

Interacción entre el factor SigD de *Bacillus subtilis* y el factor anti-sigma FlgM fusionado a una cola de histidinas en *Escherichia coli*

Beatriz González

División de Plantas. Laboratorio de Bioreactores. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.
Ave 31 e/ 158 y 190, Playa, Ciudad de La Habana AP 6162, CP 10600, Cuba.
Fax: (53-7) 33 1779; E-mail: beatriz.gonzalez@cigb.edu.cu

RESUMEN

FlgM es el factor anti-sigma específico del factor SigD de la síntesis flagelar en *Bacillus subtilis* y es responsable del acoplamiento entre la expresión de los genes tardíos del sistema flagelar y el completamiento de las estructuras primarias del flagelo. En el presente trabajo se muestra la interacción entre el factor SigD y el factor anti-sigma FlgM fusionado a una cola de histidina en extractos de proteínas celulares de *Escherichia coli*. Se copurificaron ambos factores proteicos mediante cromatografía de afinidad. Ambas proteínas se expresaron en la misma célula y se logró obtener *in vivo* un complejo estable SigD:FlgM-(His)₆ de forma soluble. Se discute el posible papel biológico de esta interacción.

Palabras claves: coexpresión, factor anti-sigma, factor sigma, interacción

Biotecnología Aplicada 2002;19:143-146

ABSTRACT

Interaction between *Bacillus subtilis* SigD and the anti-sigma factor FlgM-(His)₆ in *Escherichia coli*. FlgM is an anti-sigma factor specific for the flagellar SigD factor in *Bacillus subtilis*. It is responsible for the coupling of late flagellar gene expression and the completion of hook-basal body structure. The present work shows the interaction between sigma factor SigD and the anti-sigma factor FlgM-(His)₆ in *E. coli* cellular protein extracts, from which both proteins co-purify by affinity chromatography. Expressing both SigD and FlgM-(His)₆ proteins in the same cells, we obtained a soluble and stable SigD:FlgM-(His)₆ complex *in vivo*. The possible role of this interaction is discussed.

Keywords: anti-sigma factor, coexpression, interaction, sigma factor

Introducción

El inicio de la transcripción de un gen específico está determinado, entre otros factores, por proteínas de unión al ADN que interactúan directamente con la región promotora del gen. Recientemente se han descrito proteínas que regulan negativamente la transcripción por su interacción directa con factores sigma (σ) específicos, designándose como factores anti- σ [1]. Esto añade un nuevo nivel de regulación transcripcional de la expresión génica por la inhibición de factores σ que son específicos.

Los factores anti- σ se definen por su habilidad de impedir al factor σ unirse al núcleo de la ARN polimerasa. Como resultado de esta acción, se inhibe la transcripción a partir de un grupo de promotores cuyas secuencias son reconocidas únicamente por el factor σ con el cual el anti- σ interactúa directamente [2].

Los detalles del mecanismo molecular de acción de los factores anti- σ no han sido aún esclarecidos, no obstante se sabe que ejercen su actividad por interacciones proteína-proteína altamente específicas [3-6].

El factor anti- σ FlgM fue descrito inicialmente en *Salmonella typhimurium* como regulador negativo del factor σ^{28} (FliA) específico para la síntesis flagelar [7, 8]; posteriormente se demostró que éste interactúa con FliA formando un complejo estable [6]. En *Bacillus subtilis* se ha descrito también la proteína FlgM y se ha podido establecer que al igual que su homólogo en *S. typhimurium* constituye el principal

factor regulador de la actividad del factor σ^D (SigD) y, por lo tanto, de la expresión de los genes flagelares tardíos [9-11].

El factor anti- σ FlgM ha sido purificado y caracterizado a partir de la expresión recombinante del gen *flgM* en *E. coli* [12]. Los resultados obtenidos a partir del entrecruzamiento químico (*crosslinking*), electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes y cromatografía de exclusión molecular, demostraron que FlgM es un dímero en solución. Además, se demostró que *in vitro* FlgM forma un complejo estable con la proteína SigD, en el cual intervienen una molécula de cada especie dando lugar a un heterodímero de aproximadamente 40 kD [12].

Mediante análisis de transcripción *in vitro* a partir de promotores dependientes de SigD, se ha demostrado que FlgM inhibe el inicio de la transcripción solamente si está presente antes de dicho factor. Una vez formado el complejo de la holoenzima, FlgM no es capaz de inhibir el inicio de la transcripción [13].

En el presente trabajo se utiliza la proteína FlgM fusionada a una cola de histidina (FlgM-(His)₆), se muestra la interacción entre SigD y FlgM-(His)₆ en extractos de proteínas totales de *Escherichia coli* y se emplea la cromatografía de afinidad (IMAC) para purificar el complejo formado. Posteriormente, ambas proteínas se coexpresaron en *E. coli* y se logró obtener y purificar el complejo SigD:FlgM-(His)₆ soluble y estable. Se discute la relevancia biológica de esta interacción.

1. Brown KL, Hughes KT. The role of anti- σ factors in gene regulation. *Mol Microbiol* 1995;16:397-404.

2. Hughes KT, Mathee K. The anti-sigma factors. *Annu Rev Microbiol* 1998;52:231-86.

3. Kutsukake K. Excretion of the anti- σ factor through a flagellar substructure couples flagellar gene expression with flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* 1994;243:605-12.

4. Iyoda S, Kutsukake K. Molecular dissection of the flagellum specific anti- σ factor, FlgM, of *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* 1995;249:417-24.

5. Decatur AL, Losick R. Three sites of contact between the *Bacillus subtilis* transcription factor σ^D and its anti- σ factor SpoIIAB. *Genes Dev* 1996;10:2348-58.

6. Daughdrill GW, Hanely LH, Dahlquist FW. The C-terminal half of the anti-sigma factor FlgM contains a dynamic equilibrium solution structure favoring helical conformations. *Biochemistry* 1998;37:1076-82.

7. Gillen KL, Hughes KT. Molecular characterization of *flgM*, a gene encoding a negative regulator of flagellin synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1991;173:6453-59.

8. Ohnishi K, Kutsukake K, Susuki H, Iino T. A novel transcriptional regulatory mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*: an anti sigma factor, σ^F . *Mol Microbiol* 1992;6:3149-57.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y plásmidos

La cepa de *E. coli* DH5 α [14] fue usada para la multiplicación y purificación de los plásmidos empleados, y la cepa BL21(DE3) [15] se usó exclusivamente para la expresión de los genes *flgM* y *sigD*, que codifican para las proteínas FlgM y SigD respectivamente. Los genes fueron clonados en vectores de la serie pET (Novagen, EE.UU.) que usa el sistema de expresión regulado por el promotor del fago T7. Este sistema de expresión permite la obtención de altos niveles de proteínas recombinantes [15]. La proteína FlgM se obtiene fusionada a una cola de 6 histidinas en su extremo carboxilo, que facilita su purificación con IMAC [16].

Los plásmidos utilizados en el trabajo se describen a continuación:

- pDBB3: PT7-*flgM* Amp^r, derivado del pET22b+ [13].
- PBGB10: PT7-*sigD*- Ter T7, Cm^r, derivado del pACYC184 (construido en este trabajo).
- pYFC-11: PT7-*sigD* Amp^r, derivado del pET11a [17].

Expresión y purificación de FlgM-(His)₆

La proteína FlgM-(His)₆ se expresó a partir de la cepa BL21(DE3) transformada con el plásmido pDBB3 y se purificó mediante IMAC siguiendo el procedimiento descrito por González y colaboradores [18]. Las fracciones que contenían la proteína se unieron y dializaron contra la solución tampón TMC (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, MgCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM). Se usó un sistema Centricon-3 de Amicon.

Expresión y purificación del factor σ^D

La proteína SigD se expresó en las células de BL21(DE3) transformadas con el plásmido pYFC-11 y se purificó de acuerdo al método descrito por Chen y Helmann [17], para posteriormente ser utilizada en el ensayo de unión *in vitro* a FlgM-(His)₆.

Análisis de las proteínas expresadas y purificadas

Las proteínas purificadas se analizaron por electroforesis SDS-PAGE al 15% en condiciones desnaturantes. Para los análisis inmunológicos por Western blot, las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond C según Towbin y colaboradores [19]. La inmunoidentificación de las proteínas se realizó utilizando anticuerpo policlonal obtenido a partir de suero de conejo inmunizado con los péptidos NPYQKNYDKQAVQK y KNMINFYKKQ, que corresponden respectivamente a los residuos del 12 al 25 y del 79 al 88 de la secuencia aminoacídica de FlgM [9]. Los filtros se trataron de acuerdo con las indicaciones del sistema ECL (Amersham-Pharmacia-Biotech, Suecia).

Ensayo de unión *in vitro* entre SigD y FlgM-(His)₆

Los ensayos de unión se realizaron en solución tampón TMC con cantidades equimolares de SigD y FlgM-(His)₆ a concentraciones de 277 μ g/mL y 75 μ g/mL respectivamente. La mezcla se incubó durante 10 min a 25 °C y se mantuvo durante 12 h a 4 °C. El complejo

SigD:FlgM-(His)₆ se purificó por cromatografía de exclusión molecular en FPLC con una columna Superosa-12 HR 10/30 con solución tampón TMC.

Muestras del complejo purificado se analizaron posteriormente mediante entrecruzamiento químico (*crosslinking*) con el reactivo homobifuncional disuccinimidil suberato (DSS), (Sigma, EE.UU.) en las mismas condiciones utilizadas por Bertero y colaboradores [12]. La velocidad de formación del complejo se evaluó cualitativamente; para ello, cantidades equivalentes de ambas proteínas purificadas por separado se mezclaron e inmediatamente se trataron con DSS. Los productos de todas las reacciones se analizaron por SDS-PAGE al 15%.

Copurificación de SigD y FlgM-(His)₆ a través de IMAC

Para extraer las proteínas totales de las células de la cepa de *E. coli* BL21(DE3) transformada con el plásmido pYFC-11, se partió de dos cultivos de 50 mL. Las células se colectaron por centrifugación, se resuspendieron en 5 mL de clorhidrato de guanidina 6 M en solución tampón TMC y se incubaron a temperatura ambiente por 1 h con agitación. La suspensión se centrifugó a temperatura ambiente durante 15 min a 6 000 rpm y el sobrenadante del extracto de las proteínas celulares se dializó contra 1 L de tampón TMC durante toda la noche a 4 °C. El extracto dializado se centrifugó a 15 000 rpm durante 15 min a 4 °C, para separar todo el material precipitado y posteriormente se dividió en dos porciones. Una de ellas se incubó durante 1 h con 2 mg de la proteína FlgM-(His)₆ previamente purificada por IMAC y la otra fracción se usó como control. Ambas fracciones se sometieron al mismo procedimiento de purificación por IMAC.

Para realizar IMAC, 1 mL de resina ProbondTM activada con NiCl₂ se equilibró previamente con solución tampón TMC. El material adsorbido en la columna se lavó con 20 mL cada vez de: TMC, imidazol 10 mM en TMC e imidazol 50 mM en TMC. La elución se realizó con 3 mL de imidazol 350 mM en TMC y posteriormente se lavó la columna con imidazol 1 M en TMC. Las proteínas eluidas se analizaron por SDS-PAGE al 15%.

Coexpresión de FlgM-(His)₆ y SigD en *E. coli*

El fragmento *Bgl* II-*Eco* RV de 990 pb del pYFC-11 que contiene el promotor T7 seguido del gen *sigD* y el terminador del fago T7, se subclonaron en el vector pACYC184 [20] en los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RV. Con el plásmido obtenido, pBGB10, se transformó la cepa BL21(DE3) portadora del plásmido pDBB3 que expresa el gen *flgM*. La cepa cotransformada se cultivó y la inducción de la expresión de ambas proteínas, FlgM-(His)₆ y SigD, se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por González y colaboradores [18]. Las células colectadas por centrifugación se lisaron por ultrasonido y la fracción soluble de las proteínas totales se sometió a IMAC de acuerdo con el procedimiento descrito en el epígrafe anterior. Las fracciones con las dos proteínas SigD y FlgM-(His)₆ se unieron y concentraron. Las proteínas se repurificaron posteriormente por una columna de exclusión molecular FPLC Superosa-12 HR 10/30 en solución tampón TMC.

9. Mirel DB, Lauer P, Chamberlin MJ. Identification of flagellar synthesis regulatory and structural genes in a σ^D dependent operon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1994;176:4492-500.

10. Caramori T, Barilla D, Nessi C, Sacchi L, Galizzi A. Role of FlgM in σ^D -dependent gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1996;178:3113-18.

11. Fredrick K, Helmann JD. FlgM is a primary regulator of σ^D activity, and its absence restores motility to a σ^D mutant. *J Bacteriol* 1996;178:7010-13.

12. Bertero MG, González B, Tarricone C, Ceciliani F, Galizzi A. Overproduction and characterization of the *Bacillus subtilis* anti-sigma factor FlgM. *J Biol Chem* 1999;274:12103-7.

13. Barilla D. Regolazione dell'espressione dei geni coinvolti nella biosintesi del flagello in *Bacillus subtilis* [dissertation]. Italia: Università degli Studi Pavia; 1995.

14. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983;166:557-9.

15. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. Use of the T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 1990;185:60-89.

16. Yip TT, Hutchens TW. Immobilized metal ion affinity chromatography. In: Kenney A, Fowell S, editors. *Methods in molecular biology: practical protein chromatography*. Totowa, New Jersey: Humana Press; 1992. Vol. 11. p. 17-31.

17. Chen YF, Helmann JD. The *Bacillus subtilis* flagellar regulatory protein σ^D : Overproduction, domain analysis and DNA-binding properties. *J Mol Biol* 1995; 249:743-53.

18. González BG, Ceciliani F, Galizzi A. Growth at low temperature suppresses readthrough of the TGA stop codon during the expression of *Bacillus subtilis* *flgM* gene in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* (In press).

19. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electroforetic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-5.

20. Chang ACY, Cohen SN. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* 1978;134:1141-56.

Resultados

Interacción *in vitro* entre SigD y FlgM-(His)₆

Las proteínas SigD y FlgM-(His)₆ formaron un complejo estable que eluyó de la columna de gel filtración en un volumen de 13-14 mL (datos no mostrados), similar a lo publicado para la proteína FlgM [12].

Como se muestra en la Figura 1, el complejo purificado SigD:FlgM-(His)₆ migró a una altura aproximada de 40 kD (carril 2), que se corresponde con un heterodímero, tal y como se demostró para el complejo FlgM:SigD [12].

En el caso que se mezclaron ambas proteínas inmediatamente antes de la incubación con DSS, se observó igualmente la formación del complejo demostrado por la banda a la altura de los 40 kD (carril 4). La interacción de FlgM-(His)₆ con SigD se comportó de modo similar al de la proteína FlgM sin fusión a la cola de histidinas [12].

Copurificación de SigD y FlgM-(His)₆

La proteína FlgM-(His)₆ purificada mediante cromatografía de afinidad, se obtuvo con más de 90% de pureza determinado por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie.

El extracto de *E. coli* que contenía la proteína SigD incubado con la proteína FlgM-(His)₆ previamente purificada se aplicó a la columna de afinidad. En la Figura 2 se observa que ambas proteínas son retenidas en la columna (carril 6) y son eluidas posteriormente con imidazol (carriles 7 y 8). Como control se utilizó el extracto, sin FlgM-(His)₆, al que se le aplicó el mismo procedimiento. Se observó que la proteína SigD no se retenía en la columna de afinidad (Figura 2, carril 2). La proteína SigD tampoco se hizo ver en las fracciones correspondientes a la elución con imidazol (Figura 2, carril 3).

Teniendo en cuenta el resultado anterior se procedió a coexpresar ambas proteínas en *E. coli* y probar la formación del complejo mediante la extracción y purificación del mismo con el empleo de IMAC.

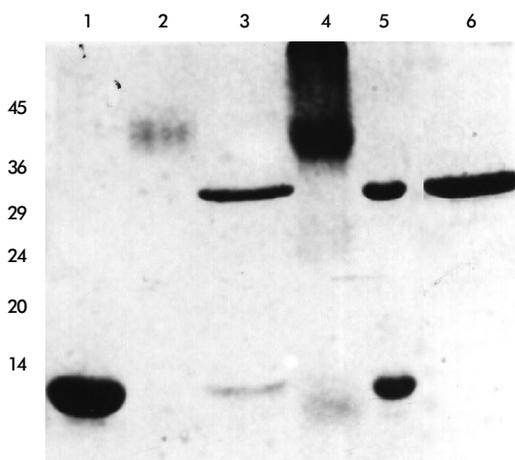


Figura 1. Interacción *in vitro* entre SigD y FlgM-(His)₆. Análisis mediante SDS-PAGE al 15% del complejo sometido a reacción de entrecruzamiento químico. 1) FlgM-(His)₆; 2) complejo SigD:FlgM-(His)₆ tratado con DSS; 3) complejo SigD:FlgM-(His)₆; 4) proteínas SigD y FlgM-(His)₆ tratadas con DSS; 5) proteínas SigD y FlgM-(His)₆; 6) SigD.

Coexpresión de FlgM-(His)₆ y SigD en *E. coli*

Los resultados mostraron que se obtuvieron altos niveles de expresión de las proteínas SigD y FlgM-(His)₆ (carril 1) en *E. coli* (Figura 3). El complejo SigD:FlgM-(His)₆ se encontró en la fracción soluble, de donde se purificó mediante IMAC (carriles 3-5). La cromatografía de exclusión molecular permitió separar en dos fracciones las proteínas purificadas por IMAC. Una fracción mayoritaria correspondió al complejo SigD:FlgM-(His)₆ (carril 6) y otra minoritaria correspondió a FlgM-(His)₆ (carril 7).

El análisis por Western blot de estas mismas muestras (Figura 4) indicó el reconocimiento de ambas proteínas en las fracciones eluidas de la purificación del complejo. Para la identificación de las proteínas se utilizó el anticuerpo anti-FlgM debido a su actividad cruzada con SigD [12].

Discusión

La interacción *in vitro* entre FlgM y SigD ha sido estudiada y caracterizada, demostrándose la formación de un complejo heterodimérico con una constante de disociación, K_d, estimada de 10⁻⁶ M o menor [12].

FlgM-(His)₆ interactúa *in vitro* con SigD del mismo modo que ha sido descrito para FlgM [12], lo cual sugiere que la presencia de las histidinas en el extremo carboxilo no interfiere en su actividad como factor anti- σ . La interacción observada entre FlgM-(His)₆ y SigD se correspondió con la alta afinidad del complejo formado por FlgM y SigD [12].

El factor σ^D se aisló a partir de extractos celulares de *E. coli* solubilizados y mezclados con el factor anti- σ FlgM-(His)₆ previamente purificado. Ambas proteínas fueron purificadas en un sólo paso de cromatografía de afinidad. La copurificación de SigD con el factor anti- σ evidenció la formación de un complejo estable entre FlgM-(His)₆ y σ^D en el entorno del extracto celular de *E. coli*.

Teniendo en cuenta lo anterior y la capacidad de la cromatografía de afinidad IMAC de purificar el complejo FlgM-(His)₆:SigD, se decidió abordar la coexpresión de ambas proteínas en *E. coli* y demostrar la interacción *in vivo*.

A partir del cultivo de células de *E. coli* cotransformadas con los plásmidos pDBB3 y pBGB10, se

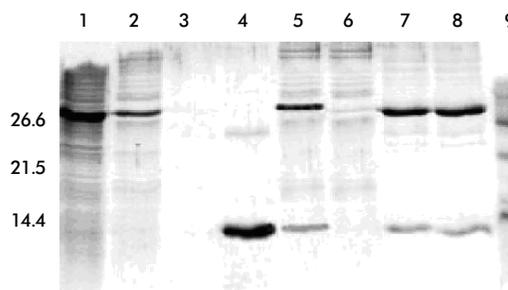


Figura 2. Copurificación de SigD con FlgM-(His)₆. Análisis de las proteínas mediante SDS-PAGE al 15%. 1) extracto de proteínas totales de *E. coli* BL21(DE3)pYFC-11; 2) proteínas no unidas a la columna de IMAC; 3) eluato de la columna de IMAC con imidazol a 350 mM; 4) FlgM-(His)₆; 5) extracto de BL21(DE3)pYFC-11 + FlgM-(His)₆; 6) proteínas no unidas a la columna de IMAC; 7,8) eluato de la columna de IMAC con el complejo SigD:FlgM-(His)₆; 9) patrón de peso molecular (kD).

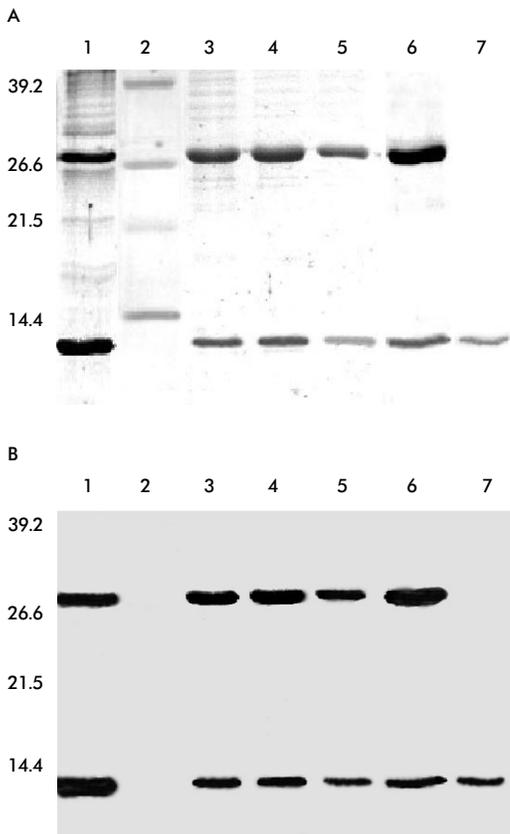


Figura 3. Coexpresión de SigD y FlgM-(His)₆ en *E. coli*. Formación del complejo *in vivo*. A) Análisis de las proteínas mediante SDS-PAGE al 15%. 1) proteínas totales de *E. coli* BL21(DE3)pDBB3+pBGB10; 2) patrón de pesos moleculares (kDa); 3-5) fracciones del eluato de la columna de IMAC, 6) complejo SigD:FlgM-(His)₆ eluido de la columna de gel filtración; 7) FlgM-(His)₆ eluido de la columna de gel filtración. B) Análisis de las proteínas mediante Western blot. Las muestras analizadas son las mismas que en A.

obtuvieron altos niveles de ambas proteínas, mayoritariamente solubles, las cuales fueron copurificadas por IMAC.

Resaltan en estos resultados los mayores niveles de acumulación de FlgM-(His)₆ obtenidos, los cuales son explicables de acuerdo al mayor número de copias del plásmido pDBB3 con relación al del pBGB10 [20].

Con los resultados mostrados se demostró que el complejo SigD:FlgM-(His)₆ extraído de las células de *E. coli*, puede ser purificado por IMAC. Mediante cromatografía de exclusión molecular, se observó la elución del complejo en el volumen correspondiente a 13-14 mL coincidente con el volumen al que eluye el complejo formado *in vitro*; además, se obtuvo un segundo pico correspondiente a FlgM-(His)₆ libre, por no encontrar suficiente SigD para interactuar debido al exceso de proteína FlgM-(His)₆ expresada en la célula. Esta observación se correspondió con la relación equimolar en que interactúan ambas proteínas según se describió en el experimento de interacción *in vitro*.

Un hecho interesante es la obtención de la proteína SigD soluble. El factor σ^D se obtiene en *E. coli* en forma de cuerpos de inclusión, y los intentos de concentrar la proteína a más de 1 mg/mL llevan a la aparición de agregados de la misma [17]. La presencia de SigD en forma soluble probablemente está asociada a la coexpresión con FlgM-(His)₆ y consecuentemente, a la formación de un complejo *in vivo* entre ambas proteínas. Se ha observado que el complejo SigD:FlgM es estable aún a concentraciones de 10 mg/mL sin que se aprecie formación alguna de agregados (resultados no mostrados).

Todos estos resultados demostraron la formación del complejo SigD:FlgM-(His)₆ *in vivo* en *E. coli*. Según se puede inferir, la coexpresión de FlgM-(His)₆ y SigD favorece la interacción inmediata de ambas proteínas, impide la formación de agregados insolubles de SigD y mantiene el complejo soluble en la célula de *E. coli*.

Resultados previos han mostrado la directa participación de FlgM en la expresión coordinada de los genes flagelares tempranos y tardíos [9, 10]. En el presente trabajo se mostró la interacción específica *in vivo* entre el factor anti- σ FlgM y el factor σ^D de *Bacillus subtilis*, mediante la coexpresión de ambas proteínas en células de *E. coli*.

Teniendo en cuenta todo lo antes expuesto, se puede afirmar que FlgM ejerce la actividad como factor anti- σ en las células de *B. subtilis* mediante su interacción directa con el factor σ^D . Esto guarda semejanzas con los mecanismos descritos para el factor anti- σ FlgM en *S. typhimurium*. De esta forma se explica cómo el factor anti- σ FlgM regula la actividad del factor σ^D , impidiendo la transcripción de los genes tardíos de la síntesis flagelar mientras no se completa el ensamblaje de las estructuras primarias de los flagelos. Probablemente, al igual que ocurre en *S. typhimurium*, una vez que finaliza el completamiento de las estructuras flagelares basales, el factor anti- σ FlgM es secretado al medio a través de ellas, y el factor σ^D libre promueve la transcripción de los genes flagelares tardíos. De hecho, estudios inmunológicos preliminares mostraron la presencia de FlgM en el sobrenadante del medio del cultivo durante la fase estacionaria del mismo (resultados no mostrados).

A partir de los resultados expuestos quedó evidente que la cola de histidinas fusionada al extremo carboxilo de FlgM no interfiere en la interacción entre el factor anti- σ y SigD. Este hecho reviste gran utilidad en estudios estructurales de la naturaleza de dicha interacción. Asimismo, la capacidad de la proteína FlgM-(His)₆ de interactuar *in vivo* con SigD, abre el camino para su empleo en posteriores estudios con vistas a esclarecer los mecanismos moleculares de regulación del factor anti- σ FlgM y del sistema flagelar.

Agradecimientos

Agradezco a Daniela Barilla y John Helmann por facilitarme los plásmidos pDBB3 y pYFC-11 respectivamente, a Alessandro Galizzi por los sueros anti-FlgM y las opiniones acerca del trabajo, a Guillermo Selman-Housein por las discusiones y críticas constructivas del trabajo y Alberto Salazar por la lectura crítica del manuscrito y sus oportunas sugerencias.