A*E*A*S*A*L*P*E*E	100
	27	A*E*.....D*F*L*A*L*L*A*G*A*L*G*A*D*G*A*Q*G*K*D*A*R*I*T*L*A*D*L*.....Q*A*G*G*K*L*S*K	64
	101	E*D*P*S*E*E*P*Q*H*S*S*A*S*E*T*G*P*D*G*S*A*G*A*A*A*T*S*A*G*D*D*L*G*A*A*Q*A*R*P*T*V*L*A*A*N*P*T*V*S	150
	65	E*L*L*T*O*H*G*E*P*G*Q*A*V*K*L*A*D*L*L*A*Q*K*A*N*A*T*D*E*T*L*T*D*L*T*Q*A*O*H*L*L*S*T*L*T*P*S*L*K*T*S	114
	151	A*L*P*A*G*A*V*P*L*P*G*S*R*P*P*A*D*G*T*P*Q*R*G*P*E*G*V*A*A*A*A*P*A*D*G*A*P*P*R*T*A*R*R*A*G*P*L*A	200
	115	A*L*A*A*L*S*K*T*A*Q*H*D*E*K*T*P*A*L*S*D*E*D*L*A*S*L*S*A*L*P*A*M*L*P*Q*Q*P*V*.....A*T*P*V*A	157
	201	E*A*G*R*A*D*D*A*S*P*V*P*A*S*S*H*F*A*A*G*A*Q*P*G*T*A*G*R*E*G*A*A*R*A*H*P*A*A*G*T*V*P*S*G*E*G*A*A*D	250
	158	G*E*T*P*A*E*N*H*I*A*L*P*S*.....L*L*R*G*D*M*P*S*A*P*Q*E*E*T*H*T*L*S*F*S*E*N*E*K*G	195
	251	T*T*P*P*S*P*A*A*A*Q*R*P*E*I*A*A*A*P*P*A*T*A*G*K*V*A*D*A*S*E*A*P*A*E*..*N*A*S*A*A*T*V*G*Q*D*G*A*E	299
	196	K*T*E*A*S*L*A*R*A*S*D*..*D*R*A*T*G*P*A*L*T*P*L*V*V*A*A*A*A*T*S*A*K*V*E*V*D*S*P*P*A*P*V*T*H*G*A*M	243
	300	T*A*L*A*V*E*P*A*G*A*T*L*A*G*S*D*P*A*P*L*T*A*L*P*S*D*L*R*L*E*R*A*G*E*P*R*A*G*A*D*G*P*L*A*L*A*A	349
	244	P*T*L*S*S*A*T*A*Q*L*P*V*A*S*A*P*V*L*S*A*P*L*G*S*H*E*W*Q*Q*T*F*S*.....	276
	350	P*D*A*P*A*E*L*Q*D*R*I*L*E*A*A*A*G*E*G*I*E*I*V*L*A*P*E*T*L*G*L*R*L*R*I*R*V*E*M*R*D*G*T*A*Q*V*S*F*T*T	399
	277	.....Q*V*M*L*F*T*R*O*Q*Q*S*A*Q*L*R*L*H*P*E*E*L*G*Q*V*H*I*S*L*K*L*D*D*N*Q*A*L*Q*M*V*S	319
	400	E*T*A*E*A*A*R*L*L*S*G*Q*E*G*R*L*S*D*L*L*E*K*H*G*L*S*L*G*R*H*E*A*G*Q*G*D*T*O*R*R*S*E*A*P*L*P*Q*P*R*P	449
	320	P*H*S*H*V*R*A*A*L*E*A*A*L*P*M*L*R*T*Q*L*A*E*S*G*I*Q*L*G*Q*S*S*I*S*S*E*S*F*A*G*Q*Q*Q*S*S*Q*Q*Q*S*S	369
	450	P*A*L*R*P*.....A*P*D*P*S*E*A*A*R*A*A*A*G*T*V*N*L*I*A	474
	370	R*A*Q*H*T*D*A*F*G*A*E*D*D*I*A*L*A*A*P*A*S*L*Q*A*A*A*R*G*N*G*A*V*D*I*F*A	405

FIG. 7. Comparison of the deduced amino acid sequences of FliK proteins from *R. sphaeroides* (*Rs*) and *S. typhimurium* (*St*). Identical matches (vertical lines) and strongly (colons) and weakly (dots) conserved amino acid residues are indicated. Asterisks highlight the proline residues in the *Rhodobacter* sequence.

Furthermore, unlike the situation in the majority of flagellated bacteria studied to date, the HAPs in *R. sphaeroides* are clearly distinguishable structures. The different patterns in the arrangement of subunits in the hook and filament are also evident in this bacterium (Fig. 2b). The length of the *Rhodobacter* hook, ca. 100 nm, agrees with the observation that monotrichous flagellated bacteria, such as *Campylobacter* and *Caulobacter* spp., possess longer hooks than do multiflagellated bacteria. This feature has previously been related to the need for the greater torque that has to be applied to a single flagellum (43).

A comparison of the N-terminal sequence of the purified FlgE monomer with N-terminal sequences of FlgE proteins from different bacteria revealed that *R. sphaeroides* FlgE contains the conserved SGL motif as well as the hydrophobic heptad repeats that have been described previously (17). These repeats have been suggested to be important for the formation of coiled-coil structures that allow interactions between subunits, which are in turn important for the organization of the axial structure of the flagellum (37). Further sequencing is needed to identify the second, extended GNNIAN N-terminal motif (17) and other features of the protein. We recently cloned the *flgE* gene from *R. sphaeroides* (8), and DNA sequence analysis is in progress.

**Identification of the *fliK* gene in *R. sphaeroides*.** We cloned and sequenced a DNA fragment that is predicted to encode a protein that is homologous to FliK from *S. typhimurium*. This assumption was made based on the high proline content and the overall sequence similarity between these two proteins. In addition, mutations in *fliK* from *S. typhimurium* and in the *R. sphaeroides* ORF give rise to the same polyhook phenotype.

Like FliK, the protein encoded by this ORF is responsible for hook length control.

We compared the C-terminal sequence of this ORF to those of other FliK sequences (Fig. 8) because this region is the most conserved among these proteins. This comparison revealed five highly conserved leucine residues and various conserved glutamine residues, whose functions will be tested.

In a recent study, we identified a 5.3-kb DNA fragment from wild-type *R. sphaeroides* 2.4.1. (7) that contained genes homologous to the *fliF* operon of *S. typhimurium* (*fliFGHIJK*). The orientation of the *Rhodobacter fliK* gene found in this work agrees with the previously described orientation for the *fliH*, *-I*, and *-J* genes from *R. sphaeroides* 2.4.1. and WS8 (7, 14).

We found an ORF upstream of *fliK* which does not correspond to *fliJ* (data not shown). This ORF has also previously been found in *Bacillus subtilis* (3) and *Vibrio parahaemolyticus* (34), but not in *E. coli* or *S. typhimurium*. There is a putative ORF with no obvious consensus promoter sequence downstream of *fliK*, suggesting that *fliK* is not the last gene in its operon.

**Proposed models for hook length regulation.** The hook must have a precise length in order to efficiently transmit torque to the filament (23). Several models have been proposed to explain the hook length control exerted by FliK (15, 25, 26, 57). These mechanisms involve switching export machinery and the participation of different proteins, i.e., FlhB, FlgM, and RflH. FlhB has previously been proposed to form part of the export apparatus, mediating the ordered export of proteins in response to the state of flagellar assembly (25). FlgM is involved in negative regulation of late gene expression (13, 24) until it is excreted from the cell (18). RflH has been recently proposed to participate with FlhB in negative regulation of FlgM export via a double-locked-gate model (26).

The discovery of a polyhook mutant of *R. sphaeroides* suggests that this bacterium also has export switching machinery that allows the export apparatus to change its substrate spec-

<i>Rs</i>	PLALAAPDAP	AELQDRI...	LEAAAGEG	EIEIVLAPET	LGRLRIRVEM
<i>St</i>	PVLSAPLGS	HEWQQTFSQQ	VMLFTROGQQ	SAQLRLHPPEE	LGQVHISLKL
<i>Ec</i>	PVLSAPLGS	HEWQQLSQH	ISLFTROGQQ	SAELRLHPQD	LGEVQISLKV
<i>Vp</i>	KVDTAGKMG	EQMMQVLRDR	VTLQAQQSVQ	EAKIRLDPPD	LQKLDLILRV
<i>Bs</i>	ETKTVAQVI	NAWKQMYTP	FG...RSTG	SFTIRLNPEH	LGFTVTKLTN
* PV-LSAP--- -EWQ----- --LF--QG-Q SA-IRL-PE- LG-V-I-L--					
<i>Rs</i>	RDGTAQVSFT	TETAEARLL	SGQEGRLSDL	LEKHGSLGR	HE.....
<i>St</i>	DDNQAQLQMV	SPHSHVRAAL	EALPMLRTQ	LAESGIQLGQ	SSISSES...
<i>Ec</i>	DDNQAQLQMV	SPHSHVRAAL	EALPMLRTQ	LAESGIQLGQ	SNISGES...
<i>Vp</i>	EGDRLSVQIN	ANTAATREAL	MQVSELRTE	LQEQNFVHVD	VNV.....
<i>Bs</i>	ENGMFQSKII	ASSQSARELL	EQHLPLQKQS	LPNMAVQIDR	FTLPVQSGDQ
* -D--AQVQ-- -----R-AL E--LP-LRT- L-E-G-QLG- -----S---					
<i>Rs</i>	..AGQGDTR	RSEAPLPQPR	PRALRPAPD	...PSEPA	ARAAAGTVNL
<i>St</i>	FAGQQQSSS	QQQSSRAQH	TDFGAEDDI	ALAAPASLQA	AARGNGAVDI
<i>Ec</i>	FSGQQQAAS	QQQSSQRTAN	HEPLAGEDDD	TLVPVSLQ	RVTGNSGVDI
<i>Vp</i>	..GADQGE	RHQQQMNDED	TTIFAARESS	A.....FQS	NTTMYSEHW
<i>Bs</i>	PIYQLADEQ	KQQQEGQRQ	RQKQKSNDFG	DLLDEVSMVE	MEEEE.....
* ---GQ-Q--- -QQQ----- -----D-- -L-----S-Q- ----N-V--					
<i>Rs</i>	IA...				
<i>St</i>	FA...				
<i>Ec</i>	FA*				
<i>Vp</i>	LNTQA				
<i>Bs</i>	.....				
* -A---					

FIG. 8. Sequence alignment of the C-terminal regions of FliK proteins from *R. sphaeroides* (*Rs*; from residue P-344), *S. typhimurium* (*St*), *E. coli* (*Ec*), *V. parahaemolyticus* (*Vp*), and *B. subtilis* (*Bs*). The sequence marked with an asterisk represents a consensus in at least three sequences. Residues identical in all five sequences are shown in boldface. The alignment was performed with the PILEUP program (12). Dashes indicate residues that are not conserved in the consensus sequence; dots indicate gaps.

ificity. In addition, the expression of flagellar operons in *R. sphaeroides* should be coupled to flagellar assembly, possibly through an anti-sigma factor regulation mechanism. It must be stressed that *R. sphaeroides* is a uniflagellated bacterium with a straight hook, unidirectional flagellar rotation, and a swimming pattern different from that of enteric bacteria. Thus, it seems that the general mechanisms of flagellar export and regulation of flagellar genes are conserved among distantly related bacteria.

How the state of assembly of the hook is sensed remains to be answered. Research will be directed toward understanding this process.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Bob Macnab from Yale University for many helpful discussions, for critically reading the manuscript, and for supplying the nucleotide sequence of *S. typhimurium* *fliK* before its publication. We also thank May Kihara for providing plasmids and strains. Our thanks also go to Chi Aizawa for helping us with early electron microscopy observations and to Jorge Sepúlveda for technical support with electron microscopy. Leigh Fish from Nottingham University is acknowledged for cloning the transposon-flanking fragment from the polyhook mutant.

This work was funded partially by grant 3290P-N9607 from CONACYT and grant IN204595 from DGAPA.

#### REFERENCES

- Aizawa, S.-I., S. Kato, S. Asakura, H. Kagawa, and S. Yamaguchi. 1980. In vitro polymerization of polyhook protein from *Salmonella* SJW880. *Biochim. Biophys. Acta* 625:291-303.
- Aizawa, S.-I., G. E. Dean, C. J. Jones, R. M. Macnab, and S. Yamaguchi. 1985. Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 161:836-849.
- Albertini, A. M., T. Caramori, W. D. Crabb, F. Scoffone, and A. Galizzi. 1991. The *flaA* locus of *Bacillus subtilis* is part of a large operon coding for flagellar structures, motility functions, and an ATPase-like polypeptide. *J. Bacteriol.* 173:3573-3579.
- Armitage, J. P., and R. M. Macnab. 1987. Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 169:514-518.
- Armitage, J. P. 1988. Tactic responses in photosynthetic bacteria. *Can. J. Microbiol.* 34:475-481.
- Armitage, J. P., D. J. Kelly, and R. E. Sockett. 1995. Flagellate motility, behavioral responses and active transport in purple non-sulfur bacteria, p. 1006-1024. In R. E. Blankenship, M. T. Madigan, and C. E. Bauer (ed.), *Advances in photosynthesis: anoxygenic photosynthetic bacteria*, vol. 2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Ballado, T., A. Campus, L. Camarena, and G. Dreyfus. 1996. Flagellar genes from *Rhodobacter sphaeroides* are homologous to genes of the *fljF* operon of *Salmonella typhimurium* and to the type-III secretion system. *Gene* 170:69-72.
- Ballado, T., B. González-Pedraja, E. Silva, L. Camarena, and G. Dreyfus. Unpublished data.
- Blair, D. F. 1995. How bacteria sense and swim. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:489-522.
- Block, S. M., D. F. Blair, and H. C. Berg. 1989. Compliance of bacterial flagella measured with optical tweezers. *Nature (London)* 338:514-518.
- Block, S. M., D. F. Blair, and H. C. Berg. 1991. Compliance of bacterial polyhooks measured with optical tweezers. *Cytometry* 12:492-496.
- Devereux, J., P. Haeblerli, and O. Smithies. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12:387-395.
- Gillen, K. L., and K. Hughes. 1991. Negative regulatory loci coupling flagellin synthesis to flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 173:2301-2310.
- Goodfellow, I. G. P., C. E. Pollitt, and R. E. Sockett. 1996. Cloning of the *fljI* gene from *Rhodobacter sphaeroides* WS8 by analysis of a transposon mutant with impaired motility. *FEMS Lett.* 142:111-116.
- Hirano, T., S. Yamaguchi, K. Oosawa, and S.-I. Aizawa. 1994. Roles of *FliK* and *FliB* in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 176:5439-5449.
- Homma, M., T. Iino, and R. M. Macnab. 1988. Identification and characterization of the products of six region III flagellar genes (*flaAII.3* through *flaQII*) of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 170:2221-2228.
- Homma, M., D. J. DeRosier, and R. M. Macnab. 1990. Flagellar hook and hook-associated proteins of *Salmonella typhimurium* and their relationship to other axial components of the flagellum. *J. Mol. Biol.* 213:819-832.
- Hughes, K. T., K. L. Gillen, M. J. Semon, and J. E. Karlinsey. 1993. Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* 262:1277-1280.
- Ikeda, T., S. Asakura, and R. Kamiya. 1989. Total reconstitution of *Salmonella* flagellar filaments from hook and purified flagellin and hook-associated proteins *in vitro*. *J. Mol. Biol.* 209:109-114.
- Jones, C. J., and S.-I. Aizawa. 1991. The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and function. *Adv. Microb. Physiol.* 32:109-172.
- Kagawa, H., K. Owari, S. Asakura, and N. Takahashi. 1976. Flagellar hook protein from *Salmonella* SJ25. *J. Bacteriol.* 125:68-73.
- Kagawa, H., S.-I. Aizawa, S. Yamaguchi, and J.-I. Ishizu. 1979. Isolation and characterization of bacterial flagellar hook proteins from salmonellae and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 138:235-240.
- Kawagishi, I., M. Homma, A. W. Williams, and R. M. Macnab. 1996. Characterization of the flagellar hook length control protein *FliK* of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178:2954-2959.
- Kutsukake, K., and T. Iino. 1994. Role of the *FliA*-*FliM* regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 176:3598-3605.
- Kutsukake, K., T. Minamino, and T. Yokoseky. 1994. Isolation and characterization of *FliK*-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 176:7625-7629.
- Kutsukake, K. 1997. Hook-length control of the export-switching machinery involves a double-locked gate in *Salmonella typhimurium* flagellar morphogenesis. *J. Bacteriol.* 179:1268-1273.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.
- LeGendre, N., and P. Matsudaira. 1988. Direct protein microsequencing from Immobilion-P transfer membrane. *BioTechniques* 6:154-159.
- Limberger, J. R., L. L. Sliwinski, and W. A. Sumsonoff. 1994. Genetic and biochemical analysis of the flagellar hook of *Treponema phagedenis*. *J. Bacteriol.* 176:3631-3637.
- Macnab, R. M. 1976. Examination of bacterial flagellation by dark-field microscopy. *J. Clin. Microbiol.* 4:258-265.
- Macnab, R. M. 1977. Bacterial flagella rotating in bundles: a study in helical geometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:221-225.
- Macnab, R. M. 1992. Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu. Rev. Genet.* 26:129-156.
- Macnab, R. M. 1996. Flagella and motility, p. 123-145. In F. C. Niedhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- McCarter, L. L., and M. E. Wright. 1993. Identification of genes encoding components of the swarmer cell flagellar motor and propeller and a sigma factor controlling differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 175:3361-3371.
- Minamino, T., T. Iino, and K. Kutsukake. 1994. Molecular characterization of the *Salmonella typhimurium* *fljB* operon and its protein products. *J. Bacteriol.* 176:7630-7637.
- Moore, M. D., and S. Kaplan. 1989. Construction of *TrpH*A gene fusions in *Rhodobacter sphaeroides*: isolation and characterization of a respiratory mutant unable to utilize dimethyl sulfoxide as a terminal electron acceptor during anaerobic growth in the dark on glucose. *J. Bacteriol.* 171:4385-4394.
- Morgan, D. G., C. Owen, L. A. Melanson, and D. J. DeRosier. 1995. Structure of bacterial flagellar filaments at 11 Å resolution: packing of the alpha-helices. *J. Mol. Biol.* 249:88-110.
- Morrissey, J. H. 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 117:307-310.
- Ohnishi, K., Y. Ohto, S.-I. Aizawa, R. M. Macnab, and T. Iino. 1994. *FliD* is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 176:2272-2281.
- Ohta, N., L.-S. Chem, E. Swanson, and A. Newton. 1985. Transcriptional regulation of a periodically controlled flagellar gene operon in *Caulobacter crescentus*. *J. Mol. Biol.* 186:107-115.
- Patterson-Delafield, J., R. J. Martínez, B. A. D. Stocker, and S. Yamaguchi. 1973. A new *fla* gene in *Salmonella typhimurium*—*flaR*—and its mutant phenotype—superhooks. *Arch. Mikrobiol.* 90:107-120.
- Pfennig, N., and H. G. Truper. 1983. Taxonomy of phototrophic green and purple bacteria: a review. *Ann. Microbiol. (Paris)* 134B:9-20.
- Power, M. E., R. A. Alm, and T. J. Trust. 1992. Biochemical and antigenic properties of the *Campylobacter* flagellar hook protein. *J. Bacteriol.* 174:3874-3883.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- Schuster, S. C., and S. Khan. 1994. The bacterial flagellar motor. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23:509-539.
- Sheffery, M., and A. Newton. 1979. Purification and characterization of a polyhook protein from *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 138:575-583.

48. Silverman, M. R., and M. I. Simon. 1972. Flagellar assembly mutants in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **112**:986–993.
49. Silverman, M. R., and M. I. Simon. 1974. Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature (London)* **249**:73–74.
50. Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**:37–45.
51. Siström, W. R. 1962. The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J. Gen. Microbiol.* **28**:607–616.
52. Sockett, R. E., J. C. A. Foster, and J. P. Armitage. 1990. Molecular biology of the *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. *FEMS Symp.* **53**:473–479.
53. Sockett, R. E., and J. P. Armitage. 1991. Isolation, characterization, and complementation of a paralyzed flagellar mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WSS. *J. Bacteriol.* **173**:2786–2790.
54. Sosinsky, G. E., N. R. Francis, D. J. DeRosier, J. S. Wall, M. N. Simon, and J. Hainfeld. 1992. Mass determination and estimation of subunit stoichiometry of the bacterial hook-basal body flagellar complex of *Salmonella typhimurium* by scanning transmission electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:4801–4805.
55. Suzuki, T., and T. Tino. 1981. Role of the *flaK* gene in flagellar hook formation in *Salmonella* spp. *J. Bacteriol.* **148**:973–979.
56. Wagenknecht, T., D. J. DeRosier, S.-I. Aizawa, and R. M. Maenab. 1982. Flagellar hook structure of *Caulobacter* and *Salmonella* and their relationship to filament structure. *J. Mol. Biol.* **162**:69–87.
57. Williams, A. W., S. Yamaguchi, F. Togashi, S.-I. Aizawa, I. Kawagishi, and R. M. Maenab. 1996. Mutations in *fliK* and *fliB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **178**:2960–2970.



## RESULTADOS ADICIONALES

Los plásmidos utilizados adicionales a los que se muestran en la tabla 1 del artículo son los siguientes:

*Tabla 2*

pRK415	Vector de expresión para <i>R. sphaeroides</i> de 10.5 kb, con el sitio de policlonación de pUC19; Tc <sup>r</sup> (Keen y cols., 1988)
pCHB500	Igual que pRK415 pero con el promotor del gen <i>cycA</i> insertado en el sitio de policlonación; Tc <sup>r</sup> (Benning y Somerville, 1992)
pET19bF	Vector de expresión con una región promotora T7lac seguida de ADN que codifica para 10 residuos de histidina y el octapéptido FLAG; Amp <sup>r</sup> (Fan y Macnab, 1996)
pBG0405a	Inserto <i>SaI</i> I de 4.6 kb del plásmido pBG0404 clonado en pRK415 en la misma orientación que el promotor Tet del vector; Tc <sup>r</sup> *
pBG0405b	Igual que pBG0405a pero con el inserto clonado en la orientación opuesta; Tc <sup>r</sup> *
pBG0503a	Fragmento <i>Eco</i> RI de 5.1 kb del c140, clonado en pRK415 en la misma orientación que el promotor Tet del vector; Tc <sup>r</sup> *
pBG0503b	Igual que pBG0503a pero con el inserto clonado en la orientación opuesta; Tc <sup>r</sup> *
pBG0509	Inserto de pBG0503a clonado en el vector pCHB500 *
pBG0110	Fragmento de 1.3 kb que contiene al gen <i>fliK</i> de <i>E. coli</i> clonado en pRK415; Tc <sup>r</sup> *
pBG0111	Producto de PCR de 1.4 kb que contiene el extremo 3' del gen <i>fliK<sub>RS</sub></i> clonado en el vector pTZ19R; Amp <sup>r</sup> *
pBG0112	Inserto de pBG0111 clonado en pET19bF; Amp <sup>r</sup> *
pBG0113	Inserto de pBG0111 clonado en pRK415; Tc <sup>r</sup> *
pBG0215	Producto de PCR de 2.1 kb que corresponde al gen <i>fliK<sub>RS</sub></i> , clonado en el vector pET19bF; Amp <sup>r</sup> *
pBG0216	<i>fliK<sub>RS</sub></i> clonado en el vector pTZ19R; Amp <sup>r</sup> *
pBG0217	<i>fliK<sub>RS</sub></i> clonado en el vector pRK415; Tc <sup>r</sup> *
c140 A	Fragmento de ~21 kb del inserto de c140 clonado en el vector pLA2917 (Allen y Hanson, 1985); Tc <sup>r</sup> *
c140 B	Fragmento de ~11 kb del inserto de c140 clonado en el vector de expresión pLA2917; Tc <sup>r</sup> *

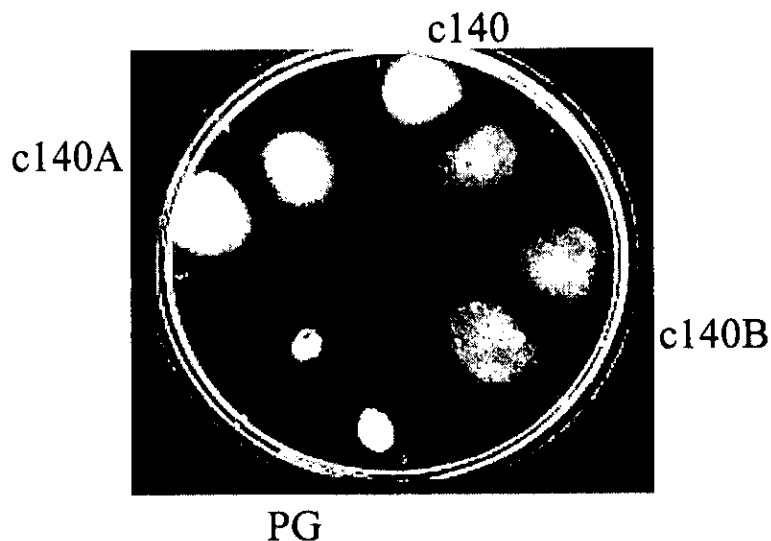
\* Construcciones realizadas durante el presente trabajo.

## Complementación de la mutante PG

Como se mencionó en el artículo, el cósmido c140 (30 kb) es capaz de restablecer el fenotipo silvestre en la mutante poligancho (tanto a PG, como a PG2). Debido a esto, se aislaron diferentes subclonas de c140 para obtener un fragmento de menor tamaño que siguiera complementando. Se realizó un mapa de restricción del inserto de c140 (ver [Figura 13](#)) para lo cual se utilizaron enzimas de restricción que no cortaran frecuentemente el ADN rico en G+C de *R. sphaeorides* como *DraI*, *BglII*, o *HindIII* así como diferentes dobles digestiones.

Los resultados de complementación para las mutantes PG y PG2 indicaron que sólo las construcciones, c140, c140 A y c140 B son capaces de restablecer el fenotipo silvestre.

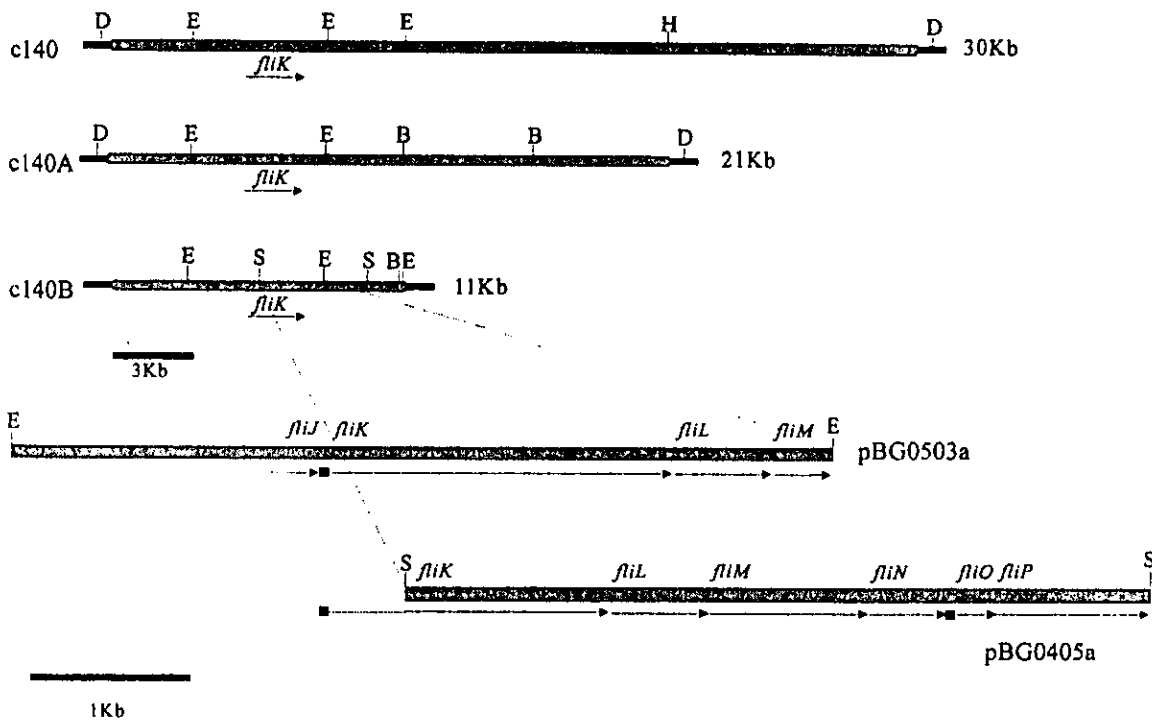
El nado se verificó tanto en cultivo líquido (por microscopía óptica), como en cajas de agar suave ([Figura 12](#)).



**Figura 12.** Placa de nado de la mutante PG sola y complementada con las construcciones c140, c140A y c140B.

Por su parte, los plásmidos pBG0405a y b así como el pBG0503a y b, no fueron capaces de complementar la mutante PG.

La relación existente entre estas construcciones se muestra en la [Figura 13](#).



**Figura 13.** Relación existente entre las construcciones utilizadas para la complementación de la mutante PG. En cada plásmido se señala la localización del gen *fliK*. Las letras señalan los sitios de corte para las siguientes enzimas de restricción: D-*DraI*, E-*EcoRI*, H-*HindIII*, B-*BglII*, S-*SaII*. Los cuadros indican la existencia de una secuencia promotora al inicio del gen *fliK* así como al inicio del gen *fliO*. La construcción *EcoRI* corresponde al plásmido pBG0503a y la *SaII* al plásmido pBG0405a (ver [Tabla 2](#)).

Inicialmente se pensó que la falta de complementación con el plásmido pBG0503a podía deberse a que se requería de un promotor más fuerte para restablecer el fenotipo silvestre; sin embargo, el plásmido pBG0509 que contiene el promotor del gen *cycA* de *Rhodobacter capsulatus* (Benning y Somerville, 1992), tampoco fue capaz de complementar. Las mutantes PG y PG2 complementadas con dichos plásmidos se observaron al microscopio electrónico y presentaban el fenotipo poliganchoso. Por otra parte, el experimento de complementación también se realizó con el plásmido pBG0217 que contiene únicamente al gen *fliK<sub>RS</sub>*, el cual a su vez fue incapaz de restablecer el fenotipo silvestre. Por último, el resultado de la complementación heteróloga utilizando el gen *fliK* de *E. coli* en el plásmido pBG0110, también fue negativo. Cabe mencionar que una mutante en *fliJ* sí se complementa con el plásmido pBG0503a (dato no mostrado), y que como se muestra en el artículo del apéndice I, la construcción pBG0405a es capaz de complementar una mutante en *fliM*. Es decir, dichas construcciones sí se están expresando en *R. sphaeroides*, pero son incapaces de restablecer el fenotipo silvestre de la mutante PG.

Estos datos muestran que, en el caso de la mutante poligancho, existe un efecto polar del transposón *TnphoA* insertado en *fliK* hacia los genes que están río abajo y que forman parte del mismo operón: *fliL*, *M* y *N* (ver apéndice I). Es por ello que sólo si todos los genes del operón están presentes (como en c140, c140A y c140B), la mutante recupera la movilidad. Estos resultados se discuten ampliamente en la siguiente sección.

### *Secuencia de fliK*

En el transcurso de los experimentos de complementación se observó que la secuencia del gen *fliK* incluía a la del denominado “*orf*” mencionado en el artículo 1 y el apéndice I; es decir, la secuencia nucleotídica completa del gen *fliK* consiste de 2103 pb que codifican para una proteína de 700 aminoácidos con un peso molecular deducido de 67,219 Da. Dicha secuencia presenta un sitio, con una posible secuencia de unión a ribosomas (AGGAG), localizado 7 pb río arriba del codón de inicio. El número de acceso para la secuencia completa en GenBank es el U86454. En el plásmido secuenciado se identificó también el extremo 3' del gen *fliJ*; y entre éste, y el principio de *fliK*, existe una región intergénica de 55 pb que contiene una secuencia consenso promotora tipo  $\sigma^{54}$ : TGGCACN5TTGCA (Helmann, 1991).

La comparación de aminoácidos entre las proteínas FliK de *R. sphaeroides* y *S. typhimurium* muestra un 22% de identidad, iniciándose el alineamiento en el residuo 301 de FliK<sub>RS</sub>, es decir, la proteína de *R. sphaeroides* presenta una extensión del extremo N-terminal (ver discusión).

### *Purificación de FliK*

Para amplificar por PCR el gen *fliK<sub>RS</sub>* se diseñaron los siguientes desoxioligonucleótidos, con sus respectivos sitios de corte para enzimas de restricción:

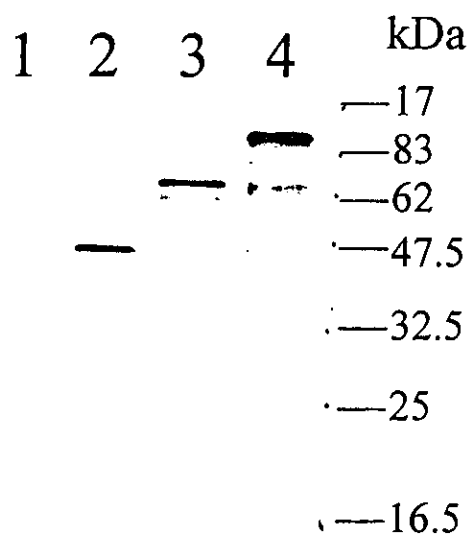
*NdeI*

a) 5' AGACACATATGAAGCTCGTCGAGG 3'

*BlnI*

b) 5' GTCACGCTCAGCTTATCAGGCAAT 3'

Se amplificó un producto de 2.1 kb que se clonó en el vector pET19bF, el que presenta una secuencia que codifica para 10 residuos de histidina así como el octapéptido DYKDDDDK que es reconocido por el anticuerpo monoclonal FLAG (Fan y Macnab, 1996). Este plásmido (pBG0215) se transformó en *E. coli* y su expresión se indujo con IPTG. El extracto de células lisadas se corrió a través de un gel de poliacrilamida-SDS, que se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para realizar una inmunoréplica tipo Western utilizando anticuerpos anti-histidinas como se mencionó en la metodología. El resultado se muestra en la *Figura 14*.



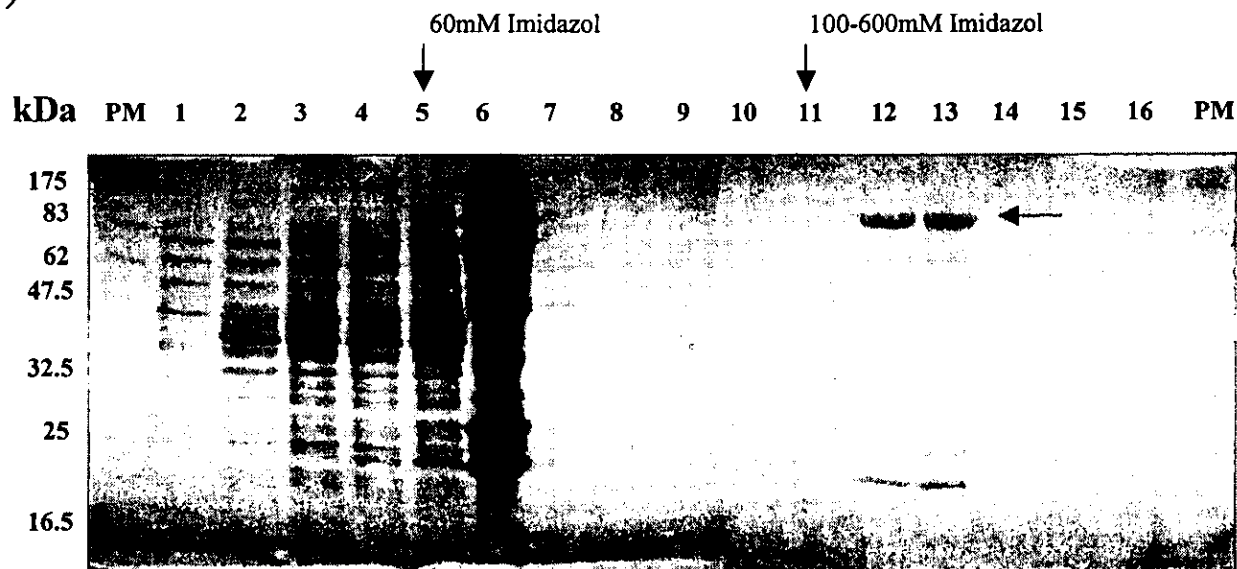
**Figura 14.** Inmunoréplica tipo Western utilizando anticuerpos anti-histidinas de las proteínas resultantes de la expresión de 1) vector pET19bF, 2) el plásmido pKM003 que contiene al gen *fliK* de *S. typhimurium* (ver tabla 1 del artículo 3), 3) plásmido pBG0112 que contiene el extremo 3' del gen *fliK<sub>Rs</sub>*, 4) plásmido pBG0215 con el gen *fliK<sub>Rs</sub>*. Las proteínas codificadas por estos plásmidos contienen la fusión con los residuos de histidina.

El tamaño de la proteína FliK deducido de la secuencia de aminoácidos es de 67.2 kDa; sin embargo, como se observa en el carril 4, la expresión del gen genera una proteína de ~90 kDa. Esta migración anómala puede deberse al alto contenido de prolinas de FliK.

Posteriormente FliK se purificó utilizando una resina de Ni-NTA (Qiagen). El perfil de elución se muestra en la *Figura 15*. El gel de poliacrilamida, así como la inmunoréplica tipo Western, indican que la proteína eluye a partir de una concentración de 100 mM de imidazol. Como se observa en la *Figura 15*, se obtiene una preparación con un alto grado

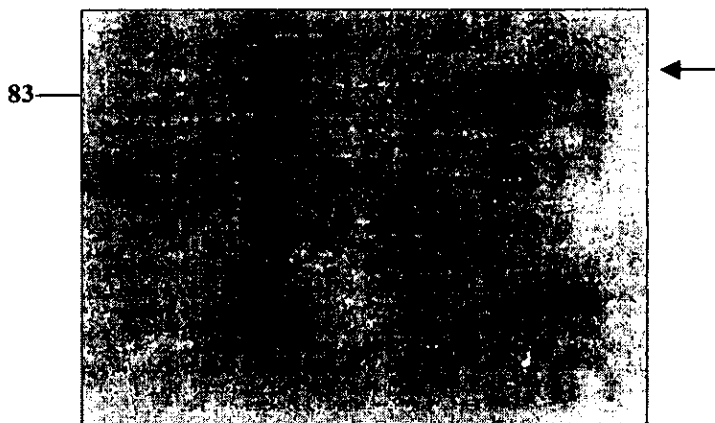
de pureza; sin embargo, existen aún bandas contaminantes de bajo peso molecular, algunas de las cuales pueden ser el resultado de degradación proteolítica.

a)



b)

kDa 1 3 5 6 PM 7 11 12 13



**Figura 15.** Perfil de elución de la proteína FliK<sub>RS</sub>. a) Geles de poliacrilamida SDS teñidos con azul de Coomassie en los que se muestran las diferentes fracciones que eluyen de la columna. En los carriles 1-4 se observa la elución de la muestra, del 5-10 corresponden al lavado con 60 mM de imidazol, del 11-16 es la elución con un gradiente lineal de 100-600 mM de imidazol. b) Inmunoréplica tipo Western de las fracciones 1,3,5,6,7,11,12 y 13 de la elución, utilizando para la detección el anticuerpo anti-histidinas.

♦ *FliK de Salmonella typhimurium*

Los resultados se muestran en el artículo del apéndice II.

## EL OPERON *flgG*: ESTUDIO DE UNA MUTANTE DEL ANILLO P

Los experimentos relacionados con la caracterización del operón *flgG* han concluido recientemente y los resultados están incluidos en un artículo que será enviado a publicación próximamente y que se titula:

"Molecular Genetics of the *flgI* Region and Its Role in Flagellum Biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*".

Bertha González-Pedrajo, F. Javier de la Mora, Teresa Ballado, Laura Camarena y Georges Dreyfus.

Las mutantes y plásmidos obtenidos en esta parte del trabajo se muestran en la Tabla 3 y la relación entre las clonas utilizadas se presenta en la Figura 16.

### Tabla 3

#### CEPAS

RsgI	derivado <i>TnphoA::flgI</i> de <i>R. sphaeroides</i> WS8-N, no móvil, Kn <sup>r</sup> , Nal <sup>r</sup>
RsgI-np	derivado <i>uidA-aad::flgI</i> de <i>R. sphaeroides</i> WS8-N, no móvil, Spc <sup>r</sup> , Nal <sup>r</sup>

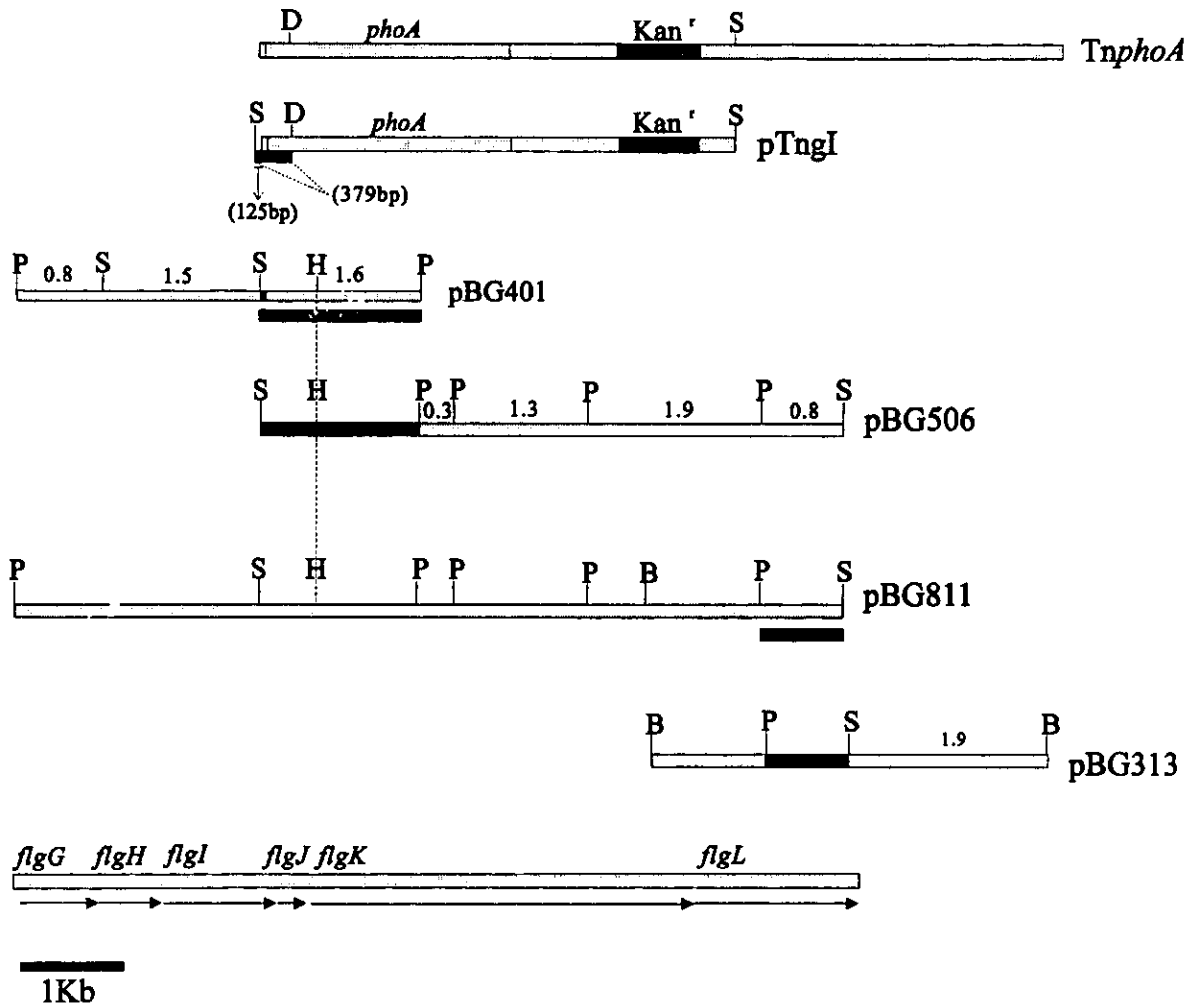
#### PLASMIDOS

pTngI	fragmento de 4.7 kb clonado en pTZ18R que contiene 4.6 kb de <i>TnphoA</i> y 125 pb del ADN de RsgI adyacente al sitio de inserción del transposón; Kn <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup>
pBG401	fragmento <i>PstI</i> de 3.9 kb de ADN de <i>R. sphaeroides</i> WS8-N clonado en pTZ19R, contiene los genes <i>flgG</i> , <i>flgH</i> , <i>flgI</i> , <i>flgJ</i> y secuencia parcial de <i>flgK</i> ; Amp <sup>r</sup>
pBG402-A	inserto del plásmido pBG401 clonado en pRK415, los genes se encuentran en la misma dirección de los promotores del vector; Tc <sup>r</sup>
pBG402-B	inserto del plásmido pBG401-A clonado en pRK415, en la dirección opuesta; Tc <sup>r</sup>
pBG003-A	fragmento <i>SalI</i> de 0.8 kb proveniente de pBG401, clonado en pTZ19R; Amp <sup>r</sup>
pBG003-B	inserto del plásmido pBG003-A, clonado en pTZ19R en la orientación opuesta; Amp <sup>r</sup>
pBG104-A	fragmento <i>SalI</i> de 1.5 kb proveniente de pBG401, clonado en pTZ19R; Amp <sup>r</sup>
pBG104-B	inserto del plásmido pBG104-A, clonado en pTZ19R en la orientación opuesta; Amp <sup>r</sup>

- pBG105-A fragmento *SalI-PstI* de 1.6 kb proveniente de pBG401, clonado en pTZ19R; Amp<sup>r</sup>
- pBG105-B inserto *EcoRI-PstI* del plásmido pBG105-A, clonado en pTZ18R; Amp<sup>r</sup>
- pBG506-A fragmento *SalI* de 5.9 kb de ADN de *R. sphaeroides* WS8-N clonado en pTZ19R, contiene los genes *flgJ*, *flgK* y secuencia parcial de *flgL*; Amp<sup>r</sup>
- pBG506-B inserto del plásmido pBG506-A clonado en pTZ19R en la orientación opuesta; Amp<sup>r</sup>
- pBG107-A fragmento *PstI* de 1.9 kb proveniente de pBG506-A, clonado en pTZ19R; Amp<sup>r</sup>
- pBG107-B inserto del plásmido pBG107-A, clonado en pTZ19R en la orientación opuesta; Amp<sup>r</sup>
- pBG108-A fragmento *PstI* de 1.3 kb proveniente de pBG506-A, clonado en pTZ19R; Amp<sup>r</sup>
- pBG108-B inserto del plásmido pBG108-A, clonado en pTZ19R en la orientación opuesta; Amp<sup>r</sup>
- pBG009 fragmento *PstI-SalI* de 0.8 kb proveniente de pBG506 clonado en pTZ19R; Amp<sup>r</sup>
- pBG010 fragmento *PstI* de 0.3 kb proveniente de pBG506 clonado en pTZ19R; Amp<sup>r</sup>
- pBG811 fragmento de 8.2 kb que resulta de la unión de las clonas pBG401 y pBG506 clonado en pTZ19R, contiene los genes *flgG*, *flgH*, *flgI*, *flgJ*, *flgK* y secuencia parcial de *flgL*; Amp<sup>r</sup>
- pBG812 inserto del plásmido pBG811 clonado en pRK415, los genes se encuentran en la misma dirección de los promotores del vector; Tc<sup>r</sup>
- pBG313 fragmento *BamHI* de ~3.8 kb de ADN de *R. sphaeroides* WS8-N clonado en pTZ19R, contiene el gen *flgL* completo; Amp<sup>r</sup>
- pBG514 fragmento de 5.3 kb que incluye al plásmido pBG401 con el cassette de espectinomicina insertado en el sitio *BlpI* del gen *flgI* (*flgI::uidA-aad*).
- pBG515 inserto del plásmido pBG514 clonado en el sitio *PstI* del vector suicida pJQ200



**Figura 16.**



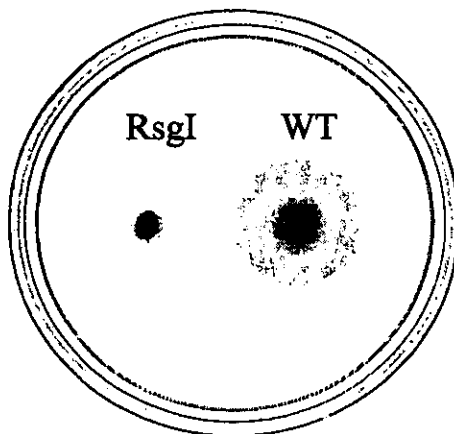
**Figura 16.** Relación existente entre las construcciones utilizadas para la caracterización de la mutante *RsgI*. Las letras indican los sitios de restricción para las siguientes enzimas: S-*SalI*, D-*DraI*, P-*PstI*, H-*HindIII*, B-*BamHI*. Los números señalan el tamaño del fragmento en kb. Los rectángulos negros corresponden a las sondas utilizadas. *Kan<sup>r</sup>* (gen de resistencia a kanamicina).

### *Aislamiento y selección de la mutante RsgI*

La mutante *RsgI* se generó por inserción del elemento transponible *TnpHoA* en el cromosoma de la cepa silvestre de *Rhodobacter sphaeroides* WS8-N (Rs). Se obtuvo como una colonia resistente al antibiótico kanamicina (resistencia conferida por el transposón

Tn5); y con una frecuencia de 1 en 600 exconjugantes. RsgI fue capaz de crecer tanto en condiciones fotosintéticas como aeróbicas, con la misma velocidad de crecimiento que la cepa silvestre.

Las colonias se analizaron en placas de nado o agar suave, en las que se observó que la mutante RsgI no forma el anillo de nado característico que genera la cepa silvestre al alejarse del punto de inoculación (*Figura 17*).

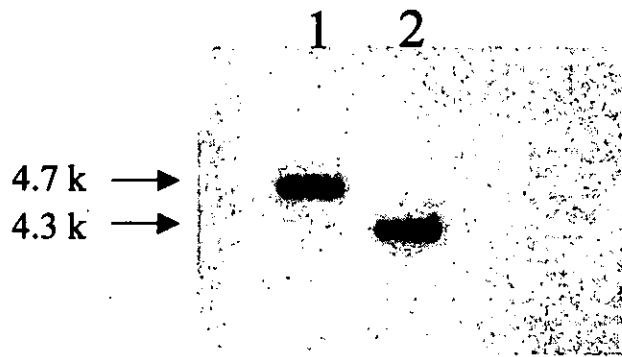


**Figura 17.** Placa de nado de *R. sphaeroides* WS8 (WT) y la mutante RsgI.

La movilidad de RsgI también se verificó por microscopía óptica de campo oscuro de alta intensidad, utilizando un cultivo en fase temprana de crecimiento ( $OD_{600\text{ nm}}$  de 0.35), que resultó no móvil, comparado con un cultivo silvestre en el que las células nadaban activamente. El análisis al microscopio electrónico de la mutante mostró que carece de cualquier estructura flagelar externa, por lo que se le asignó un fenotipo flagelar no móvil (Fla').

#### *Identificación del gen responsable del fenotipo Fla'*

La existencia de un único evento de inserción del transposón en el cromosoma de *R. sphaeroides* se demostró por análisis de hibridación tipo Southern; utilizando como sonda el fragmento interno *DraI-SaII* de *TnphoA* sobre la digestión con *SaII* del ADN cromosomal de la mutante RsgI (*Figura 18*).



**Figura 18.** Hibridación tipo Southern 1) ADN cromosomal de la mutante RsgI digerido con *SalI* 2) Fragmento *DraI-SalI* de *TnphoA*, el cual se utilizó como sonda.

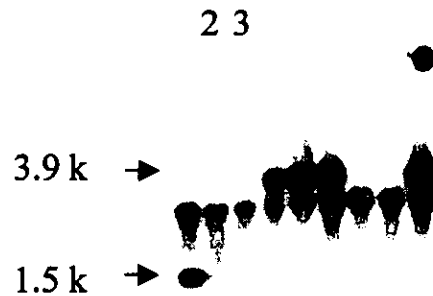
Este fragmento de 4.7 kb (clona pTngI) contiene el ADN adyacente (125 pb) al sitio de inserción del transposón (ver [Figura 16](#)), por lo que se utilizó para identificar al gen responsable del fenotipo no móvil. Se realizó la secuenciación nucleotídica del fragmento de 125 pb y su traducción a aminoácidos. El análisis de comparación con la base de datos Swissprot indicó la existencia de homología con la proteína FlgI de *Salmonella typhimurium*, la que constituye el anillo P del cuerpo basal del flagelo.

#### *Clonación del gen flagelar flgI*

Para la clonación del gen *flgI* completo del ADN cromosomal de *R. sphaeroides* WS8-N, se realizaron estudios de hibridación tipo Southern. Se utilizó como sonda el fragmento *SalI-DraI* de 379 pb de la clona pTngI (ver [Figura 16](#)). Este fragmento se hibridó con el ADN cromosomal<sub>RS</sub> digerido con diferentes enzimas de restricción y se obtuvieron bandas de hibridación de aproximadamente 3.9 kb (*PstI*), 1.5 kb (*SalI*) y 21.0 kb (*EcoRI*) (dato no mostrado). Las regiones que dieron señal positiva se purificaron, clonaron y transformaron como se describe en la metodología. Se obtuvo un total de 331 colonias transformantes con insertos de la región *PstI* y 433 para *SalI* (la región de hibridación obtenida con *EcoRI* no se clonó debido a su gran tamaño).

Las transformantes se sometieron a un experimento de hibridación en colonia, utilizando como sonda el mismo fragmento *SalI-DraI* de 379 pb de la clona pTngI. Posteriormente, se realizó la minipreparación de ADN de las colonias que dieron señal

positiva, así como el respectivo análisis de restricción para verificar la presencia del inserto correspondiente, y las digestiones se hibridaron utilizando la misma sonda (*Figura 19*). La clona positiva para el inserto *PstI* se denominó pBG401 y su análisis de restricción mostró que contenía incluido el fragmento *SaII* de 1.5 kb que se clonó y se denominó pBG104-A.



**Figura 19.** Hibridación tipo Southern utilizando como sonda el fragmento *SaII-DraI* de pTngI, sobre minipreparaciones de ADN de las colonias que dieron señal positiva. En el carril 1 se muestra el fragmento *SaII* de 1.5 kb y los carriles 4, 5, 6 y 9 contienen el fragmento *PstI* de 3.9 kb. La banda intermedia (2.9 kb) presente en todos los carriles corresponde al vector pTZ19R.

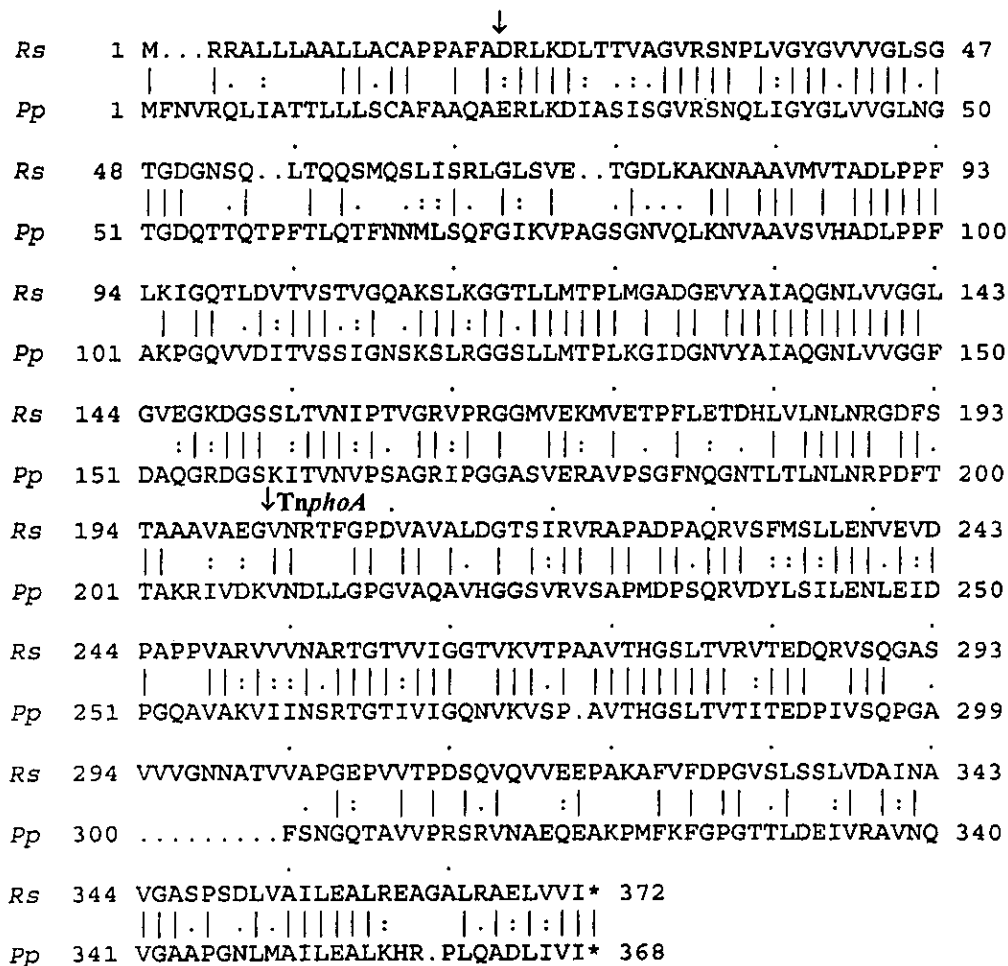
#### *Secuenciación nucleotídica del gen flgI*

Para llevar a cabo la secuenciación nucleotídica, se subclonaron los fragmentos *SaII* de 0.8 kb, *SaII* de 1.5 kb y *SaII-PstI* de 1.6 kb del plásmido pBG401, generando las clonas pBG103, 104 y 105, respectivamente (ver *Tabla 3* y *Figura 16*).

Se secuenció un total de 3956 pb a partir de las cuales se obtuvo la secuencia de aminoácidos y se realizó una búsqueda de similitud en la base de datos. Las proteínas que mostraron homología con esta secuencia resultaron ser proteínas flagelares de otras especies bacterianas: FlgG, FlgH, FlgI, FlgJ y el extremo amino terminal de FlgK. En esta secuencia también se identificó una región río arriba del gen *flgG* con homología a la secuencia consenso para un promotor tipo  $\sigma^{54}$  (Helmann, 1991). La secuencia es la siguiente: TGGCACN5TTGC y las bases subrayadas son las que están absolutamente conservadas.

La proteína FlgI (anillo P), cuya ausencia genera el fenotipo no móvil de RsgI, mostró tener una alta similitud con la misma proteína de otras especies bacterianas: 54% de

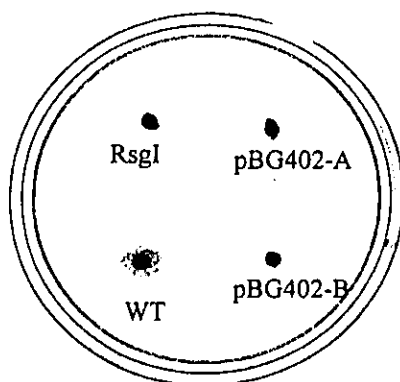
identidad con *Pseudomonas putida* y 44% con *S. typhimurium*. En la *Figura 20* se muestra el alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de FlgI de *P. putida* y *R. sphaeroides* y se señala el sitio que corresponde al lugar en el que se insertó el transposón en RsgI. Se muestra también un posible sitio de corte de la secuencia señal que identificamos en esta proteína. Una secuencia que cumple con las características de un péptido señal también fue identificada en la proteína FlgH<sub>Rs</sub>: MSRRMSLTALALLLAPAACS



**Figura 20.** Alineamiento entre los 371 aminoácidos de FlgI<sub>Rs</sub> y los 367 aminoácidos de FlgI<sub>Pp</sub>. La flecha señala el posible sitio de corte del péptido señal, así como el sitio que corresponde en FlgI al lugar en el que se insertó *TnphoA* en *flgI*.

## Complementación de la mutante *RsgI*

Para los experimentos de complementación en trans y restablecimiento de la movilidad de la mutante *RsgI* se utilizó el plásmido pBG402-A y se observó que la mutante *RsgI* complementada no recupera el nado (*Figura 21*). Este resultado se verificó por microscopía óptica utilizando cultivos en medio líquido.

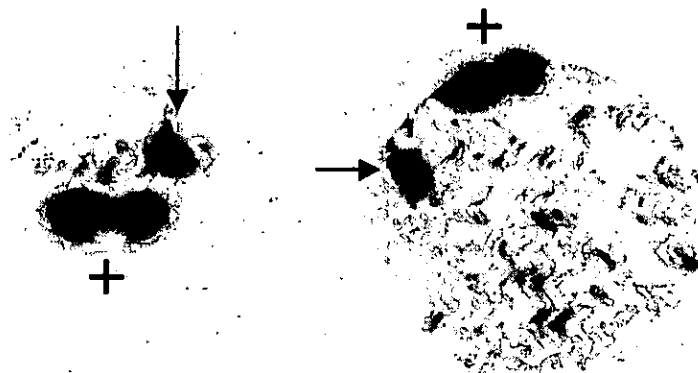


**Figura 21.** Placa de nado de *R. sphaeroides* WS8 (WT), así como la mutante *RsgI* sola y complementada con los plásmidos pBG402-A y B.

El análisis al microscopio electrónico mostró que no existe filamento, por lo que el fenotipo silvestre no se recupera. Sin embargo, para verificar la presencia de cualquier otra estructura flagelar en *RsgI* complementada, las células se rasuraron y el contenido extracelular se observó al microscopio electrónico. Los resultados indicaron la existencia de gancho en la mutante complementada (dato no mostrado), independientemente de la orientación de la clona pBG402 respecto al promotor del vector; lo que a su vez corrobora la presencia de un promotor interno en dicha construcción. Cabe mencionar, que en la mutante *RsgI* rasurada, que se utilizó como control, no se encontraron ganchos. Estos resultados indican que el defecto generado por la ausencia de la proteína FlgI ha sido restablecido en dicho experimento de complementación, ya que para que se ensamble el gancho, se requiere el anillo P. Sin embargo, en la mutante complementada no se forma el filamento, lo que implica un efecto polar del transposón en *flgI* hacia los genes 3' y que la presencia de éstos en los plásmidos pBG402-A y B es indispensable para el restablecimiento del fenotipo silvestre.

## *Clonación y secuenciación de los genes río abajo de flgI*

Para la clonación de los genes localizados hacia el extremo 3' de *flgI* se realizó una hibridación tipo Southern, utilizando como sonda el fragmento *SalI-PstI* de 1.6 kb del plásmido pBG401 sobre una digestión del ADN cromosomal<sub>R<sub>s</sub></sub> con *SalI*. Se obtuvo una región de hibridación de aproximadamente 5.9 kb, la cual se clonó y transformó. Se obtuvieron un total de 150 colonias transformantes que se sometieron a hibridación en colonia utilizando como sonda el mismo fragmento de pBG401. Los resultados de la hibridación mostraron dos colonias que dieron señal positiva (*Figura 22*), cuyo ADN plasmídico se analizó tanto por restricción como por hibridación para verificar la presencia del inserto correspondiente. Las dos clonas obtenidas presentaron orientaciones opuestas y se denominaron pBG506-A y B (ver *Tabla 3* y *Figura 16*).

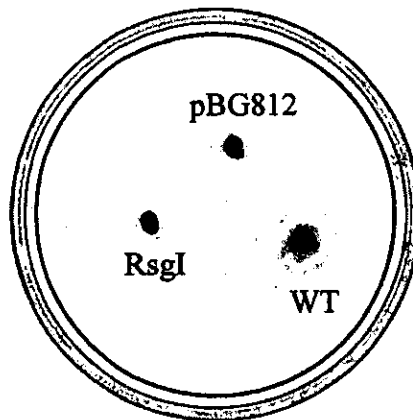


**Figura 22.** Hibridación tipo Southern en colonia utilizando como sonda un fragmento *SalI-PstI* de 1.6 kb de pBG401. El símbolo (+) señala las dos colonias que se utilizaron como control positivo en cada caja y que contienen al plásmido pBG401. Las flechas señalan las colonias que contienen las clonas pBG506-A y B.

Para llevar a cabo la secuenciación nucleotídica de pBG506, se subclonaron los fragmentos: *PstI* de 0.3 kb (generando el plásmido pBG010), *PstI* de 1.3 kb en ambas orientaciones (pBG108-A y B), *PstI* de 1.8 kb en ambas orientaciones (pBG107-A y B) así como el fragmento *PstI-SalI* de 0.8 kb (pBG009). Se secuenció un total de 4324 pb cuya traducción a aminoácidos se comparó en la base de datos. Las proteínas flagelares de otras especies bacterianas que mostraron homología con esta secuencia fueron: FlgK y FlgL (proteínas HAP1 y HAP3 respectivamente).

### Complementación de la mutante *RsgI* con la clona *pBG812*

Para intentar nuevamente restablecer el fenotipo silvestre de la mutante *RsgI*, se generó la clona *pBG811* (*Tabla 3*), que resulta de la unión de las clonas *pBG401* y *pBG506*; y que contiene desde el gen *flgG* hasta el gen *flgL* (que se encuentra incompleto en esta construcción). Las clonas se unieron a través del sitio único y común entre ellas *HindIII* (ver *Figura 16*). La construcción *pBG812* se introdujo en *RsgI* y se observó que la mutante complementada no recupera la movilidad (*Figura 23*); es decir, a pesar de que en este nuevo plásmido existe un fragmento adicional en el extremo 3' de 4.3 kb (comparando con la clona con la que se realizó el primer ensayo de complementación), éste fue también incapaz de restablecer el nado. Después de 48 hrs de incubación, la mutante con el plásmido *pBG812* comienza a nadar; sin embargo, esto se atribuye a un posible evento de recombinación, ya que la mutante complementada fue incapaz de nadar en un cultivo líquido en fase temprana de crecimiento (ver discusión).



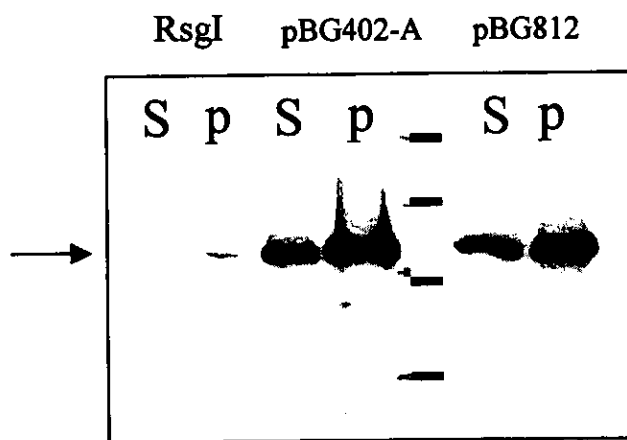
**Figura 23.** Placa de nado de *R. sphaeroides* WS8 (WT), así como la mutante *RsgI* sola y complementada con el plásmido *pBG812*.

Estos resultados (la ausencia de complementación con *pBG812*), indican nuevamente la existencia de un efecto polar del *TnphoA* en *flgI* hacia los genes 3' que formen parte del mismo operón. Sin embargo, el análisis detallado de la secuencia nucleotídica mostró una región intergénica de 108 pb entre *flgJ* y *flgK* que contiene un posible promotor tipo  $\sigma^{28}$  (clase 3), por lo que los genes *flgK* y *flgL* formarían parte de otro operón. La secuencia para el promotor tipo  $\sigma^{28}$  es la siguiente: GCAAN<sub>15</sub>GCCGAGGA. Por lo tanto, la incapacidad para restablecer el fenotipo silvestre puede explicarse si se



considera que dicho posible promotor  $\sigma^{28}$  no es funcional y que todos los genes se transcriben desde el promotor  $\sigma^{34}$  localizado río arriba de *flgG* (ver discusión). Haciendo esta consideración, el hecho de que la mutante no se complemente puede deberse entonces a que el gen *flgL* se encuentra incompleto en pBG812, imposibilitando el ensamblaje de la proteína HAP3 (codificada por *flgL*) y por lo tanto de la flagelina (FliC); o bien, a que el gen o genes río abajo de *flgL* contribuyen al correcto ensamblaje de la proteína FliC, o expresión del gen *fliC*.

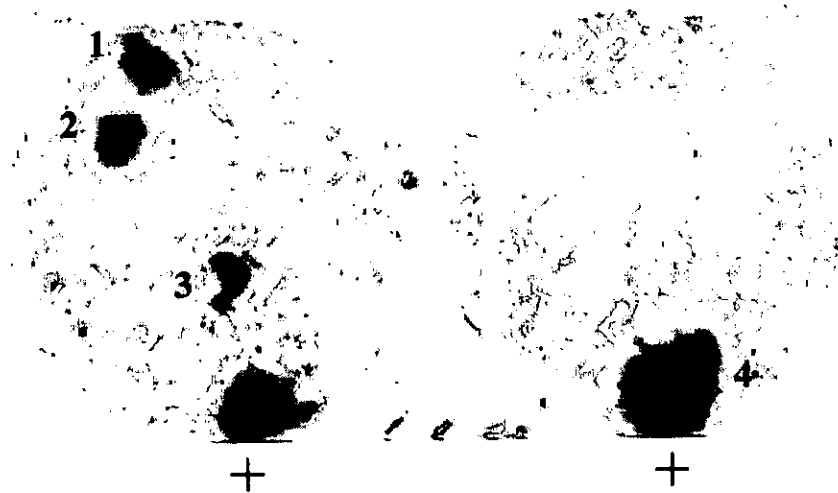
Para eliminar la posibilidad de que la expresión de *fliC* y/o la exportación de FliC estuviera afectada por la inserción de *TnphoA* en *flgI*, se realizó un experimento de inmunoréplica tipo Western, utilizando anticuerpos anti-FliC<sub>RS</sub>. Los resultados muestran que en la mutante RsgI existen sólo niveles basales de flagelina en la célula y que la proteína no se exporta, mientras que en la mutante complementada tanto con pBG402-A como con pBG812, incrementan aproximadamente 10 veces los niveles de flagelina intracelular y que ésta es capaz de ser exportada (*Figura 24*). El hecho de que FliC se sintetice indica que los genes clase 3 están siendo expresados, por lo que la falta de complementación se le puede atribuir sólo a la ausencia de la proteína HAP3 completa. Estos resultados se discuten ampliamente en la siguiente sección.



**Figura 24.** Inmunoréplica tipo Western utilizando anticuerpos anti-flagelina de *R. sphaeroides*, del sobrenadante (S) y el precipitado (P) resultante de la centrifugación de bacterias de la mutante RsgI sola y complementada con los plásmidos pBG402-A y pBG812. El carril entre estos últimos señala los pesos moleculares que corresponden a 32.5, 47, 62 y 88 kDa. La flecha señala la banda correspondiente a la flagelina (55 kDa).

### Clonación del extremo 3' del gen *flgL*

Para obtener una construcción con el gen *flgL* completo, se realizó un experimento de hibridación tipo Southern, utilizando como sonda el fragmento *PstI-SalI* de 0.8 kb del plásmido pBG506, sobre una digestión de ADN cromosomal<sub>RS</sub> con *BamHI*. Se obtuvo una región de hibridación de ~3.8 kb que se clonó y transformó. Posteriormente, se realizó una hibridación tipo Southern en colonia utilizando como sonda el fragmento *PstI-SalI* de 0.8 kb de pBG506. Se analizaron ~1000 colonias transformantes de las cuales 4 dieron señal positiva (*Figura 25*).



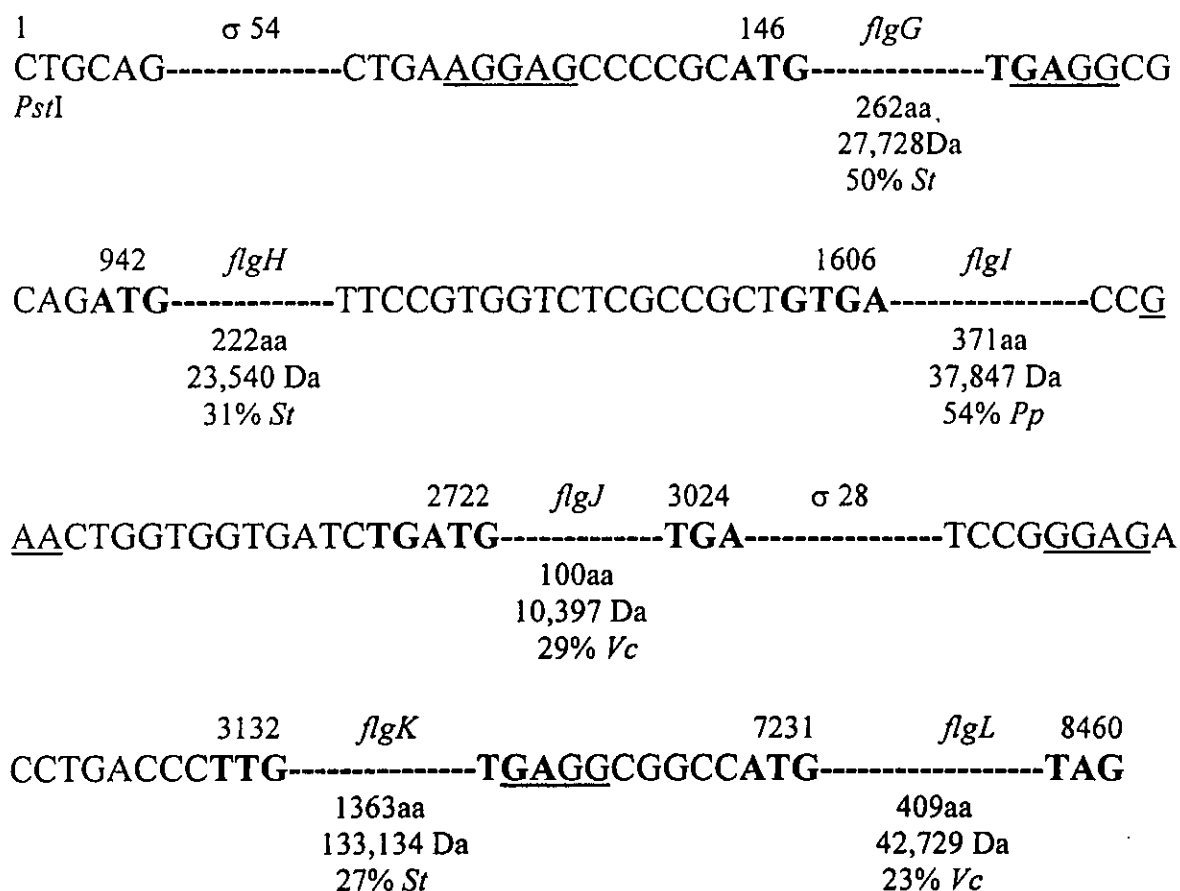
**Figura 25.** Hibridación tipo Southern en colonia utilizando como sonda un fragmento *PstI-SalI* de 0.8 kb de pBG506. El símbolo (+) señala las dos colonias que se utilizaron como control positivo en cada caja y que contienen al plásmido pBG506. Se señalan las cuatro colonias con señal positiva.

El ADN de las colonias positivas se analizó por restricción e hibridación y el plásmido resultante se denominó pBG313. Se llevó a cabo la secuenciación nucleotídica identificándose el extremo 3' del gen *flgL* que es el último gen del operón. Róo abajo se identificó una secuencia de promotor tipo  $\sigma^{54}$ , así como un marco de lectura abierto que no presenta homología con ninguna secuencia flagelar.

#### *Proteínas y genes flagelares identificados*

En las 8460 pb secuenciadas se identificaron 6 genes: *flgG*, *flgH*, *flgI*, *flgJ*, *flgK* y *flgL*, así como dos diferentes posibles promotores, el número de acceso en GenBank es el AF205139. El contenido G+C de toda la secuencia es del 72%, lo que coincide con el alto

contenido G+C que ha sido observado para el cromosoma de *R. sphaeroides*. En la *Figura 26* se muestran los tamaños de dichos genes, las secuencias de inicio y término, de unión a ribosomas, los posibles promotores, el peso molecular calculado de las proteínas, así como el porcentaje de identidad con la proteína homóloga bacteriana más conservada. Para mayor facilidad, en el apéndice III se muestran los alineamientos con cada proteína (excepto para FlgI que está en la *Figura 20*), así como la secuencia nucleotídica completa.



**Figura 26.** Los codones de inicio y término de cada gen se muestran en negritas, los números en la parte superior de la secuencia corresponden a las pares de bases. El sitio de unión a ribosomas se señala subrayado. *St-S. typhimurium*, *Pp-P. putida*, *Vc-V. cholerae*. El porcentaje de identidad para la proteína FlgJ es únicamente con el extremo N-terminal de FlgJ<sub>Vc</sub>, y el porcentaje de identidad para la proteína FlgK es considerando sólo el extremo N-terminal de FlgK<sub>RS</sub>, lo cual se debe a los diferentes tamaños de las proteínas (ver más adelante).

Como se muestra en la *Figura 26*, para el gen *flgI* no se localizó una secuencia conservada de unión a ribosomas ("Shine-Dalgarno") y dicha secuencia es débil para el gen *flgJ*. A su vez, cabe mencionar que el gen *flgI* inicia con el codón GTG que codifica para

valina, pero es comúnmente utilizado en *R. sphaeroides* como codón de inicio y el gen *flgK* utiliza el codón raro TTG que codifica para leucina, esto sólo lo habíamos observado anteriormente para el gen *fliO* (ver apéndice I). A diferencia de las demás bacterias en las que se ha identificado el gen *flgK*, éste resulta ser de mayor tamaño en *R. sphaeroides*. Las secuencias iniciales y finales de la proteína FlgK alinean con las proteínas correspondientes de otras especies bacterianas, por lo que FlgK<sub>RS</sub> presenta una extensión adicional en la zona central.

La existencia de estos marcos de lectura coincide con el análisis de predicción de marcos de lectura por uso de codones que se realizó con el programa Codon Preference (GCG), utilizando el uso de codones correspondiente a 90 genes de *R. sphaeroides* (Figura 27). Cabe mencionar que este análisis fue también exitosamente utilizado en la identificación de errores de secuenciación.

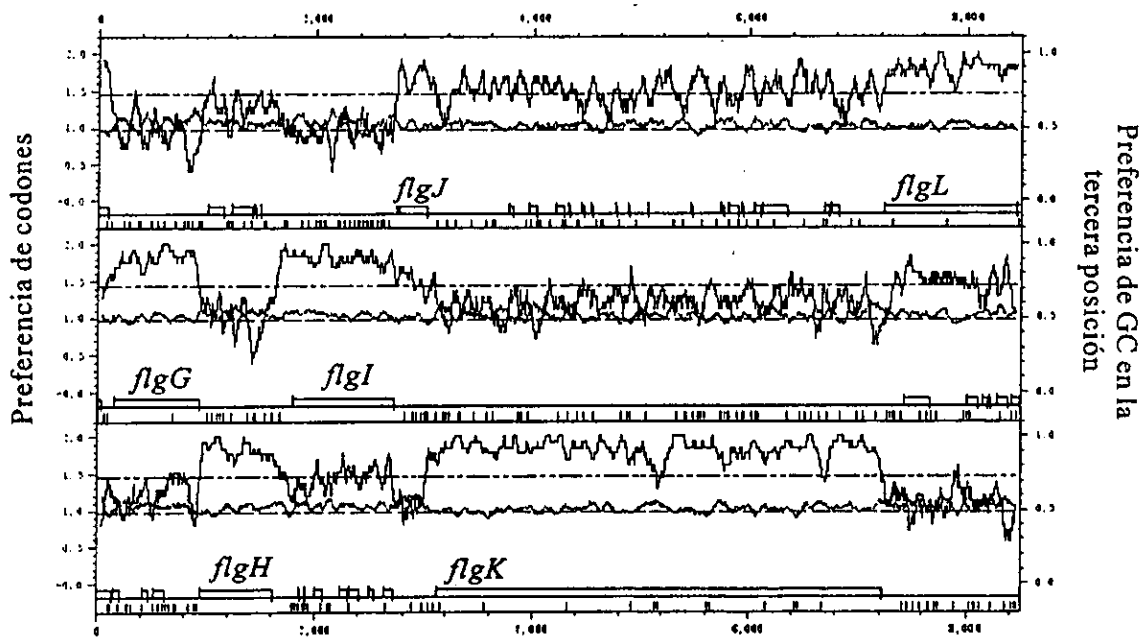
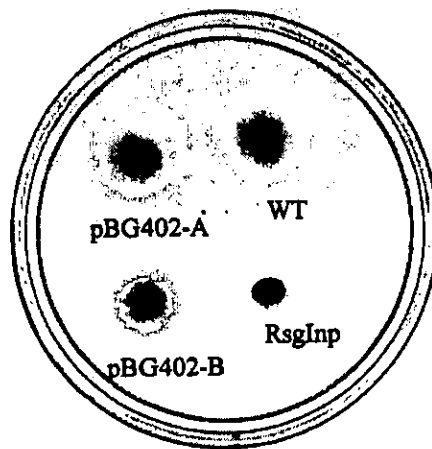


Figura 27. Análisis de predicción de marcos de lectura por uso de codones. Probabilidad de preferencia de codones (gris); probabilidad de preferencia de GC en la tercera posición (negro).

### *Aislamiento y complementación de una mutante flgI no polar*

Para comprobar que el gen *flgI* de pBG401 es capaz de restablecer el fenotipo silvestre a una mutante *flgI* cuando ésta no presenta un efecto polar hacia los genes 3', se construyó una mutante no polar denominada RsgI-np, como se describe en la metodología. La inserción del cassette de espectinomicina en el gen *flgI* se verificó por análisis de hibridación tipo Southern, utilizando dicho fragmento como sonda sobre una digestión con *PstI* del ADN cromosomal de RsgI-np (dato no mostrado).

La mutante RsgI-np es incapaz de nadar; sin embargo, al introducir las clonas pBG402 A y B en RsgI-np la mutante recupera el fenotipo silvestre (*Figura 28*).



**Figura 28.** Placa de natación de *R. sphaeroides* WS8 (WT), así como la mutante RsgI-np sola y complementada con los plásmidos pBG402-A y B.

El hecho de que la construcción pBG402 complemente a RsgI-np independientemente de la orientación de clonación respecto al promotor del vector, corrobora nuevamente la existencia del promotor  $\sigma^{54}$  río arriba de *flgG*.

## DISCUSION

Como se mencionó, el objetivo general del proyecto de investigación que se lleva a cabo en el laboratorio se refiere al estudio de la movilidad en *Rhodobacter sphaeroides*. Debido a esto, para la caracterización del flagelo de esta bacteria fotosintética, y en particular, para la identificación de los productos génicos involucrados en los procesos de exportación, biosíntesis y regulación genética, se generaron mutantes no móviles y se seleccionó el fenotipo Fla<sup>-</sup>. Con este enfoque experimental se identificaron 10 genes flagelares organizados en 2 diferentes operones, cuyo estudio se realizó en el presente trabajo.

- **Operón *fliK***

Una de las grandes preguntas del proceso de biogénesis flagelar que hasta la fecha no ha sido respondida, es la del papel que juega la proteína FliK en el ensamblaje del flagelo. Se sabe que esta proteína participa en la regulación de la longitud del gancho ya que mutantes *fliK*<sup>-</sup> generan ganchos de tamaño anormal, pero también está involucrada en el ensamblaje de la flagelina, ya que dichas mutantes son incapaces de construir el filamento. Lo que no se conoce es el mecanismo mediante el que se monitorea o registra que el gancho ha alcanzado su tamaño adecuado, ni el cómo esta señal se transmite al aparato de exportación para que lleve a cabo el cambio en la especificidad de secreción de los sustratos. En este sentido es que decidimos llevar a cabo la caracterización de una mutante poligancho en *R. sphaeroides*.

Como se mostró en el artículo de la sección de resultados, en el flagelo de *R. sphaeroides* la organización de las subunidades de FlgE en el gancho y FliC en el filamento generan patrones muy diferentes. Estas diferencias estructurales se lograron distinguir a través de microscopía electrónica de transmisión, por lo que ésta fue una herramienta indispensable para la asignación del fenotipo poligancho.

El aislamiento de esta mutante en la que se generan ganchos hasta 15 veces más largos que el tamaño normal, nos permitió purificar la proteína FlgE en cantidades

suficientes para su posterior caracterización. La proteína del gancho se ha utilizado en el laboratorio para la generación de anticuerpos anti-FlgE y por otro lado, con los ganchos de la mutante PG, se han realizado estudios estructurales haciendo reconstrucción de imágenes a partir de micrografías electrónicas. La proteína FlgE se obtuvo con un alto grado de pureza, como se observó en la tinción con plata del gel de poliacrilamida (ver *Figura 4* del artículo 1) y se utilizó para obtener la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal (Keck Foundation, Yale University, New Haven, CT). Dicha secuencia presenta la región conservada SGL, así como las héptadas repetidas de aminoácidos hidrofóbicos características de los extremos terminales de las proteínas axiales del flagelo y que son importantes para la interacción de las subunidades.

Recientemente, en el laboratorio se clonó y secuenció el gen *flgE* de *R. sphaeroides* (Ballado, T. y cols., 2000), con el que se pudo corroborar la existencia de dichos motivos conservados. Sin embargo, la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína FlgE<sub>RS</sub> indica que 5 de los residuos obtenidos en la secuenciación del extremo N-terminal, son incorrectos (ver *Figura 5* en el artículo 1). La secuencia deducida a partir del gen es la siguiente: MSINTALSGLSAAQHDLAATS; y los aminoácidos que se modificaron corresponden al primero y los últimos 4. Cabe mencionar que los errores en la secuenciación de extremos N-terminales son comunes principalmente en los últimos residuos en los que la señal es difícil de distinguir debido al alto fondo que generan otros aminoácidos. Por otro lado, en la secuencia obtenida a partir de la proteína se supuso que el primer aminoácido debía ser una metionina, sin embargo, la secuencia deducida a partir del gen indicó que en esta posición se localizaba una serina. Esto sugiere que en la proteína madura se corta la metionina inicial, lo cual es un hecho que ocurre comúnmente en proteínas bacterianas.

### *Análisis de Complementación*

El uso de mutagénesis por transposición nos permitió contar con un marcador para la posterior identificación del gen *fliK* y de los genes aledaños en el operón, entre los que se encuentran dos de los genes del complejo del interruptor. Sin embargo, la inserción de *TnphoA* conlleva un efecto polar hacia los genes río abajo que forman parte

de la misma unidad transcripcional. Esto se pudo constatar en los experimentos de complementación ya que las mutantes PG y PG2 fueron capaces de restablecer el fenotipo silvestre únicamente en presencia del operón *fliK* completo (*fliK*, *L*, *M*, *N*). Es decir, la mutante poligancho se complementó sólo con las construcciones c140, c140a y c140b.

Un efecto polar similar se observó también en la mutante *fliM*, en la que el cassette *uidA-aad* insertado en el gen *fliM* afecta la transcripción de los genes río abajo que pertenecen al mismo operón. Debido a esto, la mutante sólo fue capaz de restablecer el nado al ser complementada con el operón completo (ver apéndice I). Por otra parte, el efecto polar de la inserción de *TnphoA* ha sido también reportado para una mutante en el gen *flgE* (Ballado y cols., 2000); así como para la mutante *RsgI* en este trabajo.

Adicionalmente, datos obtenidos por la Dra. Laura Camarena en el Instituto de Investigaciones Biomédicas utilizando al gen reportero *uidA* insertado en *fliM* en la mutante PG2, indican que efectivamente existe un efecto polar de *TnphoA::fliK* hacia *fliM::uidA* cuantificado como una disminución en la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa (comunicación personal).

¿Por qué entonces la mutación en *fliK* genera un fenotipo poligancho si los genes *fliL*, *fliM* y *fliN* se encuentran afectados?

La función de la proteína FliL es aún desconocida. En *S. typhimurium* no existe un fenotipo aparente asociado con la mutación del gen y las mutantes nulas en *fliL* son normalmente flageladas y móviles; mientras que en *Caulobacter crescentus*, mutaciones en el gen *fliL* se asocian con un fenotipo paralizado (Schoenhals y Macnab, 1999). En cuanto a las otras 2 proteínas del operón, FliM y FliN; éstas forman parte del complejo del “switch” y se encuentran constituyendo el anillo C. Como se muestra en el artículo del apéndice I, la caracterización de una mutante *fliM* indica un fenotipo Fla<sup>-</sup>, por lo que esta proteína debe tener alguna función en la exportación de componentes flagelares. Por su parte, para FliN se ha demostrado que una mutante *fliN* temperatura-sensible no puede exportar proteínas flagelares a la temperatura restrictiva (Vogler y cols., 1991) por lo que estas proteínas del interruptor probablemente estén contribuyendo a la estabilidad del aparato de exportación.



Estos datos, junto con el efecto polar de *TnphoA*, indican que el fenotipo de la mutante PG debería ser Fla<sup>-</sup>. Sin embargo, el fenotipo asociado es poligancho, tanto para PG en donde el transposón se insertó a 1810 pb río abajo del codón de inicio, como para PG2 en donde *TnphoA* se localiza a 1228 pb del ATG. En este sentido, podemos sugerir que probablemente el efecto polar de *TnphoA* no sea total y quede un remanente de expresión que permita el funcionamiento de las proteínas FliL, FliM y FliN y por lo tanto, la exportación de la proteína del gancho.

Por otra parte, en los estudios de complementación con el plásmido pBG0503a en los que no se recupera el nado, se observó si el flagelo de la mutante PG se restablecía aunque la bacteria no nadara; es decir, si en lugar de tener el fenotipo poligancho, presentara ahora un fenotipo Fla<sup>-</sup>, o bien un fenotipo paralizado, con la presencia de un flagelo pero no funcional. Sin embargo, las bacterias complementadas se analizaron por microscopía electrónica y se encontró que seguían presentando el fenotipo poligancho. Estos datos sugieren la existencia de un efecto dominante negativo de la proteína mutada sobre la silvestre. Es decir, se genera una proteína de fusión que inhibe la correcta función de la proteína codificada por el plásmido.

La generación de proteínas de fusión con el gen de la fosfatasa alcalina de *TnphoA* ha sido previamente reportada y utilizada para mapear la localización celular del producto de fusión (Sockett y Armitage, 1991). Por otro lado, las inserciones del transposón dejan a la primera mitad de la proteína intacta y para el caso de la mutante PG, la mayor parte de la proteína (600 aminoácidos) es de tipo silvestre. En el caso de la mutante PG2, el transposón se insertó en fase, por lo que se puede generar el producto de fusión con la fosfatasa alcalina. Este no es el caso para la mutante PG, sin embargo, se puede generar una proteína de fusión con la secuencia del extremo 5' de *TnphoA* hasta llegar a un codón de término.

En conclusión, el hecho de que el fenotipo de las mutantes PG y PG2 continúe siendo poligancho aún en presencia de *fliK*, sugiere que la proteína mutante (codificada en el cromosoma) secuestra algún componente indispensable para la función de FliK silvestre (codificada por el plásmido), o bien, que compite con la proteína silvestre ejerciendo un efecto dominante. Es importante aclarar que para el caso de las construcciones que sí complementan (c140, c140 A y c140 B), dicho efecto dominante

debe ser suprimido por algún otro gen (o genes) presente (s) en los cósmidos. En este sentido, pudiera ser que la sobreexpresión de los componentes del aparato de exportación compensara el efecto dominante negativo de la proteína de fusión.

Para corroborar esta hipótesis sería necesario ver el efecto de la proteína mutada (*fliK::Tnp<sub>h</sub>oA*) sobre la movilidad de la cepa silvestre de *R. sphaeroides* en la que el nado debería verse afectado.

Por último, para lograr la complementación de estas mutantes con el plásmido pBG0503a, habría que hacer una supresión total del gen *fliK*.

Cabe mencionar que si la mutante complementada se deja incubando por varios días en una placa de nado, eventualmente las bacterias comienzan a nadar y se pueden observar filamentos. Esto lo atribuimos a la existencia de una alta tasa de recombinación por lo que a este fenómeno se le denominó pseudocomplementación. Inicialmente pensamos que las bacterias comenzaban a nadar debido a la escisión y re inserción de *Tnp<sub>h</sub>oA* en otro lugar del cromosoma; sin embargo, estudios de hibridación tipo Southern mostraron que éste no era el caso (datos no mostrados). Por el momento no contamos con una cepa *recA*<sup>-</sup> de *R. sphaeroides* por lo que el nado en un experimento de complementación siempre se verificó en un cultivo líquido en fase temprana de crecimiento, y en las placas de agar suave, comparando con la velocidad de nado de la cepa silvestre.

### *Secuenciación de fliK<sub>R3</sub>*

Como se mostró en el artículo, el gen *fliK* ha sido secuenciado en diferentes especies bacterianas. Recientemente, se publicó la identificación de un gen homólogo a *fliK* que genera un fenotipo poligancho en la espiroqueta *Treponema denticola* (Limberger y cols., 1999).

Las proteínas FliK en las diferentes especies se encuentran conservadas en el extremo C-terminal (ver *Figura 8* del artículo 1). Si se realiza el mismo alineamiento múltiple incluyendo las secuencias de FliK de *T. denticola*, *C. crescentus* y *P. putida*, se obtiene un patrón muy parecido al reportado con la presencia de varios residuos (principalmente leucina, alanina, prolina y glicina), que están altamente conservados

siendo idénticos para todas las especies. Estos datos indican también una función conservada del extremo C-terminal de FliK, el cual ha sido implicado en el mecanismo de cambio de la especificidad de la exportación de sustratos (Williams y cols., 1996). En general, la proteína FliK no se parece mucho a sus homólogas de otras bacterias. El alineamiento entre FliK<sub>Ec</sub> y FliK<sub>St</sub> resulta en un 50% de identidad, cuando para otras proteínas flagelares de estas bacterias se observan identidades de hasta 95%, siendo lo más común un porcentaje mayor a 80%. Además, para obtener el máximo alineamiento entre éstas, se tienen que introducir un gran número de ventanas (Kawagishi y cols., 1996). Lo mismo sucede para las proteínas FliK de diferentes especies, pero dentro del mismo género, como es el caso de *Treponema*, en donde *T. denticola* presenta un 32% de identidad con la correspondiente secuencia de *T. phagedenis* y un 21% con la de *T. pallidum* (Limberger y cols., 1999). Debido a esto, no es de sorprender que los porcentajes de identidad de esta proteína para los diferentes géneros bacterianos estén alrededor de 20-25%. El alineamiento entre los extremos C-terminales de FliK<sub>Rs</sub> y FliK<sub>St</sub> produce un 22% de identidad (ver Figura 7 del artículo). El mejor alineamiento se obtuvo con la secuencia de *C. crescentus* (24% de identidad), iniciando nuevamente en el residuo 100 de FliK<sub>Rs</sub>.

Por su parte, el dominio N-terminal se encuentra pobremente conservado y su tamaño varía en las diferentes especies (ver más adelante). Recientemente, a esta parte de la proteína se le asignó una función específica, ya que contiene la información necesaria para ser reconocida por el aparato de exportación (ver apéndice II). El hecho de que las diferentes proteínas no se parezcan en esta región indica que la señal de reconocimiento de un sustrato a ser exportado no se localiza a nivel de estructura primaria. En este sentido, para las proteínas axiales que se exportan, se ha propuesto la existencia de una señal de secreción conformacional que no puede distinguirse a nivel de secuencia primaria (Kornacker y Newton, 1994).

En cuanto a la organización del gen *fliK* como parte de una unidad transcripcional, a diferencia de las bacterias entéricas *E. coli* y *S. typhimurium* en las que el gen *fliK* es el último gen del operón *fliF* (*fliFGHIJK*), en *R. sphaeroides* corresponde al primer gen de un operón de 4 genes. Así, la organización de los genes flagelares en operones para las diferentes bacterias, es muy distinta.

En *B. subtilis* existe un marco de lectura abierto de función desconocida río arriba de *fliK* (Albertini y cols., 1991). Este dato, junto con un error de secuenciación, nos hizo pensar en un inicio que en *R. sphaeroides* existía la misma organización. Debido a esto, se menciona la existencia de un marco de lectura abierto (ORF) entre *fliJ* y *fliK*. Posteriormente nos dimos cuenta que dicha secuencia formaba parte del gen *fliK*. Cabe mencionar que el nuevo codón de inicio identificado presenta un buen sitio de unión a ribosomas localizado a 7 pb río arriba del ATG. Esta secuencia "Shine-Dalgarno" alinea totalmente con la secuencia complementaria del extremo 3' del ARNr 16S de *R. sphaeroides*. De esta forma, el gen *fliK* en *R. sphaeroides* es más grande que en las otras especies; codificando una proteína de 700 aminoácidos, cuyo alineamiento muestra que presenta una extensión del extremo N-terminal.

Al analizar el tamaño de FliK entre las diferentes especies, se observó que éste varía significativamente, desde 375 aminoácidos para *E. coli*, 457 en *T. denticola*, 595 para *C. crescentus*, 643 en *V. parahaemolyticus* hasta 700 en *R. sphaeroides*. En este sentido, se ha reportado que las bacterias con un patrón flagelar monotrico presentan ganchos más largos que las bacterias multiflageladas (Power y cols., 1992), y en este caso sucede lo mismo para la proteína FliK; sin embargo, se requerirá de un mayor número de secuencias de FliK para poder establecer si realmente existe una relación entre el tamaño de la estructura del gancho y el de FliK.

Por otro lado, la región promotora tipo  $\sigma^{54}$  identificada río arriba de *fliK*, alinea con 9 de las 10 pb de la secuencia promotora consenso (Helmann y cols., 1991).

### *Purificación de FliK<sub>RS</sub>*

Uno de los objetivos planteados al inicio de este trabajo fue el de localizar a la proteína FliK. Hasta la fecha no se ha demostrado que ésta se encuentre asociada con la estructura flagelar; sin embargo, su función sugiere que así puede ser. Debido a esto, se purificó a FliK<sub>RS</sub> haciendo uso de una secuencia de histidinas insertada en el extremo N-terminal de la proteína recombinante. Con esta proteína se podrán generar anticuerpos anti-FliK para llevar a cabo la inmunolocalización de la misma en las preparaciones de

gancho y cuerpo basal que se han obtenido en el laboratorio (West y Dreyfus, 1997); o bien, para el estudio de las interacciones entre FliK y otras proteínas flagelares.

Como se mostró en los resultados, FliK<sub>RS</sub> presenta una migración anómala en el gel de poliacrilamida. Este hecho ha sido también reportado para la proteína de *E. coli* que migra 14 kDa más arriba que el peso molecular deducido a partir de su secuencia. Como se observó previamente para *E. coli* y *S. typhimurium*, la secuencia de *R. sphaeroides* contiene un gran número de prolinas, lo que probablemente modifique su patrón electroforético. Dichas prolinas se encuentran localizadas en la región central de la proteína y seguramente le confieren a ésta una estructura secundaria particular.

En este trabajo se muestra cómo a partir de la generación de mutantes y con la posterior identificación, clonación y secuenciación de los genes afectados, se puede llegar a la purificación de la proteína correspondiente para su posterior estudio bioquímico. Este enfoque experimental resulta indispensable cuando las proteínas de interés no pueden ser identificadas por alguna actividad enzimática.

#### *Modelos para la función de la proteína FliK*

Como se mencionó en la introducción, son muchos los modelos que se han sugerido para determinar la participación de la proteína FliK en el cambio de especificidad de exportación de sustratos, y estos involucran a diferentes productos génicos, como FlhB, FlgM y RflH (también llamada Flk). Sin embargo, estos modelos deben ahora ser reconsiderados con base en los nuevos datos encontrados para FliK<sub>Sr</sub>, en referencia a que la proteína es exportada durante el ensamblaje del gancho (ver artículo en el apéndice II).

La proteína FliK claramente participa en el proceso de regulación de la longitud del gancho, pero también en la iniciación de la síntesis de filamento. Esto se corroboró con el aislamiento de mutaciones supresoras intragénicas en *fliK* que generan un fenotipo pseudorevertante denominado poligancho-filamento (pgf), es decir, que aún no pueden regular la longitud del gancho, pero que son ahora capaces de ensamblar el filamento.

Con el análisis de diferentes mutaciones en *fliK<sub>Sr</sub>*, se concluyó que los dominios amino y carboxilo terminales de la proteína tenían diferentes funciones, participando el

amino en la terminación del alargamiento del gancho mientras que el carboxilo permite la iniciación de la síntesis del filamento (Williams y cols., 1996). En el artículo del apéndice II se demuestra adicionalmente que el extremo N-terminal de FliK es indispensable para que ésta se exporte.

Por otro lado, un gran avance en el entendimiento del proceso se dió con el aislamiento de mutaciones supresoras extragénicas que generan el fenotipo pgf y mapean en el extremo C-terminal de *flhB*. FlhB forma parte del aparato de exportación y se propone que junto con FliK es la proteína responsable del cambio en la especificidad de exportación de sustratos “tipo eje-gancho” a los de “tipo filamento”.

En el artículo del apéndice II se demuestra que la exportación de FliK se lleva a cabo durante el ensamblaje del gancho y no después de que éste se forma, por lo que se clasifica dentro de las proteínas de exportación que pertenecen a la clase eje-gancho (Minamino y Macnab, 1999). También se muestra en dicho estudio que la exportación de FliK es importante para que se dé el cambio de especificidad de sustratos, ya que mutantes en *fliK* que no se exportan (aunque tengan el extremo C-terminal intacto) siguen produciendo poliganchos. Es decir, FlhB no puede detener la exportación de proteína del gancho e iniciar la de proteínas tipo filamento sin recibir la señal correspondiente de FliK.

A pesar de la nueva información obtenida para FliK, se desconoce el mecanismo preciso mediante el que actúa esta proteína, si se encuentra asociada con la estructura flagelar y de ser así, con cuáles sustratos interactúa. De hecho, la interacción de esta proteína con FlhB aún no ha sido demostrada experimentalmente, por lo que el modelo antes presentado continúa siendo hipótesis.

- **Operón *flgG***

El aislamiento de una mutante no móvil (Fla<sup>-</sup>) defectuosa en la formación del anillo P, nos permitió identificar a varios de los componentes estructurales del flagelo como son el eje distal, los anillos externos y las proteínas HAPs de unión entre el gancho y el filamento. Todas estas proteínas se encuentran conservadas en las diferentes especies bacterianas flageladas en las que se han identificado. Esto incluye a las espiroquetas

como *Borrelia burgdorferi* que tiene flagelos periplásmicos y también a especies como *Helicobacter pylori*, con los flagelos cubiertos por una membrana. Por lo tanto, aunque los mecanismos de nado y los habitats sean totalmente diferentes, la estructura general del flagelo está ampliamente conservada en el reino procarionte.

En esta región cromosomal caracterizada, identificamos a los genes *flgG*, *flgH*, *flgI*, un posible homólogo del gen *flgJ*, así como a los genes *flgK* y *flgL*. Estos genes se encuentran organizados en dos diferentes operones: *flgGHIIJ*, cuya transcripción depende de un promotor tipo  $\sigma^{54}$ , así como *flgKLI* que presenta una secuencia promotora de tipo  $\sigma^{28}$ .

### *Clonación y secuenciación*

Para la identificación del gen *flgI* y la clonación del operón en el que éste se localiza, cabe resaltar la importancia de los experimentos de hibridación tipo Southern realizados. Las sondas variaron en tamaño desde 0.3 hasta 1.6 kb y con éstas se logró identificar claramente una señal en las digestiones de ADN cromosomal. Para evitar que estas regiones de señal positiva generaran un gran número de colonias al ser clonadas, se realizó para todos los casos un segundo experimento de hibridación para localizar una subzona positiva dentro de la región inicial. Gracias a esto, obtuvimos colonias positivas para todos los casos dentro de las primeras 500 colonias analizadas.

Por su parte, la estrategia para la secuenciación de este ADN con un alto contenido de G+C fue la generación de subclonas de las que se preparó ADN de cadena sencilla. Para todos los plásmidos obtenidos se realizó un mapa de restricción y se aislaron fragmentos más pequeños, de entre 0.3 y 1.9 kb (ver *Figura 16*). Estas construcciones se clonaron en ambas orientaciones para poder utilizar el oligonucleótido del vector M13 reverso con el que se obtuvieron los mejores resultados. Para las subclonas de mayor tamaño se diseñaron oligonucleótidos internos. Por otro lado, el análisis de predicción de marcos de lectura con base en el uso de codones de esta bacteria, resultó ser de mucha utilidad para la identificación de errores de secuenciación, ya que éstos cambian los codones más frecuentemente utilizados y se puede fácilmente identificar un cambio en la fase de lectura.

En esta región del cromosoma se identificaron genes que codifican para componentes estructurales del flagelo. La organización de los mismos es parecida a la que se observa para *S. typhimurium* y *E. coli*, en las que dichos genes están agrupados en el operón clase II *flgB* (*flgBCDEFGHIJ*) y el operón clase III *flgK* (*flgKL*). Sin embargo, en *R. sphaeroides*, el primer operón se encuentra dividido en dos: *flgBCDEF* (Ballado y cols., 2000) y *flgGHIJ*, dependiendo ambos de un promotor tipo  $\sigma^{54}$ ; a continuación está el operón *flgK* (*flgKL*) precedido por un promotor tipo  $\sigma^{28}$ . El alineamiento del promotor tipo  $\sigma^{54}$  que encontramos, coincide completamente con la secuencia consenso reportada (Helmann, 1991). Sin embargo, el promotor tipo  $\sigma^{28}$  no se encuentra totalmente conservado con las secuencias consenso -35 y -10 previamente reportadas (Kutsukake e Ide, 1994). Como se mencionó para el operón *fliK*, la organización de los genes en operones en las diferentes bacterias es muy distinta. Por mencionar algunos ejemplos, en *Sinorhizobium meliloti*, que pertenece al mismo subgrupo  $\alpha$  de proteobacterias que *R. sphaeroides* y que comparte varias características similares como la rotación unidireccional y el complejo sistema quimiotáctico, el gen *flgI* forma parte de un operón constituido por los genes *flgB*, *flgC*, *fliE*, *flgG*, *flgA*, *flgI*, *orf30*, *flgH*, *fliL* y *fliP* (Sourjik y cols., 1998) (ver funciones en la Tabla 1). Por su parte, la bacteria uniflagelada *C. crescentus* que pertenece también al mismo subgrupo, presenta al gen *flgI* como el primero dentro de un operón constituido por 3 genes: *flgI*, *cheL* y *flbY* (*cheL* complementa una mutante quimiotáctica y *flbY* es un componente del cuerpo basal) (Khambaty y Ely, 1992). En conclusión, es muy difícil tratar de obtener información adicional considerando la organización de los genes flagelares pues ésta varía mucho de especie a especie.

Como se observa en la Figura 26, las regiones intercistónicas entre los genes *flgG*, *H*, *I* y *J* son muy pequeñas, e incluso, para los últimos 3 se puede observar un solapamiento de los codones de término con los de inicio, mostrando la organización TGATG o bien GTGA. Posteriormente existen 167 pb entre el final de *flgJ* y el inicio de *flgK*, en las que se localiza la posible región reguladora tipo  $\sigma^{28}$ .

La proteína FlgG que constituye el eje distal está ampliamente conservada en las diferentes bacterias a lo largo de toda la secuencia primaria, presentando en el amino terminal los dominios característicos de las proteínas axiales. Por su parte, para las



proteínas FlgH y FlgI se observan también porcentajes de identidad significativos. El alineamiento múltiple entre diferentes secuencias de FlgH muestra que la proteína varía mucho en el extremo N-terminal y es sólo la región carboxilo la que está conservada. En *S. typhimurium* estas proteínas que forman los anillos L y P son las únicas que se exportan a través de la vía Sec, es decir, que presentan una secuencia señal. Para FlgH y FlgI de *R. sphaeroides* identificamos una secuencia que cumple con los criterios necesarios para funcionar como un péptido líder (Oliver, 1985): dos residuos cargados positivamente cerca del extremo N-terminal (ambos arginina), seguidos por una región de entre 14 y 16 residuos predominantemente hidrofóbicos y la secuencia A-X-A que puede funcionar como un posible sitio de corte.

Por otro lado, a la proteína FlgJ se le asignó esta nomenclatura, ya que al comparar la secuencia nucleotídica en la base de datos presentó homología con la proteína FlgJ de *S. typhimurium*. Sin embargo, el análisis más detallado mostró que FlgJ<sub>RS</sub> es mucho más pequeña que FlgJ<sub>St</sub> (100 y 316 aminoácidos respectivamente), y la homología se presenta únicamente con el extremo N-terminal de FlgJ<sub>St</sub>. Como se mencionó en la introducción, la función que recientemente se le asignó a FlgJ<sub>St</sub> es la de una muramidasa que hidroliza la capa de peptidoglicano permitiendo así el ensamblaje del eje en el espacio periplásmico y esta actividad enzimática se localizó en el extremo C-terminal de la proteína (Nambu y cols., 1999). En la secuencia de *R. sphaeroides* no existen estos residuos que conforman el sitio activo de la muramidasa. Sin embargo, el alineamiento de FlgJ<sub>RS</sub> con las proteínas de las otras bacterias en las que se ha identificado (*S. typhimurium*, *E. coli*, *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*), muestra la presencia de varios residuos altamente conservados en el extremo N-terminal. En conclusión, pudiera ser que el ensamblaje del flagelo en *R. sphaeroides* no requiera de una muramidasa o bien que ésta se localice en otra región flagelar. Se requerirá contar con una mutante *flgJ* de *R. sphaeroides*, así como del estudio de la proteína para poder determinar su función en esta bacteria.

Por último, identificamos a las proteínas HAP1 y HAP3. La proteína FlgK en *R. sphaeroides* resultó ser muy grande (1363 aminoácidos) comparando con los 553 residuos de FlgK<sub>St</sub>. El alineamiento de esta proteína muestra que los extremos amino y carboxilo terminales de FlgK<sub>RS</sub> se encuentran muy conservados y por lo tanto existe un

dominio central adicional. En este sentido, cabe mencionar que a diferencia de las bacterias entéricas, en *R. sphaeroides* las proteínas HAP entre el gancho y el filamento se pueden distinguir fácilmente en una micrografía electrónica (ver [Figura 2b](#) del artículo 1). Nuevamente, se necesitará hacer un análisis de los dominios de la proteína para poder conocer la función de dicha región adicional.

### *Análisis de complementación*

En la mutante RsgI se observó nuevamente un efecto polar de *TnphoA* hacia los genes río abajo. Sin embargo, a diferencia de la mutante PG, en este caso sí fue posible complementar el defecto en el gen *flgI* a pesar de que el nado no se recuperó. Como se mencionó en los resultados, la clona pBG402 que contiene al gen *flgI* completo es capaz de restablecer la estructura del gancho en la mutante RsgI, por lo que se recupera la función de la proteína FlgI, ya que se requiere de la formación del anillo P para que el gancho se pueda ensamblar.

La ausencia de filamento en los experimentos de complementación se atribuye al efecto polar de *TnphoA* sobre los genes río abajo. Una posibilidad para explicar esto era que el gen estructural de la flagelina, o un gen relacionado con la exportación y/o ensamblaje de FliC, o bien, con la expresión de *fliC*, estuviera afectado. Esta hipótesis se eliminó con el experimento de inmunodetección de la flagelina, ya que se demostró la presencia de FliC tanto en el extracto celular, como en el sobrenadante de la mutante complementada. En cambio, en la mutante RsgI se detectaron únicamente niveles basales de flagelina, como era de esperarse para la mutación de un gen que forma parte del cuerpo basal. En este caso, la exportación de FlgM no se realiza, por lo que la transcripción de *fliC* se encuentra inhibida. Aparentemente este sistema de regulación está también conservado en *R. sphaeroides* y evita de igual manera la síntesis innecesaria de flagelina (lo que constituye un alto costo energético), cuando ésta no puede ensamblarse.

Con este experimento se concluyó que la ausencia de filamento en RsgI/pBG402 o incluso en RsgI/pBG812 (que contiene todos los genes excepto el extremo 3' del gen *flgL*), se debe únicamente a la ausencia de la proteína HAP3.

Cabe mencionar que prácticamente todo el gen *flgL* se localiza en la clona pBG812. Esto indica que los 79 aminoácidos del extremo C-terminal de FlgL son indispensables para su correcto ensamblaje, lo cual coincide con que ésta es la parte más conservada de la proteína y con lo previamente reportado en cuanto a que los extremos terminales de las proteínas axiales juegan un papel importante en la interacción entre subunidades. La flagelina requiere entonces de la proteína HAP3 para poder ensamblarse, lo que está de acuerdo con lo ya reportado en cuanto a que esta proteína de unión le confiere estabilidad al filamento (Fahrner y cols., 1994).

Por otra parte, de estos experimentos también se concluye que la inserción de *TnphoA* en *flgI* ejerce un efecto polar que afecta no sólo a *flgJ*, sino también a *flgK* y *flgL*, genes que no deberían verse afectados ya que forman parte de una diferente unidad transcripcional. A partir de estos datos podemos sugerir que *flgK* y *flgL* se transcriben desde el promotor  $\sigma^{54}$  río arriba de *flgG*. Este hecho ha sido observado previamente para el operón *flgK* de *S. typhimurium* que puede transcribirse desde el promotor clase II del operón *flgB*, a pesar de que la mayor contribución en los niveles de expresión proviene del promotor clase III. La transcripción de los genes *flgK* y *flgL* a partir del promotor clase II es una forma de asegurar la síntesis de las proteínas HAPs antes de que se sintetice la flagelina (Kutsukake e Ide, 1994). Estos datos de complementación en *R. sphaeroides* sugieren además que el promotor  $\sigma^{28}$  que precede a *flgK* no es funcional. Debido a esto proponemos que todos los genes, desde *flgG*, forman parte de una misma unidad transcripcional.

En el caso de la mutante RsgI complementada se observó también el efecto de pseudocomplementación previamente descrito para las mutantes PG y PG2. Este fue de mayor intensidad al complementar con la clona pBG812 que contiene un inserto más grande y por lo tanto presenta una mayor facilidad para recombinar.

Como se mostró, el fenotipo silvestre de la mutante RsgI se logró restablecer únicamente al generar una mutante no polar, para lo cual se insertó en *flgI* un cassette que no contuviera terminadores transcripcionales. El nado de la mutante RsgInp

complementada se verificó tanto en cultivo líquido como en placas de nado y al microscopio electrónico se observó la presencia de flagelos silvestres (dato no mostrado).

La complementación de RsgInp con pBG402 tanto en la orientación A como en la B, corrobora la funcionalidad del promotor tipo  $\sigma^{54}$ .

Como conclusión, a pesar de que *TnphoA* presenta un efecto polar, resultó ser una excelente herramienta experimental para la generación de mutantes no móviles y para la identificación de los genes afectados. El presente trabajo contribuye significativamente a la caracterización de la organización génica de las proteínas del flagelo de *Rhodobacter sphaeroides* así como de su función, materia que constituye el proyecto de investigación que se lleva a cabo en el laboratorio.

## REFERENCIAS

- Adler, J. (1966) Chemotaxis in bacteria. *Science* **153**: 708-716.
- Adler, J. (1969) Chemoreceptors in bacteria. *Science* **166**: 1588-1597.
- Aizawa, S. I. (1996) Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **19**: 1-5.
- Akiba, T., Yoshimura, H. y Namba, K. (1991) Monolayer crystalization of flagellar L-P rings by sequential addition and depletion of lipid. *Science* **252**: 1544-1546.
- Alon, U., Surette, M. G., Barkai, N. y Leibler, S. (1999) Robustness in bacterial chemotaxis. *Nature (London)* **397**: 168-171.
- Armitage, J. P. y Macnab, R. M. (1987) Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **169**: 514-518.
- Armitage, J. P. y Sockett, R. E. (1991) Isolation, characterization, and complementation of a paralyzed flagellar mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8. *J Bacteriol* **173**: 2786-2790.
- Armitage, J. P. (1992) Bacterial motility and chemotaxis. *Sci Progress Oxford* **76**: 451-477.
- Armitage, J. P. y Schmitt, R. (1997) Bacterial chemotaxis: *Rhodobacter sphaeroides* and *Sinorhizobium meliloti* - variations on a theme? *Microbiology* **143**: 3671-3682.
- Armstrong, J. B. y Adler, J. (1967) Genetics of motility in *Escherichia coli*: complementation of paralyzed mutants. *Genetics* **56**: 363-373.
- Ballado, T. Campos, A., Camarena, L. y Dreyfus, G. (1996) Flagellar genes from *Rhodobacter sphaeroides* are homologous to genes of the *fliF* operon of *Salmonella typhimurium* and to type-III secretion system. *Gene* **170**: 69-72.
- Ballado, T., Camarena, L., González-Pedrajo, B., Silva-Herzog, E. y Dreyfus, G. (2000) Characterization of the hook gene of *Rhodobacter sphaeroides* a bacterium with a straight hook. *J Bacteriol* (enviado).
- Benning, C. y Somerville, C. R. (1992) Isolation and genetic complementation of a sulfolipid-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **174**: 2352-2360.
- Berg, H. C. y Brown, D. A. (1972) Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature (London)* **239**: 500-504.
- Berg, H. (1995) Torque generation by the flagellar rotary motor. *Biophys J* **68**: 163s-167s.

- Berry, R. M. (1993) Torque and switching in the bacterial flagellar motor. An electrostatic model. *Biophys J* **64**: 961-973.
- Blair, D. F. y Berg, H. C. (1990) The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor. *Cell* **60**: 439-449.
- Blair, D. F. y Dutcher, S. K. (1992) Flagella in prokaryotes and lower eucaryotes. *Curr Opin Genet Develop* **2**: 756-767.
- Blair, D. F. (1995) How bacteria sense and swim. *Annu Rev Microbiol* **49**: 489-522.
- Block, S. M., Segall, J. E. y Berg, H. C. (1983) Adaptation kinetics in bacterial chemotaxis. *J Bacteriol* **154**: 312-323
- Block, S. M. y Berg, H. C. (1984) Successive incorporation of force-generating units in the bacterial rotary motor. *Nature (London)* **309**: 470-472.
- Brown, S., Poole, P. S., Jeziorska, W. y Armitage, J. P. (1993) Chemokinesis in *Rhodobacter sphaeroides* is the result of a long term increase in the rate of flagellar rotation. *Biochim Biophys Acta* **1141**: 309-312.
- Brown, K. L. y Hughes, K. T. (1995) The role of anti-sigma factors in gene regulation. *Mol Microbiol* **16**: 397-404.
- Brun, Y. V., Marczynski, G. y Shapiro, L. (1994) The expression of asymmetry during caulobacter cell differentiation. *Annu Rev Biochem* **63**: 419-450.
- Canale-Parola, E. (1978) Motility and chemotaxis of spirochetes. *Annu Rev Microbiol* **32**: 69-99.
- Chun, S. Y. y Parkinson, J. S. (1988) Bacterial motility: membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein. *Science* **239**: 276-278.
- Cohen-Bazire, G. y London, J. (1967) Basal organelles of bacterial flagella. *J Bacteriol* **94**: 458-465.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldweil, D. E., Korber, D. R. y Lappin-Scott, H. M. (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**: 711-745.
- Dailey, F. E. y Berg, H. C. (1993) Mutants in disulfide bond formation that disrupt flagellar assembly in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 1043-1047.
- Daughdrill, G. W., Chadsey, M. S., Karlinsey, K. E., Hughes, K. T. y Dahlquist, F. W. (1997) The C-terminal half of the anti-sigma factor, FlgM, becomes structured when bound to its target  $\sigma^{28}$ . *Nat Struct Biol* **4**: 285-291.

Dean, G. E., Macnab, R. M., Stader, J., Matsumura, P. y Burks, C. (1984) Gene sequence and predicted amino acid sequence of the *motA* protein, a membrane-associated protein required for flagellar rotation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **159**: 991-999.

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

Dreyfus, G., Williams, A. W., Kawagishi, I. y Macnab, R. M. (1993) Genetic and biochemical analysis of *Salmonella typhimurium* FliI, a flagellar protein related to the catalytic subunit of the FoF<sub>1</sub> ATPase and to virulence proteins of mammalian and plant pathogens. *J Bacteriol* **175**: 3131-3138.

Eisenbach, M. (1996) Control of bacterial chemotaxis. *Mol Microbiol* **20**: 903-910.

Fahrner, K. A., Block, S. M., Krishnaswamy, S., Parkinson, J. S. y Berg, H. C. (1994) A mutant hook-associated protein (HAP<sub>3</sub>) facilitates torsionally induced transformations of the flagellar filament of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **238**: 173-186.

Fan, F. y Macnab, R. M. (1996) Enzymatic characterization of FliI: an ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **271**: 31981-31988.

Francis, N. R., Irikura, V. M., Yamaguchi, S., DeRosier, D. J. y Macnab, R. M. (1992) Localization of the *Salmonella typhimurium* flagellar switch protein FliG to the cytoplasmic M-ring face of the basal body. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6304-6308.

Francis, N. R., Sosinsky, G. E., Thomas, D. y DeRosier, D. J. (1994) Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J Mol Biol* **235**: 1261-1270.

García, N., Campos, A., Osorio, A., Poggio, S., González-Pedrajo, B., Camarena, L. y Dreyfus, G. (1998) The flagellar switch genes *fliM* and *fliN* of *Rhodobacter sphaeroides* are contained in a large flagellar gene cluster. *J Bacteriol* **180**: 3978-3982.

Garza, A. G., Harris-Haller, L. W., Stoebner, R. A. y Manson, M. D. (1995) Motility protein interactions in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1970-1974.

Gegner, J. A., Graham, D. R., Roth, A. F., Dahlquist, F. W. (1992) Assembly of an MCP receptor, CheW, and kinase CheA complex in the bacterial chemotaxis signal transduction pathway. *Cell* **70**: 975-982.

González-Pedrajo, B., Ballado, T., Campos, A., Sockett, R. E., Camarena, L. y Dreyfus, G. (1997) Structural and genetic analysis of a mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 deficient in hook length control. *J Bacteriol* **179**: 6581-6588.

- Gotz, R. y Schmitt, R. (1987) *Rhizobium meliloti* swims by unidirectional, intermittent rotation of right-handed flagellar helices. *J Bacteriol* **169**: 3146-3150.
- Graf, J., Dunlap, P. V. y Ruby, E. G. (1994) Effect of transposon-induced motility mutations on colonization of the host light organ by *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* **176**: 6986-6991.
- Hamblin, P. A., Maguire, B. A., Grishanin, R. N. y Armitage, J. P. (1997) Evidence for two chemosensory pathways in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **26**: 1083-1096.
- Harlow, E. y Lane, D. (1988) *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. USA 726 pp.
- Harrison, D. M., Packer, H. L. y Armitage, J. P. (1994) Swimming speed and chemokinetic response of *Rhodobacter sphaeroides* investigated by natural manipulation of the membrane potential. *FEBS Lett* **348**: 37-40.
- Harshey, R. M. (1994) Bees aren't the only ones: swarming in Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **13**: 389-394.
- Hartzell, P. L. y Youderain, P. (1995) Genetics of gliding motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Arch Microbiol* **164**: 309-323.
- Helmann, J. D. (1991) Alternative sigma factors and the regulation of flagellar gene expression. *Mol Microbiol* **5**: 2875-2882.
- Hirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K. y Aizawa, S. I. (1994) Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 5439-5449.
- Homma, M., Fujita, H., Yamaguchi, S. y Iino, T. (1984) Excretion of unassembled flagellin by *Salmonella typhimurium* mutants deficient in hook-associated proteins. *J Bacteriol* **159**: 1056-1059.
- Homma, M., Iino, T., Kutsukake, K. y Yamaguchi, S. (1986) *In vitro* reconstitution of flagellar filaments onto hooks of filamentless mutants of *Salmonella typhimurium* by addition of hook-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 6169-6173.
- Homma, M., Kutsukake, K., Hasebe, M., Iino, T. y Macnab, R. M. (1990) FlgB, FlgC, FlgF and FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **211**: 465-477.
- Homma, M., DeRosier, D. J. y Macnab, R. M. (1990b) Flagellar hook and hook-associated proteins of *Salmonella typhimurium* and their relationship to other axial components of the flagellum. *J Mol Biol* **213**: 819-832.



- Hueck, C. J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.
- Hughes, K. T., Gillen, K. L., Semon, M. J. y Karlinsey, J. E. (1993) Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* **262**: 1277-1280.
- Hughes, K. T. y Mathee, K. (1998) The anti-sigma factors. *Annu Rev Microbiol* **52**: 231-286.
- Iino, T. (1969) Polarity of flagellar growth in *Salmonella*. *J Gen Microbiol* **56**: 227-239.
- Iino, T. (1974) Assembly of *Salmonella* flagellin *in vitro* and *in vivo*. *J Supramol Str* **2**: 372-384.
- Ikeda, T., Homma, M., Iino, T., Asakura, S. y Kamiya, R. (1987) Localization and stoichiometry of hook-associated proteins within *Salmonella typhimurium* flagella. *J Bacteriol* **169**: 1168-1173.
- Ikeda, T., Oosawa, K y Hotani, H. (1996) Self-assembly of the filament capping protein, FliD, of bacterial flagella into an annular structure. *J Mol Biol* **259**: 679-686.
- Ingham, C. J. y Armitage, J. P. (1987) Involvement of transport in *Rhodobacter sphaeroides* chemotaxis. *J Bacteriol* **169**: 5801-5807.
- Irikura, V. M., Kihara, M., Yamaguchi, S., Sockett, H. y Macnab, R. M. (1993) *Salmonella typhimurium* *fliG* and *fliN* mutations causing defects in assembly, rotation, and switching of the flagellar motor. *J Bacteriol* **175**: 802-810.
- Jones, C. J., Homma, M. y Macnab, R. M. (1989) L-, P-, and M-ring proteins of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*: gene sequences and deduced protein sequences. *J Bacteriol* **171**: 3890-3900.
- Jones, C. J. y Aizawa, S. I. (1991) The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and function. *Adv Microb Physiol* **32**: 110-163.
- Karlinsey, J. E., Pease, A. J., Winkler, M. E., Bailey, J. L. y Hughes, K. T. (1997) The *flk* gene of *Salmonella typhimurium* couples flagellar P- and L-ring assembly to flagellar morphogenesis. *J Bacteriol* **179**: 2389-2400.
- Karlinsey, J. E., Tsui, H. T., Winkler, M. E. y Hughes, K. T. (1998) Flk couples *flgM* translation to flagellar ring assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **180**: 5384-5397.
- Katayama, E., Shiraishi, T., Oosawa, K., Baba, N. y Aizawa, S. I. (1996) Geometry of the flagellar motor in the cytoplasmic membrane of *Salmonella typhimurium* as determined by stereo-photogrammetry of quick-freeze deep-etch replica images. *J Mol Biol* **255**: 458-475.

- Kato, S., Aizawa, S. I. y Asakura, S. (1982) Reconstruction *in vitro* of the flagellar polyhook from *Salmonella*. *J Mol Biol* **161**: 551-560.
- Kato, S., Okamoto, M. y Asakura, S. (1984) Polymorphic transition of the flagellar polyhook from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **173**: 463-476.
- Kawagishi, I., Homma, M., Williams, A. W. y Macnab, R. M. (1996) Characterization of the flagellar hook length control protein FliK of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 2954-2959.
- Keen, N. T., Tamaki, S., Kobayashi, D. y Trollinger, D. (1988) Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* **70**: 191-197.
- Kehry, M. R. y Dahlquist, F. W. (1982) Adaptation in bacterial chemotaxis: CheB-dependent modification permits additional methylations of sensory transducer proteins. *Cell* **29**: 761-772.
- Khambaty, F. M. y Ely, B. (1992) Molecular genetics of the *flgI* region and its role in flagellum biosynthesis in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **174**: 4101-4109.
- Khan, I. H., Reese, S. T. y Khan, S. (1992) The cytoplasmic component of the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 5956-5960.
- Komeda, Y., Suzuki, H., Ishitsu, J. I. e Iino, T. (1975) The role of cAMP in flagellation of *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* **142**: 289-298.
- Komeda, Y. (1986) Transcriptional control of flagellar genes in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **168**: 1315-1318.
- Kornacker, M. G. y Newton, A. (1994) Information essential for cell-cycle dependent secretion of the 591-residue *Caulobacter* hook protein is confined to a 21-amino-acid sequence near the N-terminus. *Mol Microbiol* **14**: 73-85.
- Kubori, T., Shimamoto, N., Yamaguchi, S., Namba, K. y Aizawa, S. I. (1992) Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **226**: 433-446.
- Kupper, J., Marwan, W., Typke, D., Grunberg, H., Uwer, U., Gluch, M. y Oesterhelt, D. (1994) The flagellar bundle of *Halobacterium salinarium* is inserted into a distinct polar cap structure. *J Bacteriol* **176**: 5184-5187.
- Kutsukake, K., Ohya, Y., Yamaguchi, S. e Iino, T. (1988) Operon structure of flagellar genes in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* **214**: 11-15.
- Kutsukake, K., Ohya, Y. e Iino, T. (1990) Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **172**: 741-747.

- Kutsukake, K. (1994) Excretion of the anti-sigma through a flagellar substructure couples flagellar gene expression with flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* **234**: 605-612.
- Kutsukake, K., e Iino, T. (1994) Role of the FliA-FlgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 3598-3605.
- Kutsukake, K. e Ide, N. (1994) Transcriptional analysis of the *flgK* and *fliD* operons of *Salmonella typhimurium* which encode flagellar hook-associated proteins. *Mol Gen Genet* **247**: 275-281.
- Kutsukake, K., Okada T., Yokoseki, T. e Iino, T. (1994) Sequence analysis of the *flgA* gene and its adjacent region in *Salmonella typhimurium*, and identification of another flagellar gene, *flgN*. *Gene* **143**: 49-54.
- Kutsukake, K., Minamino, T. y Yokoseky, T. (1994b) Isolation and characterization of FliK-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 7625-7629.
- Kutsukake, K., Iyoda, S., Ohnishi, K. e Iino, T. (1994c) Genetic and molecular analyses of the interaction between the flagellum-specific sigma and anti-sigma factors in *Salmonella typhimurium*. *EMBO Journal* **13**: 4568-4576.
- Kutsukake, K. (1997) Hook-length control of the export-switching machinery involves a double-locked gate in *Salmonella typhimurium* flagellar morphogenesis. *J. Bacteriol* **179**: 1268-1273.
- Kuwajima, G. (1988) Construction of a minimum-size functional flagellin of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**: 3305-3309.
- Larsen, S. H., Reader, R. W., Kort, E. N., Tso, W. W. y Adler, J. (1974) Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in *E. coli*. *Nature (London)* **249**: 74-77.
- Levit, M. N., Liu, Y. y Stock, J. B. (1998) Stimulus response coupling in bacterial chemotaxis: receptor dimers in signalling arrays. *Mol Microbiol* **30**: 459-466.
- Limberger, R. J., Slivienski, L. L., Izard, J. y Samsonoff, W. A. (1999) Insertional inactivation of *Treponema denticola tap1* results in a nonmotile mutant with elongated flagellar hooks. *J Bacteriol* **181**: 3743-3750.
- Liu, X. y Matsumura, P. (1994) The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J Bacteriol* **176**: 7345-7351.
- Losick, R. y Shapiro, L. (1993) Checkpoints that couple gene expression to morphogenesis. *Science* **262**: 1227-1228.

- Macnab, R. M. y Koshland, D. E. Jr. (1972) The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**: 2509-2512.
- Macnab, R. M. (1977) Bacterial flagella rotating in bundles: a study in helical geometry. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 221-225.
- Macnab, R. M. (1987a) Flagella. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Editores: Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. y Umarger, H. E. Washington, DC: Am Soc Microbiol pp 70-83.
- Macnab, R. M. (1987) Motility and Chemotaxis. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Editores: Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. y Umarger, H. E. Washington, DC: Am Soc Microbiol pp 732-759.
- Macnab, R. M. (1992) Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu Rev Genet* **26**: 131-158.
- Macnab, R. M. (1996) Flagella and motility. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, 2<sup>nd</sup> ed. Editores: Neidhardt F. C., Curtis III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. y Umbarger, H. E., Washington, DC: Am Soc Microbiol pp 123-145.
- Maddock, J. R y Shapiro, L. (1993) Polar location of the chemoreceptor complex in *Escherichia coli* cell. *Science* **259**: 1717-1723.
- Malek, W. (1992) The role of motility in the efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Arch Microbiol* **158**: 26-28.
- McCarter, L. L. (1995) Genetic and molecular characterization of the polar flagellum of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **177**: 1595-1609.
- Metcalf, W. W. y Wanner, B. L. (1993) Construction of new  $\beta$ -glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement. *Gene* **129**: 17-25.
- Mikhail, N. L., Liu, Y. y Stock, J. B. (1998) Stimulus response coupling in bacterial chemotaxis: receptor dimers in signalling arrays. *Mol Microbiol* **30**: 459-466.
- Milburn, M. V., Privé, G. G., Milligan, D. L., Scott, W. G. y Yeh, J. (1991) Three dimensional structures of the ligand-binding domain of the bacterial aspartate receptor with and without a ligand. *Science* **254**: 1342-1347.
- Minamino, T., Iino, T. y Kutsukake, K. (1994) Molecular characterization of the *Salmonella typhimurium flhB* operon and its protein products. *J Bacteriol* **176**: 7630-7637.

- Minamino, T., González-Pedrajo, B., Yamaguchi, K., Aizawa, S. I. y Macnab, R. M. (1999) FliK, the protein responsible for flagellar hook length control in *Salmonella*, is exported during hook assembly. *Mol Microbiol* **34**: 295-304.
- Minamino, T. y Macnab, R. M. (1999 a) Physical interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its export substrates. *Mol Microbiol* (enviado).
- Minamino, T. y Macnab, R. M. (1999) Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J Bacteriol* **181**: 1388-1394.
- Morgan, D. G., Macnab, R. M., Francis, N. R. y DeRosier, D. J. (1993) Domain organization of the subunit of the *Salmonella typhimurium* flagellar hook. *J Mol Biol* **229**: 79-84.
- Mowbray, S. L. y Sandgren, M. O. J. (1998) Chemotaxis receptors: a progress report on structure and function. *J Struct Biol* **124**: 257-275.
- Müller, V., Jones, C. J., Kawagishi, I., Aizawa, S. I. y Macnab, R. M. (1992) Characterization of the *fliE* genes of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* and identification of the FliE protein as a component of the flagellar hook-basal body complex. *J Bacteriol* **174**: 2298-2304
- Namba, K., Yamashita, I. y Vonderviszt, F. (1989) Structure of the core and central channel of bacterial flagella. *Nature (London)* **342**: 648-654.
- Namba, K. y Vonderviszt, F. (1997) Molecular architecture of bacterial flagellum. *Quart Rev Biophys* **30**: 1-65.
- Nambu, T., Minamino, T., Macnab, R. M. y Kutsukake, K. (1999) Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **181**: 1555-1561.
- Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H. e Iino, T. (1990) Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* **221**: 139-147.
- Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H. e Iino, T. (1992) A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*: an anti-sigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, sigma<sup>F</sup>. *Mol Microbiol* **6**: 3149-3157.
- Ohnishi, K., Ohta, Y., Aizawa, S. I., Macnab, R. M. e Iino, T. (1994) FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 2272-2281.
- Oliver, D. (1985) Protein secretion in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **39**: 615-648.

- O'Toole, P. W., Kostrzynska, M. y Trust, T. J. (1994) Non-motile mutants of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* defective in flagellar hook production. *Mol Microbiol* **14**: 691-703.
- Ottemann, K. M. y Miller, J. F. (1997) Roles for motility in bacterial-host interactions. *Mol Microbiol* **24**(6): 1109-1117.
- Packer, H. L. y Armitage, J. P. (1993) The unidirectional flagellar motor of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 can rotate either clockwise or counterclockwise: characterization of the flagellum undre both conditions by antibody decoration. *J Bacteriol* **175**: 6041-6045.
- Packer, H. L. y Armitage, J. P. (1994) The chemokinetic and chemotactic behavior of *Rhodobacter sphaeroides*: two independent responses. *J Bacteriol* **176**: 206-212.
- Packer, H. L., Gauden, D. E. y Armitage, J. P. (1996) The behavioural response of anaerobic *Rhodobacter sphaeroides* to temporal stimuli. *Microbiology* **142**: 593-599.
- Packer, H. L., Lawther, H. y Armitage, J. P. (1997) The *Rhodobacter sphaeroides* flagellar motor is a variable speed motor. *FEBS Lett* **409**: 37-40.
- Parkinson, J. S. (1993) Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* **73**: 857-871.
- Parkinson, J. S. y Blair, D. F. (1993) Does *E. coli* have a nose? *Science* **259**: 1701-1702.
- Patterson-Delafield, J., Martínez, J. R., Stocker, B. A. D. y Yamaguchi, S. (1973) A new *fla* gene in *Salmonella typhimurium-flaR-* and its mutant phenotype-superhooks. *Arch Mikrobiol* **90**: 107-120.
- Pfennig, N., y Truper, H. G. (1989) Anoxygenic Phototrophic Bacteria. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteria*. Vol. 3 Editores: Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfenning, N. y Holt, J. G., Baltimore, USA. Williams & Wilkin pp 1635-1709.
- Poole, P. S., Smith, J. M. y Armitage, J. P. (1993) Chemotactic signalling in *Rhodobacter sphaeroides* requires metabolism of attractants. *J Bacteriol* **175**: 291-294.
- Power, M. E., Alm, R. A. y Trust, T. J. (1992) Biochemical and antigenic properties of the *Campylobacter* flagellar hook protein. *J Bacteriol* **174**: 3874-3883.
- Pugsley, A. P. (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 50-108.
- Quandt, J. y Hynes, M. F. (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**: 15-21.
- Schoenhals, G. J. y Macnab, R. M. (1999) FliL is a membrane-associated component of the flagellar basal body of *Salmonella*. *Microbiology* **145**: 1769-1775.

- Segall, J. E., Block, S. M. y Berg, H. C. (1986) Temporal comparisons in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8987-8991.
- Shah, D. S. H., Armitage, J. P. y Sockett, R. E. (1995) *Rhodobacter sphaeroides* WS8 expresses a polypeptide that is similar to MotB of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**: 2929-2932.
- Shah, D. S. H. y Sockett, R. E. (1995) Analysis of the *motA* flagellar motor gene from *Rhodobacter sphaeroides*, a bacterium with a unidirectional, stop-start flagellum. *Mol Microbiol* **17**: 961-969.
- Silva-Herzog, E. y Dreyfus, G. (1999) Interaction of FliI, a component of the flagellar export apparatus, with flagellin and hook protein. *Biochim Biophys Acta* **1431**: 374-383.
- Silverman, M. y Simon, M. (1972) Flagellar assembly mutants in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **112**: 986-993.
- Socket, H., Yamaguchi, S., Kihara, M., Irikura, V. M. y Macnab, R. M. (1992) Molecular analysis of the flagellar switch protein FliM of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **174**: 793-806.
- Socket, R. E., Armitage, J. P. y Evans M. C. W. (1987) Methylation-independent and methylation-dependent chemotaxis in *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol* **169**: 5808-5814.
- Socket, R. E. y Armitage, J. P. (1991) Isolation, characterization, and complementation of a paralyzed flagellar mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8. *J Bacteriol* **173**: 2786-2790.
- Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Sourjik, V., Sterr, W., Platzer, J., Bos, I., Haslbeck, M. y Schmitt, R. (1998) Mapping of 41 chemotaxis, flagellar and motility genes to a single region of the *Sinorhizobium meliloti* chromosome. *Gene* **223**: 283-290.
- Springer, M. S., Goy, M. F. y Adler, J. (1979) Protein methylation in behavioural control mechanisms and in signal transduction. *Nature (London)* **280**: 279-284.
- Stock, J. B. y Surette, M. G. (1996) Chemotaxis En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, 2<sup>nd</sup> ed. Editores: Neidhardt F. C., Curtis III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. y Umberger, H. E., Washington, DC: Am Soc Microbiol pp 1103-1129.
- Stolz, B. y Berg, H. C. (1991) Evidence for interactions between MotA and MotB, torque-generating elements of the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**: 7033-7037.

- Suwanto, A. y Kaplan, S. (1992) Chromosome transfer in *Rhodobacter sphaeroides*: Hfr formation and genetic evidence for two unique circular chromosomes. *J Bacteriol* **174**: 1135-1145.
- Suzuki, T. e Iino, T. (1981) Role of the *flaR* gene in flagellar hook formation in *Salmonella* spp. *J Bacteriol* **148**: 973-979.
- Taylor, B. L. y Zhulin, I. B. (1998) In search of higer energy: metabolism-dependent behaviour in bacteria. *Mol Microbiol* **28**: 683-690.
- Trachtenberg, S. y DeRosier, D.J. (1987) Three-dimensional structure of the frozen-hydrated flagellar filament: the left-handed filament of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **195**: 581-601.
- Ueno, T., Oosawa, K. y Aizawa S. I. (1992) M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF. *J Mol Biol* **227**: 672-677.
- Vogler, A. P., Homma, M., Irikura, V. M. y Macnab, R. M. (1991) *Salmonella typhimurium* mutants defective in flagellar filament regrowth and sequence similarity of FliI to F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>, vacuolar and archaebacterial ATPase subunits. *J Bacteriol* **173**: 3564-3572.
- Vonderviszt, F., Kanto, S., Aizawa, S. I. y Namba, K. (1989) Terminal region of flagellin are disordered in solution. *J Mol Biol* **209**: 127-133.
- Vonderviszt, F., Ishima, R., Akaaka, K., Aizawa, S. I. (1992) Terminal disorder: a common structural feature of the axial proteins of bacterial flagellum? *J Mol Biol* **226**: 575-579.
- Walz, D. y Caplan, S. R. (1998) An electrostatic model of the bacterial flagellar motor. *Bioelectrochem and Bioener* **47**: 19-24.
- Ward, M. J., Harrison, D. M., Ebner, M. J. y Armitage, J. P. (1995) Identification of a methyl-accepting chemotaxis protein in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **18**: 115-121.
- Ward, M. H., Bell, A. W., Hamblin, P. A., Packer, H. L. y Armitage, J. P. (1995) Identification of a chemotaxis operon with two *cheY* genes in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **17**: 357-366.
- Welch, M., Oosawa, K., Aizawa, S. I. y Eisenbach, M. (1993) Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8787-8793.
- West, M. y Dreyfus, G. (1997) Isolation and ultrastructural study of the flagellar basal body complex from *Rhodobacter sphaeroides* WS8 (wild type) and a polyhook mutant PG. *Biochim Biophys Res Comm* **238**: 733-737.



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

Woese, C. R., Stackebrandt, E., y Weisburg, W. G. (1984) The phylogeny of the purple bacteria: the alpha subdivision. *Syst Appl Microbiol* **5**: 315-326.

Yamashita, I., Hasegawa, K., Suzuki, H., Vonderviszt, F., Kiyosue-Mimori, Y. y Namba, K. (1998) Structure and switching of bacterial flagellar filaments studied by X-ray fiber diffraction. *Nature Struct Biol* **5** (2): 125-132.

Youderain, P. (1998) Bacterial motility: secretory secrets of gliding bacteria. *Curr Biol* **8**(12): R408-R411.

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

## *Apéndice I*

## The Flagellar Switch Genes *fliM* and *fliN* of *Rhodobacter sphaeroides* Are Contained in a Large Flagellar Gene Cluster

NORMA GARCÍA,<sup>1</sup> ANDRÉS CAMPOS,<sup>1</sup> AURORA OSORIO,<sup>1</sup> SEBASTIAN POGGIO,<sup>1</sup>  
BERTHA GONZÁLEZ-PEDRAJO,<sup>2</sup> LAURA CAMARENA,<sup>1\*</sup>  
AND GEORGES DREYFUS<sup>2</sup>

Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas,<sup>1</sup> and Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular,<sup>2</sup> UNAM, México 04510 D.F., Mexico

Received 6 February 1998/Accepted 22 May 1998

In this work, the genes that encode the FliM and FliN proteins of *Rhodobacter sphaeroides* were characterized. These genes are part of a large flagellar gene cluster in which six additional open reading frames encoding products homologous to FliL, FliO, FliP, FliQ, FliR, and FliB proteins from other bacteria were identified. The inactivation of the *fliM* gene gave a nonflagellate phenotype (Fla<sup>-</sup>), suggesting that FliM is required for flagellar assembly. Complementation analysis of this *fliM* mutant indicated that *fliM* and *fliN* transcription starts beyond the 5' end of *fliK* and terminates after *fliN*.

Flagellar rotation alternates between the clockwise (CW) and counterclockwise (CCW) directions in some peritrichous species, like *Escherichia coli*. When flagella rotate in the CCW direction, the filaments coalesce in a bundle that acts as a propeller to push the bacterial cell body in a linear trajectory known as smooth swim. When the flagella reverse their direction of rotation, the bundle flies apart and the bacteria tumble; tumbling occurs every 2 to 5 s. In the presence of an attractant, the tumble frequency decreases and bacteria swim in the favorable direction. Ultimately, this behavior is controlled by the chemotactic protein CheY, which, in its phosphorylated form, binds to FliM, promoting the switch from CCW to CW rotation (for recent reviews, see references 13 and 24). Although the molecular details of switching are unknown, it is thought that the interaction between CheY-P and FliM is the first step in the control of this phenomenon (19, 30-32).

Interestingly, some bacteria rotate their flagellum in only one direction; consequently, reorientation at the end of a run is achieved by Brownian motion, which randomizes the direction of the next run. This kind of motility is observed in *Rhodobacter sphaeroides* (1). In the presence of an attractant, *R. sphaeroides* increases the duration of a run and, in contrast to enteric bacteria, also increases its swimming velocity. This phenomenon is known as chemokinesis (18).

Several chemotactic genes homologous to *cheA*, *cheW*, and *cheR* from other bacteria have been identified in *R. sphaeroides* (28, 29). Two *cheY* genes were found in the same operon. The deduced amino acid sequences of these genes showed that both putative CheY proteins carried residues D13, D57, and K109, which are essential for CheY function (4, 5, 28). This fact suggests that both putative CheY proteins may be functional.

Although in *R. sphaeroides* some flagellar genes have been characterized (2, 9, 21, 22), no information is available about the target of CheY in the cell. Our aim was to identify the *fliM* gene from this bacterium. We have previously reported the presence of a *fliL* homolog in *R. sphaeroides*. This gene is located in a 5.3-kb *EcoRI* fragment and is flanked by two open

reading frames (ORFs) that show homology to *fliH* and *fliJ* from enteric bacteria (2). This gene arrangement encouraged us to search for the *fliM* gene downstream of *fliJ*. The sequence of the end of the 5.3-kb *EcoRI* fragment opposite to *fliH* revealed the 5' end of *fliM*. A 4.6-kb *SalI* fragment carrying the complete *fliM* coding region was identified by Southern blot analysis (data not shown). This fragment was cloned in pTZ19R after digestion of WS8 chromosomal DNA with *SalI*. A positive clone was identified by colony hybridization and named pRS75. The sequence of this clone revealed the presence of *fliM* together with *fliN*, *fliO*, and part of *fliP*. To complete the sequence of *fliP*, we then cloned an *EcoRI* fragment of 4.4 kb in pTZ19R and performed colony hybridization with a *fliP* fragment as a probe. The new clone, pRS205, was then sequenced.

The analysis of pRS75 and pRS205 sequences was carried out with the Genetics Computer Group software package in conjunction with an *R. sphaeroides* codon usage table (7). Eight ORFs were identified (Fig. 1) and were then subjected to a BLAST search. As shown in Table 1, good homology between the flagellar proteins FliL, FliM, FliN, FliO, FliP, FliQ, FliR, and FliB of different bacterial species was found.

The highest degree of identity was obtained when these ORFs were compared to those obtained from *Salmonella typhimurium*, with the exception of FliN and FliO, which showed a higher identity to their homologs from *Borrelia burgdorferi* and *Caulobacter crescentus*, respectively.

Figure 1 and Table 1 show that the frequency of codon usage for all these ORFs is in good agreement with that observed for *R. sphaeroides* genes with the exception of *fliN* and *fliO*; in the *fliO* ORF, 11.7% of the codons are unusual ones like ATT, TTT, CTT, and ACA.

The start codons for the *fliL*, *fliM*, and *fliN* ORFs are located only a few bases downstream of, or overlapping, the stop codon of the preceding ORF, suggesting that these genes belong to the same transcriptional unit. We also found that the putative ribosome binding site for *fliL* overlaps the stop codon of the recently reported *fliK* gene (9); this result suggests that *fliK* is part of this putative operon.

Also shown in Fig. 1 is the arrangement of *fliO*, *fliP*, *fliQ*, *fliR*, and *fliB*. These genes seem to form a single operon, given that the start codon overlaps the preceding stop codon in an ATGA or TGATG arrangement, which are the first and the

\* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, Apdo Postal 70-228, 04510 México, D. F., Mexico. Phone: (525) 622 38 24. Fax: (525) 622 38 91. E-mail: rosall@servidor.unam.mx.

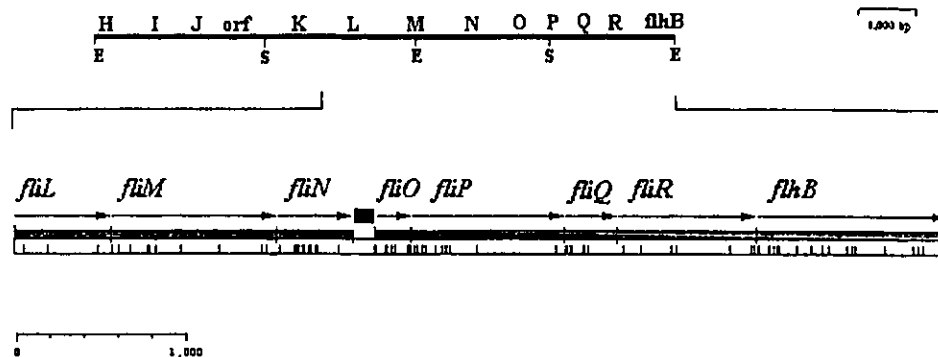


FIG. 1. Organization of the *R. sphaeroides* flagellar cluster. At the top is shown the general gene arrangement for this region (2, 9). The flagellar genes reported in this work are shown below; each ORF is represented as a shaded box. The arrows indicate the direction of transcription. A black square in the middle of *fliN* and *fliO* indicates a noncoding region containing a putative  $\sigma^{54}$  promoter sequence. Vertical bars below the schematic ORFs indicate the presence of rare codons. This analysis was done with CODONPREFERENCE from the Genetics Computer Group Wisconsin software package with a *R. sphaeroides* codon usage table (7).

second most frequent stop-start overlaps in *E. coli* (3). The initiation codons that could be used to translate the *fliO* mRNA are TTG or GTG, which predict a protein of 85 or 60 amino acids, respectively. Alignment of the NH<sub>2</sub> end of FliO sequences from *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. crescentus*, and *R. sphaeroides* shows a number of conserved residues in all these species (Fig. 2); however, if the *R. sphaeroides* FliO started at the GTG codon, some of these conserved residues would be missing. This fact allows us to conclude that the TTG codon is the most probable initiation site. Furthermore, a good ribosome binding site is located 7 bp upstream of this codon. The use of TTG as start codon, together with the high content of unusual codons in *fliO*, suggests a particular translational control of *fliO* that could maintain its product at a low molar concentration compared to the other genes of the operon.

Detailed sequence analysis did not reveal a good match with the consensus promoter sequence known for sigma 70 ( $\sigma^{70}$ ). However, a putative  $\sigma^{54}$  promoter sequence was located 83 bp downstream of the stop codon for *fliN*. This sequence (GGC ACN<sub>5</sub>TTGC) matches 9 of 10 bp of the  $\sigma^{54}$  consensus promoter sequence (10). No inverted repeated sequences were found 100 bp upstream of this putative  $\sigma^{54}$  promoter. Although this may argue against its functionality, it is known that transcriptional activation of  $E\sigma^{54}$  still occurs if the activator binding sites are moved 2,000 bp upstream or downstream the  $\sigma^{54}$  promoter (16). Therefore, the possibility that remote activation sites exist to promote initiation of this putative promoter still remains.

**Construction and characterization of an *R. sphaeroides* mutant with a *fliM* mutation.** To test the functionality of these genes, we decided to isolate a *fliM* mutant strain. For this purpose, a *Spc*<sup>r</sup> cassette, '*uidA-aad* (*uidA* encodes  $\beta$ -glucuronidase, and *aad* encodes the aminoglycoside-3-adenyltransferase and confers *Spc*<sup>r</sup>) (15), was cloned in the middle of *fliM* in plasmid pRS75. The resulting fragment, carrying *fliM::uidA-aad*, was subcloned into the *SalI* site of pJQ200mp18 (*Gm*<sup>r</sup>) (20), which is unable to replicate in *R. sphaeroides*. This new plasmid was then transferred to *R. sphaeroides* by mating (8), and *Spc*<sup>r</sup> *Gm*<sup>r</sup> transconjugants were selected. One colony was purified and named NG1.

That a successful double recombination event had occurred to yield NG1 was confirmed by a Southern blot experiment (data not shown). To test if the *fliM::uidA-aad* allele affected cell motility, NG1 cells were plated on tryptone motility plates and incubated at 30°C in a humid chamber. After 48 h, these cells were unable to swarm, in contrast to the wild-type cells (Fig. 3). It should be noted that these strains showed similar growth rates; therefore, the difference in swarming behavior cannot be explained by growth differences. To rule out the possibility that this mutant could still swim in liquid medium, an aliquot from a NG1 culture grown under aerobic and anaerobic conditions was observed directly under the microscope; swimming was not detected after growth under either condition. To determine if the inability to swim or swarm could be ascribed to a Fla<sup>-</sup> or paralyzed (Mot<sup>-</sup>) phenotype, an aliquot of NG1 cells was negatively stained and observed under

TABLE 1. Comparison of encoded proteins of *R. sphaeroides* flagellar genes with those of other bacterial species

Gene	Function	Size of product (amino acids) <sup>a</sup>	% of unusual codons	% Homology (identity/similarity) to the gene from:			
				<i>S. typhimurium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. crescentus</i>	<i>B. burgdorferi</i>
<i>fliL</i>	Unknown	190	1.5	28/48	23/61	18/43	16/45
<i>fliM</i>	Motor switch	323	3.4	26/48	21/45	21/44	23/48
<i>fliN</i>	Motor switch/export	152	9.0	38/64	—	31/61	44/72
<i>fliO</i>	Unknown	85	11.7	21/51	—	34/58	—
<i>fliP</i>	Unknown <sup>c</sup>	301	5.3	53/74	48/71	46/68	38/66
<i>fliQ</i>	Unknown <sup>c</sup>	88	5.6	44/70	33/57	31/56	32/66
<i>fliR</i>	Unknown <sup>c</sup>	269	2.6	29/55	29/58	23/52	23/56
<i>fliB</i>	Unknown <sup>c</sup>	>376	—	43/64	30/56	—	28/58

<sup>a</sup> Number of amino acids deduced from the conceptual translation.

<sup>b</sup> —, not determined.

<sup>c</sup> Suspected to be involved in flagellum assembly; the product shows homology to virulence proteins (13).

```

FliORa : -----MDILRPDQIL-TIGLFGLGL-LNLAV : 26
FliOCc : -----MDLIESIRALAAAFTGLGLAAWALR : 28
FliOEc : -----MSGALIAIIIILAAALVK : 20
FliOSc : MMKTEATVSQPTAPAGSPLMQVSGALIGIIIILAAAVIK : 41

```

FIG. 2. Alignment of the NH<sub>2</sub>-end sequences of FliO from *E. coli* (GenBank accession no. L22182 and L21994) (FliO<sub>Ec</sub>), *S. typhimurium* (L49021) (FliO<sub>St</sub>), and *C. crescentus* (U20387) (FliO<sub>Cc</sub>) with the deduced sequence of FliO from *R. sphaeroides* (FliO<sub>Ra</sub>) starting from the TTG codon. The second possible start codon encodes V25. Identical and similar residues present in all the species are shaded. The difference in length between *E. coli* and *S. typhimurium* corresponds to the controversy between the actual translation start codon for FliO (for details, see references 14 and 17).

the electron microscope. Since no flagellar structure was visible in more than 90% of cells in the sample, Fla<sup>-</sup> was the phenotype assigned to NG1. A few cells showed a small filament-like structure clearly different from the wild-type filament. These cells may represent secondary suppressors of the *fliM::uidA-aad* allele.

Full motility was recovered when pRK415 (11) carrying the 4.6-kb *Sal*I fragment was introduced into the mutant strain NG1. Both swimming and swarming were indistinguishable from wild-type behavior (Fig. 4). However, when this DNA fragment was cloned in the opposite orientation, complementation of NG1 cells was not observed (Fig. 4). In this last construction, the fragment containing *fliLMNOP*' was in the opposite orientation to the direction of transcription from the *lac* and *tet* promoters (*lac*p and *tet*p) of pRK415. The fact that this *Sal*I fragment was able to complement NG1 in just one orientation suggests that *fliM* does not have a promoter in this fragment and that its transcription depends on the *lac* and *tet* promoters of pRK415. This result strongly suggests that *fliM* expression is dependent on a promoter located upstream of *fliK*.

It has been previously shown that the *uidA-aad* fragment is highly polar in *E. coli* as well as in other bacteria (15). Therefore, we decided to determine if the *uidA-aad* cassette inserted in *fliM* exerted a polar effect on the transcription of downstream genes. For this, a 1.3-kb *Sac*II fragment and a PCR product, both containing *fliM*, were each cloned in pRK415 in the proper orientation to allow its expression from *lac*p and *tet*p. The resulting plasmids, pRS14 and pRS10, respectively, did not complement NG1 cells, indicating that the Fla<sup>-</sup> phenotype observed in the NG1 strain was caused by inactivation of the *fliM* gene, which in turn caused lack of transcription of downstream genes.

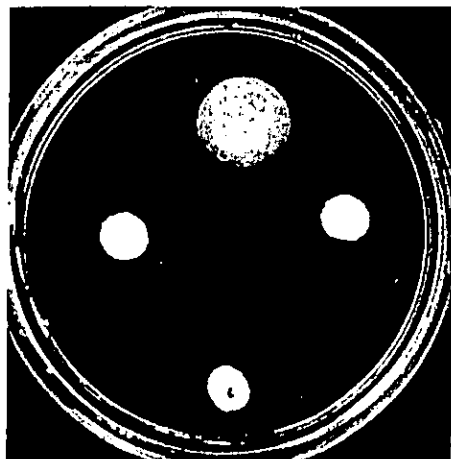


FIG. 3. Motility plates showing the phenotype of NG1 cells. WS8 was included as a control (top). The negative control (bottom) corresponds to strain PG2 (*fliK::TnphoA*) (9). NG1 cells were spotted twice (middle row).

Since the polar effect of the *uidA-aad* cassette will affect only genes that belong to the same transcriptional unit, we introduced into NG1 cells a 2.3-kb *Bam*HI fragment in pRK415. This fragment includes the *fliLMN* genes under control of the pRK415 promoters. We observed that this construction restored the swimming and swarming abilities of NG1 cells. This result suggests that *fliN* must be the last gene of a single transcriptional unit. In consequence, *fliOPQR* and *fliH* may form an independent operon. Alternatively, it is possible that *fliOPQR* and *fliH* are not functional genes; however, we consider this explanation less probable given that we have isolated a mutant with an *fliR* mutation that showed the nonmotile phenotype (6).

Finally, to determine the phenotype of a strain carrying a lesion in *fliM*, we introduced into NG1 cells a 980-bp *Pst*I-*Bam*HI fragment cloned in pRK415. This fragment contains the 3' end of *fliM* and the complete *fliN* gene. The phenotype of NG1 carrying this plasmid should correspond to a *fliM* mutant, avoiding any polar effect on *fliN*. Phenotypic characterization of NG1 cells carrying this construction shows that they have the Fla<sup>-</sup> phenotype (data not shown). This result suggests that FliM plays some role in the export of flagellar components. It was recently shown that FliM and FliN proteins require each other for their integration into the switch structure (12). In this regard, Vogler et al. (27) showed that a temperature-sensitive *fliN* mutant cannot export flagellar pro-

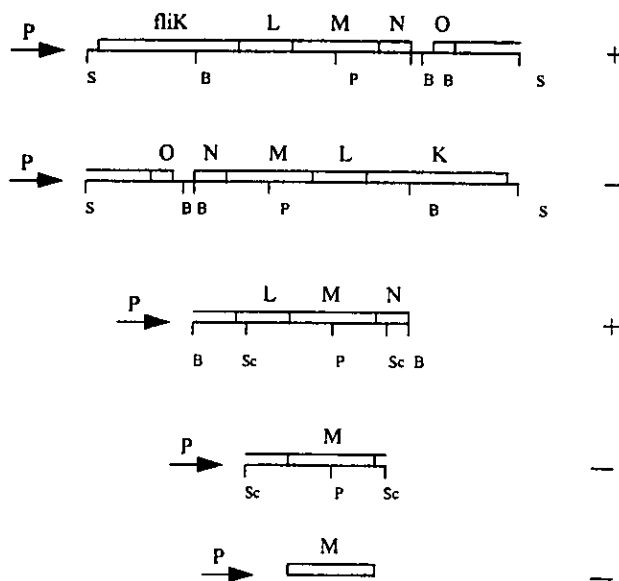


FIG. 4. Complementation analysis of NG1 cells with the 4.6-kb *Sal*I fragment and subclones. Some of the relevant restriction sites are indicated: S, *Sal*I; B, *Bam*HI; P, *Pst*I; Sc, *Sac*II. Restoration of swimming behavior is recorded by +; no complementation is indicated by -. The arrows indicate the direction of transcription starting from the *lac* and *tet* promoters located in the pRK415 vector.

```

FliMRs : KISSKEVAALVGNLMEASE-----STSLNGLVVRPVA 39
FliMSc : ILSQAEIDALL---NGDSDTKDEP-----TPGIASDSDIRPYD 39
FliMEc : ILSQAEIDALL---NGDSEVKDEP-----TASVSGESDIRPYD 50
FliMBs : VLSQNEIDALLLSAISTGEMDAEE-----LKKEEKEKKVKVYD 40
FliMTP : VLSQDEIDQLLTAISSGDA-SIED-----ARPISDTRKITLYD 41
FliMBb : ALSQDDIDSLLESINSSESLDESLSNVISSPTGKKQKVKVYD 41
FliMHp : ILSQEEIDALLEVVDENVDIQNVQ-----KKDIIPQRSVTLVYD 41
FliMCc : ILNQDEIDSLLGFDLSGDGSDDRGTGIRAINSA-----LIVSYE 88

```

FIG. 5. Alignment of the first 39 amino acids of FliM from *R. sphaeroides* with FliM sequences of other bacterial species. Identical and similar residues conserved in all the sequences are shaded. (The GenBank accession numbers are as follows: U46011 and U00096, FliM<sub>Ec</sub> [*E. coli*]; M24465, FliM<sub>Sc</sub> [*S. typhimurium*]; L75945, FliM<sub>Bb</sub> [*B. burgdorferi*]; U28219, FliM<sub>TP</sub> [*T. pallidum*]; M37691, FliM<sub>Bs</sub> [*B. subtilis*]; AE000611 FliM<sub>Hp</sub> [*H. pylori*]; M85232, FliM<sub>Cc</sub> [*C. crescentus*]).

teins at the restrictive temperature. These data suggest that the switch complex may contribute to the stability of the export apparatus. Nevertheless, the role of the switch complex in the export process has yet to be solved.

**Is a single copy of *fliM* present in *R. sphaeroides*?** The presence of two *cheY* genes in the chromosome of *R. sphaeroides*, as well as the high degree of conservation of some residues involved in CheY functionality such as D13, D57, and K109 (28) in both *cheY* products, raises the question whether more than one copy of the *fliM* gene would be necessary to form a switch complex carrying two different species of FliM protein. Using the complete *fliM* gene as a probe, we carried out a Southern blot experiment under low hybridization stringency and gentle washing conditions. We did not find evidence for a second *fliM* gene in the chromosomal DNA of *R. sphaeroides*, suggesting that CheY-mediated chemotaxis control may be achieved by competition between the two different CheY proteins for FliM or for CheA binding, as has been suggested for *Rhizobium meliloti* (23). Alternatively, it is possible that a gene encoding a protein carrying just the CheY-P binding site could not be detected by Southern blotting.

On the other hand, it has been shown that CheY binds to the first 40 to 50 amino acids of FliM (25, 26). Alignment of our deduced FliM sequence with seven other FliM sequences shows some highly conserved residues among the first 50 amino acids, i.e., a tyrosine approximately 40 residues from the N terminus, and the presence of an LN<sub>2</sub>(E/D)N<sub>3</sub>L(L/V) motif, which predicts an  $\alpha$ -helix (Fig. 5). The importance of these conserved amino acids in the function of FliM is currently under investigation in our laboratory.

It will be interesting to understand the interactions between FliM and both CheY proteins as well as FliG in order to understand how chemokinesis and the stop-start processes are controlled in this organism.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The DNA sequences of the *R. sphaeroides* *fliL*, *fliM*, *fliN*, *fliO*, *fliP*, *fliQ*, *fliR*, and *fliB* genes have been deposited in the GenBank data base under accession no. AF044254 and AF044580.

#### ADDENDUM

In the course of this work, the sequences of the *R. sphaeroides* *fliM* and *fliN* genes appeared in the GenBank database (9a). A comparison of these sequences with ours showed an inversion of GC to CG in the *fliM* sequence, producing a change of a cysteine (C152) for a valine (V152) in our sequence.

We are indebted to Luis Servín and Laura Velázquez for helpful discussions and critical review of the manuscript. We thank T. Ballado for technical assistance. We also thank M. West and E. Silva-Herzog for their comments and helpful discussions and J. Sepúlveda for technical support with electron microscopy. We also thank the Unidad de

Biología Molecular (IFC) for the synthesis of some oligonucleotides used in this work.

This work was supported in part by CONACyT grants 4739-N9406 to L.C. and 3290P-N9607 to G.D.

#### REFERENCES

- Armitage, J. P., and R. M. Macnab. 1987. Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 169:514-518.
- Ballado, T., A. Campos, L. Camarena, and G. Dreyfus. 1996. Flagellar genes from *Rhodobacter sphaeroides* are homologous to genes of the *fliF* operon of *Salmonella typhimurium* and to the type-III secretion system. *Gene* 170:69-72.
- Blattner, F. R., G. Plunkett III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-1462.
- Bourret, R. B., J. F. Hess, and M. I. Simon. 1990. Conserved aspartate residues and phosphorylation in signal transduction by the chemotaxis protein CheY. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:41-45.
- Bourret, R. B., S. K. Drake, S. A. Chervitz, M. I. Simon, and J. J. Falke. 1993. Activation of the phosphosignaling protein CheY. II. Analysis of activated mutants by <sup>19</sup>F NMR and protein engineering. *J. Biol. Chem.* 268:13089-13096.
- Camarena, L., S. Poggio, and G. Dreyfus. Unpublished data.
- Campos, A., L. Camarena, and G. Dreyfus. Codon usage table of *R. sphaeroides* of more than one hundred genes. Unpublished data.
- Davis, J., T. J. Donohue, and S. Kaplan. 1988. Construction, characterization, and complementation of a *puf* mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 170:320-329.
- Gonzalez-Pedrajo, B., T. Ballado, A. Campos, R. E. Sockett, L. Camarena, and G. Dreyfus. 1997. Structural and genetic analysis of a mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 deficient in hook length control. *J. Bacteriol.* 179:6581-6588.
- Goodfellow, I. G., et al. GenBank accession no. Y14335.
- Helmann, J. D., and M. J. Chamberline. 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.* 57:839-872.
- Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* 70:191-197.
- Kubori, T., S. Yamaguchi, and S.-I. Aizawa. 1997. Assembly of the switch complex onto the MS ring complex of *Salmonella typhimurium* does not require any other flagellar proteins. *J. Bacteriol.* 179:813-817.
- Macnab, R. M. 1996. Flagella and motility, p. 123-145. In F. C. Neidhart, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Malakooti, J., B. Ely, and P. Matsumura. 1994. Molecular characterization, nucleotide sequence, and expression of the *fliO*, *fliP*, *fliQ*, and *fliR* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176:189-197.
- Metcalf, W. W., and B. L. Wanner. 1993. Construction of new  $\beta$ -glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement. *Gene* 129:17-25.
- Ninfa, A. J., L. J. Reitzer, and B. Magasanik. 1987. Initiation of transcription at the bacterial *glnAp<sub>2</sub>* promoter by purified *E. coli* components is facilitated by enhancers. *Cell* 50:1039-1046.
- Ohnishi, K., F. Fan, G. J. Schoenhals, M. Kihara, and R. M. Macnab. 1997. The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*: putative components for flagellar assembly. *J. Bacteriol.* 179:6092-6099.
- Packer, H. L., and J. P. Armitage. 1994. The chemokinetic and chemotactic behavior of *Rhodobacter sphaeroides*: two independent responses. *J. Bacteriol.* 176:206-212.
- Parkinson, J. S., S. R. Parker, P. B. Talbert, and S. E. Houts. 1983. Inter-

- actions between chemotaxis genes and flagellar genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **155**:265-274.
20. Quandt, J., and M. F. Hynes. 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene* **127**: 15-21.
  21. Shah, D. S. H., and R. E. Sockett. 1995. Analysis of the *motA* flagellar motor gene from *Rhodobacter sphaeroides*, a bacterium with a unidirectional, stop-start flagellum. *Mol. Microbiol.* **17**:961-969.
  22. Shah, D. S. H., J. P. Armitage, and R. E. Sockett. 1995. *Rhodobacter sphaeroides* WS8 expresses a polypeptide that is similar to MotB of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**:2929-2932.
  23. Sourjik, V., and R. Schmitt. 1996. Different roles of CheY1 and CheY2 in the chemotaxis of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* **22**:427-436.
  24. Stock, J., and M. G. Surette. 1996. Chemotaxis, p. 1103-1129. In F. C. Neidhart, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
  25. Toker, A. S., Kihara, M., and R. M. Macnab. 1996. Deletion analysis of the FliM flagellar switch protein of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **178**: 7069-7079.
  26. Toker, A. S., and R. M. Macnab. 1997. Distinct regions of bacterial flagellar switch protein FliM interact with FliG, FliN and CheY. *J. Mol. Biol.* **273**: 623-634.
  27. Vogler, A. P., M. Homma, V. M. Irikura, and R. M. Macnab. 1991. *Salmonella typhimurium* mutants defective in flagellar filament regrowth and sequence similarity of FliI to  $F_0F_1$ , vacuolar and archaeobacterial ATPase subunits. *J. Bacteriol.* **173**:3564-3572.
  28. Ward, M. J., A. W. Bell, P. A. Hamblin, H. L. Packer, and J. P. Armitage. 1995. Identification of a chemotaxis operon with two *cheY* genes in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* **17**:357-366.
  29. Ward, M. J., D. M. Harrison, M. J. Ebner, and J. P. Armitage. 1995. Identification of a methyl-accepting chemotaxis proteins in *R. sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* **18**:115-121.
  30. Welch, M., K. Oosawa, S.-I. Aizawa, and M. Eisenbach. 1993. Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:8787-8791.
  31. Welch, M., K. Oosawa, S.-I. Aizawa, and M. Eisenbach. 1994. Effects of phosphorylation,  $Mg^{2+}$ , and conformation of the chemotaxis protein CheY on its binding to the flagellar switch protein FliM. *Biochemistry* **33**:10470-10476.
  32. Yamaguchi, S., S.-I. Aizawa, M. Kihara, C. J. Jones, and R. M. Macnab. 1986. Genetic evidence for a switch an energy-transducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **168**:1172-1179.

## *Apéndice II*



# FliK, the protein responsible for flagellar hook length control in *Salmonella*, is exported during hook assembly

Tohru Minamino,<sup>1</sup> Bertha González-Pedrajo,<sup>1†</sup>  
Kenta Yamaguchi,<sup>2</sup> Shin-Ichi Aizawa<sup>2</sup> and  
Robert M. Macnab<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biophysics and Biochemistry,  
Yale University, New Haven, CT 06520–8114, USA.

<sup>2</sup>Department of Biosciences, Teikyo University,  
Utsunomiya 320–8551, Japan.

## Summary

In wild-type *Salmonella*, the length of the flagellar hook, a structure consisting of subunits of the hook protein FigE, is fairly tightly controlled at  $\approx 55$  nm. Because *fliK* mutants produce abnormally elongated hook structures that lack the filament structure, FliK appears to be involved in both the termination of hook elongation and the initiation of filament formation. FliK, a soluble protein, is believed to function together with a membrane protein, FlhB, of the export apparatus to mediate the switching of export substrate specificity (from hook protein to flagellin) upon completion of hook assembly. We have examined the location of FliK during flagellar morphogenesis. FliK was found in the culture supernatants from the wild-type strain and from *flgD* (hook capping protein), *flgE* (hook protein) and *flgK* (hook-filament junction protein) mutants, but not in that from a *flgB* (rod protein) mutant. The amount of FliK in the culture supernatant from the *flgE* mutant was much higher than in that from the *flgK* mutant, indicating that FliK is most efficiently exported prior to the completion of hook assembly. Export was impaired by deletions within the N-terminal region of FliK, but not by C-terminal truncations. A decrease in the level of exported FliK resulted in elongated hook structures, sometimes with filaments attached. Our results suggest that the export of FliK during hook assembly is important for hook-length control and the switching of export substrate specificity.

## Introduction

The bacterial flagellum is a complex structure composed of a basal body, a hook and a filament. The basal body, which consists of a cytoplasmic ring (C ring), an inner ring (MS ring), two outer rings (P ring and L ring) and a rod, is embedded in the cell envelope, whereas the hook and filament extend far into the cell exterior. Flagellar assembly begins with the basal body, proceeds with the hook, and finishes with the filament (Macnab, 1996). One of the remarkable features of the flagellar structure is that the length of the hook, a tubular structure composed of subunits of the protein FigE, is closely controlled at about 55 nm in wild-type cells (Hirano *et al.*, 1994).

Mutants with a defect in a protein called FliK have abnormally elongated hooks called polyhooks (Patterson-Delafield *et al.*, 1973; Suzuki and Iino, 1981; Kawagishi *et al.*, 1996), indicating that FliK is involved in length control. On the basis of analyses of intragenic and extragenic *fliK* suppressor mutants, FliK is thought to be a regulatory protein, which mediates the ordered export of flagellar proteins (Kutsukake *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996; Kutsukake, 1997; Muramoto *et al.*, 1998; Minamino and Macnab, 1999). During rod and hook assembly, a membrane protein, FlhB, which is a component of the type III flagellar export apparatus (Minamino *et al.*, 1994; Minamino and Macnab, 1999), supports the export of the rod-type (FigB, FigC, FigF, FigG) and hook-type (FigD, FigE) proteins, but not that of the filament-type proteins (FigM, FigK, FigL, FliD, FliC) (Kutsukake *et al.*, 1994). At this stage, a second regulatory protein, RflH, also acts to inhibit the export of filament-type proteins (Kutsukake, 1997). Upon completion of hook assembly, the hook-length signal is somehow transmitted to FliK and/or FlhB, shutting off rod/hook-type protein export and turning on filament-type protein export. Mutations in *fliK* prevent FlhB from switching the substrate specificity of the export apparatus, and so polyhooks are produced.

It should be noted that the hook-length signal, as opposed to the process of hook-length control, appears to be (at least to some degree) independent of FliK, as *fliK* mutants show a peak in hook-length distribution at the wild-type value of 55 nm, even though the distribution extends far further out than that of the wild-type (Koroyasu *et al.*, 1998).

Received 14 May, 1999; revised 12 July, 1999; accepted 22 July, 1999. †Present address: Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, 04510, México DF, Mexico. \*For correspondence. E-mail robert.macnab@yale.edu; Tel. (+1) 203 432 5590; Fax (+1) 203 432 9782.

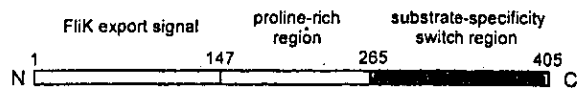


Fig. 1. The primary structure of the hook-length control protein FliK. Its 405 amino acid sequence can be roughly divided into three regions. The C-terminal region is known to be essential for switching the substrate specificity of the export apparatus from hook-type proteins to filament-type proteins. The central region is proline rich, and may perform a hinge-like function between the N- and C-terminal domains. The function of the N-terminal region has been unknown until now; the present study establishes that it contains the information necessary for FliK export by the type III flagellum-specific apparatus.

FliK consists of three regions: an N-terminal region, a proline-rich central region, and a highly conserved C-terminal region (Fig. 1) (Kawagishi *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1996). Spontaneous polyhook mutations are either frameshift or nonsense, resulting in truncation of the C-terminus (Suzuki and Iino, 1981; Williams *et al.*, 1996). Intragenic suppressor mutants, whose second-site mutations invariably restore this C-terminal region, have regained the ability to switch substrate specificity and assemble filament, although often with decreased efficiency (Williams *et al.*, 1996). We have therefore proposed that the C-terminal region of FliK is directly involved in switching substrate

specificity. This C-terminal region is highly conserved among the FliK proteins of other bacteria (González-Pedrajo *et al.*, 1997).

FliK has been believed to reside permanently in the cytoplasm, because it is soluble and has not been found as a component of the wild-type flagellar structure or of flagellar precursors (Kawagishi *et al.*, 1996). If this belief is correct, it is not easy to imagine how it can control the state of an external structure like the hook. In this study, we show that, prior to the completion of hook assembly, FliK is exported from the cell via the flagellum-specific pathway. In this case, it must be associated in some way with the flagellum during the assembly process.

## Results

### *FliK is exported into the culture medium*

To investigate if FliK is restricted to the cytoplasm, we prepared the periplasmic contents and culture supernatants from various flagellar mutants (wild-type, *flgB*, *flgD*, *flgE*, *flgK* and *fliK*) (see Table 1 for a listing of strains and plasmids used in this study). After the proteins in the two fractions had been separated by SDS-PAGE, immunoblotting was performed with anti-FliK antibody (Fig. 2).

Table 1. Strains and plasmids.

Strain or plasmid	Relevant characteristic	Source or reference
<i>Salmonella</i> strains		
JR501	For converting plasmid to <i>Salmonella</i> compatibility	Ryu and Hartin (1990)
SJW1103	Wild type with respect to flagellation	Yamaguchi <i>et al.</i> (1984)
SJW1525	<i>flgB</i> (rod protein) mutant	Ohnishi <i>et al.</i> (1994)
SJW157	<i>flgD</i> (hook capping protein) mutant	Ohnishi <i>et al.</i> (1994)
SJW1353	<i>flgE</i> (hook protein) mutant	Ohnishi <i>et al.</i> (1994)
SJW1353IK	<i>flgE fliK::Tn10</i>	This study
KK1334	<i>flgK</i> (HAP1, hook-filament junction protein) mutant	Minamino and Macnab (1999)
SJW108	<i>fliK</i> (hook-length control protein) mutant	Williams <i>et al.</i> (1996)
MY3003	Intragenic <i>fliK</i> pseudorevertant with amino acids 21–30 deleted <sup>a</sup>	Williams <i>et al.</i> (1996)
MY3006	Intragenic <i>fliK</i> pseudorevertant with amino acids 24–30 deleted	Williams <i>et al.</i> (1996)
MY3007	Intragenic <i>fliK</i> pseudorevertant with amino acids 26–30 deleted	Williams <i>et al.</i> (1996)
MY3008	Intragenic <i>fliK</i> pseudorevertant with amino acids 28–30 deleted	Williams <i>et al.</i> (1996)
MY3009	Intragenic <i>fliK</i> pseudorevertant with amino acids 29–30 deleted	Williams <i>et al.</i> (1996)
MY2802	Intragenic <i>fliK</i> pseudorevertant with amino acids 118–130 deleted	Williams <i>et al.</i> (1996)
MY2803	Intragenic <i>fliK</i> pseudorevertant with amino acids 92–158 deleted	Williams <i>et al.</i> (1996)
MY2805	Intragenic <i>fliK</i> pseudorevertant with amino acids 121–133 deleted	Williams <i>et al.</i> (1996)
MY2807	Intragenic <i>fliK</i> pseudorevertant with amino acids 129–159 deleted	Williams <i>et al.</i> (1996)
Plasmids		
pKM000	pBR322/wild-type FliK	Muramoto <i>et al.</i> (1998)
pKM002	pTrc99A/wild-type FliK	Muramoto <i>et al.</i> (1998)
pKM003	pET19b/N-terminally His-tagged FliK	K. Muramoto (unpublished)
pKM004	pET19b/N-terminally His-FLAG <sup>b</sup> -tagged FliK	Muramoto <i>et al.</i> (1998)
pKM802	pTrc99A/FliK S319amber	Muramoto <i>et al.</i> (1998)
pKM902	pTrc99A/FliK E380ochre	Muramoto <i>et al.</i> (1998)
pIKΔ1, pIKΔ2, etc.–pIKΔ10 <sup>c</sup>	pET19b/FliKΔ(1–10), FliKΔ(11–20), etc.–FliKΔ(91–100)	This study
pMMK3003, etc.	pTrc99A-based plasmids encoding <i>fliK</i> alleles of MY3003, etc.	This study

a. In most cases, the two frameshift mutations that these pseudorevertant strains contain result not only in the deletion of the amino acids shown, but also in the addition of a few amino acids of non-FliK sequence at the same position (Williams *et al.*, 1996).

b. FLAG is a short peptide epitope tag (Hopp *et al.*, 1988)

c. These plasmids encode a His tag at their N terminus.

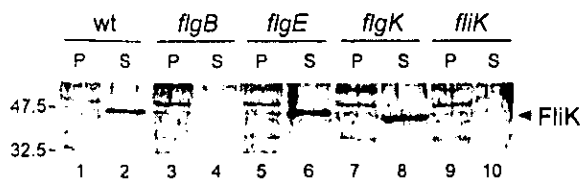


Fig. 2. Immunoblot, using polyclonal anti-FliK antibody, of the periplasmic (P) and culture supernatant (S) fractions of wild-type (wt) and various mutant cells. Molecular mass markers (in kDa) are shown to the left; the deduced molecular mass of FliK is 42 kDa (Kawagishi *et al.*, 1996). The slight downward shift of the FliK band in lane 8 is caused by large amounts of exported flagellin in this culture.

FliK was detected in the culture supernatants from the wild-type strain (lane 2) and the *flgD* (data not shown), *flgE* (lane 6) and *flgK* (lane 8) mutants, but not in those from the *flgB* (lane 4) and *fliK* (lane 10) mutants. From its apparent molecular mass, it is evident that the exported FliK molecule is full size.

*flgB* mutants do not assemble the rod structure (Kubori *et al.*, 1992), and so export substrates cannot penetrate the outer membrane. The fact that FliK was not found in the culture supernatant of the *flgB* mutant therefore supports the hypothesis that FliK export proceeds via the flagellum-specific pathway. However, FliK was not detected in the periplasmic fraction of the *flgB* mutant either (lane 3). The fractionation itself was successful, as a known periplasmic protein,  $\beta$ -lactamase (encoded by pUC18; see *Experimental procedures*), was readily detectable (data not shown). FliK is known to be protease sensitive (Muramoto *et al.*, 1998) and so FliK may have been exported to the periplasm but degraded. It is also possible that FliK export does not start until the rod has been assembled.

#### *FliK export only proceeds efficiently prior to hook completion*

The amount of FliK was somewhat higher in the culture supernatant from the *flgE* mutant (Fig. 2, lane 6) than in that from the wild-type strain (lane 2) or the *flgK* mutant (lane 8); the differences were not large, perhaps because in all cases there may have been appreciable carry-over of protein that had been exported during earlier stages of assembly.

To investigate further whether FliK export occurs predominantly prior to the completion of hook assembly, we increased the FliK level by introducing pKM002 (which encodes wild-type FliK on pTrc99A; Muramoto *et al.*, 1998) into the *flgE* and *flgK* mutants. We also attempted to reduce the problem of carry-over by washing and resuspending in fresh M9 medium and growing out for a limited period of time (see *Experimental procedures*), before preparing the culture supernatants. After SDS-PAGE,

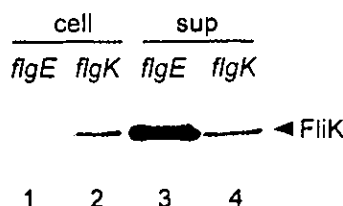


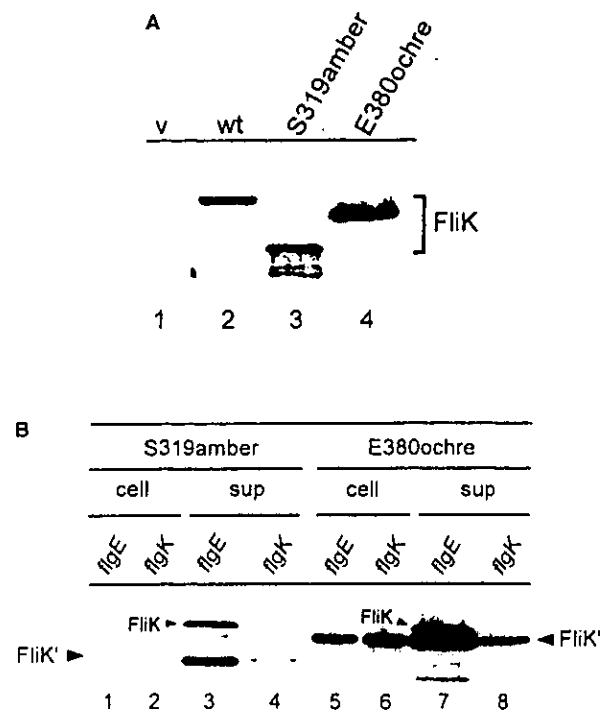
Fig. 3. Immunoblot, using polyclonal anti-FliK antibody, of the cell and culture supernatant fractions of hook-associated protein 1 (*flgE*) and hook-associated protein 1 (*flgK*) mutants transformed with a plasmid, pKM002, which overproduces FliK.

immunoblotting was performed with anti-FliK antibody (Fig. 3). Cellular levels of FliK were somewhat lower in the *flgE* mutant (lane 1) than in the *flgK* mutant (lane 2). In the culture supernatant, however, the amount of FliK was much higher with the *flgE* mutant (lane 3) than with the *flgK* mutant (lane 4). We conclude that FliK is only exported efficiently prior to hook completion.

#### *Truncation of the C-terminal region of FliK does not affect export*

Structural flagellar proteins, like flagellin, (Kuwajima *et al.*, 1989; Kornacker and Newton, 1994; T. Minamino and R. M. Macnab, unpublished results) and the regulatory protein, FlgM, (Iyoda and Kutsukake, 1995) can still be exported when their C-terminus has been truncated. To examine whether this is also true of FliK, we introduced the plasmids pKM802 and pKM902 – which encode FliK S319amber and FliK E380ochre respectively (Muramoto *et al.*, 1998) – into SJW108 (*fliK*). The proteins in the culture supernatants from the resulting transformants were then analysed using immunoblotting with anti-FliK antibody (Fig. 4A). Like the wild-type FliK protein (lane 2), both of the C-terminally truncated forms of FliK were detected (lanes 3 and 4).

To examine whether C-terminal truncation of FliK affects its ordered export, we examined export before and after hook completion. SJW1353 (*flgE*) and KK1334 (*flgK*) mutants were transformed with either pKM802 or pKM902, and their culture supernatants were collected and subjected to immunoblotting with anti-FliK antibody (Fig. 4B). As with wild-type FliK, the amount of both of the truncated FliK proteins in the culture supernatant was much higher with the *flgE* mutant (lanes 3 and 7) than with the *flgK* mutant (lanes 4 and 8), demonstrating that the truncated FliK proteins had retained the property of ordered export. Both of the host strains are *fliK*<sup>-</sup>; presumably it was the wild-type FliK that was responsible for the switching of substrate specificity, as C-terminally truncated FliK is known to be unable to do this. [*flgK* mutants are known to have undergone the switch in substrate specificity (Homma *et al.*, 1984).] Although both



**Fig. 4.** A. Immunoblot, using polyclonal anti-FliK antibody, of culture supernatants containing wild-type FliK (lane 2) or proteins with C-terminal truncations (FliK S319amber, lane 3, and FliK E380ochre, lane 4). FliK S319amber appears to have been partially degraded. B. As in A, but in *flgE* and *flgK* backgrounds to examine the issue of ordered transport. As well as the truncated forms of FliK (FliK'), wild-type FliK resulting from chromosomal expression was detected.

wild-type and truncated FliK proteins could be exported simultaneously, they do not appear to be in competition.

#### Deletion of the N-terminal region of FliK can affect export

We constructed a series of mutant versions of FliK with sequential 10-amino-acid deletions within the N-terminal region; these were encoded by the pET19b-based plasmids pIK $\Delta$ 1–10 (Fig. 5A).

These plasmids were introduced into SJW108 (*fliK*) and the motility of the resulting transformants was tested on motility agar plates (Fig. 5B). pIK $\Delta$ 5,  $\Delta$ 6 and  $\Delta$ 10 fully complemented the *fliK* mutant.  $\Delta$ 4 restored motility to some degree, and  $\Delta$ 2 and  $\Delta$ 3 less so.  $\Delta$ 1,  $\Delta$ 7,  $\Delta$ 8 and  $\Delta$ 9 did not complement at all.

Failure to complement could be a result of protein instability. To test this, we introduced the plasmids into BL21(DE3)pLysS, and prepared the whole cell proteins from the resulting transformants. Immunoblotting with anti-FliK antibody (Fig. 5C) revealed that FliK $\Delta$ 1– $\Delta$ 6 and  $\Delta$ 10 (lanes 2–7 and 11) were detected at wild-type levels

(lane 1). A small amount of a degraded form of  $\Delta$ 9 was detected (lane 10), but  $\Delta$ 7 and  $\Delta$ 8 were not detected at all (lanes 8 and 9). Thus the failure of plasmids pIK $\Delta$ 7,  $\Delta$ 8 and  $\Delta$ 9 to complement does not prove that the deleted regions are essential for FliK export or motility.

Next we examined the export of those mutant FliK proteins that were stable enough to be detected, using SJW1353IK (*flgE fliK::Tn10*) as the host because FliK is exported most efficiently before completion of hook assembly (Fig. 3). In immunoblots of the culture supernatants with anti-FliK antibody (Fig. 5D), the FliK $\Delta$ 5,  $\Delta$ 6 and  $\Delta$ 10 proteins (lanes 7, 8 and 9) were detected at wild-type levels, indicating that their deletions hardly affect export. However, the other deletions ( $\Delta$ 1– $\Delta$ 4) caused severe inhibition of export (lanes 3–6).

#### Flagellar morphology of in frame deletion mutants that are export deficient

The  $\Delta$ 1,  $\Delta$ 2,  $\Delta$ 3 and  $\Delta$ 4 versions of FliK were stable, but complemented poorly and were deficient in export (see above). To examine whether the export deficiency affected flagellar morphology, we prepared osmotically shocked cells of SJW108/pIK $\Delta$ 1,  $\Delta$ 2,  $\Delta$ 3 and  $\Delta$ 4 and observed their flagellar structures by electron microscopy, as is illustrated for the case of FliK $\Delta$ 1 in Fig. 6. Cells produced polyhooks both with and without filaments (Table 2). The efficiency of filament formation was consistent with the complementation data; thus FliK $\Delta$ 4, which had the highest ratio of polyhook filaments to polyhooks, was also the best at complementation (Fig. 5B). Thus, FliK export appears to be important both for the termination of hook elongation and for the initiation of filament formation.

#### Export of intragenic suppressor mutant FliK proteins

We next examined whether the poor motility of some intragenic suppressor (pseudorevertant) *fliK* mutants (strains MY3003, 3006, 3007, 3008, 3009, 2803, 2802, 2805 and 2807; Williams *et al.*, 1996) was a result of deficiency of FliK export. The two mutations in each of these strains are frameshifts, which together result in (i) deletion of some natural sequence, (ii) in some cases, the addition of a frame-shifted sequence, and (iii) most importantly, restoration of a frame (Table 1 and Fig. 5A). They fall into two groups according to where the deletions lie. For MY3003, 3006, 3007, 3008, 3009 the deletions lie near their N termini, whereas those of MY2803, 2802, 2805 and 2807 lie further in. The culture supernatants were prepared from these strains, and immunoblotting was performed with anti-FliK antibody (Fig. 7). FliK was detected in the culture supernatants from MY2803, 2802, 2805 and 2807 (illustrated by MY2807 in lane 3),

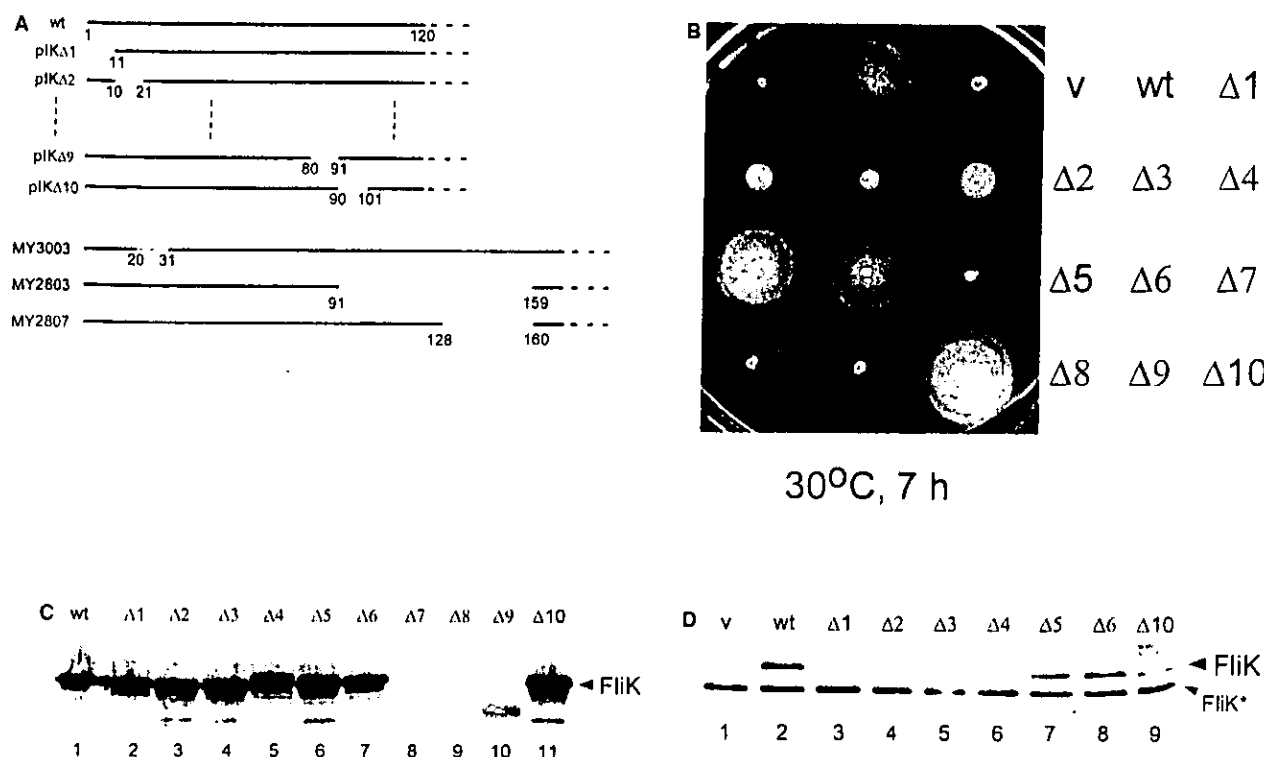


Fig. 5.

A. N-terminal deletion plasmids (pIK $\Delta$ 1–10) and intragenic pseudorevertants (Williams *et al.*, 1996), illustrated here by MY3003, MY2803 and MY2807; the grey region within the FliK sequence of MY3003 represents frame-shifted (i.e. synthetic) sequence before a second shift restores frame.

B. Complementation properties measured by swarming on soft tryptone agar of SJW108(*fliK*) transformed with plasmids carrying His-tagged alleles of *fliK*.

C. Immunoblot, using polyclonal anti-FliK antibody, of whole cell samples of BL21(DE3)pLysS cells transformed with plasmids pIK $\Delta$ 1–10. FliK $\Delta$ 7 and  $\Delta$ 8 were too unstable to be detected, and  $\Delta$ 9 could only be detected weakly as a degradation product.

D. Immunoblot, using polyclonal anti-FliK antibody, of culture supernatants from transformed SJW1353IK (*flgE fliK::Tn10*) cells synthesizing those FliK deletion proteins that were shown in Fig. 5C to be stable. The band marked FliK\*, which is present in all lanes (including the vector control), derives from the transposon-inserted chromosomal gene.

but not in those from MY3003, 3006, 3007, 3008 and 3009 (illustrated by MY3003 in lane 2). None of these mutations affected the synthesis or stability of the protein (data not shown). These results are consistent with the positions of their deletions and those of the in frame deletions of FliK.

#### Effect of overproduction of the intragenic suppressor mutant FliK proteins on motility

If the poor swarming of a *fliK* mutant derives primarily from the poor export of FliK (rather than other aspects of its function), overproduction might result in increased FliK levels within the growing flagellar structure and hence improved motility. To test this, we examined for multicopy effects on the motility of SJW108(*fliK*) cells transformed with pTrc99A-based plasmids carrying the *fliK* alleles of the pseudorevertants MY3003, 3007, 3008, 3009, 2802, 2805 and 2807. The transformants were

inoculated on motility agar plates with or without IPTG. In all cases, IPTG substantially improved motility, as is illustrated in Fig. 8 for plasmids pMMK3003 and pMMK2807. It also resulted in increased levels of the mutant FliK in the culture supernatant (data not shown). With the pBR322-based plasmid, pKM000, encoding wild-type FliK, IPTG (as expected) had no effect. More importantly, with the pTrc99A-based plasmid, pKM002, encoding wild-type FliK, IPTG also had no effect, suggesting that the protein was already being exported at sufficient levels for maximum effect.

#### Estimate of the level of FliK exported from wild-type cells

To estimate the amount of FliK being exported from wild-type cells, we prepared the culture supernatant from a known number ( $1 \times 10^9$ ) of cells of the wild-type strain SJW1103, and performed quantitative immunoblotting

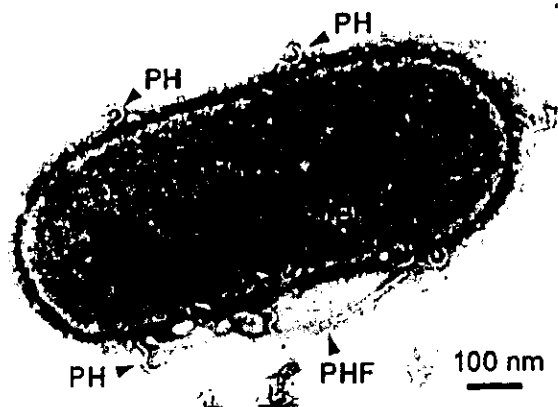


Fig. 6. Electron micrograph showing polyhook (PH) and polyhook-filament (PHF) structures on an osmotically shocked cell of SJW108 (*fliK*) transformed with pIK $\Delta$ 1. The origins of the PH and PHF structures at the cell surface are circled.

with anti-FliK antibody, as described by Muramoto *et al.*, 1998. By comparing the amount of the exported FliK protein with known amounts of purified N-His-FLAG-FliK, the wild-type exported level was estimated to be 30–100 molecules per cell (data not shown).

## Discussion

*FliK is exported during hook-basal body assembly, and is subject to the substrate-specificity switch mechanism*

FliK has been proposed to be a cytoplasmic regulatory protein, which together with FlhB controls the ordered export of the flagellar proteins (Kutsukake *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996; Kutsukake, 1997; Muramoto *et al.*, 1998). In this study, however, we have established that FliK is itself an export substrate recognized by the flagellum-specific export apparatus (Fig. 2). When is FliK exported? We found that the amount of FliK in the culture supernatant from a *flgE* mutant was much more than in that from a *flgK* mutant (Fig. 3), suggesting that FliK is exported most efficiently, perhaps exclusively, during hook formation. This property is similar to that of the hook-type proteins, FlgD and FlgE (Kutsukake *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996; Kutsukake, 1997; Minamino *et al.*, 1999). We conclude that FliK is exported during

hook formation, and that its export properties place it in the same class as the rod-and hook-type proteins. Both FlhB and FliK appear to be involved in shutting off hook-type protein export upon completion of the hook assembly process (Hirano *et al.*, 1994; Kutsukake *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996; Kutsukake, 1997). As FliK export is poor after the completion of hook assembly (Fig. 3), the FlhB-FliK regulatory system also appears to be involved in shutting off FliK export when the hook reaches its mature length.

*The process of FliK export is important for the substrate-specificity switching mechanism*

As we have just discussed, FliK as an export substrate appears to be subject to the FlhB-FliK regulatory system. The relationship appears in some way to be reciprocal. FliK is necessary for the substrate-specificity switch: *fliK* null mutants produce polyhooks, because FlhB cannot stop the export of hook-type protein and initiate the export of filament-type proteins (Kutsukake *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996; Kutsukake, 1997). In this study, we have shown that the export of FliK is part of the substrate-specificity switch mechanism, as export-deficient *fliK* mutants – even those whose C-terminus is intact – still produce polyhook structures.

Because we have encountered situations in which no exported FliK can be detected, yet appreciable motility is retained (for example, in strain MY3003; cf. Figs 7 and 8), we cannot at this point state with certainty that FliK export is absolutely required for substrate-specificity switching, but we suspect that it may be. FliK export could be occurring at levels too low to be detectable, but sufficient to sustain some degree of switching and hence filament formation and motility.

*FliK probably functions within the growing flagellar structure*

Is the FliK export process itself important, or is it the resultant presence of FliK in the growing flagellar structure? We suspect it is the latter, for the following reason. The mutant FliK from some pseudorevertants (e.g. MY2807) is stable and is efficiently exported (Fig. 7). However, it does not sustain fully wild-type motility when produced from the

Table 2. Hook morphology resulting from deletion *fliK* alleles.

<i>fliK</i> -encoding plasmid	Polyhooks per cell <sup>a</sup>	Polyhook filaments per cell <sup>a</sup>	Polyhook filaments (%)
pIK $\Delta$ 1	5.3	0.2	3
pIK $\Delta$ 2	3.8	0.4	9
pIK $\Delta$ 3	4.8	0.3	5
pIK $\Delta$ 4	3.0	1.9	38

a. Means of 20 cells

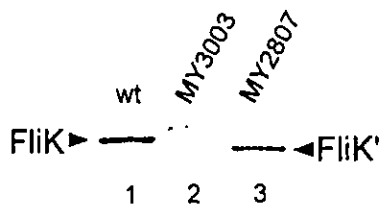


Fig. 7. Immunoblotting, using polyclonal anti-FliK antibody, of supernatants from two intragenic pseudorevertants. The sequence of MY3003 FliK (cf. Figure 5A) carries a deletion close to its N-terminus that results in failure of export, whereas that of MY2807 FliK (labelled FliK') carries a deletion that, though larger, is further in from the N-terminus and permits export.

pTrc99A-based plasmid pMMK2807 in the absence of inducer (Fig. 8, left). Under inducing conditions, motility improves to the wild-type level (Fig. 8, right). Thus, it is necessary to export in excess in order to have normal function. This is most easily explained if the association of FliK with the growing structure is the limiting step. This idea is consistent with our previous study, which showed that a decrease in the level of synthesis of wild-type FliK results in polyhook phenotype (Muramoto *et al.*, 1998).

If FliK functions in the growing structure why, then, is it exported into the external medium? This could simply reflect spillover, and not in any direct sense be physiologically significant. HAP monomers, for example, are known to be exported into the external medium after the relevant HAP structures are complete (Homma and Iino, 1985). However, it is worth remembering that there is at least

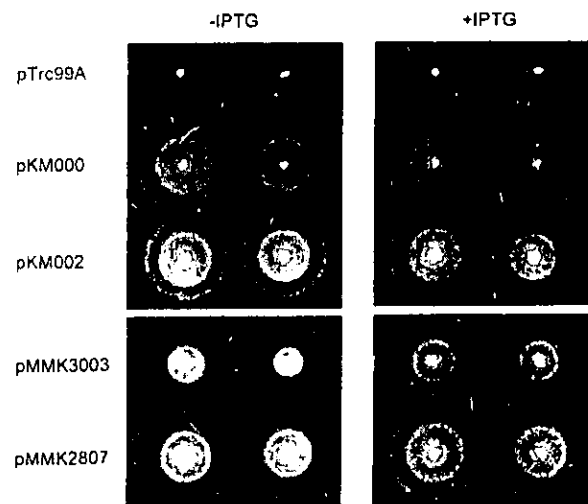


Fig. 8. Multicopy effect of mutant FliK on swarming of SJW108 (*fliK*). pKM000 is pBR322 based and encodes wild-type FliK. All other plasmids are pTrc99A based and therefore are inducible by IPTG, used on the right at 0.1 mM. pKM002 encodes wild-type FliK, whereas pMMK3003 and pMMK2807 encode intragenic pseudorevertant versions of the protein. The mutant proteins support less than wild-type swarming in the absence of IPTG, but support essentially wild-type swarming in its presence. Cells were incubated at 30°C for 6 h. Swarms are shown in duplicate.

one known example (the anti- $\alpha$  factor FigM; Ohnishi *et al.*, 1992) in which total export, i.e. loss from the cell, is important (Hughes *et al.*, 1993; Kutsukake, 1994).

Although we measured the amount of FliK in the external medium (data not shown), we do not place too much significance on the actual value obtained, except to note that it is small, and probably reflects a low export rate into the flagellar apparatus. This would also be consistent with the observations that cytoplasmic levels of FliK in wild-type cells are low ( $\approx$  40–80 molecules per cell), and that substantially lower levels in mutants can still sustain some degree of function (Muramoto *et al.*, 1998).

#### *The N-terminal region, but not the C-terminal region, is critical for FliK export*

In a previous study (Williams *et al.*, 1996), we concluded that the C-terminal domain of FliK is directly involved in the substrate specificity switching of the export apparatus. However, we did not understand the roles of the N-terminal region or the proline-rich central region of FliK, because mutations within these regions resulted in polyhooks or polyhook filaments, even though the C-terminal domain was intact. In this study, we have shown that C-terminal truncations of FliK do not affect its export (Fig. 4), whereas deletions within its N-terminal region (depending on their exact position; see below) severely interfere with the process (Figs 5D and 7). If these *fliK* mutations were to result in shutting off the rod/hook-type protein export, only the MS ring would be produced. However, these mutants produce complete basal bodies with polyhooks attached. Therefore, the N-terminal region appears to be important only for the export of FliK itself, and not that of rod or hook proteins.

Minamino *et al.* (1999) have proposed that the flagellar proteins contain either a rod/hook-type or filament-type export signal, which conveys an ordered export property to each group. In this study, we have shown that the export properties of FliK are similar to those of the rod/hook-type proteins, and that neither C-terminal truncations, nor those N-terminal in frame mutations that still permit export, disrupt the property of its ordered export. Therefore, it is probable that the ordered export signal for FliK is also contained within its N-terminal region.

#### *Molecular dissection of the N-terminal region of FliK*

Within the N-terminal region, deletions within the first 40 amino acids of FliK resulted in the inhibition of FliK export (Fig. 5D). Deletion of the first 10 amino acids completely inhibited motility, and deletions  $\Delta 2$ – $\Delta 4$  also severely affected motility (Fig. 5B). Deletions  $\Delta 7$ – $\Delta 9$  totally inhibited motility but, as they resulted in unstable proteins (Fig. 5C), we are unable to say whether the deleted

amino acids, 61–90, contribute to the signal for export. They may not, since the flanking deletions,  $\Delta 5$ – $\Delta 6$  and  $\Delta 10$ , hardly affected either export or motility.

The mutations of the pseudorevertants we analysed fell into two classes. In the first class (exemplified by MY3003), the mutated sequences were short, lay close to the N-terminus and corresponded closely to  $\Delta 2$  with respect to mutation position, failure to give detectable levels of exported FliK and incomplete complementation. In the second class (exemplified by MY2807), the mutated sequences were more extensive, lay further in from the N-terminus (covering roughly amino acids 90–160), gave readily detectable levels of exported FliK, and complemented quite well. Thus, amino acids 90–160 are not necessary for export or motility. The status of amino acids 70–100 remains uncertain, although a plasmid from a previous study (pAW35; Williams *et al.*, 1996), which encodes a FliK protein with amino acids 63–157 deleted, still complements fairly well.

In summary, only the N-terminal 40 amino acids or so of FliK appear to be absolutely essential for FliK export, and for enabling the C-terminal region of FliK to execute the switch in substrate specificity.

#### *Role of FliK in hook-length control and specificity switching of the export apparatus*

Until now it has been hard to imagine how FliK works in terms of hook-length control and the specificity switch of the export apparatus, because FliK has been believed to be exclusively a cytoplasmic protein. In this study, we have shown that FliK is exported and that this export is important for both hook-length control and substrate-specificity switching. The role of FliK, therefore, has to be reconsidered in light of this new information.

Substrate-specificity switching is a process that involves the C-terminus of FliK (FliK<sub>C</sub>) and the C-terminal cytoplasmic domain (FliK<sub>B</sub>) of the FliH component of the export apparatus (Kutsukake *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996). However, FliK has an additional function, namely, receiving the hook-length signal and transmitting it to FliK<sub>C</sub>–FliH. The N-terminal region is essential for the export of FliK. We suspect that it acts within the flagellar apparatus, presumably in the vicinity of the hook, to sense the state of the hook assembly. However, we know that substrate-specificity switching is not performed before completion of hook assembly, even though FliK is being exported, because filament-type proteins are not exported into the culture medium in a *flgE rliH* mutant background (Kutsukake, 1997). In addition, the C-terminal domain has to be in some sense activated, because FliK that cannot be exported, yet has its C-terminus intact, does not cause switching.

It is evident from its apparent molecular mass that the FliK exported to the external medium is the intact molecule

(Figs 2 and 3); in other words, the C-terminal domain is capable of being exported provided it is attached to the N-terminal domain. It could not, under these circumstances, interact physically with FliH<sub>B</sub>. If the interaction is in fact a physical one, we can think of two ways this might be achieved. Non-exported copies of FliK might somehow exert the specificity-switch aspect of their function upon receipt of the proper signal. However, it is unclear how the state of hook assembly (i.e. the length signal) would be transmitted back to the cytoplasmic pool of FliK.

Another possibility would be that the physical state of the exported FliK is progressively altered as the hook elongates, until, at the mature length of 55 nm, the system 'backs up' so that FliK monomers cannot be fully translocated across the plane of the cell membrane, but instead leave their C-terminal domain in the cytoplasm able to interact productively with FliH<sub>B</sub>. [This model has some elements in common with one proposed by Muramoto *et al.* (1998) in which the state of hook subunits themselves was fed back to the base.] The N-terminal plus central regions ( $\approx 265$  amino acids) could extend  $\approx 40$  nm as an  $\alpha$  helix or  $\approx 90$  nm as a  $\beta$  or extended structure. Thus physical communication between the hook and the cytoplasm is not impossible. However, as has been noted before, the simple concept of a molecular ruler is difficult to accept because internally deleted FliK molecules result in elongated hooks not shortened ones (Kawagishi *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1996).

Finally, it should be noted that physical interaction between FliK<sub>C</sub> and FliH<sub>B</sub> has not been experimentally proved. Communication could possibly involve intact exported FliK and FliH<sub>B</sub>.

An immediate goal will be to establish which, if any, external flagellar components FliK interacts with – obvious possibilities would be the hook protein FlgE and the capping protein FlgD. Information of this sort could then be refined to establish what part of the FliK sequence is responsible for the interaction. It will also be important to renew efforts to detect FliK in flagellar precursors, and to delineate where the subunits are located and the time at which they are present in the process of morphogenesis.

## Experimental procedures

### *Bacterial strains, plasmids and media*

The strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Luria broth (LB) contained 10 g of Bacto-Tryptone, 5 g of yeast extract and 5 g of NaCl per litre. Motility agar plates contained 10 g of Bacto-Tryptone, 7 g of NaCl and 3.5 g of Bacto-agar per litre. M9+CA medium contained 100 ml of  $\times 10$  M9 salts (10 g of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 59 g of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 30 g of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g of NaCl), 1 ml of 0.1 M  $\text{CaCl}_2$ , 1 ml of 1 M  $\text{MgSO}_4$ , 20 ml of 50% glycerol, 1  $\text{mg ml}^{-1}$  of Vitamin B1 and 3 g of Casamino



acids per litre. Ampicillin was added to the media to a final concentration of  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

#### Polymerase chain reaction and cloning

Synthetic primers containing restriction sites were synthesized using a model 393 DNA/RNA synthesizer (Applied Biosystems). Polymerase chain reaction (PCR) was carried out using an MJ MiniCycler (MJ Research) and Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim). PCR products were prepared from agarose gel with QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Restriction enzymes and T4 DNA ligase (New England Biolabs) were used according to the manufacturer's recommendations. The recombinant plasmids were purified with QIAprep Spin Plasmid Kit (Qiagen).

#### Preparation of the periplasmic contents and culture supernatants

The periplasmic contents and culture supernatants were prepared from the wild-type strain and various non-flagellate mutants as has been described (Minamino *et al.*, 1999); the cells had been transformed with pUC18 in order to use  $\beta$ -lactamase as a control for the periplasmic fraction.

For the preparation of the culture supernatants from SJW108 carrying pKM002, pKM802 or pKM902, or from the *flgE* or *flgK* mutants carrying pKM002, transformants were grown at  $37^\circ\text{C}$  in 3 ml of M9+CA medium containing ampicillin until  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  reached 1.2–1.4. After washing twice with M9+CA medium containing ampicillin, cells were suspended in 3 ml of M9+CA medium containing ampicillin and 1 mM IPTG, and incubated for 1.5 h at  $37^\circ\text{C}$ . The aliquots of culture proteins containing a constant number of cells were clarified by centrifugation. The cell pellet was resuspended in the sample loading buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol). The proteins in the culture supernatant and periplasmic fractions were precipitated by 10% TCA and suspended in Tris-saturated SDS loading buffer.

#### Immunoblotting

Immunoblotting was performed with anti-FliK antibody or anti- $\beta$ -lactamase antibodies as described previously (Minamino *et al.*, 1999). Immunodetection was performed with an ECL immunoblotting detection kit (Amersham International).

#### Construction of nested in frame deletions of FliK

Nested deletion mutants of FliK were constructed using the method of Williams *et al.* (1996). The construction was confirmed by DNA sequencing using the modified T7 DNA polymerase Sequenase (US Biochemical)

#### Preparation of osmotically shocked cells

Cells were harvested at late log phase (between  $\text{OD}_{650\text{nm}}$  0.5–1.0), and resuspended in a small volume (1:100 of the culture volume) of 0.5 M sucrose, 0.15 M trizma-base (pH not adjusted). After incubation for 30 min on ice, 100 vols of

prechilled water was quickly added to the cell suspension. Intact cells were removed by low-speed centrifugation (2000 g, 10 min), and the osmotically shocked cells remaining in the supernatant were collected by high-speed centrifugation (18 500 g, 20 min). Cells in the pellet were resuspended in water and immediately observed by electron microscopy.

#### Acknowledgements

We acknowledge technical assistance from May Kihara and Gabriele Miller. B.G.P. was a Fulbright Scholar at Yale University while conducting this research. This work was supported by USPHS grant AI12202.

#### References

- González-Pedrajo, B., Ballado, T., Campos, A., Sockett, R.E., Camarena, L., and Dreyfus, G. (1997) Structural and genetic analysis of a mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 deficient in hook length control. *J Bacteriol* **179**: 6581–6588.
- Hirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K., and Aizawa, S.-I. (1994) Roles of FliK and FliH in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 5439–5449.
- Homma, M., and Iino, T. (1985) Excretion of unassembled hook-associated proteins by *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **164**: 1370–1372.
- Homma, M., Fujita, H., Yamaguchi, S., and Iino, T. (1984) Excretion of unassembled flagellin by *Salmonella typhimurium* mutants deficient in the hook-associated proteins. *J Bacteriol* **159**: 1056–1059.
- Hopp, T.P., Prickett, K.S., Price, V.L., Libby, R.T., March, C.J., Cerretti, D.P., *et al.* (1988) A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Bio/Technology* **6**: 1204–1210.
- Hughes, K.T., Gillen, K.L., Semon, M.J., and Karlinsey, J.E. (1993) Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* **262**: 1277–1280.
- Iyoda, S., and Kutsukake, K. (1995) Molecular dissection of the flagellum-specific anti-sigma factor, FlgM, of *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* **249**: 417–424.
- Kawagishi, I., Homma, M., Williams, A.W., and Macnab, R.M. (1996) Characterization of the flagellar hook length control protein FliK of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 2954–2959.
- Kornacker, M.G., and Newton, A. (1994) Information essential for cell-cycle-dependent secretion of the 591-residue *Caulobacter* hook protein is confined to a 21-amino-acid sequence near the N-terminus. *Mol Microbiol* **14**: 73–85.
- Koroyasu, S., Yamazato, M., Hirano, T., and Aizawa, S.-I. (1998) Kinetic analysis of the growth rate of the flagellar hook in *Salmonella typhimurium* by the population balance method. *Biophys J* **74**: 436–443.
- Kubori, T., Shimamoto, N., Yamaguchi, S., Namba, K., and Aizawa, S.-I. (1992) Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **226**: 433–446.
- Kutsukake, K. (1994) Excretion of the anti-sigma factor through a flagellar structure couples flagellar gene expression

- with flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* **243**: 605–612.
- Kutsukake, K. (1997) Hook-length control of the export-switching machinery involves a double-locked gate in *Salmonella typhimurium* flagellar morphogenesis. *J Bacteriol* **179**: 1268–1273.
- Kutsukake, K., Minamino, T., and Yokoseki, T. (1994) Isolation and characterization of FliK-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 7625–7629.
- Kuwajima, G., Kawagishi, I., Homma, M., Asaka, J.-I., Kondo, E., and Macnab, R.M. (1989) Export of an N-terminal fragment of *Escherichia coli* flagellin by a flagellum-specific pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 4953–4957.
- Macnab, R.M. (1996) Flagella and motility. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. 2nd edn. Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., et al. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 123–145.
- Minamino, T., and Macnab, R.M. (1999) Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J Bacteriol* **181**: 1388–1394.
- Minamino, T., Iino, T., and Kutsukake, K. (1994) Molecular characterization of the *Salmonella typhimurium* *flhB* operon and its protein products. *J Bacteriol* **176**: 7630–7637.
- Minamino, T., Doi, H., and Kutsukake, K. (1999) Substrate specificity switching of the flagellum-specific export apparatus during flagellar morphogenesis in *Salmonella typhimurium*. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**: 1301–1303.
- Muramoto, K., Makishima, S., Aizawa, S.-I., and Macnab, R.M. (1998) Effect of the cellular level of FliK on flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **277**: 871–882.
- Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H., and Iino, T. (1992) A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*: an anti-sigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor,  $\sigma^F$ . *Mol Microbiol* **6**: 3149–3157.
- Ohnishi, K., Ohto, Y., Aizawa, S.-I., Macnab, R.M., and Iino, T. (1994) FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 2272–2281.
- Patterson-Delafield, J., Martinez, R.J., Stocker, B.A.D., and Yamaguchi, S. (1973) A new *flaR* gene in *Salmonella typhimurium*–*flaR* – and its mutant phenotype – superhooks. *Arch Mikrobiol* **90**: 107–120.
- Ryu, J., and Hartin, R.J. (1990) Quick transformation in *Salmonella typhimurium* LT2. *BioTechniques* **8**: 43–44.
- Suzuki, T., and Iino, T. (1981) Role of the *flaR* gene in flagellar hook formation in *Salmonella* spp. *J Bacteriol* **148**: 973–979.
- 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**: 2960–2970.
- Yamaguchi, S., Fujita, H., Sugata, K., Taira, T., and Iino, T. (1984) Genetic analysis of H2, the structural gene for phase-2 flagellin in *Salmonella*. *J Gen Microbiol* **130**: 255–265.

## *Apéndice III*

Secuencia nucleotídica del operón *flgG*

*Pst*I  
CTGCAGCGCACTTTTCGAGCTCAACCTCCGCATGATCTCCTCGGCCAAGGAGCTGGACGAG  
sigma 54  
AGCGGCGCGCGGCTCCTGCGTCCGCCCGAGTGAGCGTGGCACGGGGCTTGACCCGGAAG  
GGCGTACGGCCTGAAGGAGCCCCGCATGTCACCAATGCGATGCATGTGCGCTCGACCGG  
M S T N A M H V A S T G  
FlgG  
TCTCAATGCCAGCAGACCCGGATGCAGGTGATCTCGAACAACTCGCCAACGTCAACAC  
L N A Q Q T R M Q V I S N N L A N V N T  
GACAGGGTTC AAGCGGACCGCGCAAATTTTCGAGAGCCTCCTCTACCAGACCTGGAAGCC  
T G F K R D R A N F E S L L Y Q T W K P  
CGCGGGGCGCAGACGTCCGAAGCCACCGCCATGACCTCGCCCTCGGCGGTGGGGACGGG  
G G A Q T S E A T A M T S P S A V G T G  
GGTCCGCGTCTCGACCGAAAAGCTCTACACTCAGGGCTCGCTCGCCAATACCGACAA  
V R V V S T E K L Y T Q G S L A N T D N  
TGGCTCGATCTGGCCATCGACGGGCCGGGCTTCTTTCAGGTGCTGATGCCCCACGGGCG  
A L D L A I D G P G F F Q V L M P D G R  
CATGGGCTACACCCGGAACGGCACCTTCTCGCAGAATGCCGAAGGCACCATCACCACCCC  
M G Y T R N G T F S Q N A E G T I T T P  
CTCGGGCTATGTCGTGCAGCCCCGAGATCCAGATCCCCGAGGGCGCGGTCTCGGTACCAT  
S G Y V V Q P E I Q I P E G A V S V T I  
CTCGTCCGACGGGATCGTGTGCGGTGCTGATGCCCCACGAGACCGAGGCGCAGGAGGTGGG  
S S D G I V S V L M P D E T E A Q E V G  
CCAGATGACCCTCGCCACCTTCGCCAACCCGCGTGGCCTCCAGCCCCTGGGCGAGACCTT  
Q M T L A T F A N P R G L Q P V G E T F  
CGCGGTTCGAGACCGGGGCTTCGGGCGAGGCGGTGATCGGCAATCCGGTTCGAGCCCGGCTT  
A V E T G A S G E A V I G N P V E P G F  
CGGCAAGCTCGTGCAGGGGTCCCTCGAAGCCTCGAACGTCAACGTGGTGCAGGAGCTGGT  
G K L V Q G S L E A S N V N V V Q E L V  
CGACATGATCGAGACCCAGCGCGCCTACGAGGTCAATTCCAAGTCCATCTCGGCCTCCGA  
D M I E T Q R A Y E V N S K S I S A S D  
CGAGATGATGCAGTATCTTTCCAACAAGCTCTCAGGCGCAGATGTCGGCCCGCATGTCCC  
E M M Q Y L S N K L \* M S R R M S L  
FlgH  
TCACCGCGCTGGCCCTGCTGCTCGCGCCCGCCGCTGCTCGACCTATGTCGAGGACCGCG  
T A L A L L L A P A A C S T Y V E D R A  
CCTCCGAGGCCTGGGCCCCGGTCTATCCGGTTCGAGGAGGCCGAGCGGCTCGACAGCCTGC  
S E A W A P V Y P V E E A E R L D S L P

CCACCGCGGGATCTACAGCAGCACCTCCC GCGGCCTCTTCGTCTCGGACCGGCGCGGG  
T G G I Y S S T S R G L F V S D R R A A  
CGCGGTGGGCGACATCGTGACGGTGGATTTGACGAGAAATTCTCGGCCTCGAAGTCGC  
R V G D I V T V D F D E K F S A S K S Q  
AGAGCGCCTCGGGCTCGCGCAAGAGCGATTATGCGATCGACCTGCCCGATGCGCTCACGC  
S A S G S R K S D Y A I D L P D A L T L  
TGGGGCTCGACGACGGGGTGCTCGACAATTCGACCGATCAGGGCTTTTCGGGCAAGGGGG  
G L D D G V L D N S T D Q G F S G K G A  
CGGCCTCGCAGTCGAACTCGCTGCGCGGGCGGATGTCGGTCTCGGTCACGCGCGTGCTGC  
A S Q S N S L R G R M S V S V T R V L P  
CGGGCGGCAATCTCGAGATCATGGGCCAGAAGCTCCTCACGCTGAACAACGGCAACGAA  
G G N L E I M G Q K L L T L N N G N E Y  
ATGTCGGGCTGAAGGGCGTGGTGC GCCCGAGGACATCGGGCCGACAATGTGGTGACCT  
V R L K G V V R P E D I G P D N V V T S  
CGGACCGGATCGCCCATGCCGAGATCAAGTATATCGGCGCGGGCGACACTGCCGACACCG  
D R I A H A E I K Y I G A G D T A D T A  
CGAACCCGGCTGGCTGCGGGCGGGCCTTTCCGTGGTCTCGCCGCTGTGAGGGCGCGCTCT  
N A G W L R R G L S V V S P L \* R R A L  
**FlgI**  
CCTTCTCGCAGCGTTCTGGCCTGCGCGCCGCCCTTCGCCGACCGTCTGAAGGACCT  
L L A A L L A C A P P A F A D R L K D L  
GACGACGGTTCGGGGCGTGC GGTCGAACCCGCTCGTGGGCTACGGCGTGGTGGTGGGCT  
T T V A G V R S N P L V G Y G V V V G L  
GTCGGGAACCGGCGACGGCAATCCCAGCTCACCCAGCAGTCGATGCAGTCGCTGATCTC  
S G T G D G N S Q L T Q Q S M Q S L I S  
GCGCCTCGGCCTCTCGGTTCGAGACGGGCGATCTCAAGGCCAAGAATGCCGCGGCCGTCAT  
R L G L S V E T G D L K A K N A A A V M  
GGTGACGGCCGACCTGCCGCCGTTCTGAAGATCGGCCAGACGCTCGATGTGACCGTCTC  
V T A D L P P F L K I G Q T L D V T V S  
GACCGTCGGTCAGGCCAAGTCGCTGAAGGGCGGCACGCTTCTGATGACGCCGCTCATGGG  
T V G Q A K S L K G G T L L M T P L M G  
GGCGGATGGCGAGGTCTATGCCATCGCGCAGGGCAATCTCGTGGTGGGCGGGCTCGGCGT  
A D G E V Y A I A Q G N L V V G G L G V  
CGAGGGCAAGGACGGCTCGTCGCTACCGTGAACATCCCACCCTGGGCGGGTGCCCCG  
E G K D G S S L T V N I P T V G R V P R  
CGGCGGCATGGTCGAGAAGATGGTCGAGACGCCCTTCTCGAGACCGATCATCTGGTGCT  
G G M V E K M V E T P F L E T D H L V L  
GAACCTCAACCGCGGCGATTTTCCACCGCGGCCGTTGGCGGAGGGCGTGAACCGCAC  
N L N R G D F S T A A A V A E G V N R T  
CTTCGGTCCCAGATGTGGCGGTGGCGCTCGACGGGACCTCGATCCGCGTGCGCGCGCCGGC



TCGAGAGCCTGTTTCTGGCCGGGGCGGGCAGCGTGCCCGAGGCGCTGACGGGGCTTCTTCG  
E S L F L A G A G S V P E A L T G F F D

ACGCGCTCAACGGGCTCGGCGCCACGCCGCGACGGTGCGCTGCGGCAGGTGGTGTGG  
A L N G L G A T P R D G A L R Q V V L A

CGGCGGGCCAGACGCTGGCCAGTTCCTTCACCACCGTGGCAAGCGGGCTCGCGGGGCTCC  
A G Q T L A S S F T T V A S G L A G L R

GCGACGAGGTGACGGGGCTTGCCGGGCAGACCGCCGTTGAGGCCTCGCAGACGCTTCGGC  
D E V T G L A G Q T A V E A S Q T L R Q

AGCTGGCCGAGCTGAACGGGCGCATGACCGGAGCGCAGCAATCGGCGCTGAACCCGCTGC  
L A E L N G R M T G A Q Q S A L N P L L

TGGACGAGCGGGACCGGCTCCTCGGCGAGCTCTCGGCGACGGTGGGGGTCCAGGCCAGCT  
D E R D R L L G E L S R T V G V Q A S F

TCGATGCTCTGGGCGCACACGGTGACGCTCGGCTCGGCCCGGGCGGGCCCTGCTGC  
D A L G R T T V T L G S A P G G P L L L

TCGAGGGGACGGCGGCGAGCACGCTCGGCGTGGCCGAGGCGGGCGGTCTCGTGCTCGAAG  
E G T A A S T L G V A E A G G L V L E V

TCACGCGGGCAGGCGCCACGCTCCAGAGCCGCCAGATCACCGGGGGCAGCCTGCAGGGCT  
T R A G A T L Q S R Q I T G G S L Q G Y

ATGCGTCGGCGCTCTCGGCGGTGGACAATGCGGCGGCCGAGCTCGATGCGCTCGCGCGGC  
A S A L S A V D N A A A E L D A L A R Q

AGCTGGTCCCGAGATGAACACGGTGCACGCGCAGGGGATCGATCAGTCCGGGGCCCGGG  
L V A E M N T V H A Q G I D Q S G A R G

GGGGCGATCTCTTCGCGCTCGAGGGCTGGCAGGTGGCGGCCGACGCCGGCAACCGGGGCA  
G D L F A L E G W Q V A A D A G N R G T

CGGGCGGCGCGTCCGGTGGTGGCCTTCGACACCGCCACGGCGCCCGGCCCGCTCACGCTGC  
G G A S V V A F D T A T A P G P L T L L

TGCACGATGCCCGGGCGGGGCTCTGGCACGCCTACGACGCGGGGGCAGCCTCCTCGGCA  
H D A A A G L W H A Y D A G G T L L G S

GCGGCGCCGAGACGCTGGCGCTGACGGGCCTCACGCTGCAGATGACCGGCGCGGCCATGG  
G A E T L A L T G L T L Q M T G A A M D

ATGGAGACCGTCTGACGGTCTCGCCGCGCCAAGGGCGGGCGCTCGACATGCGCTTCCTGC  
G D R L T V S P R Q G R A L D M R F L L

TGACCGACACCCGCCAGATCGCGGCCGCGGCGCCCTATATCGTCTCGGCCGCGAGCGGCA  
T D T R Q I A A A A P Y I V S A A S G N

ATGCGGGGTCCGGCGCAGGCGAGCTTCGTGCCGGTGACCTCCACGCTCCCCGCCACCGGAT  
A G S A Q A S F V P V T S T L P A T G S

CGCTGGGCGGCCTGCTGACGGACGCGGGCGGGGCGGATGCCGCGACGCTGATCCGCGCGG  
L G G L L T D A G G A D A A T L I R A G

GCGTGGTGGGCCATATTCGGGCCGAACGGGCTCGGTCACGCTGGCGAGCCTCGGCAGCC

V V G H I P A G T G S V T L A S L G S Q  
AGTCGCAGCAGGAGTTCCTCCTGTCCGACCCGGCCGCGGGCGCCACGACGCTTTCCT  
S Q Q E F L L S D P A A A G A T T L S F  
TCTCGATCGGGCGGCACGGTCCACAGCTTCGATCTGTGGCGCTGGGCGCGACGGACCCGG  
S I G G T V H S F D L S A L G A T D P A  
CCACTCTGGCCGCGGCGCTGAATGCCGGGGCTGTGAGCACCGGCGGGCAGACCCTCGCCG  
T L A A A L N A G A V S T G G Q T L A E  
AGCTGGGCGTCACGGCCAGCGGCAGCACGGGGCGCTTCACGCTGATGCTGGGGCAGGGCG  
L G V T A S G S T G R F T L M L G Q G D  
ACTTCGATGCCGGCGCCAGCGTGACGGGATCCGCCGGGACCGTCCGAGGCAGTCTGACAG  
F D A G A S V T G S A G T V A G S L T A  
CCGCCGAGCCCGGGCGGGACGATCCAGATCATCACGGGGACGGACGCCACATCGCAG  
A E P A G G T I Q I I T R D G R H I A G  
GCGCCGCGCTCACGGCCGAGGAGGCCGCGCTTCTGCTGACCGAGGCCAACGGCTTCTGCG  
A A L T A E E A A L L L T E A N G F L P  
CGGGCGCGGTCTACGATGCCTCGACGCTGAACGGTGCCGGAGGCACCGGCTTTCGCGGAA  
G A V Y D A S T L N G A G G T G F R G T  
CCGGGATCGCGGGCGGATCCTGCCGGGCGAGCGTGTGCTGTGCTTCATCCCGCCGATC  
G I A G A I L P G E R V L S L H P A D P  
CGGTGGCCGGCAGTTCGGGCCTTCTGCCTCCTGCATCCGCGCTCCCGAGCCTGACGCTCG  
V A G S S G L L P P A S A L P S L T L E  
AAGCGGCCGGGGCCCTTCCCCTCCCCTGCGAGCTGCCTGCGGGTGCCTCGGCGGCCGAGA  
A A G G L P L P V Q L P A G A S A A E M  
TGGCGCAGGCCATCAACCGGTTCGGGGCCGGGATCGAGGCCGAGGCCCGCACCGGCGTCA  
A Q A I N A F G A G I E A E A R T G V T  
CGATCGAGGGCGCCCGCCGACGGCACGCTCACGTTCGCGCTCACCGGCACCAACCTCTCGC  
I E A P A D G T L T F A L T G T N L S P  
CCGTGCGCATCAGCGGCGCCGTGGCGGGGGGGCGCATGGATGCGCTGGCGCTGGCGGTCA  
V R I S G A V A G G R M D A L A L A V N  
ATGCGGTGAGCGCGGCCACCGGCGTGGCGGGCCGAGCTGTGCGCGGACGGGGCGCGGCTCC  
A V S A A T G V R A E L S P D G A R L L  
TCCTCGTTTCAGGACGGGGGGGGCGGATATCGGGATCGTGGGCCTCCGCCACACGGCCGGGG  
L V Q D G G A D I G I V G L R H T A G A  
CCGCCGTACGCTGCAGGGCACGGACGCCGAGGGCAGTCCCGCAGGCGCGCCCTCACCT  
A V T L Q G T D A E G S P A G A P L T L  
TGTCGGGCACGGCCGACAGCGCGCGCTTCACGGGCGAGCTGCGGCTCTCGTCGGCGAGCG  
S G T A D S A R F T G E L R L S S A S G  
GTTTCTCGGCCGATCTGGGCGGCGTGGCGGAGGATGGCGCCGTGGATCCGATGAGCGGCG  
F S A D L G G V R Q D A A V D P M S G G



GCCTCGTCTCGCGCGGCGTGAGCGGGGCAGGCGGTGTTTCAGACCTATGGCTTCACCTACG  
L V S R G V S G A G G V Q T Y G F T Y D

ATCCCGCCTTCGACGGGGCGGGGCTCTCGGCGGACGGCACCTTCGCGCAGGCGGGTTCGG  
P A F D G A G L S A D G T F A Q A G S A

CGCAGTATGCGATGACGGTGGGCAACCGGACGGTGACACTCGATGCCGCGGCGGGCGGCG  
Q Y A M T V G N R T V T L D A A A A G V

TGAGCGACGGGGCCGGCGTGCCCTCGGCGCTTGGCGCTCTCCTGCGCGCCGAAGCCCCGG  
S D G A G V A S A L A A L L R A E A P A

CGGCGACGCTGACCGGGCGGGCCCGTTCGCGGCGCTGCCCGCGATGGGGCGAGCGTCTCGG  
A T L T G G P V A A L P A D G R S V S V

TCTCTACGAGGGGCAGAGCTACACGCTGCGCATGACGGGTGGGGCGGTTCGCGGTCGATG  
S Y E G Q S Y T L R M T G G A V A V D G

GCGGCGAGCCGGGACTGCTCACGGCGGCCTTCGACGCGACGAACCGTCTGGTCATCCAGG  
G E P G L L T A A F D A T N R L V I Q A

CGGCAGGTTTCGCTCGACGGCGGGCCCTGCGCATCGAGAGCGGGGCGGCCGCGGCTTCG  
A G S L D G A G L R I E S G A A A A F G

GACTGGCGGGCGGCCGACGCCCGGTCTCGACCCTCACCGGTCAGCCCGGGATCCCCCGG  
L A A A D A P V S T L T G Q P A D P A A

CGCTGCCCGCGAGCTTCGACATCGAGCTGGGCGGCACCCTCTACAGCTGACCGCAAGCG  
L P A S F D I E L G G T L Y S L T A S A

CGGGCGGCATCGCGGTGCCGGCGGGCTTCCCCGGCAGCGCGGGCTGGGACGGGGCGGGGC  
G G I A V P A G F P G S A G W D G A G R

GTCTGGTGCTGGAGGTTCCGGCCGCGGCCGGGGCCTTGGCGGTGCCGCCCCAGGCCGGGG  
L V L E V P A A A G A L R V P P Q A G A

CGCGGGCGGGCGGGGCTTGCCACCGAAGGCGTCTCGGTGGCGGTGTCGCAGGGCGCGCTGG  
R A A G L A T E G V S V A V S Q G A L V

TCCTCACCTCCACCACCGGCGGCCCGTTCGCGGCCTCGGCCGAGGCGCAGGCGCTGGCGG  
L T S T T G A P V A A S A E A Q A L A G

GCCAGCGGCTGACCCTCACCGATCTGCCGGACGAGGATCTGATCGTTCGTCATGACCGGCA  
Q R L T L T D L P D E D L I V V M T G T

CGGGCACGCTCCGTCTTGGGGCTCCCTCGATGAGGCGCCTCCGCCACCTACACCGGCCG  
G T L R L A G S L D E A P P P P T P A A

CCGTCGAGCTGCGGGTGACCGATGCGGCCAGCGGCAGGTCGAGCTCTTCGACACGGCGA  
V E L R V T D A A S R Q V E L F D T A T

CCGGCCATTCATCGGCAGCCGACGCTCGGCGCGGACGGGTTCGGTGACGGTGGGCGGCT  
G H S I G S R T L G A D G S V T V G G Y

ACCGCATCACGCTGACGGGCACGCTCGCCACCGGCGACCGGTTACCCCTGACGCCCGCCA  
R I T L T G T L A T G D R F T L T P A T

CCGGCAATTCTGGGCGGGCGGAGATCCTCGACCGGCTGGTGGCGCTGGCCTCGGGCGATC  
G N S G G G E I L D R L V A L A S G D P

CCGCCACCGGCCAGGGCGGCTACGGGGCGGATTACATGCAGCTCCAGACCCGGATCGGCA  
A T G Q G G Y G A D Y M Q L Q T R I G T

CGCAGGCCAAGGCCGCCCGGGCGGCTCTCCTCGACCGCGGGCGCTCGAGGTGGCCG  
Q A K A A A G R V S S T A A A L E V A E

AACCGCCTCTGCGGGCGGAGCGCGGTCAACCTCGACGAGGAAGCCGCCCGGCTCATCG  
R A S A A A S A V N L D E E A A R L I E

AGCAGCAGCAGGCCTATCAGGCCTCCTCGCAGGTCTTCTCGGTGGCGCAAACCCTGTTCG  
Q Q Q A Y Q A S S Q V F S V A Q T L F E

AAACCCTCTGAACGCGCTGTGAGGCGGCCATGACCCTCGGAACCACCTCTTCGCCACG  
T L L N A L \* M T L G T T L F A T  
FlgL

CTTGCCAGCCGCAACTTCTCGCGCCTTCAGACCGAGATCGGCACATTGCAGGCCCGTATC  
L A S R N F S R L Q T E I G T L Q A R I

GCCTCGGAGGTGCGCGACCCGCGCCCGTCCGCCGATCCCACCCGCGCGGTGCAGCTCTCG  
A S E V R D P R P S A D P T R A V Q L S

CGGGCGAAGGAGATGGAAGCCACGCTCGGGCGCTACGGCGCAAATGCGAGCTCGGCCGCG  
A A K E M E A T L G R Y G A N A S S A A

GACCGGCTGGCCCATGCCGACGTGGCGCTGGGCGAGGTCGCGGCGGGATGCGCGAGCTC  
D R L A H A D V A L G E V A A R M R E L

AAGGATGTCGTGCTGCAGGCGGGAACCCGACGCTCTCCGACGAGGGACGGGCCGGTCTG  
K D V V L Q A G N P T L S D E G R A G L

CGGATCGTGGCCGAGTCGGCCCGGAGGCGCTCTTCGCGCTGGCCAACCGCAAGGATGCG  
R I V A E S A R E A L F A L A N R K D A

ATGGGGCAGGGCCTCTTTGCGGGCTATGCCGCGGGTCCGGCCTTCGTGAAGGAGGGCGAT  
M G Q G L F A G Y A A G P A F V K E G D

ACGGTCCGATTCGCGGGCAACGACGGGCAGCCCGTGGCCCAGCTCTCCGAGACGCTGCGC  
T V R F A G N D G Q P V A Q L S E T L R

GTGGCCACCAGCCTCGGGCGGCGCCGAGGTCTTCATGGCGGTGCCGACCGAGGCGGGGCCG  
V A T S L G G A E V F M A V P T E A G P

CGCAGTGTCTTCGAACTGGCCGACGATCTGGTGGCGACCCTGTCCGTGCCGCTGGCACAT  
R S V F E L A D D L V A T L S V P L A H

TCCAGCCCGCAGCGCACGGCGGAAGACACGGCACGGCTCTCTCTGGCAGCCCCTCCGGCC  
S S P Q R T A E D T A R L S L A A P P A

CCGGCCACGGTGCCTTACCCTGACGGGCCCGGGGGCTCGGTTCGAGATCGAGCAGCGG  
P A T V R F T L T G P G G S V E I E Q R

CTGCCGGGCTCGGCCCTTGCCGCCATCAATGCGGCCTCGCCCCAGACCGGCGTCACCGCC  
L P G S A L A A I N A A S P Q T G V T A

ACGGAGGAACCGGACGGGACCCTCGTCTCGGGGCCGTGGGCCGATCACGGTCTCGGAC

T E E P D G T L V L G A V G R I T V S D  
 ATGAGCCGCGACGACGACCCGCGCGACGTGCTGGCAACCTTCACCAGCGCGGATGACAAG  
 M S R S D D P R D V L A T F T S A D D K  
 GCGGGCTGGATCATGCCCGCGCGGTTTCGACGCGGCCCTCGCTGACCGACGCTTTCGATGCC  
 G G W I M P A R F D A A S L T D A F D A  
 GCCGTGAGCCACATGGCCGAGCAGCGGGCCCGCGCCGGCGCGCTCGCCGCCTCTGTGAC  
 A V S H M A E Q R A R A G A L A A S V D  
 ACGCAGGCGGATGCGATCAGGACCCGGCAGACCCGAATCGCCACTGCCATCGGCGGGGCTC  
 T Q A D A I R T R Q T R I A T A I G G L  
 GAGGATCTCGACGTGGCCGAGGCGGTCACGCGGCTGCAGCAGCTTCTCCTGACGCAGGAG  
 E D L D V A E A V T R L Q Q L L L T Q E  
 GCGGCGCAGCAGACCTATGTCAAGATCGCCAACCGCAGCCTGTTGATTACCTGCGCTAG  
 A A Q Q T Y V K I A N R S L F D Y L R \*  
 agccgatggcacggcccttgcccgggaggggcatgaggttcgcgctcgctcctgatcctg  
 acgcttctggccgcccccgccctcgcgggcgacgagggctgagagagcctcgcgggcccg  
 gcgtgagcgctat

Los codones de inicio y término de cada gen se muestran en negritas. El sitio de unión a ribosomas se señala subrayado. Se indica también la posición en la que inician los dos diferentes promotores. La proteína FlgI comienza con una metionina codificada por el codón GTG.

FlgG de *S. typhimurium* y *R. sphaeroides*

Porcentaje de Identidad: 50%

Ventanas introducidas para alinear: 0

```
St 1 .MISSLWIAKTGLDAQQTNMDVIANNLANVSTNGFKRQRAVFEDLLYQTI 49
    ..: :| |||.|||| | ||.|||||. | ||| || || |||
Rs 1 MSTNAMHVASTGLNAQQTRMQVISNNLANVNTTGFKRDRANFESLLYQTW 50
    50 RQPGAQSSEQTTLPSGLQIGTGVRPVATERLHSQGNLSQTNNSKDVAIKG 99
    : |||.|| | : | :|||| |.||:|.|||. |. |. |. || |
    51 KPGGAQTSEATAMTSPSAVGTGVRVSTEKLYTQGLANTDNALDLAIDG 100
    100 QGFFQVMLPDGTSAYTRDGSFQVDQNGQLVTAGGFQVQPAITIPANALSI 149
    |||||:| ||| |||.|. | . | : | |: || | || |. |:
    101 PGFFQVLMPPDGRMGYTRNGTFSQNAEGTITTPSGYVVQPEIQIPEGAVSV 150
    150 TIGRDGVVSVTQQGQAAPVQVGQLNLTTFMNDTGLESIGENLYIETQSSG 199
    || ||: ||| : :||: | || | ||: :|| :|| .||
    151 TISSDGIVSVLMPDETEAQEVGQMTLATFANPRGLQPVGGETFAVETGASG 200
    200 APNESTPGLNGAGLLYQGYVETSNVNVAAEELVNMIQVQRAYEINSKAVST 249
    | | | | | . | |||| :|||.||: ||||:||||.:|
    201 EAVIGNPVEPGFGKLVQGSLEASNVNVVQELVDMIETQRAYEVNSKSISA 250
    250 TDQMLQKLTQL* 261
    .|:|:| |.
    251 SDEMMQYLSNKL* 263
```

FlgH de *R. sphaeroides* y *S typhimurium*

Porcentaje de Identidad: 31%

Ventanas introducidas para alinear: 2

```
Rs      1 .....MSRRMSLTALALLAPAACSTYVEDRASEAWAPVYPVEEAERLDS 45
      :      :      :      |      |      |      |      |
St      1 MQKYALHAYPVMALMVATLTGCAWIPAKPLVQGATTAQPIPGPVPVANGS 50

      46 LPTGGIYSSTSRGLFVSDRRAARVGDIVTVDFDEKFSASKSQSASGSR.. 93
      :      .      |||      :|| .|:      |      |||||      ||.      ||
      51 IFQSAQPINYGYPQLFEDRRPRNIGDTLTIVLQENVSASKSSANASRDG 100

      94 KSDYAIDLDPDALTLGL...DDGVLDNSTDQGFSGKGAASQSNLGRMSV 140
      !. :      |      ||      ::      |      |.|||      |.      ||.      | :. |
      101 KTSFGFDTVPRYLQGLFGNSRADMEASGGNSFNGKGGANASNTFSGTLTV 150

      141 SVTRVLPGGNLEIMGQKLLTLNNGNEYVRLKGVVRPEDIGPDNVVTS DRI 190
      .| .||      |||      :. |:| :      :|      | | : :|      |||      |      |      |      | :.
      151 TVDQVLANGNLHVVG EKQIAINQGFIRFSGVVNPR TISGSNSVPSTQV 200

      191 AHAEIKYIGAGDTADTANAGWLRRLSVVSPL* 223
      |      |      |. |:|      |      :      |      |||.      |      .||:|
      201 ADARIEYVGNNGYINEAQNMGWLQRFFLNLSPL* 233
```

FlgJ de *R. sphaeroides* y *V. cholerae*

Porcentaje de Identidad: 29%

Ventanas introducidas para alinear: 2

```
Rs      1 .....MELKLQALTPLSLSGSRA.QPAGREDLRQAAEGFESLFLTQ 40
          : | |           : ||. | || |||:| .
Vc      1 MINNSNDIGFIQDIAGLDKLRQKAVNGDENAGQSALTAARQFESIFTSM 50
          .
41 LLKAGRAGLPG..GDLLGSSGVDTARDMLDMELAKSSAGRAGLGIADAIE 88
          :||. |           ||: | | | ||| :| . ||:| |
51 MLKSMRDANSDFKSDLMSSQNE DL YRQMLDEQMASEFSSCGSLGLADMIV 100
          .
89 RQFAPLVRDGKS*..... 101
          | .
101 AQLSTGQTASEQKGEDGFQEAMRRVEHARKTASERSNEDLVAAVYPLRKT 150
```

FlgK de *R. sphaeroides* y *S. typhimurium*

Porcentaje de Identidad: 27%

Ventanas introducidas para alinear: 7

Rs	1	M.SILDIARSGLLSYRSALSVTAENIANVNTEGYVRREAVLAQVPGGQIS	49
		: : .         . . .     . .               . :	
St	1	MSSLINHAMSGLNAAQAALNTVSNINNYNVAGYTRQTTILAQ...ANST	47
	50	PTSAATSGQGVRVEDVRRAFDGLVAQRLRTAEGAAASAETLDTTAGALES	99
		.           .   :   : .       : . .   : : .	
	48	LGAGGWIGNGVYVSGVQREYDAFITNQLRGAQNQSSGLTTRYEQMSKIDN	97
	100	LFLAGAGSVPEALTGFFDALNGLGATPRDGALRQVVLAAGQTLASSEFTTV	149
		. .   . .     .   .         . : :   .	
	98	LLADKSSSLSGSLQSFFTSLQTLVSNAEDPAARQALIGKAEGLVNQFKTT	147
	150	ASGLAGLRDEV TGLAGQTAVEASQTLRQLAELNGRMTG...AQQSALNP	195
		:     . : . :         . . . . .	
	148	DQYLRDQDKQVNIAIGSSVAQINNYAKQIANLNDQISRMTGVGAGASPN	197
	196	LLDERDRLLGELSRTVGVQASFDALGRTTVTLGSAPGGPLLEGTAASTL	245
		:     .     . :       :     .   : .	
	198	LLDQRDQLVSELNKIVGVEVSVQDGGTYNLTMANG.....	232
	246	GVAEAGGLVLEVTRAGATLQSRQITGGSLQGYASALSASVDNAAAELD...	292
		.   .   . . .         : :	
	233	.....YTLVQGSTARQLAAVPSSADPRTT VAYVDEAAGNIEIPE	272
	293	.....ALARQLVAEMNTVHAQGIDQSGA	315
		.	
	273	KLLNTGSLGGLLTFRSQDLQTRNTLGQLALAFADAFNAQHTKGYDADGN	322
	316	RGGDLFALEGWQVAADAGNRGTGGASVVAFDTATAPGPLTLLHDAAAGLW	365
		:       . :   . . .	
	323	KGKDFFSIGSPVVYSNSNNADK.....	344
		.	
		.	
		.	
	766	GGRMDALALAVNAVSAATGVRAELESPD GARLLLVDGGADIGIVGLRHTA	815
	345	.....TVSLTAKV	352

816 GAAVTLQGTDAEGSPAGAPLTLSTGADTSARFTGELRLSSASGFSADLGGV 865  
 . . | || . . | .. |||. ||  
 353 VDSTKVQATDYKIVFDGTDWQVTRTADNTFTA..... 385  
 .  
 .  
 .  
 1216 ATGHSIGSRTLGDGSVTVGGYRITLTGTLATGDRFTLTPATG..... 1258  
 | ||| . : | ::|. | || | .  
 386 .....TKDADGKLEIDGLKVTVGTGAQKNSFLLKPVSNAIVDMNV 426  
 1259 .....NSGGGEILDRLVALASGDPATGQGGYGA 1286  
 |. | . . | :  
 427 KVTNEAEIAMASESKLDPDVTGDSNDRNGQALLDLQNSNVVGGNKTEND 476  
 1287 DYMQLQTRIGTQAKAAAGRVSSSTAAALEVAERASAAASAVNLDEEAARLI 1336  
 | | . :| . .. | .. : . | ||||| |  
 477 AYATLVSDVGNKTSTLKTSSTTQANVVKQLYKQQQSVSGVNLDEEYGNLQ 526  
 1337 EQQQAYQASSQVFSVAQTLFETLLNAL\* 1364  
 || | |..|| | ||: ||| |  
 527 RYQQYYLANAQVLQTANALFDALLNIR\* 554



FlgL de *R. sphaeroides* y *V. cholerae*

Porcentaje de Identidad: 23%

Ventanas introducidas para alinear: 5

```

Rs      1 ..MTLGTTLFATLASRNFSRLQTEIGTLQARIASEVRDPRPSADPTRAVQ 48
      : . . . | :. : | | : | | : : | . |
Vc      1 MLNRISSEFHNYQAVQNDIRROESEVFNNQAQLASGKKLLSASDNPLATHY 50

49 LSAAKEMEATLGRYGANASSAADRLAHADVALGEVAARMRELKDVVLQAG 98
      : : | | . | . | | | : | : : | | : :
51 IQNVGQQEEQLRQYLDIVLVRNRLEHQEVIIISNTEEFSDSAKRTVMEMI 100

99 NPTLSDEGRAGLRIVAESAREALFALANRKDAMGQGLFAGYAA..GPAFV 146
      | . | | | | : | | | | . | | : | | | | | |
101 NGSLSPEDRVARARVLQEMANNFINLANVQDESGNYIFAGTKPKNQPFRR 150

147 KEGDTVRFAGNDGQPVAQLSETLRVATSLGGAEVFMAVPTEAGPRSVFEL 196
      | : | | . | | . : | . | : . | . . | | | : | | |
151 DNQGNVTYAGDDYQRKMKISNSLEIPFNNPGSKVFMEIPNPFSGSYEPNYA 200

197 ADDLVATLSVPLAHSSPQRTAEDTARLSLAAPPAPATVRFTLTGPGGSVE 246
      : | . . | . : | | | . | | | | | | | | | |
201 LQEGSELLLERAVNLNP....DDTASYRVTFVDMPEGKNGYQLERNGSV. 245

247 IEQRLPGSALAAINAASPQTGV TATEEPDGTLLVLGAVGRITVSDMSRSD 296
      | | | | | | : | . . | | | | |
246 .VQAGEFDAKTGIQFEELNIQVKQISKGD AIELTPRTTFSVFD TFR.DA 293

297 PRDVLATFTSADDKGGWIMPAREFDAASLTDAFDAVSHMAEQRARAGALA 346
      | . . | . . | : | | | | : . | | |
294 IRYAEGSVSDASNTA.....KLHQLVEEFHTAFIHLNKTRTDIGARL 335

347 ASVDTQADAIRTRQTRIATAIGGLEDLDVAEAVTRLQQLLLTQEAAQQTY 396
      ... | | : . : | . | | | | | | : | | . | :
336 STLDIQEEQHEDFKISLAKSKSTFEDLDYAEAVIEFNENSRALEASQKAF 385

397 VKIANRSLFDYLR* 410
      | . . | | . | :
386 GKTKDLTLFNFI* . 398
    
```