



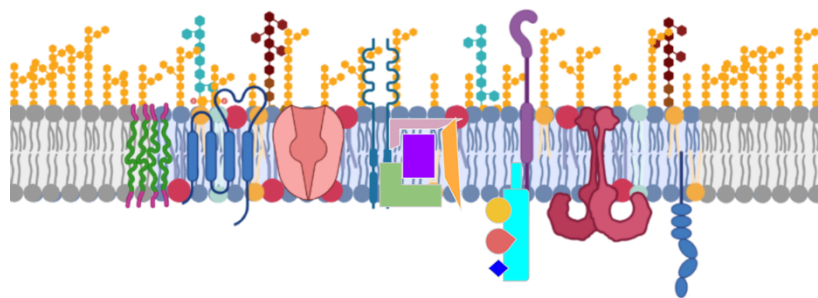
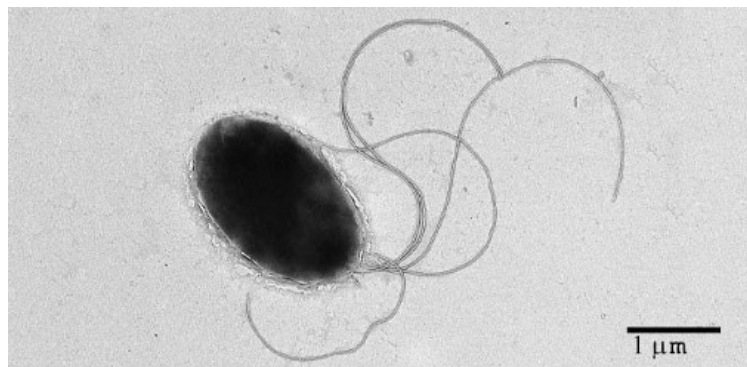
Facultad de Biología

Departamento de Microbiología



Grado en Biología

**La flotilina y su importancia en el ensamblaje del sistema de secreción de tipo VI y del flagelo en *Pseudomonas putida***



**Trabajo de Fin de Grado**

**Javier de la Peña Noya**

**Tutora / Directora: Patricia Bernal Guzmán**

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	<b>2</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>8</b>
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	<b>9</b>
3.1. Lista de acrónimos. ....	9
3.2. Bacterias, plásmidos, cebadores y medios de cultivo .....	9
3.3. Análisis <i>in silico</i> de la proteína FloA en <i>Pseudomonas</i> .....	12
3.4. Construcción del mutante <i>floA</i> por delección .....	12
3.2.1. Digestión y ligación .....	13
3.5. Ensayo de competición .....	13
3.6. Ensayo de secreción. ....	14
3.6.1. Preparación muestras de secreción y de células completas .....	14
3.6.2. Western-Blot. ....	15
3.7. Ensayo de motilidad flagelar .....	15
<b>4. Resultados</b> .....	<b>16</b>
4.1. Identificación de la proteína FloA en <i>P. putida</i> .....	16
4.2. Construcción de la cepa $\Delta floA$ . ....	16
4.2.1. Construcción del fragmento $\Delta floA$ . ....	17
4.2.2. Subclonación del fragmento $\Delta floA$ en pSEVA612. ....	18
4.2.3. Generación del mutante <i>floA</i> usando la técnica <i>SceI</i> .....	18
4.3. La ausencia de FloA no disminuye la capacidad de eliminar <i>E. coli</i> .....	21
4.4. La ausencia de FloA no interfiere en la capacidad de secretar Hcp1 .....	22
4.5. El ensamblaje del flagelo no se ve afectado en ausencia de FloA .....	24
<b>5. Discusión</b> .....	<b>25</b>
<b>6. Conclusiones</b> .....	<b>27</b>
<b>7. Bibliografía</b> .....	<b>27</b>

## RESUMEN

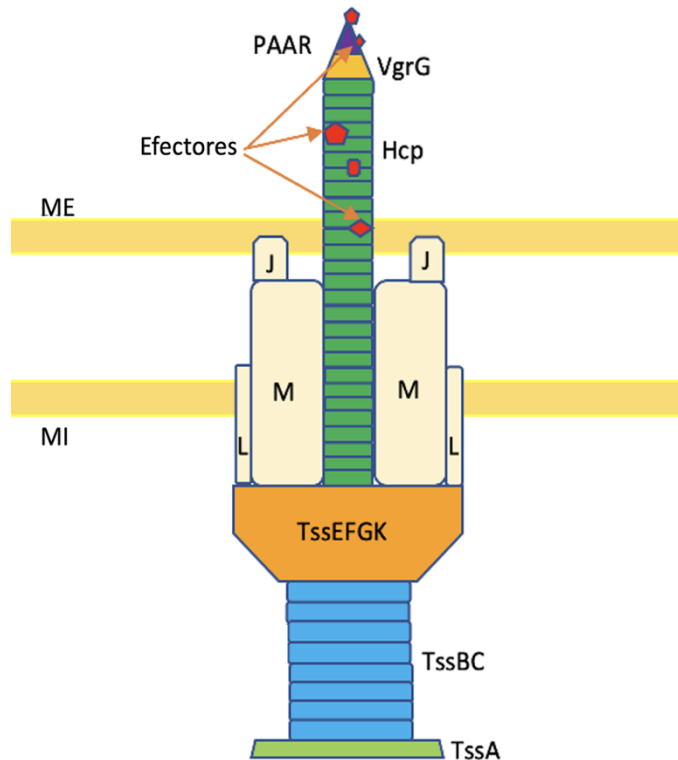
*Pseudomonas putida* es una bacteria colonizadora de la rizosfera de plantas de interés agrícola. Esta bacteria utiliza los flagelos para desplazarse lo que le permite una correcta localización en la planta desde donde puede llevar a cabo su función como agente de control biológico, eliminando patógenos de plantas. Uno de los principales mecanismos que utiliza *P. putida* para eliminar fitopatógenos y otras bacterias competidoras es el sistema de secreción de tipo VI (T6SS). Tanto el flagelo como el T6SS son complejos macromoleculares que se ensamblan en la envoltura celular traspasando tanto la membrana interna como la externa en bacterias gram-negativas. Las proteínas y lípidos de la bicapa lipídica son fundamentales para que las proteínas de membrana de sistemas macromoleculares se inserten de forma correcta y puedan llevar a cabo su función. En procariotas, se han descrito recientemente unos dominios específicos denominados microdominios funcionales de membrana (MFM) que parecen ser responsables de proporcionar el ambiente necesario para el ensamblaje de macrocomplejos proteicos. En los últimos años, se ha descrito la presencia de una proteína de andamiaje presente en los MFM en *Staphylococcus aureus* denominada FloA y que facilita el correcto ensamblaje de algunos sistemas multiproteicos, que se insertan en la membrana, como el T7SS. En este trabajo hemos identificado en *P. putida* la proteína homóloga de FloA de *S. aureus*. Esta proteína está codificada por el locus PP\_0199 denominado *qmcA* (nombre del gen original) y que hemos rebautizado como su homóloga en *S. aureus*, FloA. En este proyecto hemos estudiado el papel de FloA de *P. putida* en el ensamblaje y la actividad del T6SS y del flagelo. Nuestros datos indican que FloA no es determinante para el correcto funcionamiento de ninguno de estos complejos multiproteicos de *P. putida*.

## 1. Introducción

---

*Pseudomonas putida* es una bacteria gram-negativa, saprofita y ubicua del suelo que es utilizada como agente de control biológico para la protección de cultivos (Volke *et al.*, 2020). *P. putida* tiene una gran capacidad de desplazamiento gracias a que posee entre cinco y siete flagelos lo que le permite ser una excelente colonizadora de la rizosfera. Esta rápida y eficiente colonización es clave para sus funciones como agente de control biológico, ya que al colonizar la raíz puede eliminar patógenos de plantas (fitopatógenos) que llegan a la misma evitando la infección (Harwood *et al.*, 1989; Ho *et al.*, 2014). La cepa utilizada en este trabajo, KT2440R, está muy bien caracterizada y es utilizada como modelo en muchos laboratorios debido, entre otros factores, a su alta versatilidad metabólica (Volke *et al.*, 2020) y sus propiedades de biocontrol. El mecanismo principal que utiliza *P. putida* para eliminar fitopatógenos es el sistema de secreción de tipo VI o T6SS (de sus iniciales en inglés Type VI Secretion System) (Bernal *et al.*, 2017).

El sistema de secreción de tipo VI es una nanomáquina molecular que se encuentra en más del 25% de bacterias gram-negativas. Este sistema es un complejo macromolecular que secreta efectores / toxinas al interior de bacterias competidoras inhibiendo su crecimiento o incluso matándolas (Ho *et al.*, 2014). Su función principal es la competencia interbacteriana, pero también participa en la interacción de las bacterias con sus hospedadores y en la adquisición de nutrientes (Lin *et al.*, 2017). El T6SS es un complejo macromolecular que se ensambla a nivel de envoltura celular y que lo forman tres componentes principales: el complejo de membrana (TssJLM) donde las proteínas TssL y TssM son proteínas transmembrana de la membrana interna y TssJ es una lipoproteína que ancla el complejo a la membrana externa; la placa base (TssEFGK); la vaina contráctil (TssBC); la proteína TssA, encargada de reclutar a las proteínas que componen la placa base y de promover la polimerización de la cola; y por último la cola formada por un tubo interno de anillos hexaméricos de proteínas Hcp que termina en una estructura en forma de punta formada por las proteínas VgrG y PAAR. Los efectores se encuentran asociados a los diferentes componentes de la cola (**Figura 1**) (Aschtgen *et al.*, 2010; Brunet *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017; Zoued *et al.*, 2016; Planamente *et al.*, 2016).

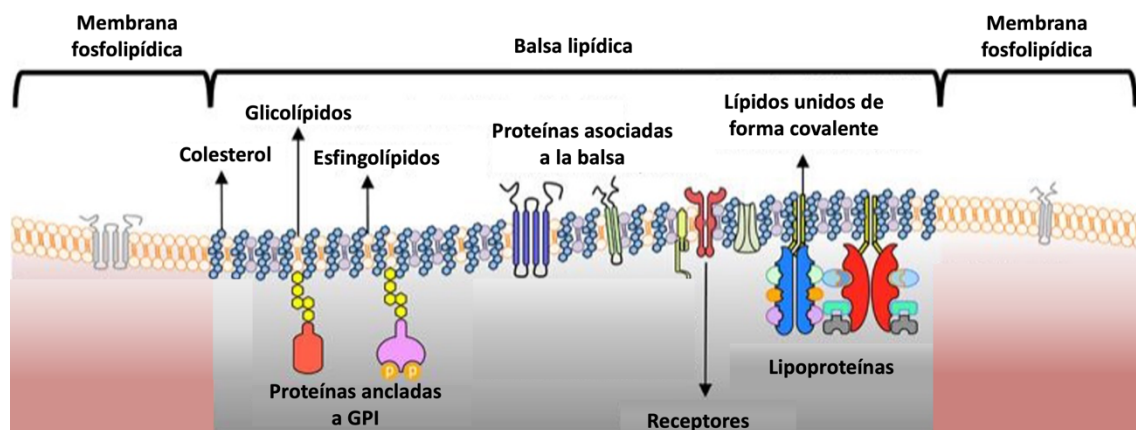


**Figura 1. Representación esquemática del sistema de secreción tipo VI.** Componentes de la placa base (TssEFGK) en color naranja, componentes del complejo de membrana (TssJLM) en color beige, componentes de la vaina (TssBC) en color azul, componentes del tubo interno (Hcp) en color verde oscuro, naranja (VgrG) y morado (PAAR) la punta del sistema. Anillo hexamérico de proteínas TssA en color verde claro.

Las bacterias utilizan el flagelo para su locomoción a través de medios líquidos y superficies húmedas, además de para la adhesión, la colonización de raíces y la formación de biopelículas (Kirov, 2003). El flagelo es un filamento helicoidal externo de gran longitud cuyo ensamblaje ocurre a nivel de envoltura celular (Erhardt *et al.*, 2010). Dependiendo de la especie bacteriana, los flagelos varían en número y posición dentro de la célula distribuyéndose alrededor de la superficie celular. Por lo general, más de 50 genes están involucrados en la producción de flagelos, un proceso complejo que requiere coordinación en el espacio y en el tiempo y para ello los promotores y los genes que codifican los diferentes componentes del flagelo se organizan jerárquicamente y se regulan temporalmente durante el ensamblaje (Leal-Morales *et al.*, 2022).

El T6SS y el flagelo son nanomáquinas moleculares que se ensamblan a nivel de envoltura celular expandiéndose a través de la membrana interna, el periplasma y la membrana externa. Estas membranas celulares definen un límite dinámico que está constituido por un conjunto específico de lípidos y proteínas cuya correcta organización influye en todos los procesos celulares (Grecco *et al.*, 2011). En 1972, Singer y Nicolson describieron el modelo pionero del mosaico fluido en el que se describe que los lípidos y

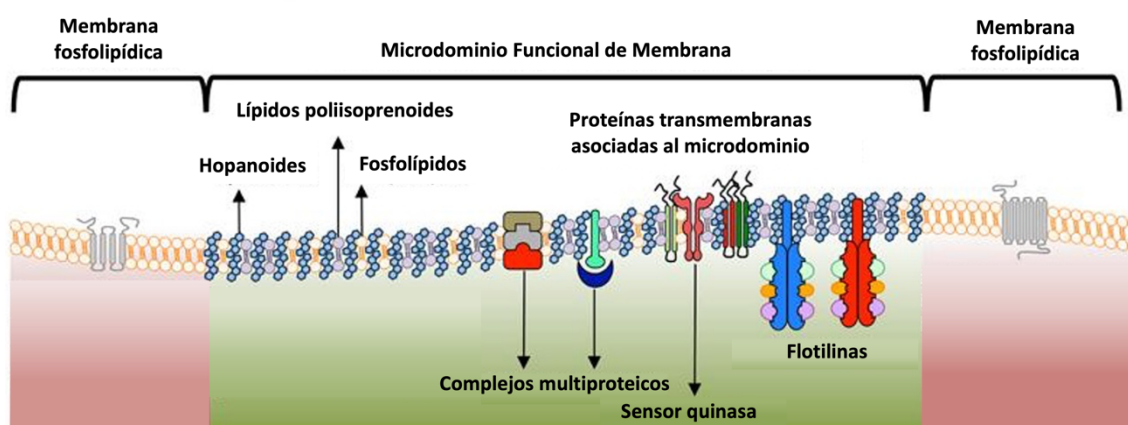
componentes de la membrana difunden libremente siendo distribuidos homogéneamente por la membrana teniendo, de esta manera, movilidad lateral (Singer y Nicolson, 1972). Este modelo dio pie a nuevas investigaciones en células eucariotas sobre la composición de la membrana y se definieron nuevos compartimentos formados por esfingolípidos, colesterol y glicolípidos a los que denominaron balsas lipídicas (**Figura 2**) (Simons e Ikonen, 1997).



**Figura 2. Balsa lipídica.** Esquema de un dominio de membrana en células de mamífero considerado como plataforma de señalización compuesto por proteínas transmembranas y complejos multiméricos involucrados en procesos de señalización. También contiene fosfolípidos, esfingolípidos y colesterol que confieren fluidez a estos dominios (Adaptado de Lopez y Koch, 2017).

Estas regiones en la bicapa lipídica organizan una variedad de proteínas relacionadas con la transducción de señales y el tráfico de membranas en los propios dominios. También poseen una serie de proteínas específicas que varían con el tiempo y se encuentran embebidas en la membrana. Una de las proteínas asociadas a estos dominios de membrana es la flotilina que se define como una proteína de andamiaje (Morrow y Parton, 2005; Simons e Ikonen, 1997). Las flotilinas son chaperonas que se encuentran exclusivamente en estas balsas lipídicas unidas a la membrana. Aquí, reclutan las proteínas que deben localizarse en estos dominios para estar activas y facilitar su interacción y oligomerización, desempeñando un papel central en la organización de éstas (Babuke y Tikkanen, 2007; Zhao *et al.*, 2011). La actividad de la flotilina es importante para la correcta funcionalidad de numerosos procesos celulares asociados a estos dominios como el tráfico de membranas, la transducción de señales y la polarización celular. En consecuencia, la perturbación de estas proteínas de ensamblaje provoca graves defectos en esos procesos (Babuke y Tikkanen, 2007; Zhao *et al.*, 2011).

La existencia de dominios de membrana no es una característica exclusiva de las células eucariotas, también existen en bacterias y arqueas (Lopez y Kolter, 2010; Bramkamp y Lopez, 2015). La organización de la membrana es particularmente importante en los organismos unicelulares ya que representa el límite entre el organismo y el medio ambiente y, por lo tanto, dirige muchos procesos celulares que son esenciales para la vida, como la división celular o la transducción de señales (Barak y Muchová, 2013; Matsumoto, *et al.*, 2006). Son los llamados **microdominios funcionales de membrana (MFM)** los que realizan esta función, los cuales son muy similares funcional y estructuralmente a las balsas lipídicas de células eucariotas (**Figura 3**). Los MFM fueron descubiertos originalmente en estudios de regulación de la formación de biopelículas por el sensor quinasa KinC asociado a la membrana de *Bacillus subtilis* (Lopez y Kolter, 2010).



**Figura 3. Microdominio funcional de membrana.** Esquema de un dominio de membrana de bacterias con diferentes lípidos que funciona como sitio de ensamblaje de complejos multiproteicos cuya oligomerización está facilitada por las flotilinas (Adaptado de Lopez y Koch, 2017).

Estructuralmente, estos microdominios están compuestos a nivel lipídico por farnesol y/o lípidos poliisoprenoides derivados de farnesol, (Feng *et al.*, 2014); hopanooides, lípidos estructuralmente similares al colesterol eucariótico que son importantes para la integridad de la membrana y la adaptación a las condiciones de estrés (Sáenz *et al.*, 2015); y los carotenoides, que tienen propiedades químicas análogas a las





*Staphylococcus aureus* se ha descrito que la ausencia de FloA (SA\_1402), una flotilina bacteriana, evita la correcta oligomerización de proteínas asociadas a los microdominios funcionales de membrana. La ausencia de FloA provoca que los complejos multiproteicos no puedan ensamblarse correctamente en estos microdominios, cómo por ejemplo el sistema de secreción de tipo VII (T7SS) (Mielich-Süss *et al.*, 2017). El T7SS es un complejo multiproteico, que se encuentra anclado en la envoltura celular de bacterias gram-positivas y que al igual que el T6SS en gram-negativas, es un mecanismo de competición interbacteriana (Cao *et al.*, 2016). Por tanto, el ensamblaje de estas nanomáquinas moleculares; como los sistemas de secreción bacterianos, parece asociarse a los **MFM**, aunque hasta el momento son escasos los estudios realizados.

Con el fin de aumentar el conocimiento actual del papel de las flotilinas asociadas a MFM en bacterias gram-negativas, nos planteamos el siguiente objetivo en este proyecto: estudiar el papel de la flotilina en el ensamblaje de complejos multiproteicos (T6SS y flagelo) usando como bacteria modelo el agente de biocontrol *Pseudomonas putida* KT2440R.

## 2. Objetivos

---

El objetivo general de este proyecto es conocer el papel de la flotilina en el ensamblaje de complejos multiproteicos que se localizan en la envoltura celular como el sistema de secreción de tipo VI (T6SS) y el flagelo en *Pseudomonas putida*. Para desarrollar este objetivo principal se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. La construcción de un mutante por delección del gen *floA* (PP\_0199) en *P. putida* KT2440.
2. La realización de ensayos de competición para determinar la eficiencia del mutante *floA* para eliminar a una presa (*Escherichia coli*).
3. La realización de ensayos de secreción para determinar la capacidad del mutante *floA* de ensamblar y disparar el sistema de secreción de tipo VI.
4. La realización de ensayos de motilidad flagelar para determinar la capacidad del mutante *floA* para ensamblar y utilizar el flagelo.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Lista de acrónimos

- Rif: Rifampicina
- Kan: Kanamicina
- Gm: Gentamicina
- Sm: Streptomicina
- LB: Caldo lisogénico (del inglés, Lysogenic Broth)
- LBA: Caldo lisogénico agar (del inglés, Lysogenic Broth Agar)
- PBS: Tampón fosfato (del inglés, Phosphate Buffered Saline)
- SDS-PAGE: Electroforesis en gel de acrilamida con dodecilsulfato sódico
- UFC: Unidades formadoras de colonias
- TBS-T: Solución salina tamponada Tris – Tween (del inglés, Tris Buffered Saline – Tween)

#### 3.2. Bacterias, plásmidos, cebadores, kits y medios de cultivo

Las estirpes y los plásmidos usados en este trabajo se muestran en la **Tabla 1** y **2**, respectivamente. En la **Tabla 3** se muestran los cebadores y en la **Tabla 4** los kits.

**Tabla 1.** Cepas empleadas en este trabajo.

BACTERIAS		
Estirpe	Características	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH5a	F – <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 hsdR17(rK –mK + ) λ–</i>	Hanahan y Glover., 1985
CC118λpir	<i>araD Δ(ara, leu) ΔlacZ74 phoA20 galK thi-1 rspE rpoB argE recA1 λpir</i>	Herrero <i>et al.</i> , 1990
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2440	Rif <sup>R</sup>	Espinosa-Urgel <i>et al.</i> , 2000

<b>KT2440 <math>\Delta floA</math></b>	Mutante por delección del gen <i>floA</i> , Rif <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>KT2440 <math>\Delta tssA1</math></b>	Mutante delección del gen <i>tssA1</i> , Rif <sup>R</sup>	Bernal <i>et al.</i> , 2017
<b>KT2440 <math>\Delta fleQ</math></b>	Mutante delección del gen <i>fleQ</i> , Rif <sup>R</sup>	Laboratorio de Patricia Bernal

**Tabla 2.** Plásmidos empleados en este trabajo.

<b>PLÁSMIDOS</b>		
<b>Plásmidos</b>	<b>Características</b>	<b>Referencia</b>
<b>pTOPO-BluntII</b>	Vector de clonación, ColE1 ori, Kan <sup>R</sup>	Invitrogen
<b>pSEVA612</b>	Vector suicida, con dos sitios de corte SclI, de bajo número de copias, R6K ori, Gm <sup>R</sup>	Martínez-García, E. <i>et al.</i> , 2015
<b>pTOPO_ <math>\Delta floA</math></b>	Vector de clonación con el fragmento $\Delta floA$ , ColE1 ori, Kan <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pSEVA612_ <math>\Delta floA</math></b>	Vector suicida con el fragmento $\Delta floA$ , R6K ori, Gm <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pSEVA428</b>	Vector portador del gen de la endonucleasa SclI, RK2 ori, Sm <sup>R</sup>	Martínez-García, E. <i>et al.</i> , 2015
<b>pRL662-gfp2</b>	Vector que expresa la proteína fluorescente GFP2, Gm <sup>R</sup>	Laboratorio de Erh-Min Lai

**Tabla 3. Cebadores empleados.** Los nucleótidos en mayúsculas representan los sitios de unión de las enzimas de restricción. Los nucleótidos en mayúsculas y en negrita son secuencias homólogas a los siguientes 9 nucleótidos del cebador con el que se va a realizar el solapamiento que terminará formando el fragmento por delección.

CEBADORES	
Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>floA-1</i>	taataaTCTAGAgtggtatctgctgctgctg
<i>floA-2</i>	CTATTTCTCgacttgcatgaacatggcattc
<i>floA-3</i>	ATGCAAGTCgagaaatagtgatgggccaatcgc
<i>floA-4</i>	atatatGGATCCctggcgtggttactggaacg
<i>floA-5</i>	cgctgaacgtgatcgatc
<i>floA-6</i>	gtacaggccctgcacaaag

**Tabla 4.** Kits empleados en este trabajo.

KITS		
Nombre	Función	Referencia
<b>Monarch PCR &amp; DNA Cleanup Kit</b>	Purificación de productos ADN	New England #T1030S
<b>Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System</b>	Purificación de plásmido	Promega #A1460

Los medios utilizados en este trabajo son: caldo lisogénico con agar (del inglés Lysogenic Broth Agar, Condalab), caldo lisogénico líquido (del inglés Lysogenic Broth, Condalab), caldo Super Óptimo con represión catabólica (del inglés Super Optimal broth with Catabolite represión, Condalab), caldo de triptona de soja (del inglés Tryptone Soya Broth, Sigma), Bactotriptona (BD) y cloruro sódico (Sigma). Todos estos productos son autoclavados (15 min a 121°C) para su esterilización.

Las soluciones utilizadas en este trabajo son: Tampón fosfato (PBS del inglés Phosphate Buffered Saline, Sigma #p4417), solución salina tamponada Tris – Tween 10x (TBST del inglés Tris Buffered Saline – Tween (Base de Tris, NaCl, HCl, Tween 20 y H<sub>2</sub>O)).

### 3.3. Análisis *in silico* de la proteína FloA en *Pseudomonas*

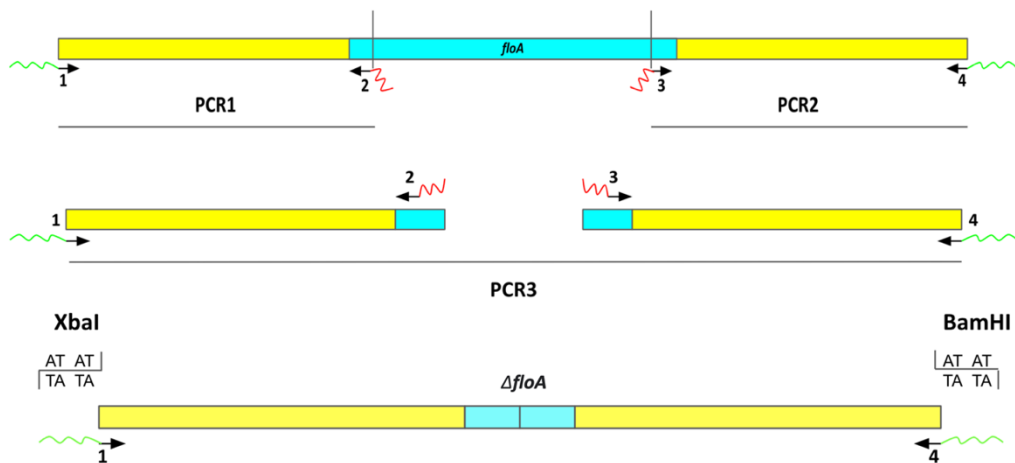
Se identifica la proteína homóloga a FloA (SA\_1402) de *S. aureus* en *P. putida* utilizando como herramientas la base de datos que proporciona la página web del N.C.B.I. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/947537>) y el algoritmo del programa Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comparar proteínas.

### 3.4. Construcción del mutante *floA* por delección

El papel de la proteína FloA de *P. putida* en la funcionalidad del flagelo y el T6SS se evalúa construyendo un mutante limpio del gen *floA*. El proceso se explica en detalle en el apartado 4.2. de los resultados (Construcción del mutante KT2440R\_Δ*floA*). En este apartado se especifican las partes técnicas del proceso.

Para construir el fragmento Δ*floA*, se realiza una primera PCR para amplificar el fragmento aguas arriba (PCR1) con los cebadores *floA-1* y *floA-2*, y una segunda PCR para amplificar el fragmento aguas abajo (PCR2) con los cebadores *floA-3* y *floA-4*. Estos cebadores (**Tabla 3**) fueron sintetizados por Macrogen. El tamaño esperado de las bandas de la PCR 1 y 2 es de 550 pb y 604 pb, respectivamente. La PCR de solapamiento de los productos de la PCR 1 y 2 se realiza con los cebadores *floA-1* y *floA-4* (**Figura 5**). Las reacciones de PCR se programan con una temperatura de alineamiento (T<sub>m</sub>) de 55 °C y se llevan a cabo con la polimerasa KOD (Roche). La extracción de bandas de ADN y la limpieza de la agarosa de los geles se realiza con el kit mencionado en la **Tabla 4**. La extracción de los plásmidos se realiza con el kit de miniprep mencionado en la **Tabla 4**.

El plásmido pSEVA428 se cura inoculando la cepa Δ*floA* consecutivamente en medio LB sin antibióticos hasta que el vector se pierde, al no ser necesario para la supervivencia del organismo. Para identificar las cepas sin el vector se realiza una PCR de cribado con cebadores que amplifiquen una región del plásmido. El hecho de que no aparezca una banda en la PCR indica la ausencia de pSEVA428.



**Figura 5.** Proceso de construcción del fragmento  $\Delta floA$ .

### 3.4.1. Digestión y ligación

La digestión de los plásmidos pTOPO\_Δ*floA* y pSEVA612 se realiza con las enzimas de digestión XbaI y BamHI. La ligación entre el vector pSEVA612 y el fragmento  $\Delta floA$  se realiza con la ligasa T4 DNA Ligase (New England BioLabs, #M0202).

### 3.5. Ensayo de competición

En los ensayos de competición *in vitro* se estudia la funcionalidad del T6SS en la competencia interbacteriana usando como organismo presa *Escherichia coli*.

Los cultivos de las cepas de *P. putida* y *E. coli* se ajustan e igualan a  $OD_{660nm} = 1$  y posteriormente se lavan con PBS 1x. Tras los lavados, se mezclan 100  $\mu$ L de cada bacteria en proporción 1:1 (*P. putida*:*E. coli*) y se siembran 20  $\mu$ L de cada combinación de las cepas de *P. putida* con *E. coli* incubándose durante 5 horas a 30 °C. A tiempo 0 se realizan diluciones seriadas (en este trabajo hasta  $10^{-7}$ ) que se siembran en placas de Petri de 12x12 cm con 50 mL de LBA con antibióticos que permiten seleccionar *E. coli* y *P. putida* de forma independiente. *E. coli* contiene el plásmido pRL662 (Tabla 2), el cual confiere resistencia a gentamicina. En el caso de *P. putida* KT2440R, es un aislado resistente a rifampicina. Tras 5 horas de incubación, se recoge la biomasa con un asa de siembra y se resuspende en 1 mL de PBS. De aquí se preparan diluciones seriadas y se siembran en los medios definidos anteriormente.

Posteriormente, se cuantifican las unidades formadoras de colonia por ml de cultivo (UFC/ml) y se calcula el índice de competitividad que refleja la capacidad de matar de la bacteria que contiene el sistema de secreción de tipo VI. El índice de competitividad se calcula con la siguiente fórmula: índice de competitividad =  $(P. putida$  a las 5h/ $E. coli$  a las 5h)/ $(P. putida$  a las 0h/ $E. coli$  a las 0h). Se han realizado cuatro repeticiones biológicas de este experimento.

### **3.6. Ensayo de secreción**

En los ensayos de secreción se examina la funcionalidad del T6SS de las diferentes cepas en estudio. Para ello se analiza la capacidad de estas cepas de ensamblar y disparar el T6SS. Cuando esto ocurre, la proteína del tubo interno (Hcp1) se encuentra en el sobrenadante y puede ser detectada mediante ensayos de Western-Blot.

#### **3.6.1. Preparación de muestras de secreción y de células totales células completas**

Las distintas cepas de *P. putida* se inoculan en caldo de triptona de soja (Sigma) y se incuban a 30 °C durante 8 h en agitación (180 rpm), condiciones en el que el T6SS de *P. putida* tiene mayor actividad (Bernal *et al.*, 2017; Bernal *et al.*, 2021). Para las muestras de células completas, se recogen cultivos a una OD<sub>660nm</sub> total de 1, se centrifugan a 13.000 g, se descarta el sobrenadante y se resuspenden en 100 µL de tampón Laemmli 1x, un colorante electroforético que desnaturaliza proteínas para ser posteriormente separadas electroforéticamente en un sistema SDS-PAGE (electroforesis en gel de acrilamida con dodecilsulfato sódico).

Para preparar las muestras del sobrenadante se realizan tres centrifugaciones seriadas a 5000 rpm durante 20' donde se van recogiendo volúmenes cada vez menores de sobrenadante (13 mL, 10 mL y 7 mL) de la zona superior para evitar que en la muestra del sobrenadante haya contaminación con células. Tras la última centrifugación se recogen 1,8 mL de sobrenadante y se precipitan las proteínas con ácido tricloroacético (TCA) en frío durante 16 horas. Las muestras se centrifugan durante 30' para concentrar las proteínas, y se lavan los precipitados con acetona 90%. Por último, el precipitado se resuspende en tampón Laemmli 1x para desnaturalizar las muestras de proteína que posteriormente se separan electroforéticamente con un sistema SDS-PAGE.

### **3.6.2. Western-Blot**

Las muestras previamente preparadas se cargan en geles de electroforesis SDS-PAGE que contienen 7,5% y 15% de acrilamida para separar las proteínas (80 V, 15 min; 100 V, 1 h 45 min). Se utiliza el gel de 7,5% para detectar la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa (155 KDa), y el gel de 15% para la detección de la proteína Hcp1 (18 KDa). Los geles de acrilamida se transfieren a una membrana de nitrocelulosa utilizando un sistema de transferencia Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). Posteriormente se bloquean en leche desnatada al 5% (p/v) para prevenir uniones no específicas del anticuerpo. Se retira la leche lavando con una solución de TBS-T. Las membranas se incuban con el anticuerpo primario, se realizan 3 lavados de 10' con TBST-T de nuevo y se incuban con el anticuerpo secundario.

Los anticuerpos primarios son el anticuerpo anti-Hcp1 de conejo (Bernal *et. al*, 2021) y el anticuerpo anti- $\beta$ -ARN polimerasa de *E. coli* (BioLegend, #W0023). Los anticuerpos secundarios son el IgG-HRP anti-conejo de cabra (Sigma Aldrich, #12-348) y el IgG-HRP anti-ratón de cabra (Sigma Aldrich, #AP127P).

Las membranas se lavan tres veces durante 5' con TBS-T antes del revelado. El revelado de los anticuerpos se realiza con el sustrato Immobilon Forte Western HRP (Millipore) y el sistema de imágenes Odyssey® FC (LI-COR BioSciences). Se realizaron dos experimentos independientes.

### **3.7. Ensayo de motilidad flagelar.**

En los ensayos de motilidad flagelar se estudia la funcionalidad y actividad del flagelo de las diferentes cepas observando el halo de crecimiento que generan al sembrarlos en un medio en el que pueden desplazarse. El medio para observar movilidad contiene una concentración de agar muy por debajo a los medios tradicionales de crecimiento para el aislamiento de colonias. Para preparar 600 mL del medio de agar triptona con un 0,3% de agar se necesita: 6 g de Bactotripton, 3 g de NaCl, 1,8 g de agar y se enrasa con H<sub>2</sub>O destilada hasta alcanzar los 600 mL. Tras ser autoclavado, se extiende en placas de Petri de 90 mm de diámetro y se dejan secar durante 4 h en condiciones de esterilidad. Posteriormente se inocula una colonia aislada en el centro de la placa con un palillo de punta redonda y se incuba a 30°C durante 12 h. Para evaluar los resultados de movilidad, se miden los halos de crecimiento.



## 4. Resultados

### 4.1. Identificación de la proteína FloA en *P. putida*

La proteína homóloga a FloA (SA\_1402) de *S. aureus* en *P. putida* fue identificada mediante BlastP como se describe en materiales y métodos. Esta proteína se denomina QmcA y está codificada por el gen *qmcA* (cuyo locus es PP\_0199). QmcA de *P. putida* presenta un 88% de aminoácidos idénticos y un 9% de aminoácidos similares (de alta similitud fisicoquímica) con la proteína FloA de *S. aureus*, como se muestra en la **Figura 6**. Dada la alta homología entre ambas proteínas, en este proyecto hemos renombrado a la proteína QmcA como FloA, así como también al gen *qmcA* como *floA*.

Range 1: 24 to 113 [GenPept](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

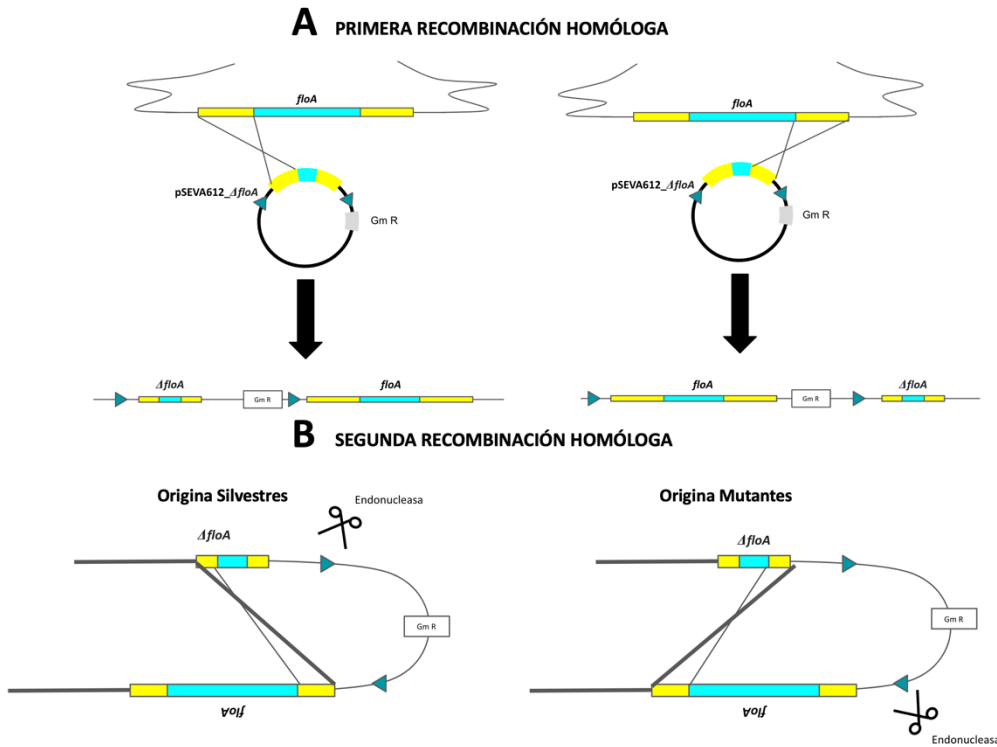
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
169 bits(429)	4e-55	Compositional matrix adjust.	79/90(88%)	88/90(97%)	0/90(0%)
Query 26		REYERGVVFQLGRFWKVGKPGPLVLPVPAIQQMVRIDLRTIVLDVPPQDVISRDNVSVKVN			85
Sbjct 24		REYERGVVFQLGRFW+VKGKPGPL+L+IP IQQMVR+DLRT+VLDVPPQDVI+RDNVSVKVN			83
Query 86		AVVYFRVLDPQKAI IQVENYLAATSQLAQT	115		
Sbjct 84		AVLYFRVLDPQKAI IQVE++L ATSQLAQT	113		

**Figura 6.** Alineamiento entre las proteínas FloA de *S. aureus* (“Query”) y QmcA de *P. putida* (Sbjct).

### 4.2. Construcción de la cepa $\Delta floA$

Para estudiar el papel de la flotilina en el ensamblaje de complejos multiproteicos como el T6SS o el flagelo se construyó un mutante limpio del gen *floA* por recombinación homóloga. En este proceso, la región génica que rodea al gen *floA* se intercambia por una copia mutante que tiene delecionado el gen *floA* (fragmento  $\Delta floA$ ) y se introduce en la bacteria en un vector suicida que no replica en *Pseudomonas*. Para que se lleve a cabo el intercambio génico de forma completa, se tienen que dar dos eventos de recombinación, aguas arriba y aguas debajo de la región que se quiere intercambiar (**Figura 7**). El primer evento da lugar a la inserción del vector suicida que lleva el fragmento  $\Delta floA$  y flanqueado por sitios de restricción *SceI*, formando merodiploides con la copia silvestre y mutante de *floA* en el cromosoma. El segundo evento de recombinación resuelve esta estructura con dos posibles resultados: si la recombinación ocurre por el mismo lugar que el primer

evento, se obtiene una cepa silvestre. Si el segundo evento de recombinación ocurre por el sitio contrario, el fragmento mutante se habrá intercambiado por el silvestre y se obtendrá como resultado una cepa mutante con el gen *floA* deleciónado. Para inducir la segunda recombinación, se induce la expresión de la endonucleasa *SceI* con 3-metil benzoato.



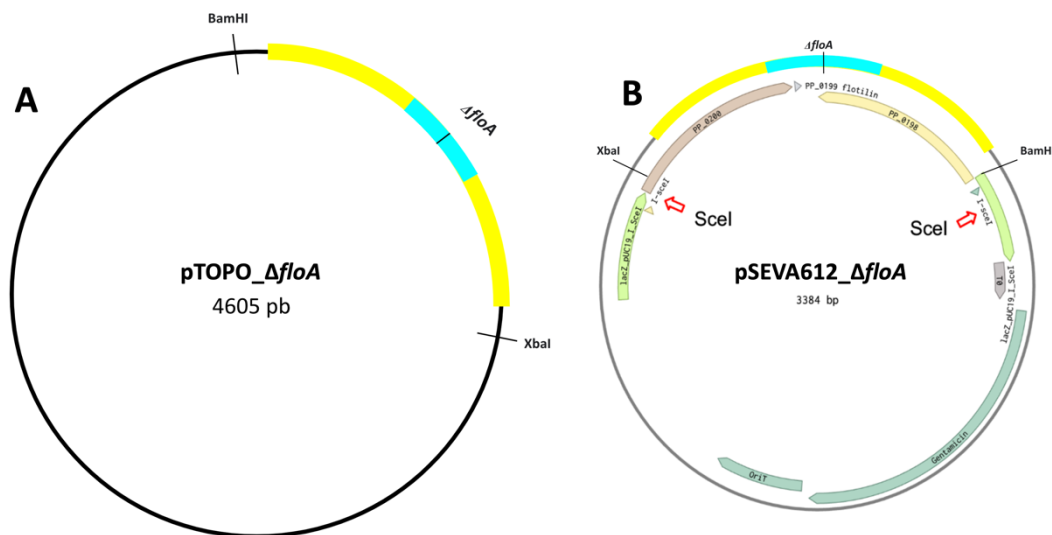
**Figura 7.** (A) Primer evento de recombinación homóloga y (B) Segundo evento de recombinación homóloga.

#### 4.2.1. Construcción del fragmento $\Delta floA$

Para la construcción del fragmento  $\Delta floA$  se realizan una serie de PCRs con el objetivo de amplificar las regiones aguas arriba y aguas abajo del gen *floA* y seguidamente solapar los fragmentos tal y como se describe en Materiales y Métodos (Figura 5). El fragmento  $\Delta floA$  se inserta en un vector comercial lineal (pTOPO) para su secuenciación y posterior subclonación en el plásmido de destino (pSEVA612) dando lugar a la construcción pTOPO\_ $\Delta floA$ . Ésta se transforma en *E. coli* DH5 $\alpha$  y se realiza un cribado por PCR para identificar a las bacterias que hayan incorporado el pTOPO con el fragmento  $\Delta floA$ . Entre los candidatos positivos, se selecciona uno de ellos para extraer el plásmido y confirmar por secuenciación que la construcción es correcta.

#### 4.2.2. Subclonación del fragmento $\Delta floA$ en pSEVA612

Para la subclonación del fragmento  $\Delta floA$  en el vector suicida, se realiza una digestión de los vectores pTOPO\_ $\Delta floA$  y pSEVA612 con las enzimas de restricción XbaI y BamHI. Posteriormente, el fragmento  $\Delta floA$  y el plásmido suicida pSEVA612 con extremos compatibles se ligan según se indica en Materiales y Métodos dando lugar al vector pSEVA612\_ $\Delta floA$ . En esta construcción, el fragmento  $\Delta floA$  queda comprendido entre dos sitios de corte de la endonucleasa ScaI, como se muestra en la **Figura 8**. El producto de la ligación se transforma en *E. coli*  $\lambda pir$  y se realiza un cribado por PCR para identificar los candidatos que han incorporado el fragmento en el plásmido suicida. Entre los candidatos positivos se selecciona uno para extraer el vector que se va a utilizar en el siguiente paso.



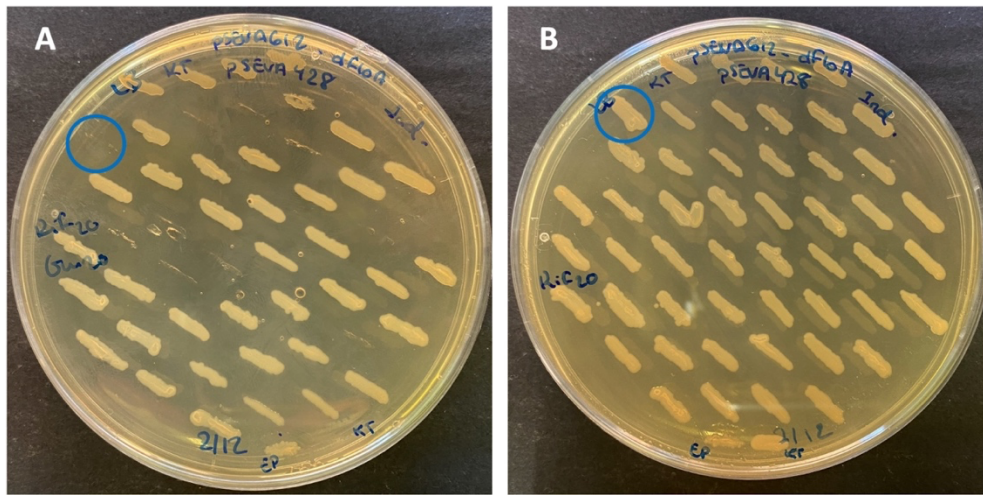
**Figura 8.** (A) Vector lineal pTOPO con el fragmento  $\Delta floA$  y (B) subclonación en el vector suicida pSEVA612

#### 4.2.3. Generación del mutante $floA$ usando la técnica ScaI

El vector suicida con el fragmento  $\Delta floA$  (pSEVA612\_ $\Delta floA$ ) se introduce en *P. putida* mediante electroporación. Esto permite que se dé el primer evento de recombinación homóloga formando cepas merodiploides, bacterias con la versión silvestre y la versión delecionada del gen  $floA$ . Posteriormente, se electropora el plásmido pSEVA428 (un vector con el gen de la endonucleasa ScaI y un marcador de Sm) en las cepas merodiploides para inducir el segundo evento de recombinación. Este segundo evento, originado gracias a la actividad de la endonucleasa ScaI, puede dar lugar a cepas

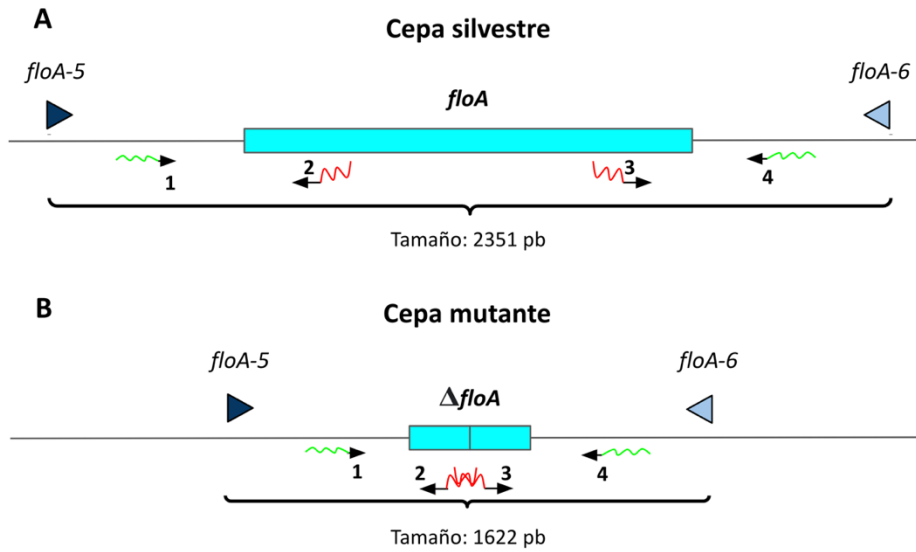
silvestres o mutantes según el sitio donde se dé la recombinación tal y como se describe en Materiales y Métodos y se ilustra en la **Figura 7**.

Tras la inducción del segundo evento de recombinación por la endonucleasa *SceI*, se aíslan colonias que posteriormente se siembran en medio selectivo (Gm) para comprobar que han llevado a cabo el proceso de recombinación (pérdida del vector suicida) (**Figura 9**). En la Figura 9 se pueden ver las estrías en placa de LB Rif (**Figura 9B**) donde deben crecer todas las estrías y en LB Rif Gm (no han llevado a cabo el segundo evento de recombinación). Las colonias que no crecen en la placa de LB Rif Gm pero sí en la placa de LB Rif son los candidatos a mutante.



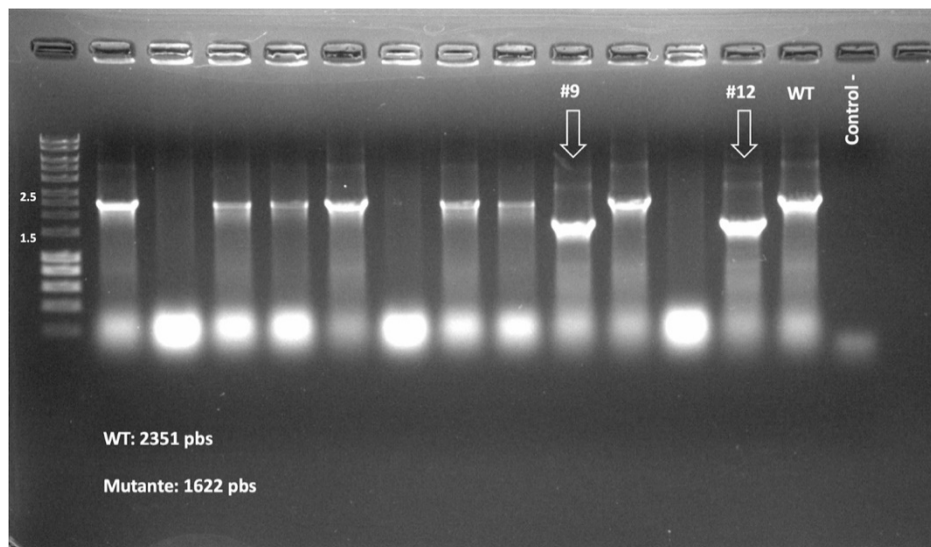
**Figura 9. Placas para determinar los candidatos a mutantes.** (A) Placa de Rif<sub>20</sub> Gm<sub>20</sub> donde sólo crecen los merodiploides ya que poseen el marcador de resistencia a Gm del vector suicida y (B) placa de Rif<sub>20</sub> que sirve de control de biomasa para recuperar los candidatos a mutante.

La PCR para identificar las cepas mutantes se realiza con los cebadores *floA-5* y *floA-6* los cuales se unen a secuencias aguas arriba y aguas abajo del fragmento  $\Delta floA$ , amplificando una región de 1622 pb en el caso del mutante y una región de 2351 pb en el caso del silvestre (**Figura 10**).



**Figura 10.** Región adyacente al fragmento  $\Delta floA$  donde se unen los cebadores *floA-5* y *floA-6*. (A) Fragmento esperado en la cepa silvestre (B) y en la cepa mutante.

De los 12 candidatos analizados, los candidatos #9 y #12 amplifican el tamaño esperado para la cepa mutante (**Figura 11**). Los candidatos #1, #3, #4, #5, #7, #8 y #10 amplifican el tamaño esperado de las cepas silvestre y en el carril 2, 6 y 11 la reacción de PCR no produjo ningún producto.

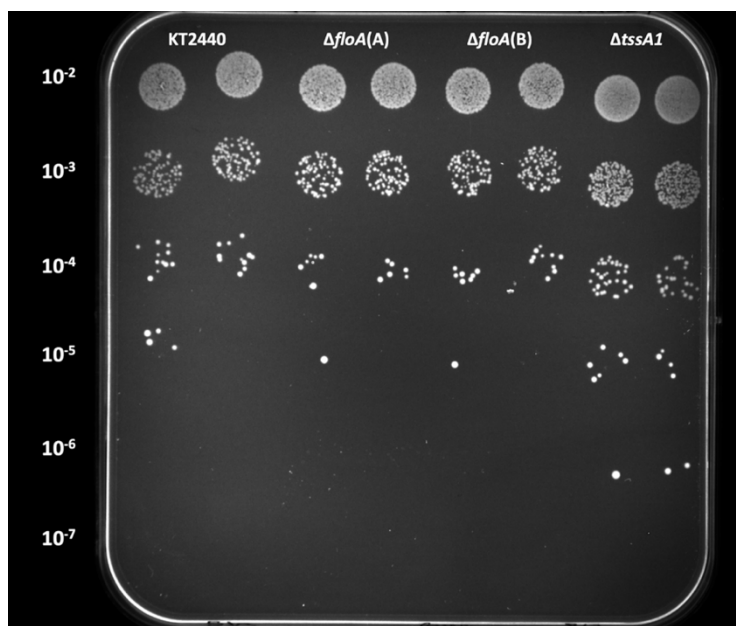


**Figura 11.** PCR de cribado para identificar las cepas mutantes *floA*. El tamaño del fragmento amplificado por PCR para las cepas mutantes es de 1622 pb y de 2351 pb para las cepas silvestres.

Tras confirmar los candidatos mutantes por PCR, se cura el plásmido pSEVA428 como se describe en Materiales y Métodos y se guardan las cepas en glicerol a -80 °C para su conservación hasta la realización de los estudios fenotípicos. Ambos candidatos han sido utilizados en los experimentos realizados a continuación.

### 4.3. La ausencia de FloA no disminuye la capacidad de eliminar *E. coli*

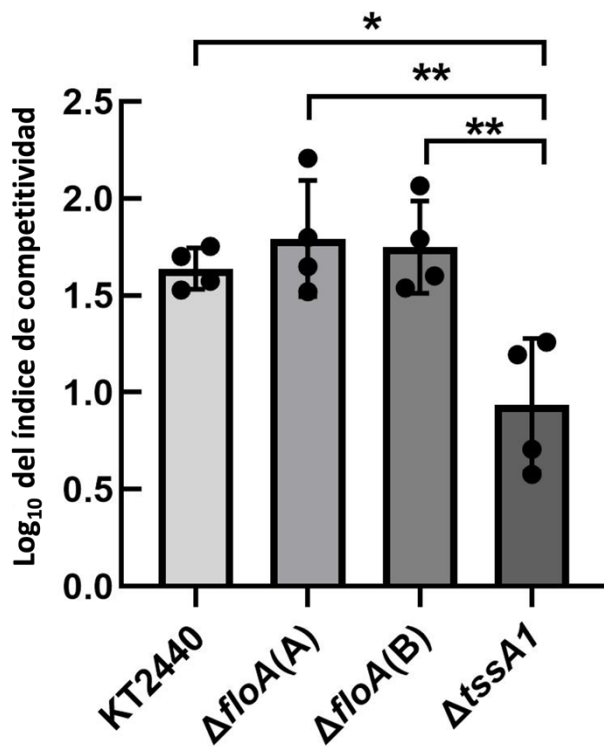
*P. putida* es un eficiente agente de biocontrol que utiliza el T6SS para matar a sus competidores (Bernal *et al.*, 2017). Con el objetivo de estudiar el papel de la proteína FloA en la funcionalidad del sistema de secreción tipo VI, hemos realizado ensayos de competición entre *P. putida* (cepa silvestre y mutante isogénico *floA*) y *E. coli*. Como control negativo utilizamos la cepa mutante  $\Delta tssA1$  que no ensambla el T6SS. En la **Figura 12** se muestra la supervivencia de *E. coli* después de la competición con *P. putida*. Los resultados indican que el mutante *floA* elimina a *E. coli* con la misma eficacia que la cepa silvestre, mientras que la cepa  $\Delta tssA1$  disminuye 10 veces su eficiencia.



**Figura 12.** Supervivencia de *E. coli* tras competir con *P. putida*.

En esta figura se muestra el crecimiento de *E. coli* después de 5h compitiendo con las cepas de *P. putida*. En las columnas crece *E. coli* después de competir con: 1ª y 2ª columna: cepa silvestre KT2440R; 3ª y 4ª columna:  $\Delta floA$  (A); 5ª y 6ª columna:  $\Delta floA$  (B); 7ª y 8ª columna:  $\Delta tssA1$ .

En la **figura 13** se representa el logaritmo en base 10 del índice de competitividad (IC) que indica la capacidad de *P. putida* para matar *E. coli*.

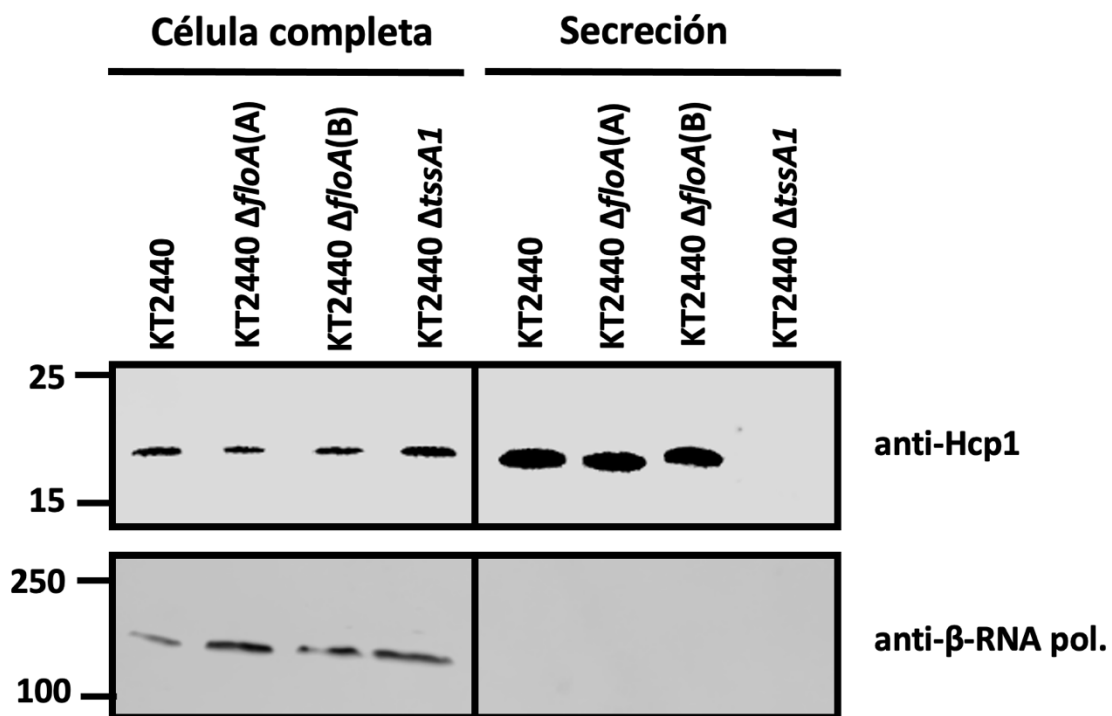


**Figura 13.** Índice de competitividad de las cepas de *P. putida* contra *E. coli*. Se muestra el log<sub>10</sub> del índice de competitividad de *P. putida* KT2440 frente a *E. coli*. Los dos mutantes *floA* tienen un IC similar entre ellos y al de la cepa silvestre (IC = 1,6). Sin embargo, todos ellos tienen diferencias significativas con la cepa  $\Delta tssA1$  (IC = 0,9).

Estos resultados demuestran que la proteína FloA no está implicada en el ensamblaje del T6SS en *P. putida*.

#### 4.4. La ausencia de FloA no interfiere en la capacidad de secretar Hcp1

De forma complementaria, estudiamos la funcionalidad del sistema de secreción de tipo VI detectando la presencia de la proteína Hcp1 mediante Western-Blot. La secreción de Hcp1 depende del correcto funcionamiento del T6SS por lo que es un buen marcador para evaluar la funcionalidad del sistema (Pukatzki *et al.*, 2006). En este ensayo se detecta la presencia de Hcp1 en 4 cepas: la cepa silvestre como control positivo, los dos mutantes *floA* (A y B) y el mutante *tssA1* como control negativo. La proteína Hcp1 se detecta en el sobrenadante de la cepa silvestre (sistema funcional) pero no en un mutante *tssA1* ya que el sistema no puede ensamblarse.



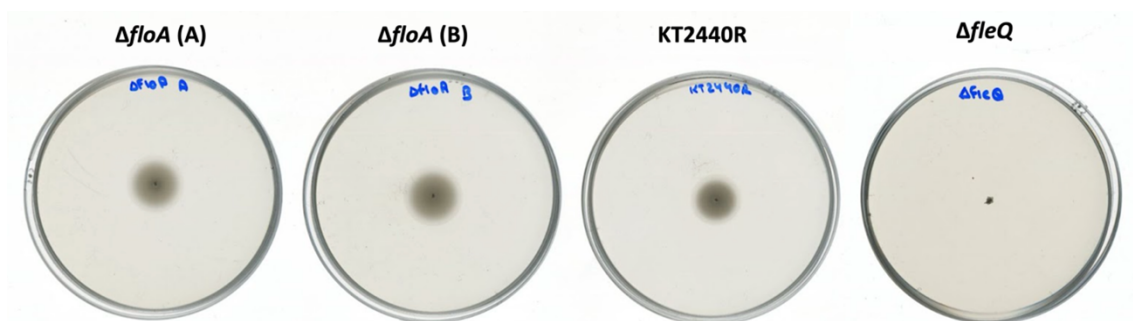
**Figura 14.** Producción y secreción de Hcp1 en la cepa silvestre KT2440, las cepas  $\Delta floA$  y la cepa  $\Delta tssA1$ . La proteína Hcp1 se detecta mediante Western-Blot usando un anticuerpo anti-Hcp1. La detección de la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa se usa como control de carga (células completas) y control de lisis celular (secreción) al ser una proteína citosólica.

En la **Figura 14** se puede observar cómo los mutantes *floA* secretan Hcp1 de manera similar a la cepa silvestre. La cepa  $\Delta tssA1$  es incapaz de ensamblar el T6SS y por tanto no secreta Hcp1. Estos resultados indican que los mutantes *floA* sí ensamblan correctamente el sistema de secreción de tipo VI siendo capaces de secretar la misma cantidad de Hcp1 que la cepa silvestre. Por tanto, dado los resultados de los ensayos de competición y de secreción, podemos afirmar que la ausencia de FloA no afecta al ensamblaje ni a la funcionalidad del T6SS.



#### 4.5. El ensamblaje del flagelo no se ve afectado en ausencia de FloA

En el experimento de motilidad flagelar estudiamos el correcto ensamblaje y funcionamiento del flagelo. En este experimento se siembran las cepas a estudiar en un medio semilíquido (ver Materiales y Métodos) que permite a las bacterias con flagelos desplazarse. En este medio, las bacterias móviles que tienen un flagelo funcional forman un halo de crecimiento, mientras que las bacterias sin flagelo funcional no forman halo (**Figura 15**). En este trabajo estudiamos la movilidad debida a flagelo de las cepas: silvestre, mutantes *floA* (A y B) y del mutante *fleQ*. FleQ es una proteína encargada de la regulación de la síntesis del aparato flagelar y la maquinaria de quimiotaxis, la cual se encuentra en la parte superior de la jerarquía transcripcional (Leal-Morales *et al.*, 2022), por lo que en ausencia de FleQ no se oligomeriza ni se ensambla el flagelo.



**Figura 15. Ensayo de motilidad flagelar.** Las cepas  $\Delta floA$  (A) y  $\Delta floA$  (B) forman un halo de crecimiento similar a la cepa silvestre. La cepa  $\Delta fleQ$  no forma halo de crecimiento ya que su flagelo no es funcional.

Nuestros datos indican que el mutante *floA* es capaz de ensamblar correctamente los flagelos ya que puede formar un halo de crecimiento en la placa similar al de la cepa silvestre. Por ello podemos afirmar que la ausencia de la proteína FloA no es determinante para el correcto ensamblaje y funcionamiento del flagelo.

## 5. Discusión

---

El objetivo principal de este proyecto es conocer el papel de la proteína de andamiaje FloA en *Pseudomonas putida*, con respecto al ensamblaje de complejos multiproteicos de membrana como el sistema de secreción tipo VI o el flagelo. Para evaluar el papel de esta proteína hemos realizado diferentes ensayos que nos permiten evaluar la actividad de ambas nanomáquinas moleculares. Entre los experimentos realizados destacan los ensayos de secreción y de competición para estudiar la funcionalidad del T6SS y los ensayos de motilidad flagelar para estudiar la funcionalidad del flagelo. Los resultados de este trabajo muestran que la flotilina no es fundamental para ensamblar ni el flagelo ni el T6SS, ya que ambos sistemas funcionan correctamente en su ausencia. Por lo que podemos afirmar que FloA no es una proteína esencial para el ensamblaje de estos macrocomplejos proteicos de membrana.

Los MFM han sido escasamente estudiados en bacterias gram-negativas por lo que hay muchas posibilidades que pueden explicar los resultados obtenidos. La hipótesis más plausible es que los MFM de *P. putida* tenga una gran variedad de proteínas de andamiaje que puedan compensar la ausencia de FloA.

Los microdominios funcionales de membrana en procariotas se descubrieron en el año 2010 en *Bacillus subtilis* (Lopez y kolter, 2010). En esta bacteria gram-positiva se describió por primera vez como las membranas promovían interacciones entre un diverso grupo de proteínas efectoras (Lysenko *et al.*, 1997). Fue en este mismo organismo dónde también se describió por primera vez la presencia de una proteína homóloga a la flotilina eucariota (Dempwolff *et al.*, 2016), a la que denominaron FloA. FloA se ha visto involucrado en la formación de biopelículas y la esporulación, así como el correcto funcionamiento del sistema de secreción Sec (Bach y Bramkamp, 2013; Lopez *et al.*, 2013). Por otro lado, el papel de la flotilina (FloA) en el ensamblaje de un sistema de secreción (T7SS) similar al T6SS ha sido estudiado en *S. aureus* (Mielich-Süss *et al.*, 2017). Proteínas homólogas a FloA han sido identificadas en otras bacterias como *Bacillus anthracis* o *Mycobacterium tuberculosis* (Somani *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2015).

En bacterias gram-negativas existen muy pocos estudios al respecto. Entre ellos cabe destacar la organización de microdominios de membrana en *Methylobacterium extorquens* (Sáenz *et al.*, 2015) o el papel de la flotilina del patógeno *Campylobacter*

*jejuni* en la adhesión a células epiteliales del hospedador (Tareen *et al.*, 2013). En la cianobacteria *Synechocystis sp.* la flotilina oligomeriza en las membranas celulares y en los tilacoides teniendo un papel importante en el ensamblaje del aparato fotosintético (Boehm *et al.*, 2009). Por último, en *E. coli* también se han descrito la presencia de estos MFM y de proteínas con dominio SPFH (Guzmán-Flores *et al.*, 2019). La limitada información que se tiene de los MFM en bacterias gram-negativas hace que la bacteria modelo *P. putida* sea muy atractiva para el estudio de estos microdominios (Schneider *et al.*, 2015).

A nivel bioquímico, las flotilinas poseen un dominio PHB o SPFH conservado que debe su nombre a las proteínas Estomatina, Prohibitina, Flotilina y HflK/C (Tavernarakis *et al.*, 1999). Estas proteínas se encuentran tanto en organismos procariotas como en eucariotas. La mayoría de los miembros de la familia SPFH eucariota están involucrados en el ensamblaje de complejos en las balsas lipídicas funcionando como proteínas de andamiaje (Browman *et al.*, 2007; Langhorst *et al.*, 2005). También se ha demostrado que las proteínas en las que se encuentran estos dominios SPFH están localizados en los microdominios funcionales de membrana y por ello se utilizan como marcadores para estos (Browman *et al.*, 2007; Lopez y Kolter, 2010).

Recientemente se han descrito la existencia de cuatro genes (*yqiK*, *qmcA*, *hflK* y *hflC*) que codifican para proteínas con un dominio SPFH (o PHB) en *E. coli* K12 (Guzmán-Flores *et al.*, 2019). Estas proteínas se encuentran teóricamente en los microdominios funcionales de membrana y tienen función de andamiaje (Guzmán-Flores *et al.*, 2017). De los 4 genes identificados en *E. coli*, hemos confirmado la presencia de 3 en *P. putida* (*qmcA*, *hflC* y *hflK*) incluyendo el estudiado en este proyecto (*qmcA* = *floA*). Una posibilidad es que las proteínas HflC y HflK de *P. putida* sean proteínas de andamiaje que en ausencia de FloA puedan complementar su función. En un futuro se podría comprobar esta hipótesis construyendo mutantes por delección de los genes *hflC* y *hflK* así como mutantes dobles y triples para estudiar el funcionamiento del T6SS y del flagelo en ausencia de estas putativas proteínas de andamiaje.

## 6. Conclusiones

---

1. La ausencia de la proteína FloA no disminuye la capacidad de eliminar bacterias competidoras usando el sistema de secreción de tipo VI.
2. La ausencia de la proteína FloA no afecta la secreción de Hcp1 a través del sistema de secreción de tipo VI.
3. Por tanto, FloA no participa en el ensamblaje del T6SS en la envoltura celular.
4. La proteína FloA no es determinante para el ensamblaje y la actividad del flagelo.

## 7. Bibliografía

---

- Aschtgen, M. S., Thomas, M. S., y Cascales, E. (2010). Anchoring the type VI secretion system to the peptidoglycan: TssL, TagL, TagP... what else?. *Virulence*, 1(6), 535-540.
- Babuke, T., y Tikkanen, R. (2007). Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. *European journal of cell biology*, 86(9), 525-532.
- Bach, J. N., y Bramkamp, M. (2013). Flotillins functionally organize the bacterial membrane. *Molecular microbiology*, 88(6), 1205-1217.
- Barak, I., y Muchová, K. (2013). The role of lipid domains in bacterial cell processes. *International journal of molecular sciences*, 14(2), 4050-4065.
- Bernal, P., Allsopp, L. P., Filloux, A., y Llamas, M. A. (2017). The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. *The ISME journal*, 11(4), 972-987.
- Bernal, P., Furniss, R. C. D., Fecht, S., Leung, R. C., Spiga, L., Mavridou, D. A., y Filloux, A. (2021). A novel stabilization mechanism for the type VI secretion system sheath. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(7).
- Boehm, M., Nield, J., Zhang, P., Aro, E. M., Komenda, J., y Nixon, P. J. (2009). Structural and mutational analysis of band 7 proteins in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of bacteriology*, 191(20), 6425-6435.
- Bramkamp, M., y Lopez, D. (2015). Exploring the existence of lipid rafts in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(1), 81-100.
- Browman, D. T., Hoegg, M. B., y Robbins, S. M. (2007). The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends in cell biology*, 17(8), 394-402.

- Brunet, Y. R., Zoued, A., Boyer, F., Douzi, B., y Cascales, E. (2015). The type VI secretion TssEFGK-VgrG phage-like baseplate is recruited to the TssJLM membrane complex via multiple contacts and serves as assembly platform for tail tube/sheath polymerization. *PLoS Genetics*, 11(10), e1005545.
- Cao, Z., Casabona, M. G., Kneuper, H., Chalmers, J. D., y Palmer, T. (2016). The type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* secretes a nuclease toxin that targets competitor bacteria. *Nature microbiology*, 2(1), 1-11.
- Cvetkovic, D., Fiedor, L., Wisniewska-Becker, A., y Markovic, D. (2013). Organization of carotenoids in models of biological membranes: current status of knowledge and research. *Current Analytical Chemistry*, 9(1), 86-98.
- Daley, D. O. (2008). The assembly of membrane proteins into complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(4), 420-424.
- Dempwolff, F., Schmidt, F. K., Hervás, A. B., Stroh, A., Rösch, T. C., Riese, C. N., ... y Graumann, P. L. (2016). Super resolution fluorescence microscopy and tracking of bacterial flotillin (Reggie) paralogs provide evidence for defined-sized protein microdomains within the bacterial membrane but absence of clusters containing detergent-resistant proteins. *PLoS genetics*, 12(6), e1006116.
- Erhardt, M., Namba, K., y Hughes, K. T. (2010). Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(11), a000299.
- Espinosa-Urgel, M., Salido, A., y Ramos, J. L. (2000). Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *Journal of bacteriology*, 182(9), 2363-2369.
- Feng, X., Hu, Y., Zheng, Y., Zhu, W., Li, K., Huang, C. H., ... y Oldfield, E. (2014). Structural and functional analysis of *Bacillus subtilis* YisP reveals a role of its product in biofilm production. *Chemistry & biology*, 21(11), 1557-1563.
- Good, M. C., Zalatan, J. G., y Lim, W. A. (2011). Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science*, 332(6030), 680-686.
- Grecco, H. E., Schmick, M., y Bastiaens, P. I. (2011). Signaling from the living plasma membrane. *Cell*, 144(6), 897-909.
- Guzmán-Flores, J. E., Alvarez, A. F., Poggio, S., Gavilanes-Ruiz, M., y Georgellis, D. (2017). Isolation of detergent-resistant membranes (DRMs) from *Escherichia coli*. *Analytical biochemistry*, 518, 1-8.
- Guzmán-Flores, J. E., Steinemann-Hernández, L., González de la Vara, L. E., Gavilanes-Ruiz, M., Romeo, T., Alvarez, A. F., y Georgellis, D. (2019). Proteomic analysis of *Escherichia coli* detergent-resistant membranes (DRM). *Plos one*, 14(10), e0223794.
- Hanahan, D., y Glover, D. M. (1985). DNA cloning: a practical approach. *DNA cloning: a practical approach*, 1, 109-135.

- Harwood, C. S., Fosnaugh, K., y Dispensa, M. (1989). Flagellation of *Pseudomonas putida* and analysis of its motile behavior. *Journal of bacteriology*, 171(7), 4063-4066.
- Herrero, M., De Lorenzo, V., y Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*, 172(11), 6557-6567.
- Ho, B. T., Dong, T. G., y Mekalanos, J. J. (2014). A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell host & microbe*, 15(1), 9-21.
- Kirov, S. M. (2003). Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. *FEMS microbiology letters*, 224(2), 151-159.
- Langhorst, M. F., Reuter, A., y Stuermer, C. A. O. (2005). Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(19), 2228-2240.
- Leal-Morales, A., Pulido-Sánchez, M., López-Sánchez, A., y Govantes, F. (2022). Transcriptional organization and regulation of the *Pseudomonas putida* flagellar system. *Environmental Microbiology*, 24(1), 137-157.
- Lee, J., Kim, S. H., Choi, D. S., Lee, J. S., Kim, D. K., Go, G., ... y Ghoo, Y. S. (2015). Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics*, 15(19), 3331-3337.
- Lin, J., Zhang, W., Cheng, J., Yang, X., Zhu, K., Wang, Y., ... y Shen, X. (2017). A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. *Nature communications*, 8(1), 1-12.
- Lopez, D., y Koch, G. (2017). Exploring functional membrane microdomains in bacteria: an overview. *Current opinion in microbiology*, 36, 76-84.
- Lopez, D., y Kolter, R. (2010). Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes & development*, 24(17), 1893-1902.
- Lopez, D., Mielich-Süss, B., y Schneider, J. (2013). Overproduction of Flotillin Influences Cell Differentiation and Shape in *Bacillus subtilis*.
- Lysenko, E., Ogura, T., y Cutting, S. M. (1997). Characterization of the *ftsH* gene of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 143(3), 971-978.
- Martínez-García, E., Aparicio, T., Goñi-Moreno, A., Fraile, S., y de Lorenzo, V. (2015). SEVA 2.0: an update of the Standard European Vector Architecture for de-/re-construction of bacterial functionalities. *Nucleic acids research*, 43(D1), D1183-D1189.
- Matsumoto, K., Kusaka, J., Nishibori, A., y Hara, H. (2006). Lipid domains in bacterial membranes. *Molecular microbiology*, 61(5), 1110-1117.

- Mielich-Süss, B., Wagner, R. M., Mietrach, N., Hertlein, T., Marincola, G., Ohlsen, K., ... y Lopez, D. (2017). Flotillin scaffold activity contributes to type VII secretion system assembly in *Staphylococcus aureus*. *PLoS pathogens*, 13(11), e1006728.
- Morrow, I. C., y Parton, R. G. (2005). Flotillins and the PHB domain protein family: rafts, worms and anaesthetics. *Traffic*, 6(9), 725-740.
- Planamente, S., Salih, O., Manoli, E., Albesa-Jové, D., Freemont, P. S., y Filloux, A. (2016). TssA forms a gp6-like ring attached to the type VI secretion sheath. *The EMBO journal*, 35(15), 1613-1627.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., ... y Mekalanos, J. J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), 1528-1533.
- Sáenz, J. P., Grosser, D., Bradley, A. S., Lagny, T. J., Lavrynenko, O., Broda, M., y Simons, K. (2015). Hopanoids as functional analogues of cholesterol in bacterial membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(38), 11971-11976.
- Schneider, J., Mielich-Süss, B., Böhme, R., y Lopez, D. (2015). In vivo characterization of the scaffold activity of flotillin on the membrane kinase KinC of *Bacillus subtilis*. *Microbiology (Reading, England)*, 161(9), 1871.
- Simons, K., e Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *nature*, 387(6633), 569-572.
- Singer, S. J., y Nicolson, G. L. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes: Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids. *Science*, 175(4023), 720-731.
- Somani, V. K., Aggarwal, S., Singh, D., Prasad, T., y Bhatnagar, R. (2016). Identification of novel raft marker protein, FlotP in *Bacillus anthracis*. *Frontiers in microbiology*, 7, 169.
- Tareen, A. M., Lüder, C. G., Zautner, A. E., Groß, U., Heimesaat, M. M., Bereswill, S., y Lugert, R. (2013). The *Campylobacter jejuni* Cj0268c protein is required for adhesion and invasion in vitro. *PLoS One*, 8(11), e81069.
- Tavernarakis, N., Driscoll, M., y Kyrpides, N. C. (1999). The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends in biochemical sciences*, 24(11), 425-427.
- Volke, D. C., Calero, P., y Nikel, P. I. (2020). *Pseudomonas putida*. *Trends Microbiol*, 28(512-513), 1.
- Wang, J., Brackmann, M., Castano-Diez, D., Kudryashev, M., Goldie, K. N., Maier, T., ... y Basler, M. (2017). Cryo-EM structure of the extended type VI secretion system sheath-tube complex. *Nature microbiology*, 2(11), 1507-1512.

Zhao, F., Zhang, J., Liu, Y. S., Li, L., y He, Y. L. (2011). Research advances on flotillins. *Virology Journal*, 8(1), 1-6.

Zoued, A., Durand, E., Brunet, Y. R., Spinelli, S., Douzi, B., Guzzo, M., ... y Cascales, E. (2016). Priming and polymerization of a bacterial contractile tail structure. *Nature*, 531(7592), 59-63.

**Foto de la portada:**

C.S.I.C. (2015)

Mis agradecimientos al Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología y a mi tutora y directora, Patricia Bernal Guzmán, por permitirme llevar a cabo este trabajo de investigación. También me gustaría agradecer al grupo de investigación de Fernando Govantes Romero y Aroa López Sánchez (Universidad Pablo de Olavide) por su asistencia a la hora de llevar a cabo los estudios de movilidad.