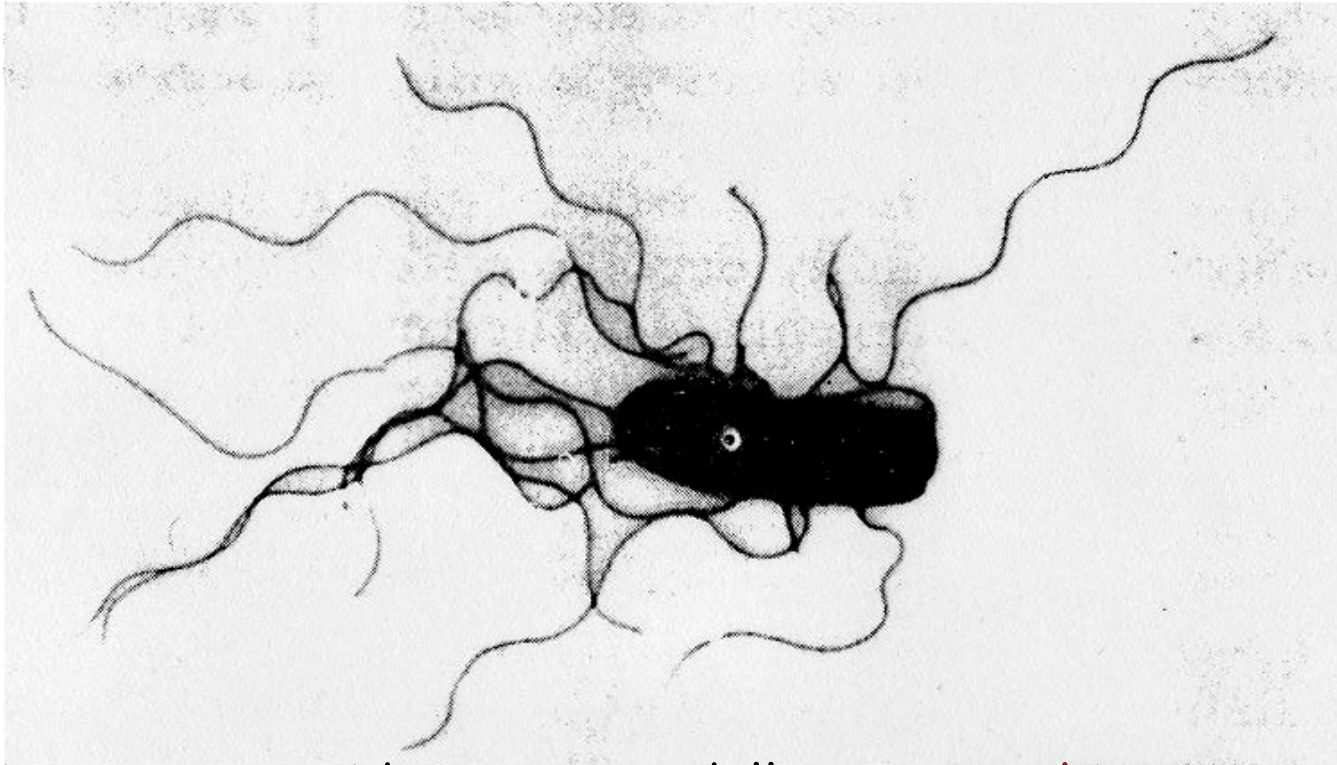


I flagelli

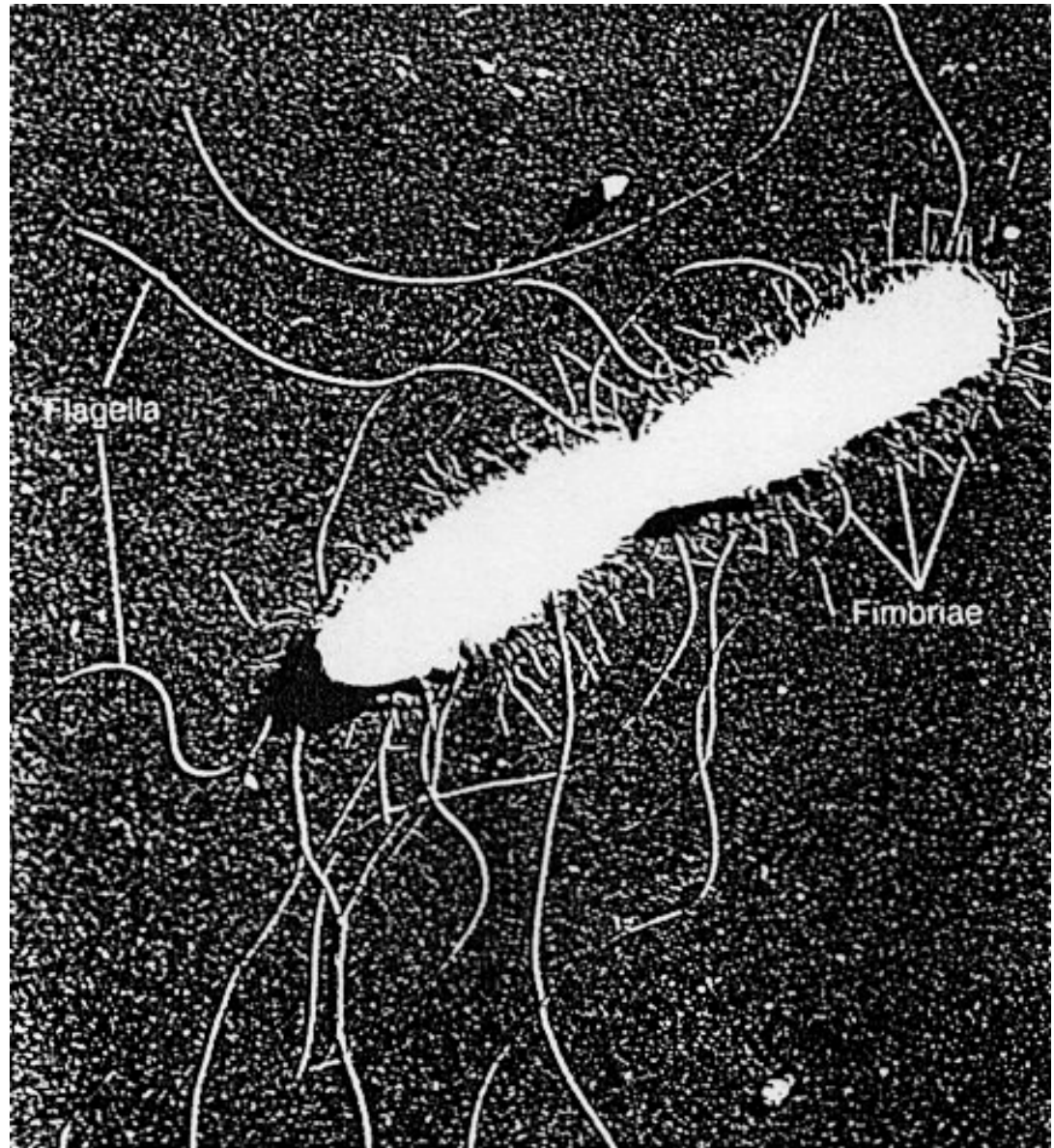


I flagelli si possono considerare come delle **nanomacchine** in grado di autoassemblarsi e permettono il movimento del batterio nel proprio ambiente.

I flagelli dei batteri Gram+ e Gram- sono essenzialmente identici ad eccezione del fatto che si estendono oltre la M.E.

I flagelli negli Archea hanno un diverso meccanismo di secrezione della flagellina che subisce anche una serie di modificazioni post traduzionali

**Cellula batterica con
flagelli peritrichi:
E.coli , Salmonella**



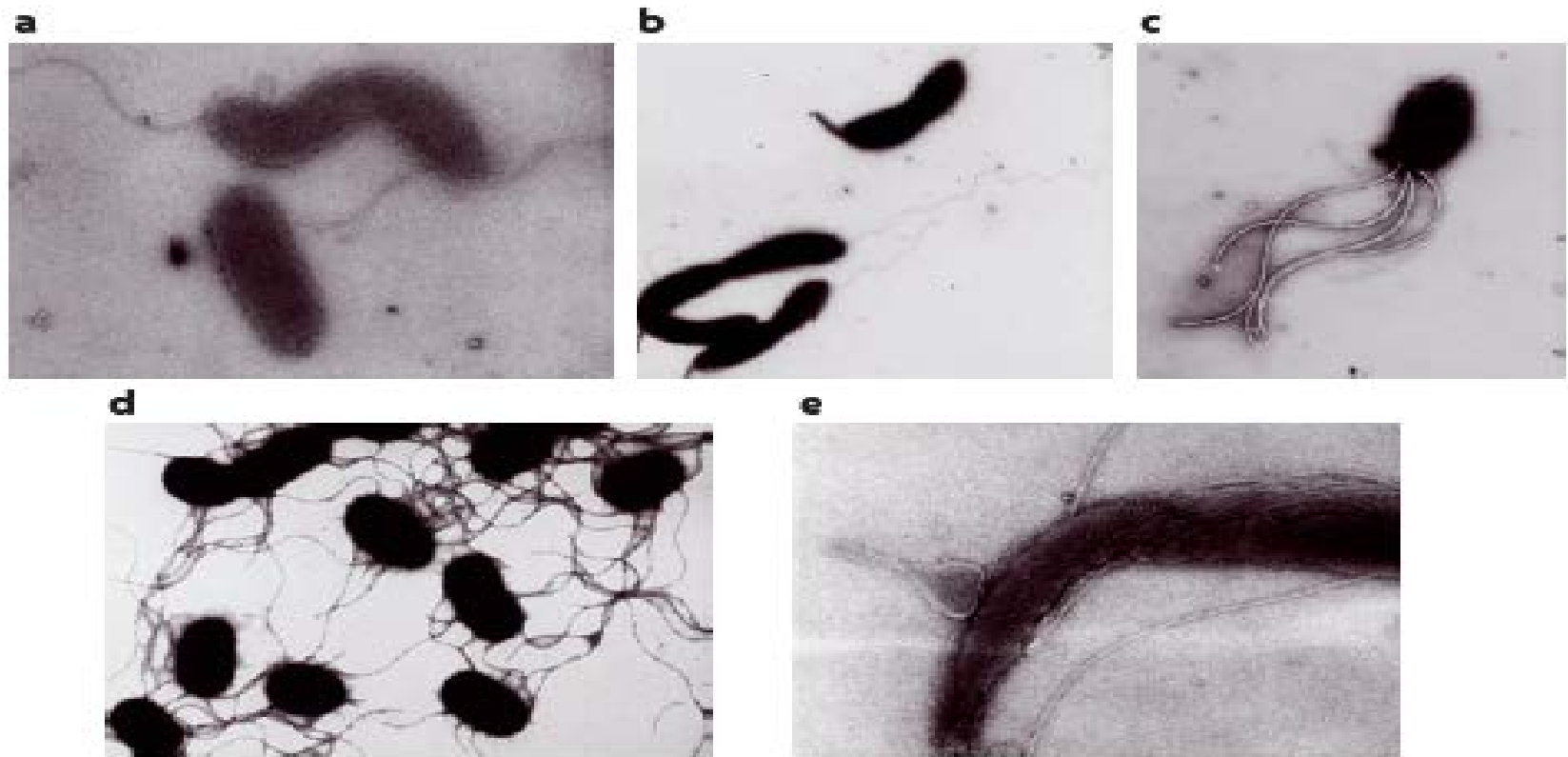
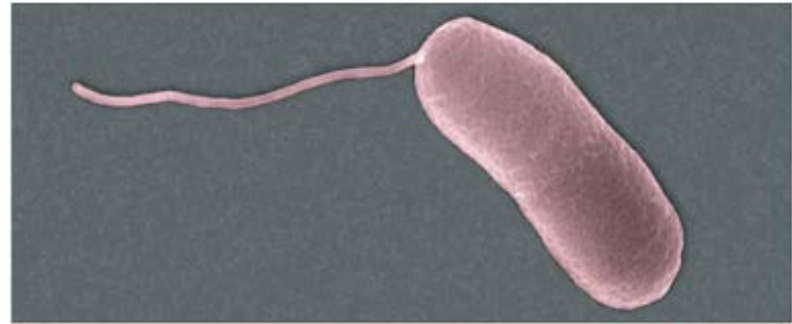


Figure 1 | Electron micrograph images illustrating the different types of flagellar arrangement in bacteria. A single flagellum can be present at one end of the cell (monotrichous); for example, in *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Idiomarina loihiensis* (a) and *Caulobacter crescentus* (b). Many bacteria have numerous flagella and, if these are co-located on the surface of the cell to form a tuft, the bacterium is lophotrichous; for example, *Vibrio fischeri* (c) and *Spirillum* spp. Peritrichous flagella are distributed all over the cell; for example *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (d). For spirochaetes, such as species of *Borrelia* (e), *Treponema* and *Leptospira*, a specialized set of flagella are located in the periplasmic space, the rotation of which causes the entire bacterium to move forward in a corkscrew-like motion. Images kindly provided by S.-I. Aizawa, Prefectural University of Hiroshima, Japan.



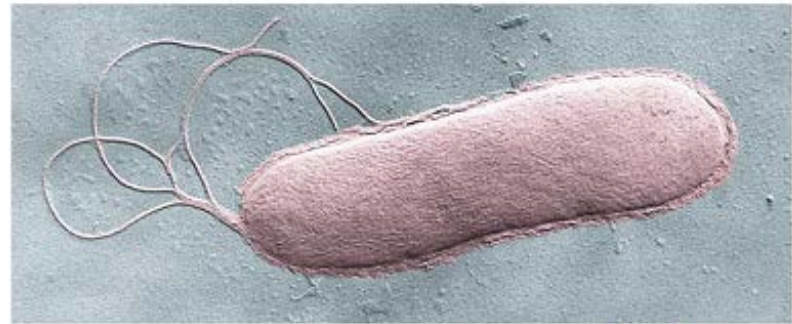
(a)

SEM 1 μm



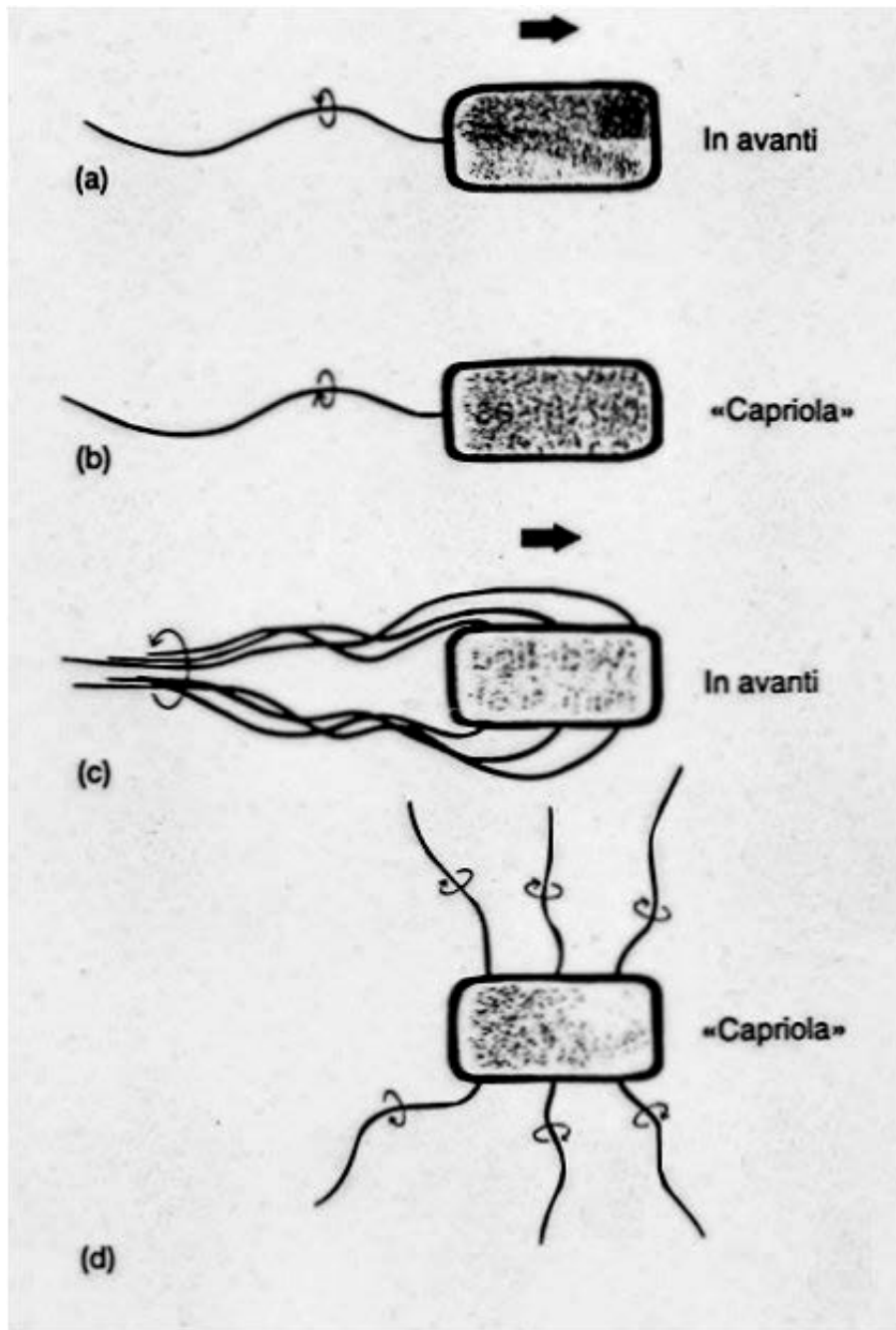
(b)

SEM 0.7 μm

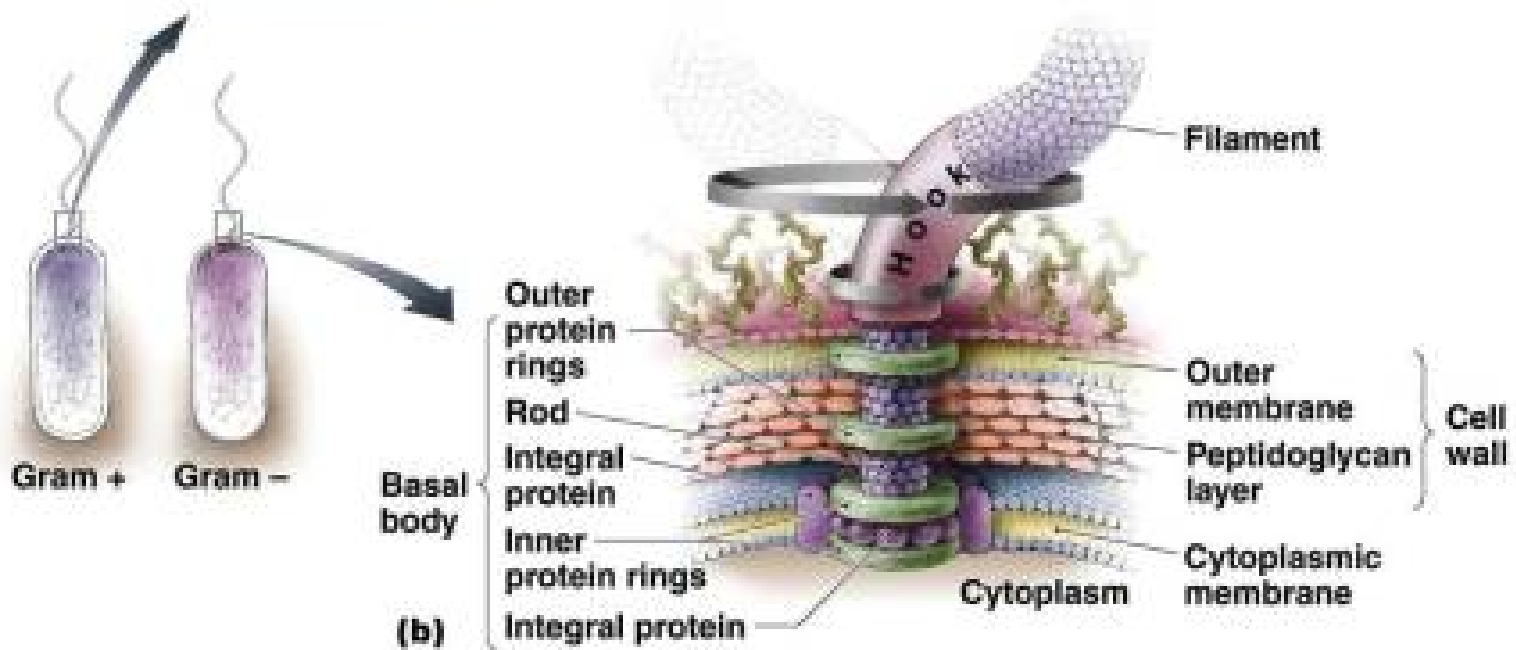
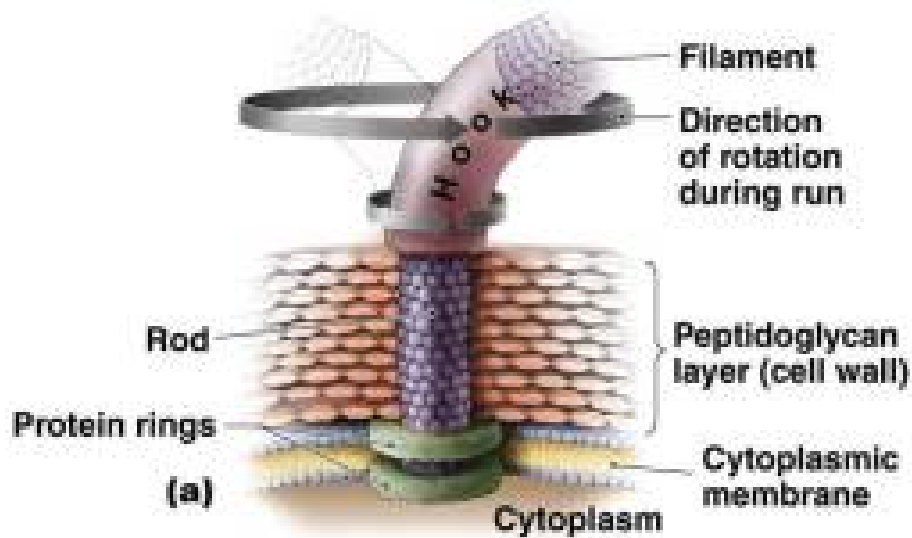


(c)

SEM 0.5 μm



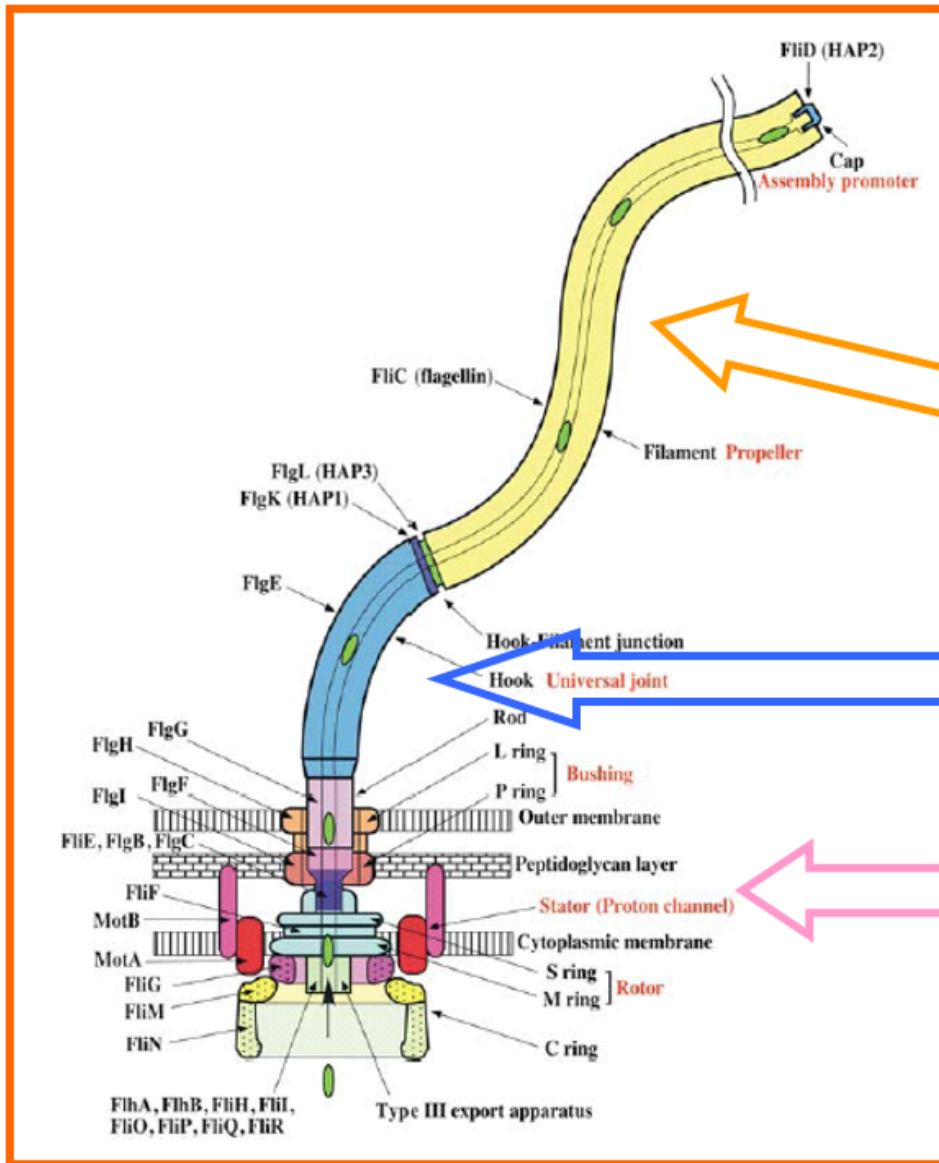
Monotrichi e peritrichi: differenze nel movimento



La struttura del flagello (EM)



Organizzazione del Flagello



Il flagello è costituito da tre unità strutturali:

Il flagello propriamente detto (propulsore)

L'uncino (giunto)

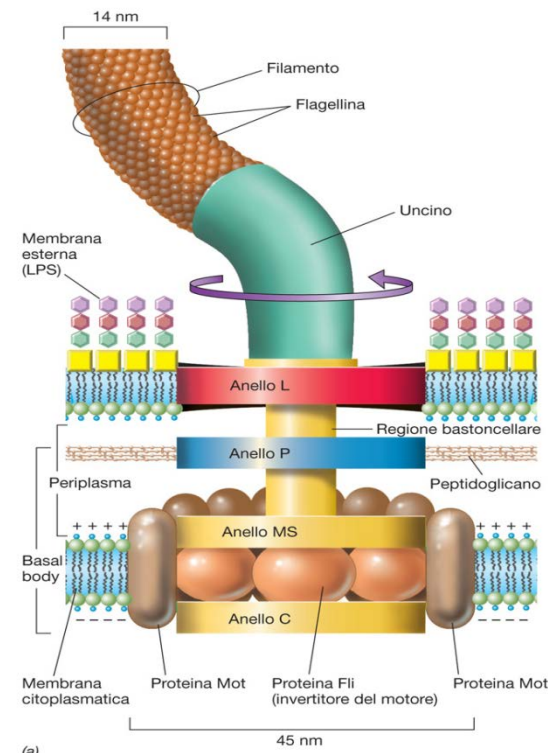
Il corpo basale (il motore)

Da un punto di vista funzionale possiamo suddividere il flagello in

- * Motore
- * Propulsore
- * Giunto che unisce questi due elementi

Il motore o corpo basale include

- un rotore e uno statore entrambi inseriti nella membrana citoplasmatica ,
- un bastone che agisce da albero motore e si estende dal rotore attraverso il peptidoglicano fino alla M.E. e
- una boccia che si assembla attorno alla parte finale del bastone per formare un poro nella M.E.

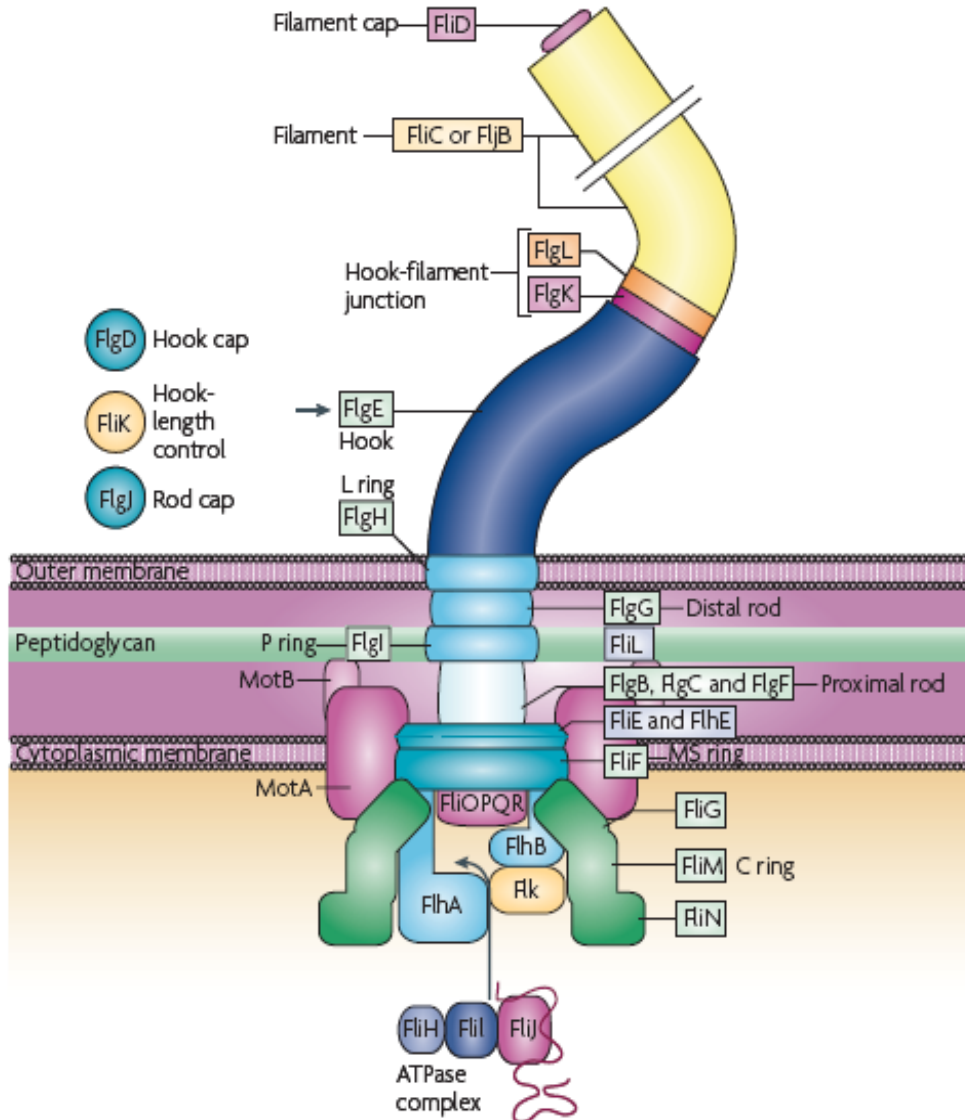


Il propulsore

è un filamento lungo ad elica composto da circa 20.000 subunità di una singola proteina che è avvolta da una impalcatura che permette il ripiegamento ed il posizionamento corretto delle varie subunità. Le subunità di flagellina sono assemblate ed esportate tramite la cavità del flagello che assomiglia ad un sistema di esportazione di tipo III ad eccezione degli anelli P ed L che utilizzano il sistema Sec.

Il giunto o uncino

è una struttura flessibile permette l'articolazione tra flagello e motore. E' costituito da circa 120 copie di una medesima proteina ed è assemblato come il filamento.



Tutti i componenti del flagello che sono localizzati al di fuori del citoplasma sono esportati tramite uno specifico sistema di secrezione flagellare simile al sistema di tipo III ad eccezione degli anelli P ed L che utilizzano il sistema Sec.

Il processo di secrezione è dipendente dalla PMF: il complesso citoplasmatico con funzione ATPasica serve per accelerare il processo.

La forza PMF serve sia per la secrezione che per il movimento del flagello

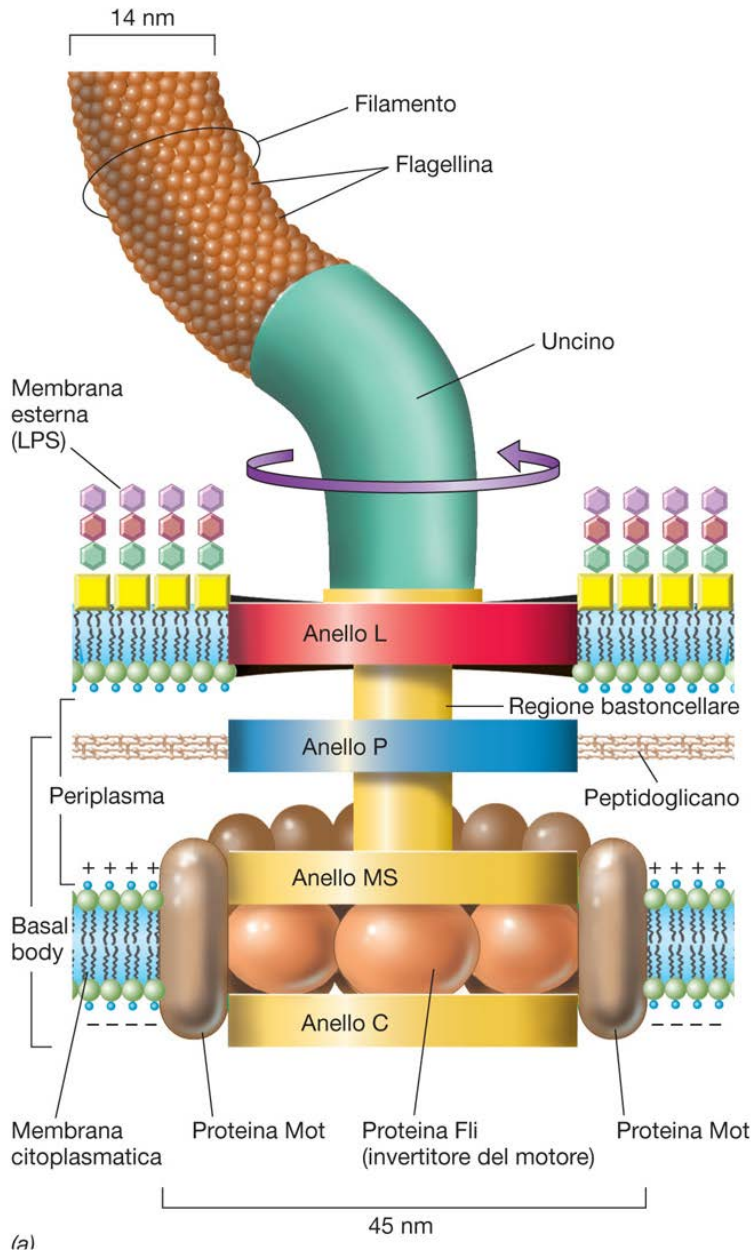
Il processo di esportazione richiede almeno 11 componenti 7 dei quali sono proteine di membrana e sono localizzate all'interno del corpo basale.

Altre 3 proteine sono componenti del citoplasma (solubili):

- * ATPase che controlla l'esportazione
- * un regolatore negativo dell'ATPase e
- * un chaperone per la secrezione dei componenti del flagello.

La forza PMF è richiesta sia per il processo di esportazione che per il movimento mentre l'idrolisi della ATP è richiesta per l'avvio del processo di esportazione dei componenti del flagello.

Struttura del flagello



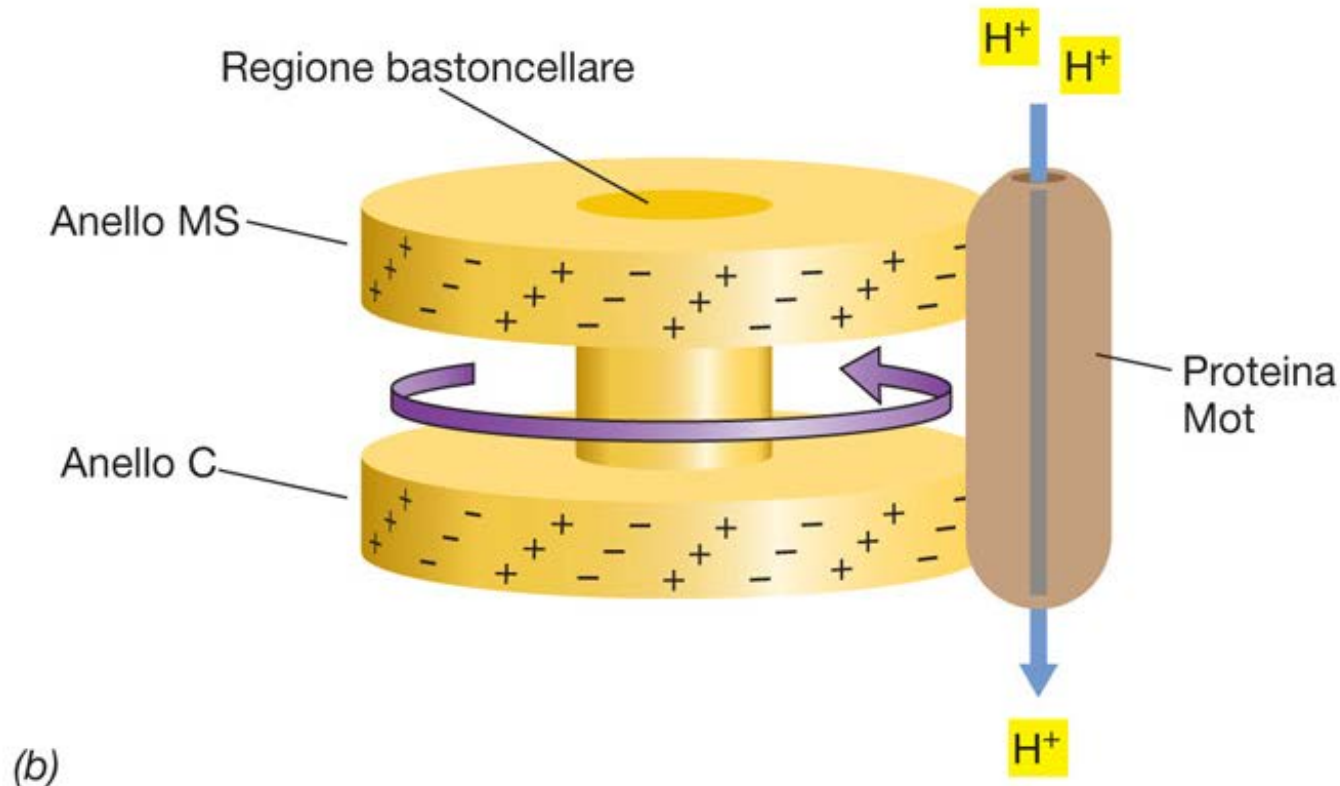
- **Corpo basale** localizzato tra citoplasma e membrana esterna. Le proteine **Mot** funzionano da motore flagellare mentre le proteine **Fli** come invertitore

- **Uncino** unità ripetute di una stessa proteina

- **Filamento** unità ripetute di flagellina

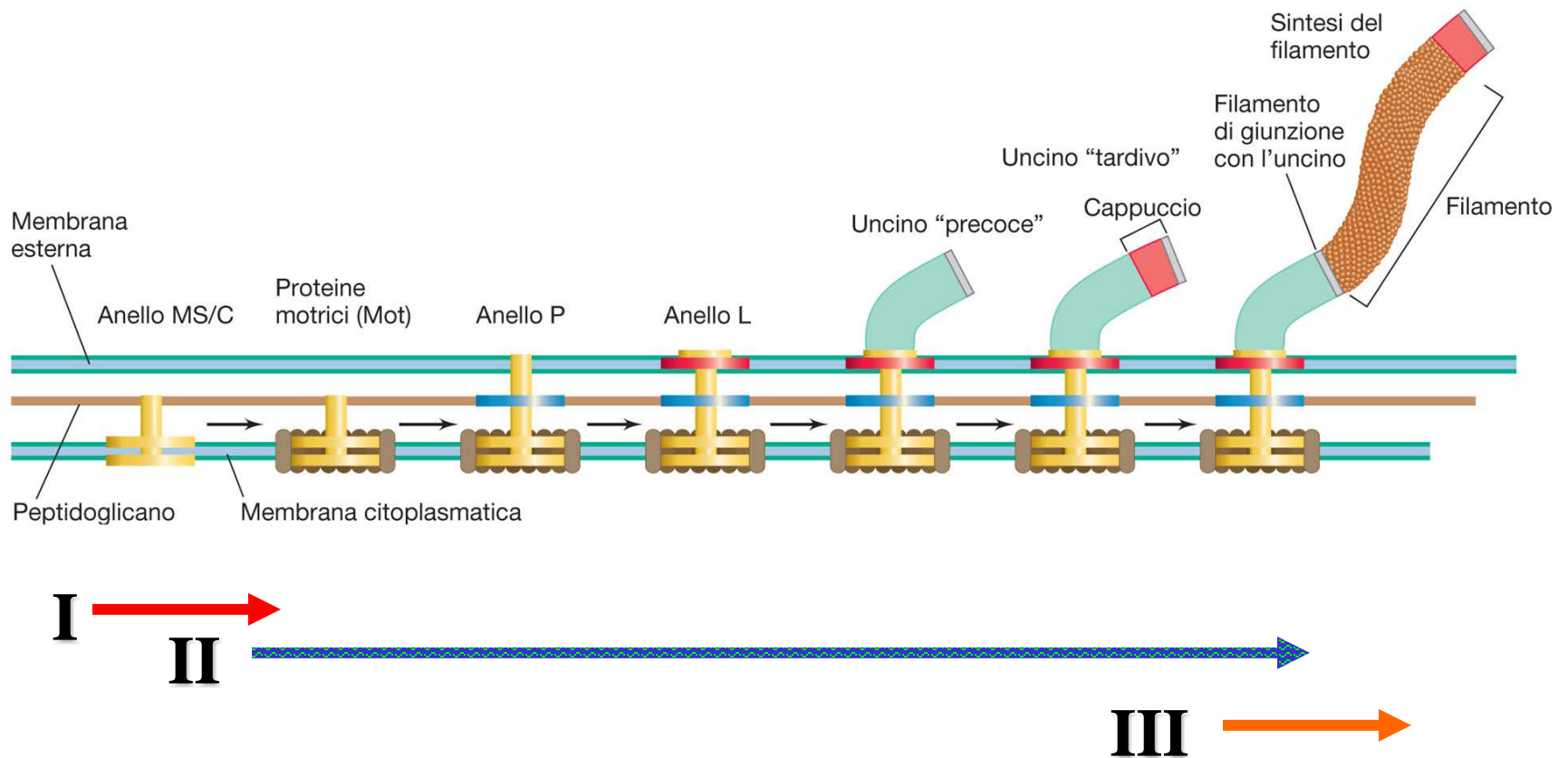
Modello a turbina protonica

I protoni scorrendo attraverso la proteina MOT possono esercitare forza elettrostatica sugli anelli C e MS provocando rotazione del rotore.



La biosintesi del flagello procede dalle strutture più interne alla cellula verso le più esterne ...

I geni coinvolti in questo processo sono molti e sono stati suddivisi in tre gruppi (I, II e III)

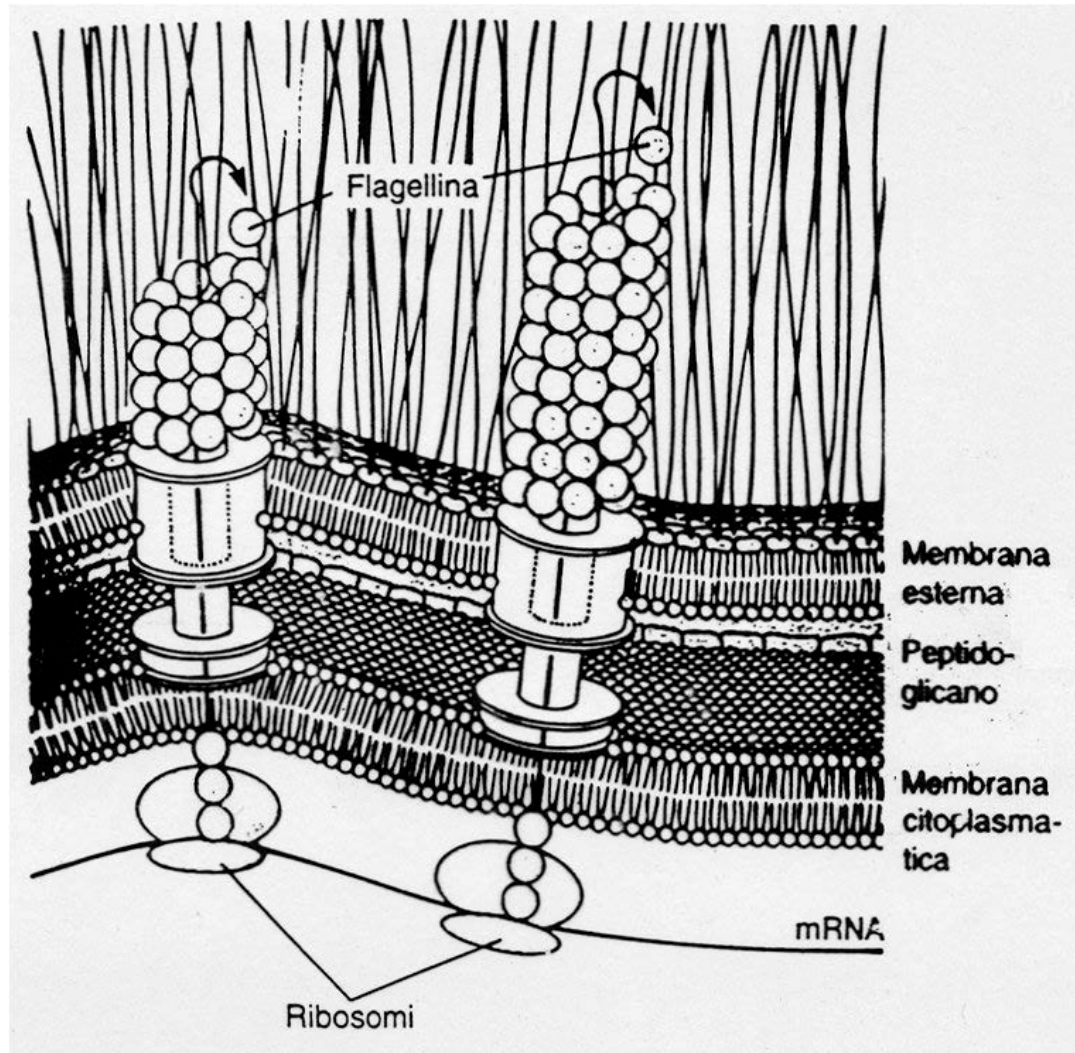


La sintesi inizia con l'assemblaggio dell'anello MS/C localizzato nella membrana citoplasmatica seguito dalla formazione degli altri anelli, dell'uncino e del cappuccio.

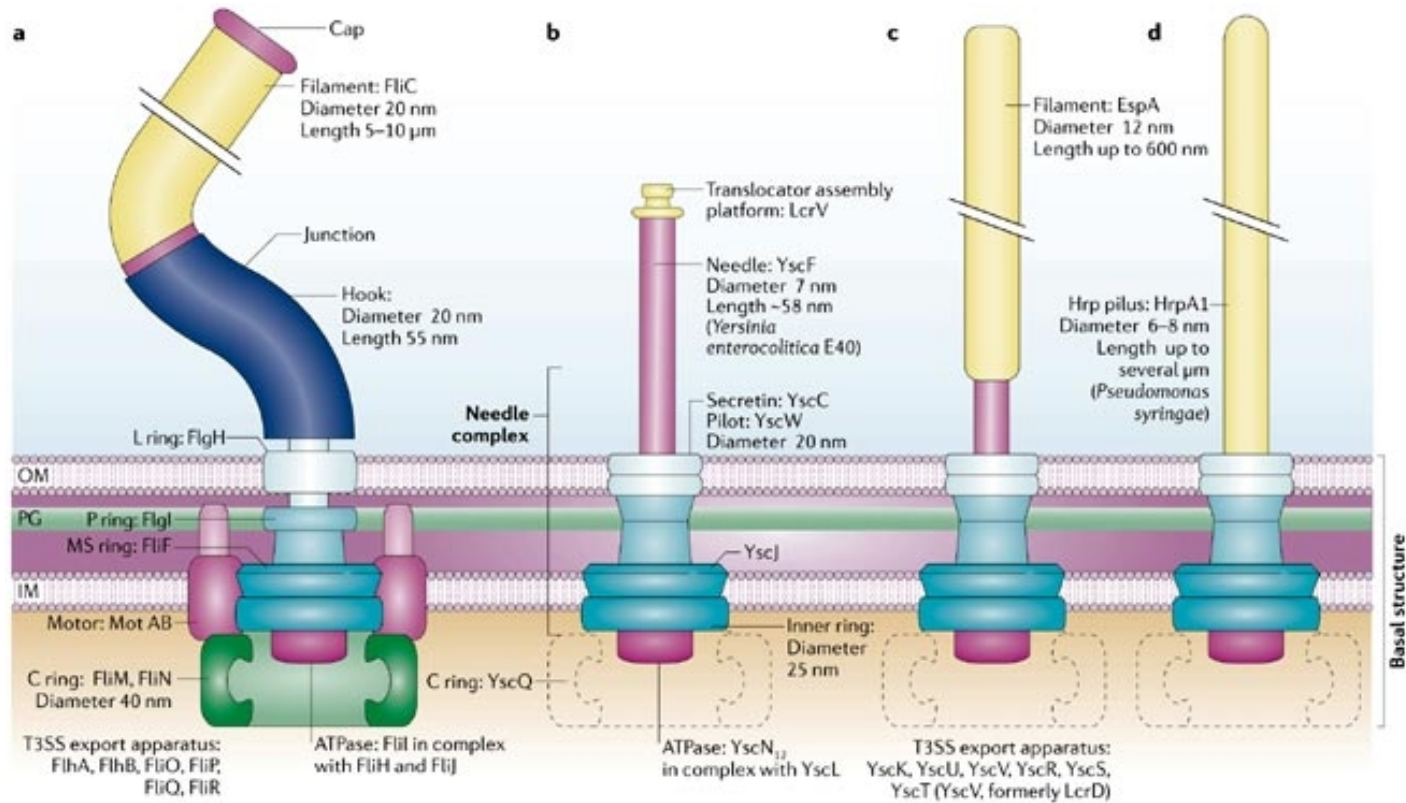
La flagellina scivola all'interno dell'uncino per formare il filamento

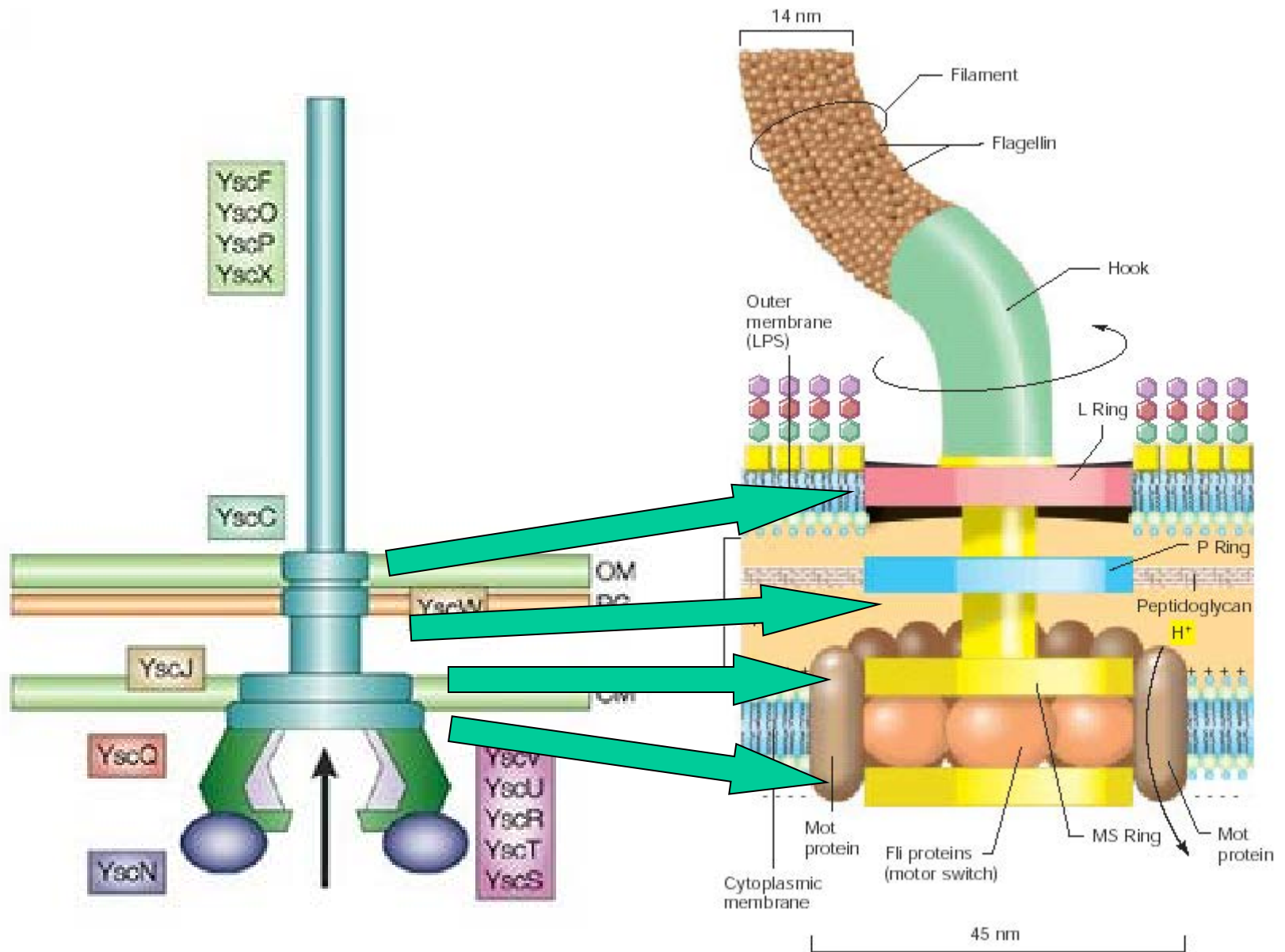
Le proteine cap guidano la flagellina assicurando un corretto assemblaggio del flagello.

Il flagello ha una crescita apicale a differenza del pilo.
Le subunità di flagellina vengono man mano inserite nel
flagello in forma elicoidale



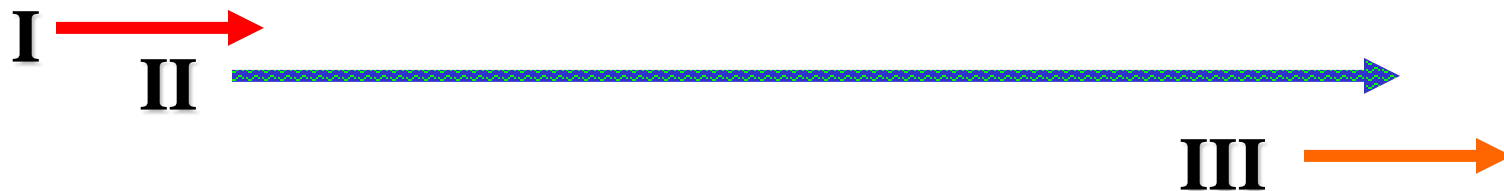
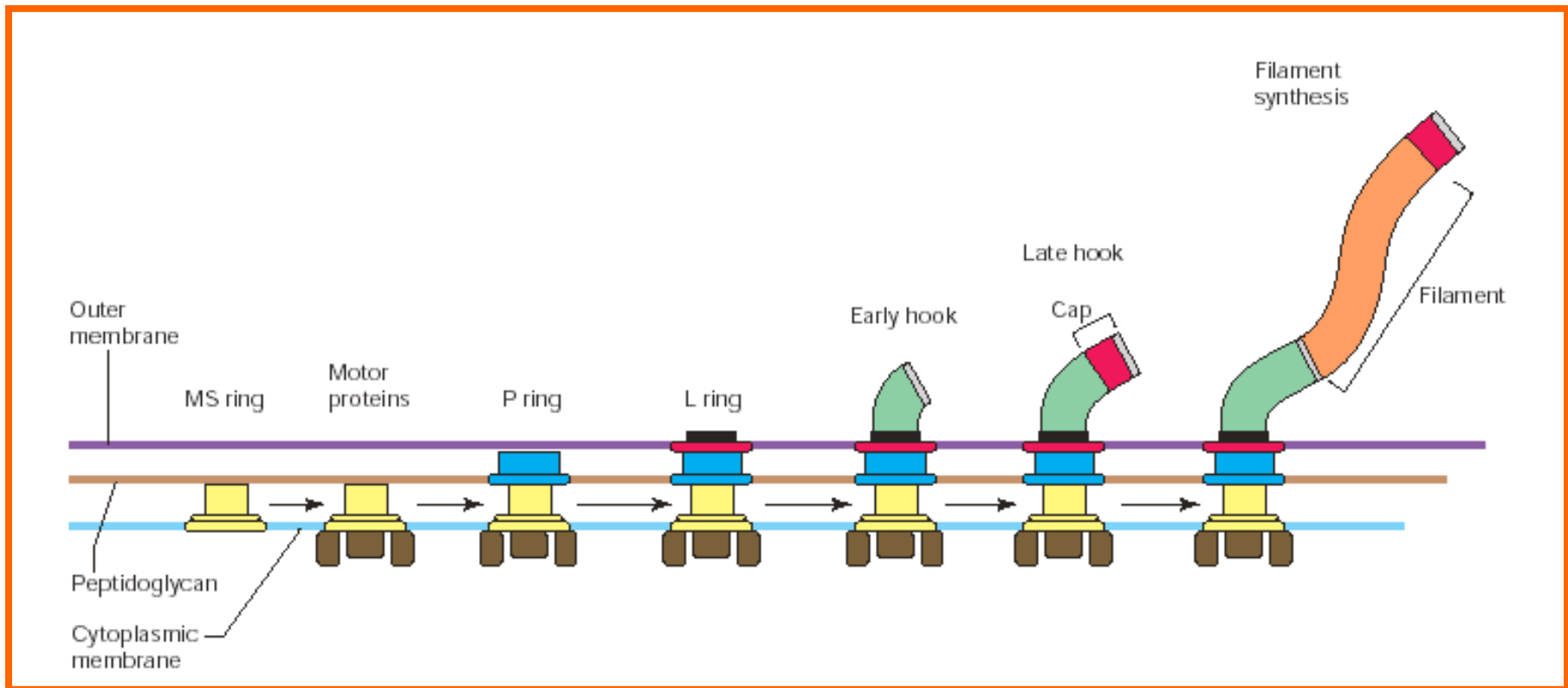
Flagello e sistema di esportazione di tipo III , un 'origine evolutiva comune: struttura dell'iniettosoma





La biosintesi del flagello procede dalle strutture più interne alla cellula verso le più esterne ...

I geni coinvolti in questo processo sono molti e sono stati suddivisi in tre gruppi (I, II e III)



Questo processo è controllato sia a livello trascrizionale che post trascrizionale

Il primo gruppo di geni (detti **geni precoci**) codifica soprattutto i geni regolatori (*flhC flhD*) che sono responsabili dell'attivazione trascrizionale dei geni intermedi

Il gruppo di **geni intermedi** è costituito principalmente da geni per le proteine strutturali del corpo basale e dell'uncino. Inoltre tra questi geni troviamo anche il gene *fliA* e *flgM* responsabili del controllo trascrizionale dei geni tardivi

I **geni tardivi** codificano le proteine strutturali del filamento flagellare, del cappuccio e i geni per la chemiotassi

cAMP/CAP



Regolatori positivi
flhDC(FlhD4C2)

$\sigma 70$

Geni precoci

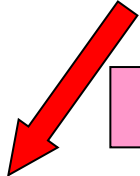
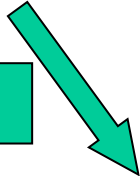


fliA
 σ^{28}

flgM
anti σ^{28}

Geni per la sintesi
• corpo basale
• Uncino(HBB)

+



-

Geni intermedi

Geni tardivi

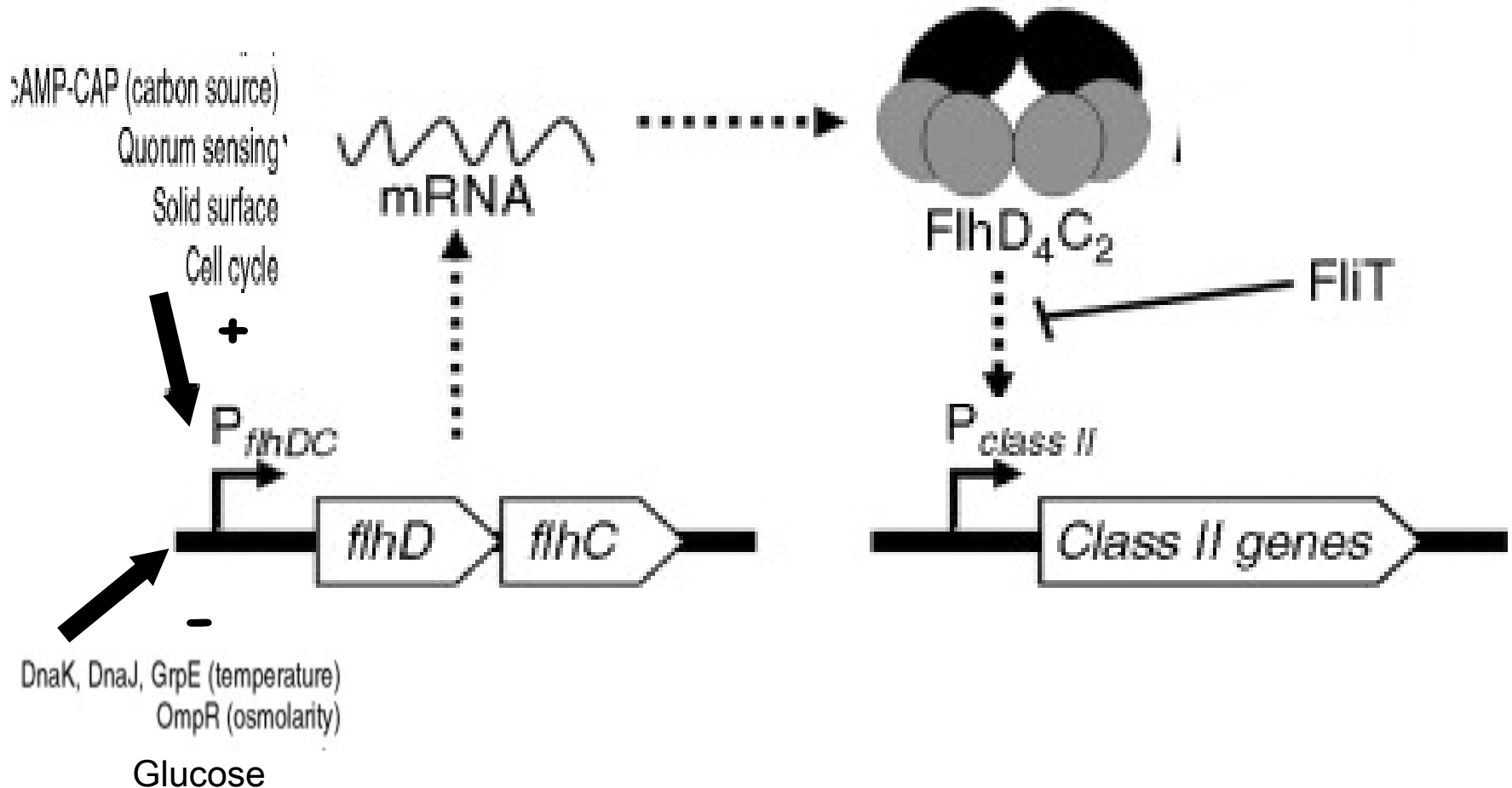
• operone hap

• geni per la flagellina

• geni per la chemiotassi

Attivazione dei geni per la sintesi del flagello

In risposta a segnali ambientali ed in presenza di CAP-cAMP i geni per il complesso regolatore FlhD4C2 vengono attivati



I geni *fliA* e *flgM* codificano rispettivamente un fattore $\sigma(\sigma^{28})$ e il suo anti- σ . Queste due proteine vengono sintetizzate contemporaneamente e, quindi σ^{28} non è subito attiva.

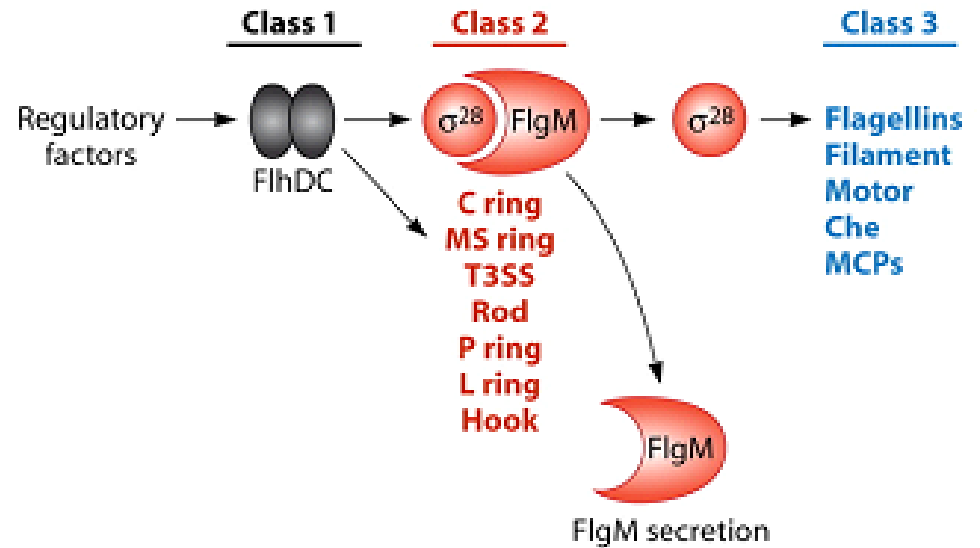
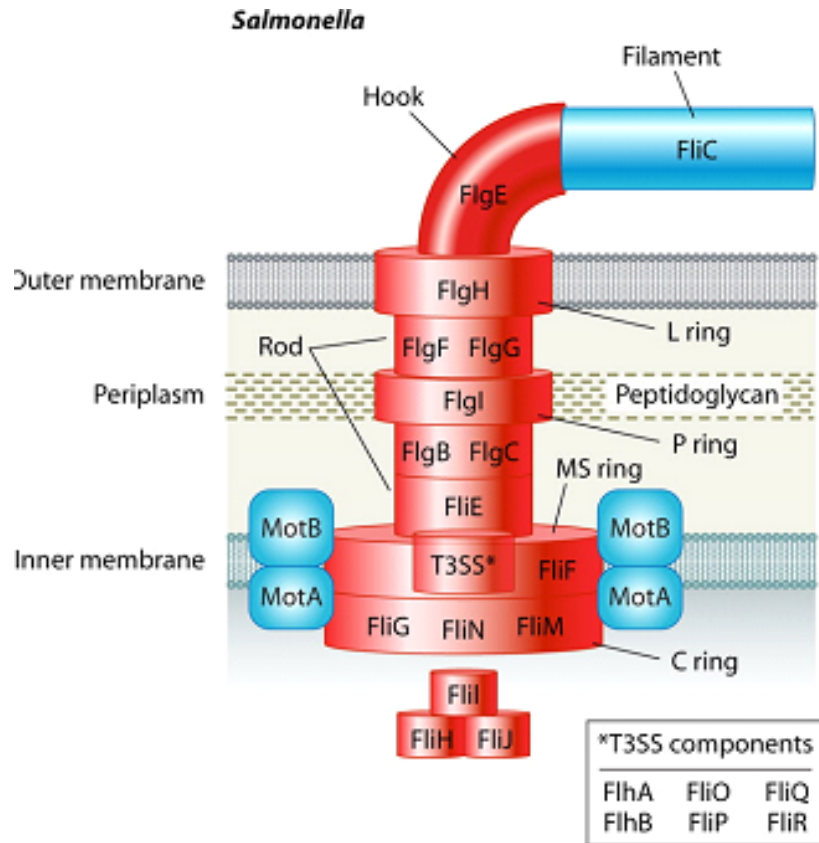
La sua attivazione richiede la eliminazione dal citoplasma cellulare dell'anti- σ

Questa avviene solamente quando l'uncino è completato

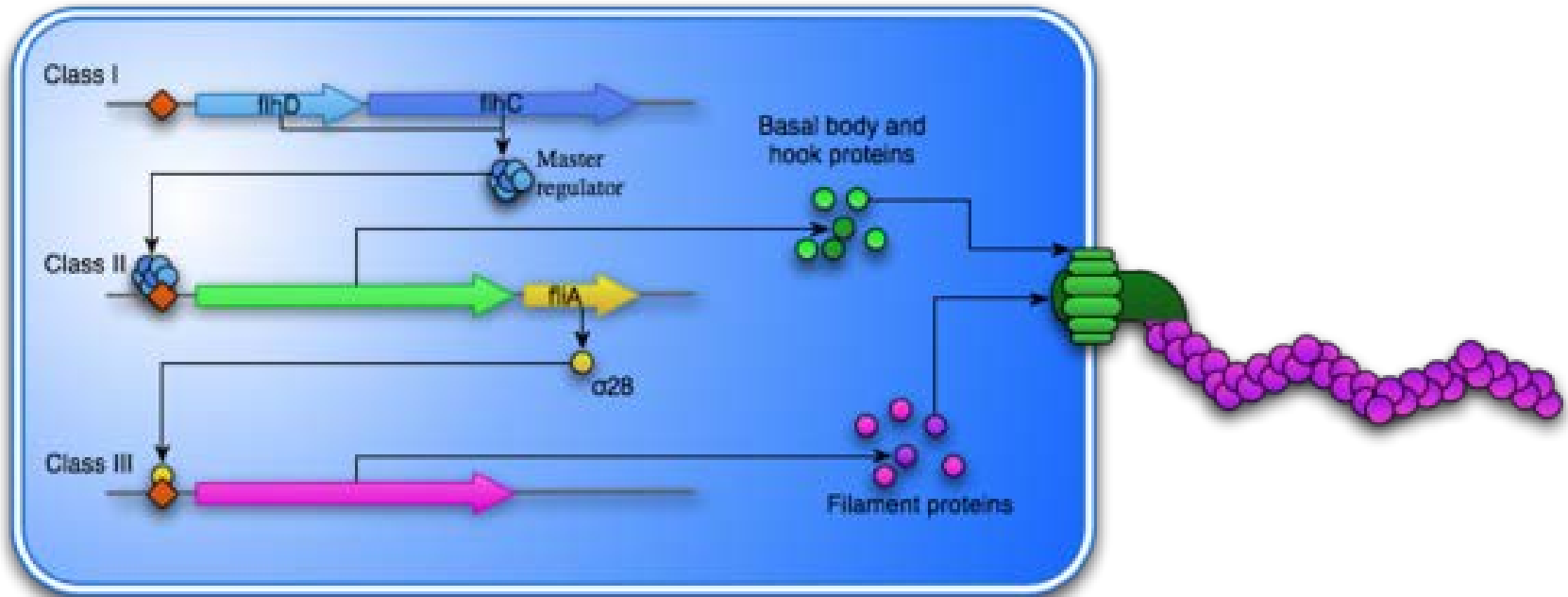
Il corpo basale del flagello si comporta come un sistema di secrezione di tipo III . Esso infatti trasporta tutte le proteine strutturali necessarie per l'assemblaggio del flagello.

Quando viene terminato l'uncino, il sistema di secrezione inizia a trasferire all'esterno della cellula il fattore FlgM, liberando il fattore σ^{28} e permettendo la trascrizione dei geni del gruppo III che porteranno al completamento della struttura del flagello.

Struttura e regolazione del flagello



La cascata di regolazione positiva nella sintesi del flagello



In caso di errore nella sintesi dell'uncino il fattore Sigma 28 rimarrà inattivo perché legato dall'antisigma 28 che non sarà esportato e non avverrà di conseguenza la trascrizione dei geni di classe III inclusi quelli per la flagellina

Il fattore σ^{28} : attivazione e disattivazione

A. Partial basal body-hook

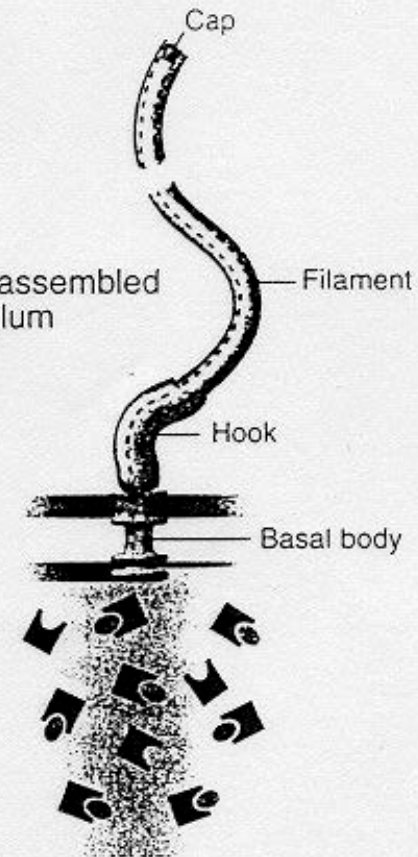


CHECKPOINT!

B. Complete basal body-hook

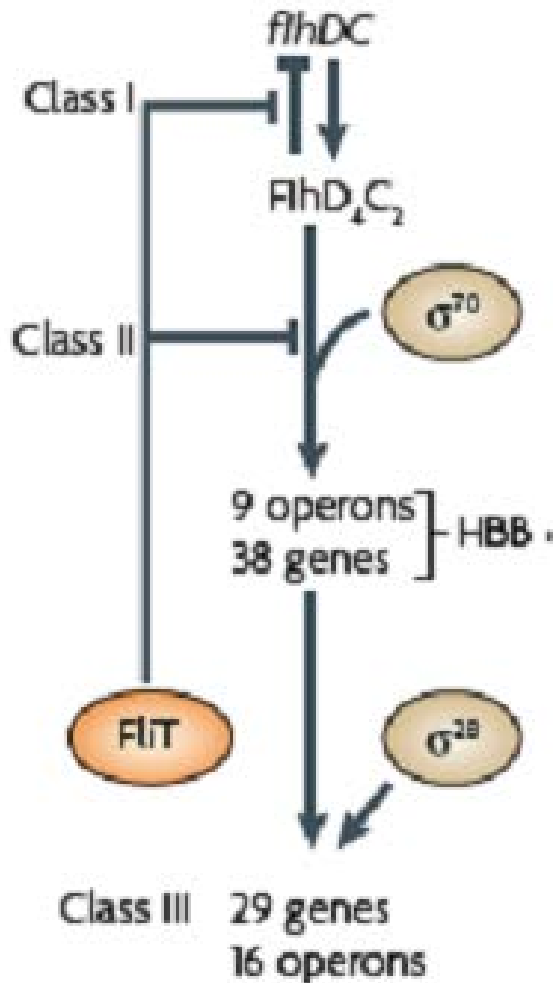


C. Fully assembled flagellum



Flagellar checkpoint.
Coupling flagellar gene expression to flagellar morphogenesis by export of a regulatory protein.

Un altro regolatore FliT

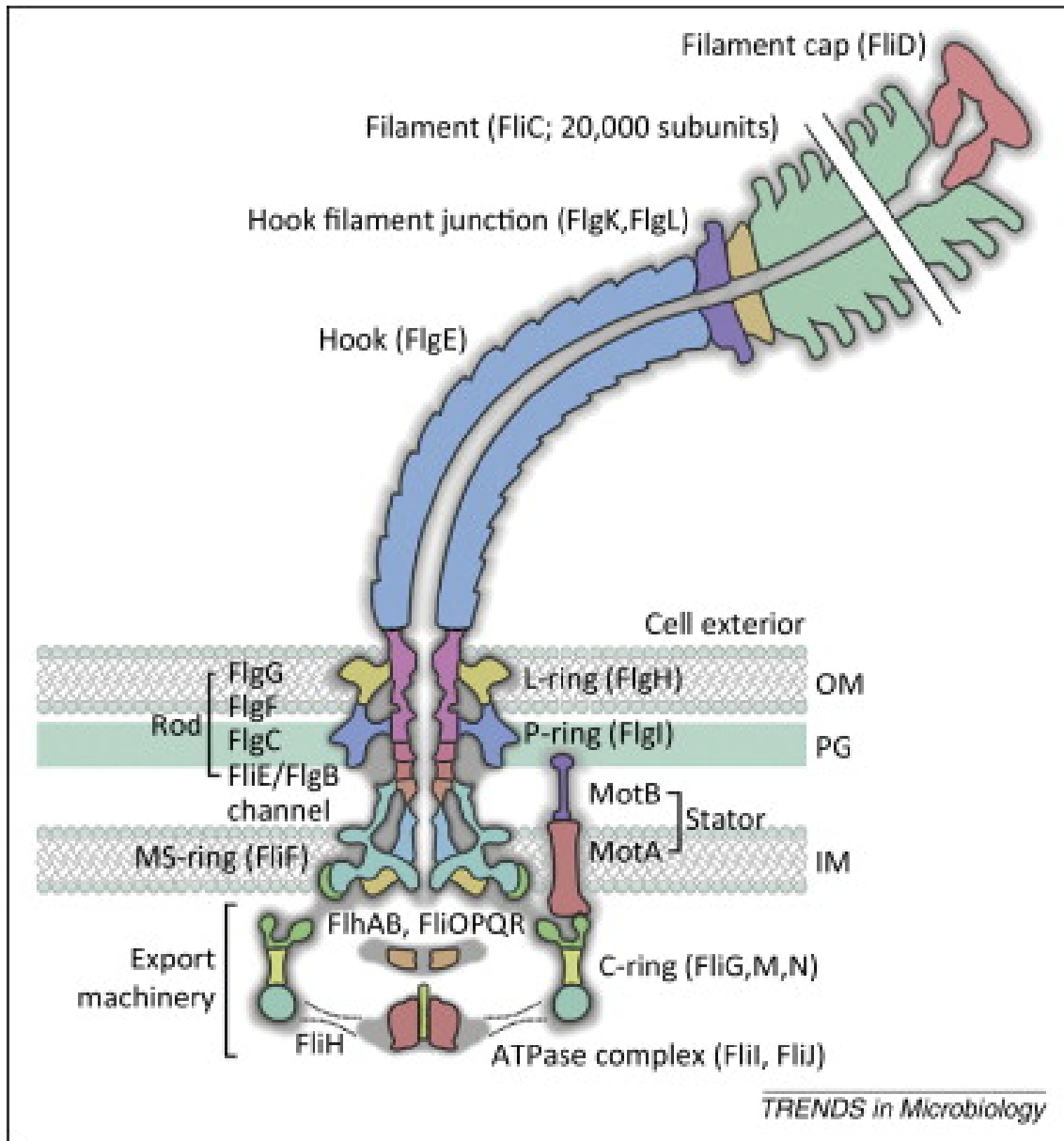


Nel processo di regolazione interviene un'altra proteina **FliT** che è in grado di inibire :

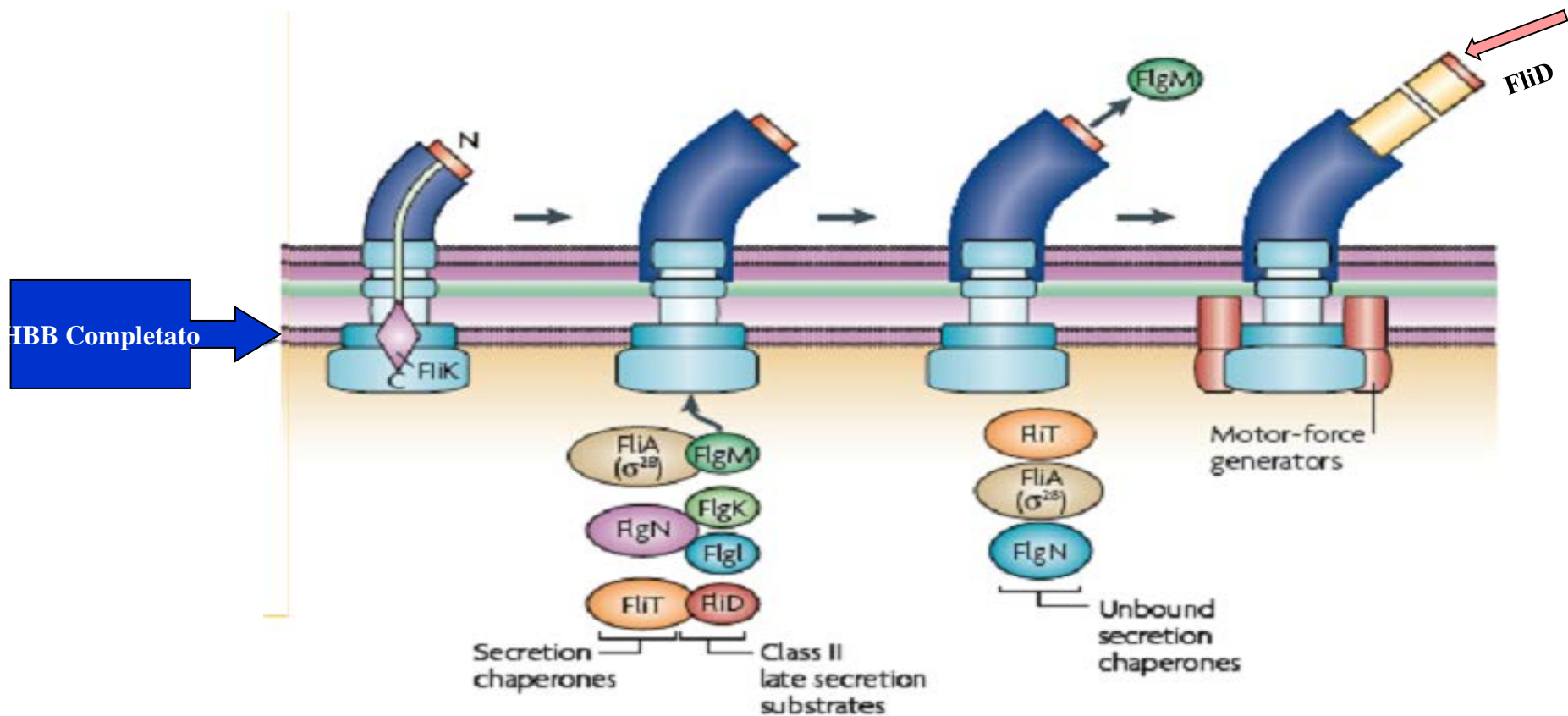
-sia l'attivazione mediata dal complesso $FlhD_4C_2$

-sia l'autoinibizione di $FlhD_4C_2$ facendo così ripartire la sintesi del flagello.

-FliT è inibita da una proteina FlhD una proteina strutturale che costituisce il cappuccio del filamento.



FliD è il cappuccio del filamento :
 quando si trova nel citoplasma lega FliT rendendola inattiva



Quando la sintesi del HBB (Uncino -Corpo basale) è completata si ha un duplice cambio di specificità perché vengono esportati sia FlgM (anti- σ^{28}) che FliD, l'inibitore di FliT.

A questo punto FliT inibisce la sintesi dei geni FlhDC- regolati ed elimina l'autoinibizione del complesso FlhDC sul proprio promotore in modo che il ciclo di regolazione possa ripartire dall'inizio.

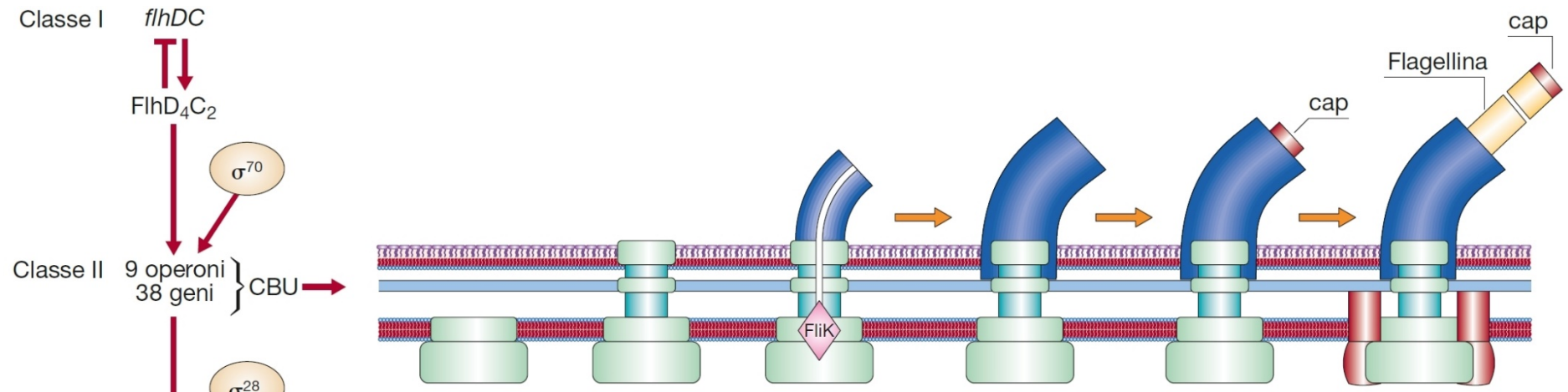
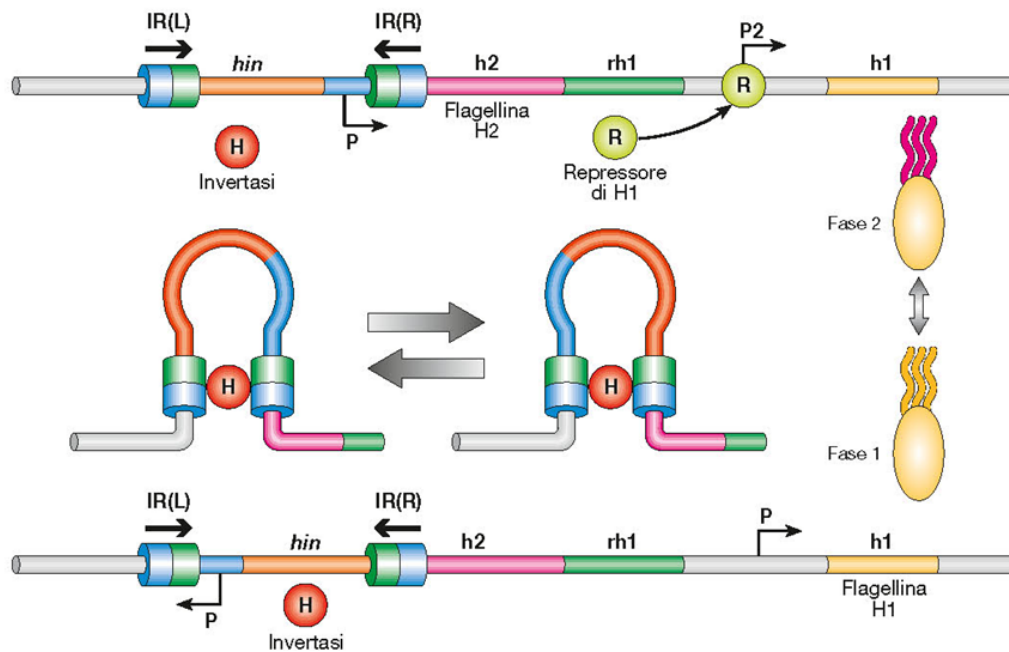


Figura 2.59 ASSEMBLAGGIO DEL FLAGELLO. L'operone *flhDC* è sotto il controllo di numerosi segnali regolatori che portano all'attivazione o all'inibizione dell'espressione dei geni responsabili della biosintesi e assemblaggio del flagello. L'induzione dell'espressione dei geni dell'operone dalla classe I produce FlhD e FlhC che formano il complesso eteromultimerico $FlhD_4C_2$ che agisce direttamente sulla trascrizione σ^{70} -dipendente dei geni flagellari della classe II e reprime la trascrizione dei geni della classe I. I promotori di classe II dirigono la trascrizione dei geni necessari per la struttura e l'assemblaggio del corpo basale e dell'uncino (CBU). Il fattore alternativo σ^{28} promuove la trascrizione dei geni della classe III che codificano per le proteine del filamento flagellare e della chemiotassi (FC).



Variazione di fase in *Salmonella* (classico esempio di ricombinazione sito-specifica)

Hin è un invertasi sito specifica che determina un'inversione del frammento contenente il gene hin e il promotore di h2-rh1. La proteina Fis coadiuvina Hin nell'inversione

Fase 2: il promotore dell'operone che codifica sia la flagellina H2 (h2) che il repressore della flagellina H1 (rh1) è nell'orientamento corretto per la trascrizione. Il repressore di H1 blocca la trascrizione della fase 1 e viene espressa la flagellina H2

Fase 1: il repressore della flagellina di fase 1 (rH1) non viene prodotto in quanto il promotore dell'operone che codifica sia la flagellina H2 che il repressore di h1 è nell'orientamento inverso

Figure 2 | Flagellar components of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Shows the structure of the bacterial flagellum as it resides within the cell wall and membranes (BOX 1). Soluble cytoplasmic components include the FliH–FliI–FliJ ATPase complex, which is thought to deliver a number of the secreted substrates and help determine the order of substrate secretion. The filament protein consists of either FliC or FljB, which are alternately transcribed. The rod cap (FlgJ) and the hook cap (FlgD) are transiently associated with the flagellum during rod and hook polymerization, respectively. FliK is secreted during rod–hook polymerization as a molecular ruler that couples rod–hook length to the flagellar secretion specificity switch at FlhB.

Legenda diapositiva 11

Figure 3 | Coupling of flagellar gene regulation to flagellum assembly. The *flhDC* operon, or flagellar master operon, is under the control of numerous global regulatory signals that lead to the expression or inhibition of flagellar gene expression. Induction of the class I *flhDC* operon (class I on) produces FlhD and FlhC, which form a heteromultimeric complex, FlhD₄C₂, that acts to direct σ^{70} -dependent transcription from class II flagellar promoters and auto-repress *flhDC* transcription (class I off; class II on). Class II promoters direct the transcription of genes that are necessary for the structure and assembly of the hook–basal body (HBB) substructure. Upon HBB completion, late secretion substrates are exported from the cell and their cognate chaperones are released to regulate gene expression. FliT is an FlhD₄C₂ factor and prevents both FlhD₄C₂ auto-repression and the activation of class II promoters. The σ^{28} transcription factor directs the transcription of class III promoters, which include the filament structural genes and the genes of the chemosensory pathway (class I on; class II off; and class III on). Activation of class I transcription would re-initiate the flagellar regulon for a new round of flagellar gene expression. As drawn, the FliK and FlhA proteins are meant to reside within the C ring. The stoichiometries of Fluke, FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ and FliR within the C ring are not known.

Legenda diapositiva 25

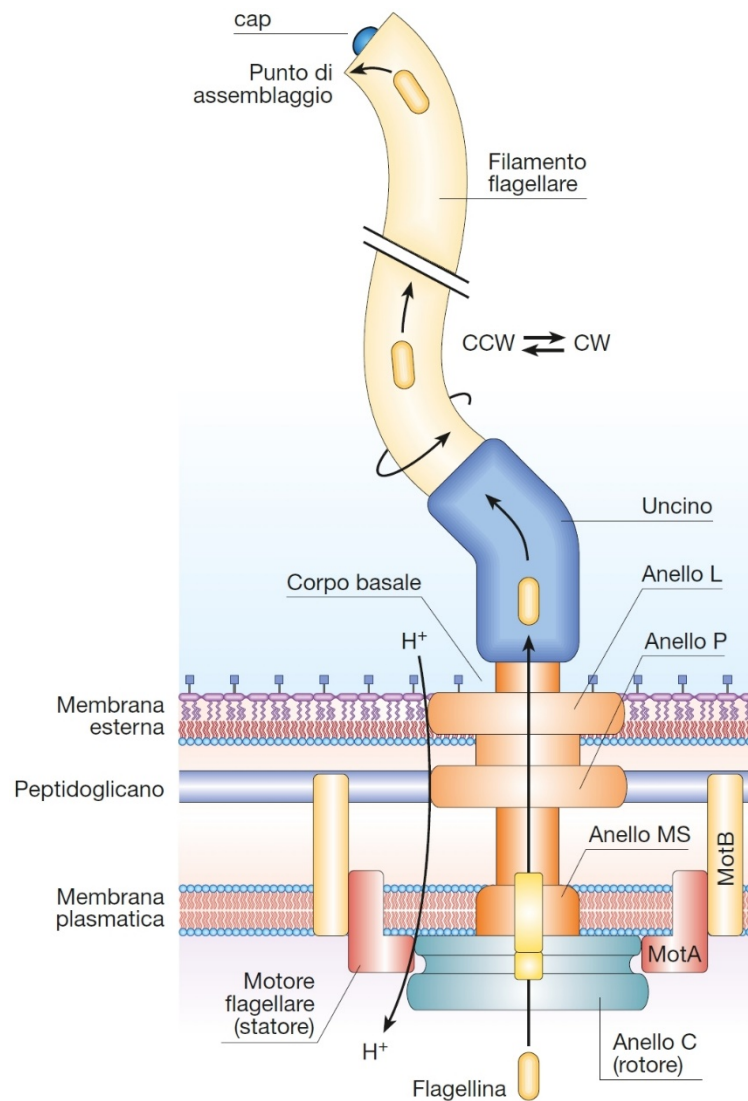


Figura 2.53 STRUTTURA DEL FLAGELLO DI UN BATTERIO GRAM NEGATIVO. Il flagello è costituito da tre parti: il filamento flagellare, l'uncino e il corpo basale. Il flusso protonico attraverso la membrana plasmatica determina la rotazione del rotore e del filamento flagellare. CCW e CW indicano la rotazione del filamento in senso antiorario (*counterclockwise*) e orario (*clockwise*), rispettivamente. Cap: proteina necessaria per l'assemblaggio delle subunità di flagellina.