



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Biomédicas
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Papel de la proteína flagelar MotF en la rotación del flagelo de
Rhodobacter sphaeroides.

Tesis

que para optar por el grado de Doctor en Ciencias
Presenta:

Víctor Florencio Ramírez Cabrera

Directora de Tesis:

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Comité Tutorial:

Dr. Georges Dreyfus Cortés
Dr. Diego Gonzalez Halphen.
Instituto de Fisiología Celular

México, D.F. Mayo de 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

Resumen	3
Introducción	4
El flagelo bacteriano: función y generalidades.	4
Estructura del flagelo bacteriano.	6
Motor flagelar bacteriano: mecanismo y variedades.	9
Generalidades de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> .	12
Regulación del flagelo en <i>Rhodobacter sphaeroides</i> .	13
Hipótesis	16
Objetivo	16
Objetivos particulares	16
Resultados	16
La proteína MotF es necesaria para la rotación flagelar.	16
El gen <i>motF</i> se expresa a partir de su propio promotor en la clase III de la jerarquía flagelar.	20
MotF es una proteína transmembranal con su segmento mayor presente en el periplasma.	22
La localización de MotF depende de la presencia de un motor flagelar funcional.	24
Mutaciones puntuales en <i>motB</i> recuperaron el nado en ausencia de MotF	26
Importancia de las regiones localizadas a los lados del cruce transmembranal de la proteína MotF.	30
Interacción de MotF con otras proteínas flagelares.	32
Discusión	36
Contexto genético y expresión de MotF y RSP_6092	36
Homología de <i>motF</i> con genes de otros organismos	37
Topología de MotF	37
Localización de MotF y proteínas del motor flagelar.	39
Supresión de la mutación de <i>motF</i>	39
Conclusiones	41
Material y Métodos	42
Bibliografía	51

Anexos

- I. Tabla de oligonucleotidos usados en este trabajo.
- II. Secuencia del gen *motF* y la proteína MotF.
- III. Artículo: A Novel Component of the *Rhodobacter sphaeroides* Fla1 Flagellum Is Essential for Motor Rotation

Resumen

En el presente trabajo describimos una proteína, la cual es necesaria para la rotación del flagelo en la bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. Esta proteína es producto de la transcripción y traducción del marco abierto de lectura RSP_0067, el cual ha sido renombrado como *motF*. Este gen se localiza adyacente a un gen hipotético y es posible que ambos formen un operón. El análisis de la secuencia de aminoácidos, predijo que MotF es una proteína que contiene un cruce transmembranal. Para corroborar esta idea, se llevaron a cabo ensayos de acceso de proteasas y además se observaron al microscopio cepas expresando fusiones proteicas de MotF con la proteína verde fluorescente. A partir de estos experimentos determinamos que la predicción era correcta y el segmento carboxilo terminal de MotF se localiza en el espacio periplásmico. Cabe resaltar que el segmento periplásmico de MotF es el segmento más largo de la proteína. Al expresar la fusión proteica funcional GFP-MotF en la cepa silvestre WS8, se observó un solo foco de fluorescencia por cada célula. La localización de esta proteína en distintos fondos genéticos nos permitió determinar que la localización normal de MotF depende de la presencia de las proteínas FliL y MotB. La caracterización de una cepa pseudorevertante de la mutación en *motF* reveló que un solo cambio en el gen *motB* suprimió el fenotipo Mot- de la mutante en *motF*. Asimismo, otros alelos mutantes de *motB*, aislados como supresores del fenotipo Mot- provocado por la ausencia del gen *fliL*, también fueron epistáticos sobre *motF*. Estos resultados muestran que MotF es un nuevo componente del flagelo 1 el cual, en conjunto con FliL, es requerido para llevar a cabo la rotación flagelar, posiblemente facilitando la activación del canal de protones formado por las proteínas MotA/B.

Abstract

Here we describe a novel component essential for flagellar rotation in *Rhodobacter sphaeroides*. This protein is encoded by *motF* (RSP_0067), the first gene of a predicted transcriptional unit which contains two hypothetical genes. Sequence analysis indicated that MotF is a bitopic membrane-spanning protein. Protease sensitivity assays and green fluorescent protein (GFP) fusions confirmed this prediction and allowed us to conclude that the C terminus of MotF is located in the periplasmic space. Wild-type cells expressing a functional GFP-MotF fusion show a single fluorescent focus per cell. The localization of this protein in different genetic backgrounds allowed us to determine that normal localization of MotF depends on the presence of FliL and MotB. Characterization of a Δ *motF* pseudorevertant strain revealed that a single nucleotide change in *motB* suppresses the Mot⁻ phenotype of the *motF* mutant. Additionally, we show that MotF also becomes dispensable when other mutant alleles of *motB* previously isolated as second-site suppressors of Δ *fliL* were expressed in the *motF* mutant strain. These results show that MotF is a new component of the Fla1 flagellum, which together with FliL is required to promote flagellar rotation, possibly through MotB.

Introducción

El flagelo bacteriano: función y generalidades.

La movilidad celular permite a las bacterias acercarse a atrayentes y nutrientes o evitar condiciones nocivas para su subsistencia. Uno de los mecanismos de movimiento de las bacterias es por medio de rotación del o de los flagelos (Figura 1).

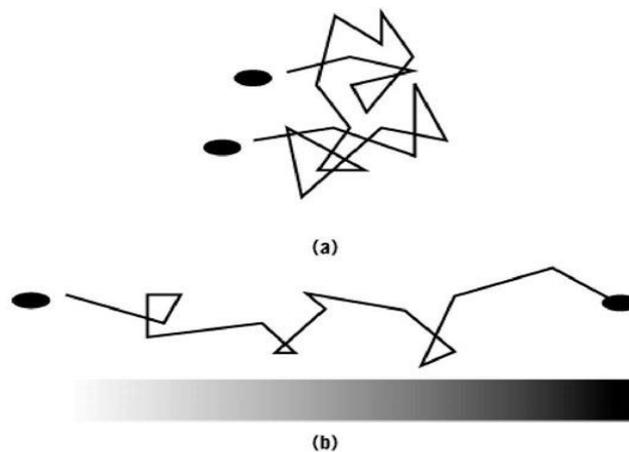


Figura 1. Nado de una bacteria por rotación flagelar en medio homogéneo (a) y siguiendo un gradiente (b).

En el espacio tridimensional, el flagelo bacteriano adopta una estructura en forma de hélice que al rotar genera la fuerza que impulsa a la célula hacia adelante, esto es, actúa como una turbina.

Las células pueden poseer uno o varios flagelos, estos pueden estar distribuidos de las siguientes formas (Figura 2):

Polar: Uno o más flagelos en un sólo polo de la célula.

Lofótrica: Dos o más flagelos en ambos polos o extremos de la célula.

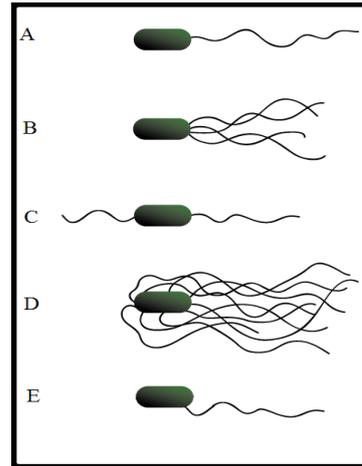
Perítrica: Varios flagelos, alrededor de todo el cuerpo celular.

Lateral: Uno o varios flagelos, localizados a los lados del cuerpo celular.

Subpolar: Uno o más flagelos, al lado del polo celular bacteriano.

Figura 2. Formas de distribución del flagelo bacteriano.

- A) Monótrico polar
- B) Polar
- C) Lofótrico
- D) Perítrico
- E) Subpolar



Ya sean uno o varios los flagelos, todos ellos comparten la misma estructura. Cuando es uno, se trata de una hélice simple, mientras que al ser varios se unen todos en una especie de trenza girando todos al mismo tiempo.

El flagelo bacteriano es una parte muy visible de la célula, pues su longitud es del doble del diámetro de la bacteria y en *E. coli*, la rotación del filamento se da a favor (clockwise o CW) o en contra del sentido de las manecillas del reloj (counterclockwise o CCW). En esta bacteria peritrica, el giro de los flagelos en el sentido CCW impulsa al cuerpo celular bacteriano hacia el frente, mientras que la rotación en el sentido CW provoca que la trenza que impulsa el cuerpo celular se desagrupe y el movimiento descoordinado de cada uno de los flagelos provoca que la bacteria presente un movimiento del tipo de sacudida o bamboleo, lo cual da lugar a la reorientación de la célula. Algunas bacterias tienen también la capacidad de regular la velocidad del giro CCW y por tanto la velocidad del impulso del cuerpo celular bacteriano hacia el frente. Finalmente, algunas bacterias giran su flagelo en una sola dirección; en este caso, la reorientación del nado se da por medio de los eventos de paro del flagelo ^(Berg 2003).

El flagelo en su conjunto se constituye como un motor diminuto, o una nano-máquina rotatoria impulsada por un motor, colocado en la base del mismo. La parte rotatoria del motor, denominada rotor, gira gracias a la fuerza protón-motriz. Durante la rotación, el paso de protones a través del estator, impulsa la rotación del flagelo ^(Berg 2003, Sowa 2008, Terashima 2008).

Estructura del flagelo bacteriano.

Para su estudio, el rotor del flagelo se ha dividido en tres partes principales: el **cuerpo basal**, el **gancho** y el **filamento** (Figura 3).

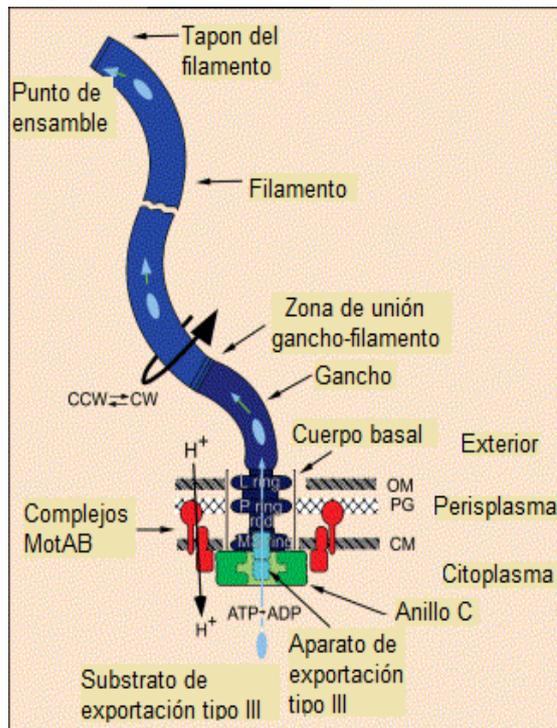


Figura 3. Estructura del flagelo bacteriano. (Macnab 2004)

El **cuerpo basal** está formado por una serie de anillos concéntricos, que del citoplasma hacia la membrana externa, se denominan: Anillo C, MS, P y L.

El anillo MS está conformado por cerca de 26 subunidades de la proteína FliF. FliF es una proteína integral de membrana: tiene dos cruces transmembranales, con sus extremos citoplásmicos largos y un pequeño segmento periplásmico. Por medio del extremo carboxilo terminal de FliF, el anillo MS está unido al anillo C, el cual está formado por subunidades de las proteínas FliG, FliM y FliN^(Francis 1992, Francis 1994, Paul 2011, Zhao 1996, Zhao 1996*).

El anillo MS es un anillo hueco, y al centro de ese anillo se encuentra un pedazo o parche de membrana. En ese parche se encuentra el aparato de exportación flagelar, el cual pertenece a los sistemas de exportación tipo III, éste se encarga de la

exportación de las proteínas axiales, como son las proteínas que constituyen el eje, el gancho, el filamento, los anillos de unión entre cada una de estas estructuras, así como la proteína de coronamiento ubicada en el extremo del filamento (conocida como *cap protein*). Este aparato de exportación está formado por las proteínas FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ (Minamino 1999).

En algunos casos, el aparato de exportación flagelar cumple con otras funciones para la célula, por ejemplo, en *Campylobacter jejuni*, la secreción de algunas proteínas de virulencia ocurre a través de este aparato (Konkel 2004).

Alrededor del rotor se encuentra el estator del motor flagelar, compuesto por las proteínas MotA y MotB, las cuales forman el canal de protones, la entrada de protones a través de este canal, genera la energía que impulsa al flagelo (Terashima 2008).

El eje atraviesa la pared de peptidoglicano y la membrana externa pasando por el centro de un par de anillos: el anillo P, ubicado en la pared de peptidoglicano y el anillo L, en la membrana externa. Estos anillos están formados por subunidades de las proteínas FlgH y FlgI.

El **gancho**, es una estructura semirígida que transmite el torque generado en el cuerpo basal hacia el filamento. Está constituido por subunidades de la proteína FlgE. La longitud del gancho está regulada por la proteína FliK. Los estudios indican que FlhB sufre un cambio o corte, el cual es mediado por FliK, para cambiar la especificidad de las proteínas que exportará el sistema de secreción tipo III, y pasar de exportar proteínas del gancho a proteínas del filamento. Una vez que el gancho logra la longitud adecuada, FliK dará la señal a FlhB, entonces FlhB sufrirá el corte en el espacio citoplásmico, perdiendo el carboxilo terminal soluble (Erhardt 2010). La mutación y ausencia de FliK genera la formación de la estructura conocida como “poligancho”, que es un gancho mas largo de lo común y que resulta poco eficiente para el nado (Kutsukake 1994, Fraser 2003, Minamino 2006).

Finalmente, el **filamento** está formado por alrededor de 20,000 subunidades de la proteína FliC, o flagelina, la cual constituye la parte más larga y visible del flagelo. Este filamento al rotar por el torque generado por el cuerpo basal y transmitido por el gancho, genera el impulso para mover la célula.

El ensamble del flagelo sigue un orden que va de acuerdo a la expresión de los genes flagelares. Este ensamble se da como se describe en la figura 4. Tomando en cuenta que FliF es la primera proteína estructural que se traduce, la primera estructura que se ensambla es el anillo MS en la membrana citoplásmica. En el centro de ese anillo queda un parche de membrana donde se forma el aparato de exportación tipo III. Posteriormente, y pegado a la cara citoplásmica del anillo MS, se ensambla el anillo C. En la cara periplásmica del anillo MS se inserta el eje, al cual se unen los anillos P y L al tiempo que atraviesa la pared de peptidoglicano y la membrana externa. Al terminarse el eje, se exporta y polimeriza el gancho flagelar. Al lograr la longitud adecuada, un cambio en la estructura de FlhB genera cambios en la especificidad del aparato de exportación y derivado de éste se empiezan a exportar las subunidades de flagelina, las cuales se polimerizan en el extremo distal del filamento, hasta llegar a la longitud adecuada (Macnab 2003).

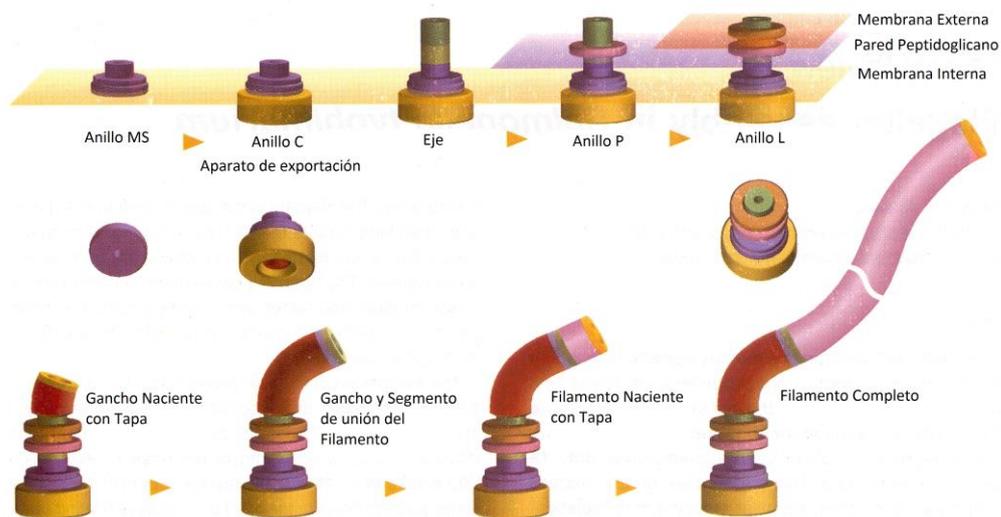


Figura 4. Esquema de la secuencia de ensamblaje del flagelo bacteriano. Tomada y adaptada de: Macnab 1996.

Motor flagelar bacteriano: mecanismo y variedades.

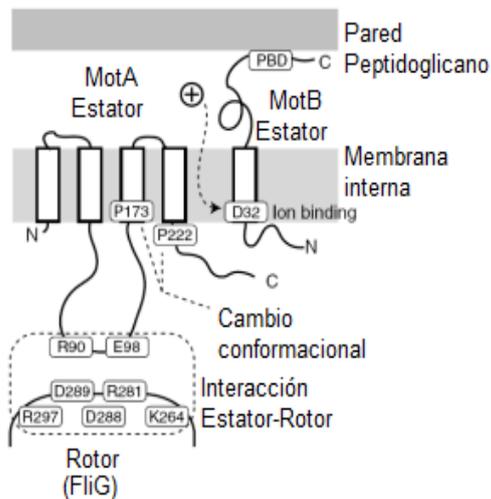
El cuerpo basal del flagelo constituye un motor funcional completo. Está compuesto por dos partes: el **rotor** y el **estator**, los cuales en conjunto generan el torque del motor^(Blair 1990, Stolz 1991).

El rotor está compuesto por los anillos MS y C, como se mencionó anteriormente. El **estator** flagelar está formado por las proteínas MotA y MotB; estas proteínas, están ancladas a la pared mediante un dominio de unión a peptidoglicano presente en el extremo carboxilo terminal de MotB^(Reboul 2011).

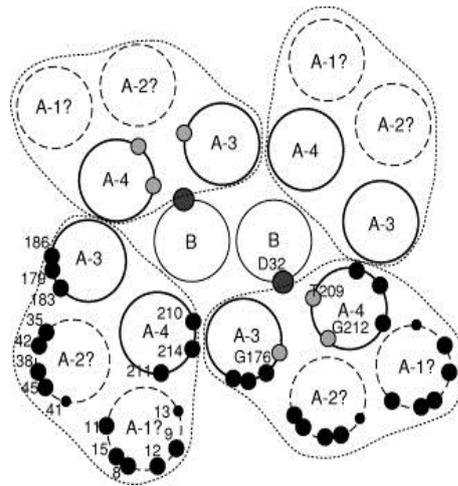
La proteína MotA tiene cuatro hélices transmembranales (TM1 a TM4) y un pequeño segmento periplásmico entre las hélices transmembranales 1 y 2 así como entre las 3 y 4. Entre las hélices 2 y 3 tiene un dominio citoplásmico largo^(Blair 1991, Dean 1984, Zhou 1995). En este segmento citoplásmico hay una serie de residuos cargados, los cuales son necesarios para generar el torque y la rotación del rotor (Figura 5)^(Zhou 1997).

Por su lado, la proteína MotB tiene un solo cruce transmembranal, un pequeño segmento NH-terminal, localizado en el citoplasma y un dominio periplásmico largo en donde se encuentra el dominio de unión a peptidoglicano mencionado anteriormente^(Chun 1988).

Las proteínas MotA y MotB se encuentran en una estequiometría MotA₄/MotB₂. La hélice transmembranal de MotB junto con los segmentos transmembranales 3 y 4 de MotA, forman el canal de protones^(Braun 2001, Braun 2004). Recientemente se calculó que al menos 11 complejos MotA₄/MotB₂ están localizados alrededor del rotor flagelar^(Reid 2006).



(Kojima 2004)



(Blair 2003)

Figura 5. Esquema de los aminoácidos cargados en MotA, MotB y FliG, sus interacciones, y el arreglo de las hélices transmembranales de las proteínas MotA y MotB.

Estos complejos no son únicos ni estáticos, sino que son intercambiados rápidamente, usando una reserva de estatores membranales inactivos ^(Leake 2006). Estos complejos inactivos se localizan junto a los activos que están en el rotor. La activación de los complejos requiere de ciertos cambios conformacionales en la región periplásmica de MotB. Durante el primer cambio, se extiende la región periplásmica de MotB, y con ello queda expuesta la región de MotB en donde se localiza el motivo de unión al peptidoglicano, como consecuencia, MotB se ancla a la pared. Adicionalmente, la región periplásmica de MotB que forma la compuerta del canal, conocida como “plug” (una alfa-helice anfipática localizada inmediatamente después del dominio transmembranal de MotB) se coloca perpendicular a la membrana, y de este modo se abre el canal de protones ^(Hosking 2006, Kojima 2009, Li 2011, O’neil 2011).

FliG tiene una serie de aminoácidos cargados en su carboxilo terminal. Estos residuos son parte fundamental para la interacción con residuos cargados del estator, pues en su conjunto son los que generan el torque ^(Lloyd 1996, Yamaguchi 1986). Los residuos cargados en el estator están presentes en el segmento citoplásmico de MotA y son los que interactúan con FliG (Figura 5) ^(Lloyd 1997, Zhou 1007, Zhou 1998).

La pérdida y ganancia cíclica de protones en el residuo conservado Asp32 de MotB genera cambios conformacionales en el canal MotAB, los cuales modifican la estructura secundaria del segmento citoplásmico de MotA. Al cambiar esta conformación se afectan las interacciones electrostáticas con el dominio carboxilo terminal de FliG. Esta serie de cambios entre los residuos cargados que forman la interfase entre MotA y FliG, son esenciales para la generación del torque^(Che 2008, Kim 2008, Kojima 2001, Zhou 1998).

Si bien en general todos los flagelos bacterianos comparten la misma estructura y funcionan de forma similar y el sistema de *E. coli* (varios flagelos peritricos) es el mas estudiado, no todos los sistemas de rotación flagelar funcionan de la misma manera.

Por ejemplo, la rotación del flagelo en muchas de las especies del género *Vibrio*, está basada en el movimiento por iones de sodio (Na^+) y no de protones (H^+) como sucede en *E. coli* ^(Dibrov 1986, Imae 1989, Tokuda 1988, Yorimitsu 2001). En los motores dependientes de protones las proteínas del estator son denominadas MotA y MotB, mientras que las proteínas del estator en los motores dependientes de sodio, son conocidas como PomA y PomB, las cuales son proteínas ortólogas de MotA y MotB, respectivamente ^(Assay 1997, Yakushi 2004, Yorimitsu 1999). Sin embargo, la rotación del flagelo en estas especies requiere de dos proteínas periplásmicas adicionales: MotX y MotY, ^(McCarter 1994, McCarter 1994*, Okabe 2002) éstas permiten o favorecen la incorporación del complejo PomAB al motor flagelar. MotX y MotY solo están presentes en los motores de sodio y no existe alguna proteína homóloga en los sistemas dependientes de protones ^(Kojima 2008, Li 2011, Terashima 2006).

El requerimiento de componentes adicionales para la rotación del flagelo se ha observado también en otras especies bacterianas, por ejemplo: En *Sinorhizobium meliloti*, la proteína periplásmica MotC funciona como un embrague y actúa sobre MotB, regulando la velocidad de la rotación del rotor^(Platzer 1997). En *Vibrio alginolyticus*, también se ha descrito la proteína FlgT, asociada al estator flagelar, la cual es necesaria para la formación de un anillo extra en el motor flagelar^(Terashima 2006).

En *C. jejuni*, la proteína de membrana externa, FlgP (Cj1026c), es necesaria para la rotación flagelar^(Sommerland 2007).

Los ejemplos anteriores ilustran que en algunas especies, el funcionamiento adecuado del flagelo requiere de la presencia de proteínas flagelares específicas que no se encuentran siempre representadas en otras bacterias.

Generalidades de *Rhodobacter sphaeroides*.

En el presente estudio se utilizó como modelo el flagelo de *Rhodobacter sphaeroides*, ésta es una bacteria púrpura, no sulfurosa, clasificada en el grupo de las α -3-proteobacterias. En su genoma, tiene dos juegos completos de genes flagelares. El conjunto 1 de genes flagelares, Fla1, el cual fue adquirido por transferencia horizontal^(Poggio 2007), es expresado en las condiciones comunes de laboratorio. Cabe mencionar que en el laboratorio se logró aislar una mutante capaz de expresar el segundo conjunto de genes flagelares. Para ello, se utilizó como cepa progenitora una mutante incapaz de nadar debido a una mutación en los genes flagelares 1, y se seleccionaron las cepas que recobraron la capacidad de nado^(Poggio 2007).

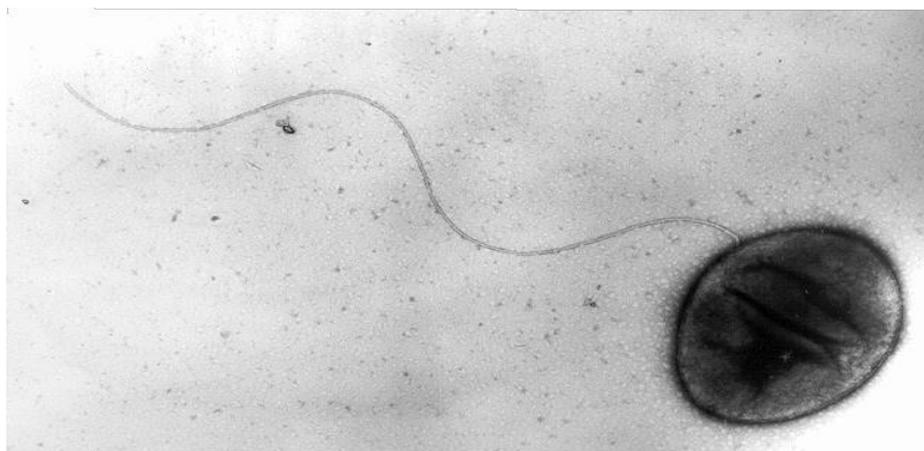


Figura 6. Fotografía de microscopía electrónica de *Rhodobacter sphaeroides* WS8. Fotografía cortesía del Dr. G. Dreyfus, IFC, UNAM.

El conjunto de genes Fla1, codifican para todos los componentes que permiten la formación de un sólo flagelo localizado en posición subpolar (Figura 6); éste se

mueve únicamente en sentido contrario de las manecillas del reloj. La reorientación del nado se da por eventos de paro (Armitage 1987).

Regulación del flagelo en *Rhodobacter sphaeroides*.

La expresión y ensamble del flagelo tiene un alto costo metabólico para la célula, por lo que estos procesos están regulados por una cascada de regulación flagelar que consiste en una jerarquía de **cuatro clases** de proteínas flagelares (Figura 7) (Suaste-Olmos 2010).

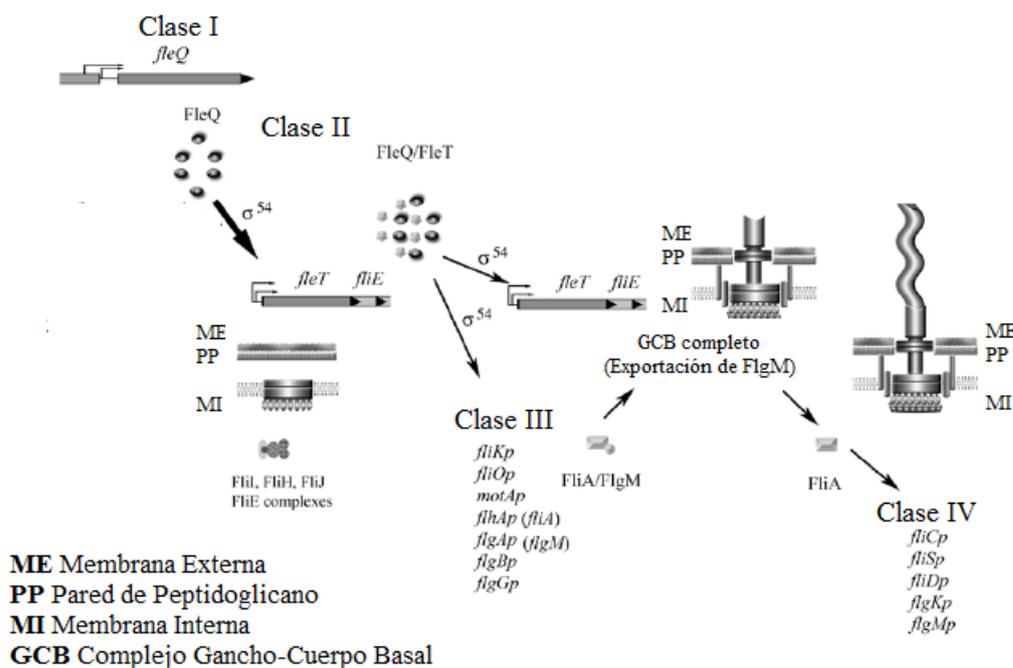


Figura 7. Esquema de la cascada de regulación flagelar en *R. sphaeroides*. Imagen tomada de Poggio et al 2005.

La **clase I** está formada únicamente por el gen *fleQ*, éste codifica para la proteína de unión al sitio de activación, también denominado “enhancer”. Este tipo de proteínas se denominan EBP (siglas de enhancer-binding proteins) o proteínas activadoras dependientes del factor sigma-54. FleQ y sigma-54 llevan a cabo la transcripción de los genes flagelares de las clases II y III (Poggio 2005).

La **clase II** incluye a los genes *fleT*, *fliE*, *F*, *G*, *H*, *I* y *fliJ*. *fleT* codifica para una proteína activadora dependiente del factor sigma-54, la cual interactúa con FleQ y

RpoN2 (sigma-54); las tres proteínas en conjunto, llevan a cabo la transcripción de los genes de clase III. El resto de las proteínas codificadas por los genes de clase II corresponden al cuerpo basal flagelar y al aparato de exportación flagelar ^(Poggio 2005).

En la **clase III** de genes flagelares se encuentran aquéllos que codifican para las proteínas del eje, el gancho, las proteínas que unen a estas dos estructuras y los anillos L y P (FlgH y FlgI). Estas dos últimas estructuras no son exportadas por el aparato de secreción flagelar, sino por el sistema de secreción Sec, que es independiente de los genes flagelares. Dentro de la clase III, se encuentran los genes *fliA* y *flgM*, los cuales codifican para el factor sigma-28 y el factor anti-sigma-28, respectivamente. Sigma 28 constituye además un chaperón del factor anti-sigma. Una vez formado el gancho la proteína FlgM es exportada, lo que tiene como resultado que el factor sigma-28 (también conocido como FliA), pueda llevar a cabo la transcripción de los genes que pertenecen a la **clase IV** de jerarquía flagelar; entre los cuales se encuentran *fliC* y *fliD*, que codifican para la flagelina (FliC), la cual forma el filamento, así como la proteína que forma la corona del mismo (FliD).

En la clase III de la jerarquía, están los genes que codifican para las proteínas MotA y MotB, las cuales constituyen el estator que generan la fuerza para la rotación del flagelo ^(Leake 2006, Shah 1995, Shah 1995*). Recientemente, en el laboratorio se caracterizó otra proteína flagelar denominada FliL, la cual es necesaria para la rotación del flagelo. La proteína FliL, tiene un solo cruce transmembranal ubicado cerca del extremo amino terminal, y la mayor parte de la proteína se localiza en el espacio periplásmico. El fenotipo de las cepas que carecen del gen *fliL* es Mot-, esto es, las células ensamblan el flagelo pero son incapaces de hacerlo rotar. En dicho estudio se demostró que la cepa *ΔfliL* es capaz de recobrar la capacidad de nado, gracias a mutaciones secundarias en *motB*. Sin embargo, utilizando dos diferentes ensayos de interacción proteína-proteína, se demostró que las regiones periplásmicas de MotB y FliL no interactúan. A partir de estos resultados se propuso que FliL afecta negativamente la rotación del flagelo debido a que altera la conformación de MotB de forma indirecta ^(Suaste-Olmos 2010).

El locus flagelar Fla1 de *R. sphaeroides* posee una serie de marcos abiertos de lectura (orf's), los cuales no tienen similitud con alguna otra proteína previamente caracterizada.

Entre los genes *flhB* y *rpoN2*, se encuentran dos marcos abiertos de lectura denominados RSP_0067 y RSP_6092, los cuales no muestran una similitud significativa con algún otro marco abierto de lectura anotado en las bases de datos disponibles en internet.

Con el objeto de obtener información adicional acerca de estos ORFs, se analizó la secuencia río arriba de RSP_0067. En dicha región encontramos una secuencia similar a la secuencia consenso reconocida por el factor sigma-54.

La localización de estos genes dentro del contexto flagelar, así como la presencia de un posible promotor dependiente del factor sigma-54, nos llevó a suponer que ambos marcos abiertos de lectura podrían estar relacionados con la biogénesis o con el funcionamiento del flagelo 1 de *R. sphaeroides*.

HIPOTESIS

RSP_0067 y RSP_6092 codifican para componentes involucrados en la formación y/o el funcionamiento del flagelo 1 de *R. sphaeroides*.

OBJETIVO:

Caracterización del papel de la proteína MotF en la biogénesis y/o funcionamiento del flagelo de *R. sphaeroides*"

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1) Aislar cepas mutantes en RSP_0067 y RSP_6092
- 2) Caracterizar el fenotipo de las cepas mutantes
- 3) En caso de que una o ambas mutaciones afecten la capacidad de nado de la bacteria, se analizará detalladamente la causa de este defecto

Resultados

La proteína MotF es necesaria para la rotación flagelar.

En la secuencia del genoma de *R. sphaeroides* 2.4.1 se encuentran dos juegos de genes flagelares. Dentro del locus flagelar 1, entre los genes *flhB* y *rpoN2*, hay una zona que está predicha como un operon bicistrónico, compuesto por los marcos abiertos de lectura (orf's) RSP_0067 y RSP_6092 (Figura 8). *flhB* codifica para una proteína que forma parte del aparato de secreción flagelar, mientras que *rpoN2* codifica para el factor sigma-54, encargado de la transcripción de los genes flagelares de clase II y clase III. La secuencia de aminoácidos predicha para estos marcos de lectura fue comparada mediante el algoritmo BLAST, buscando secuencias parecidas. La búsqueda demostró que RSP_0067 y RSP_6092 están presentes exclusivamente en las cepas de *R. sphaeroides* ATCC 17029, ATCC 17025, KD131 y WS8.

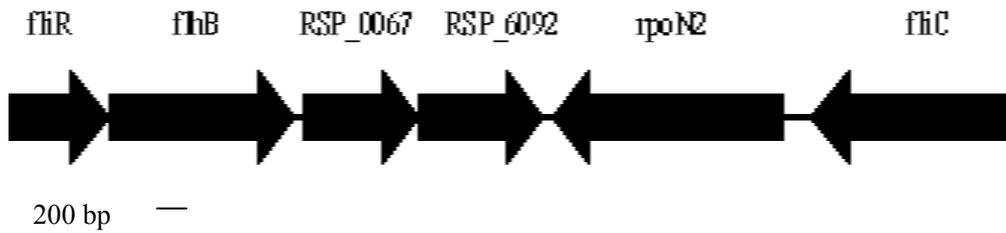


Figura 8. Esquema de la ubicación de *RSP_0067* (*motF*) en el locus flagelar.

El análisis de la secuencia primaria de los polipéptidos codificados por estos genes, sugirió que *RSP_0067* es probablemente una proteína integral de membrana, con un cruce transmembranal. El cruce transmembranal está flanqueado por zonas que predicen la presencia de motivos con potencial de formar estructuras de hélices entrelazadas (coiled-coil), las cuales podrían estar involucradas en establecer interacciones proteína-proteína. Además, en el cruce transmembranal, se encuentra una secuencia con el motivo GXXXG, el cual se conoce como un cierre de glicinas, y sugiere la interacción proteína-proteína dentro del cruce transmembranal (Figura 9) (Senes 2000, Sanguk 2005)

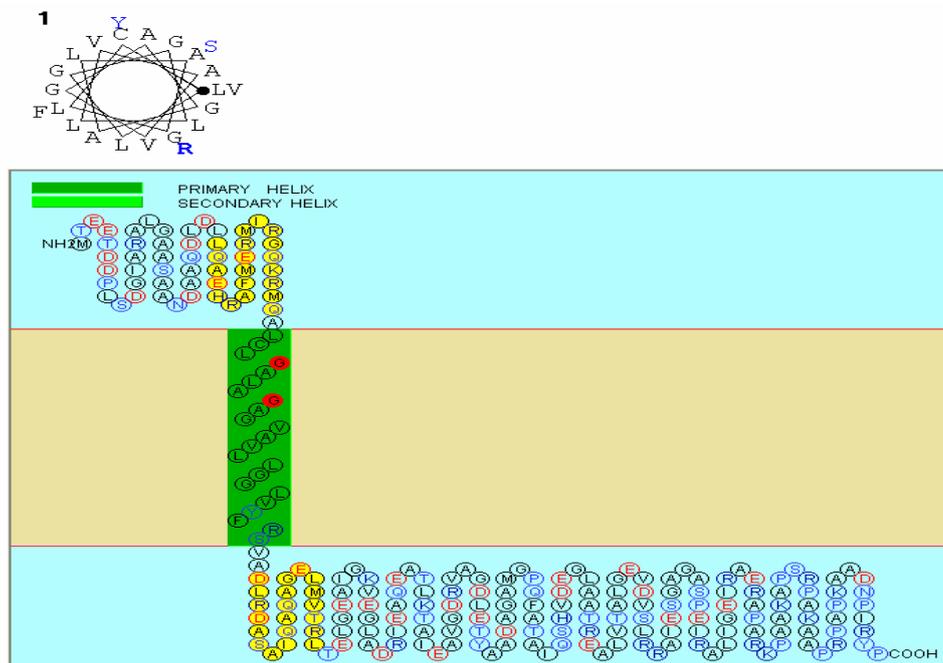


Figura 9. Esquema de la topología predicha para la proteína codificada por *RSP_0067*. En amarillo se indican las zonas potenciales de interacción proteína-proteína mediada por hélices enrolladas (coiled coil); en rojo se indican las glicinas que forman parte del motivo GXXXG (cierre de glicinas) presente en el cruce transmembranal. Imagen obtenida mediante el programa SOSUI/Prediction of transmembrane regions (Nagoya University, Japan) <http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>

En la secuencia correspondiente a RSP_6092 fueron predichas dos hélices hidrofóbicas que podrían corresponder a dos cruces transmembranales. Tomando en cuenta el contexto genómico en que se encuentran RSP_0067 y RSP_6092, se decidió evaluar su posible participación en la movilidad de *R. sphaeroides*.

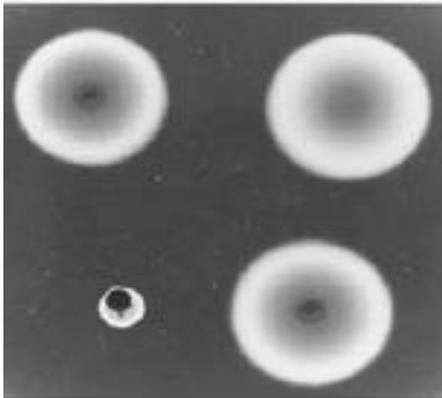
Se interrumpieron ambos marcos abiertos de lectura con un casete de resistencia al antibiótico espectinomina (*aadA*). Para ello, se siguió el procedimiento descrito en la sección de Materiales y métodos.

La capacidad de nado de ambas mutantes fue evaluada por microscopía y en cajas de agar suave. La mutante que tenía interrumpido RSP_6090 no sufrió afectaciones en el nado. Sin embargo, la cepa con la interrupción en RSP_0067 no fue capaz de nadar. Como se muestra en la figura 10 A, la cepa mutante en RSP_0067 no produjo el halo de nado característico de las cepas competentes para el nado.

Para descartar que otras mutaciones no detectadas pudieran ser las responsables del fenotipo observado para la cepa con la interrupción en RSP_0067, se procedió a reintegrar en dicha cepa el gen silvestre clonado en el vector de expresión pRK415. Al reintroducir el gen, la capacidad de nado de la cepa resultante fue similar a la detectada para la cepa silvestre (Figura 10 B), indicando que la ausencia de RSP_0067 es la única causa del fenotipo observado para la cepa mutante.

En este punto había que diferenciar entre los dos fenotipos que se podrían presentar. El fenotipo Fla⁻, en el cual las células pierden completamente el flagelo, o el fenotipo Mot⁻ en el cual las células ensamblan el flagelo correctamente, pero alguna deficiencia en el motor, impide su rotación.

Figura 10. Evaluación del nado de cepas mutantes y complementadas.



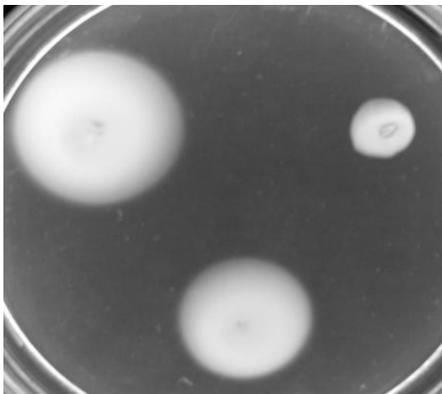
A. Evaluación de la capacidad de nado en cajas con agar suave.

Sup. Izq. WS8.

Sup. Der. VR5 (RSP6092::*aadA*),

Inf. Izq. VR1 (RSP0067::*aadA*)

Inf. Der. VR1/pRK_0067⁺

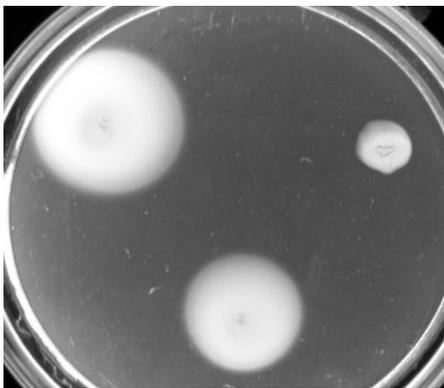


B. Evaluación de la capacidad de nado en cajas con agar suave.

Sup. Izq. WS8

Sup. Der. VR1 (RSP0067::*aadA*)

Inf. VR1/pRK415_0067⁺



C. Evaluación de la capacidad de nado en cajas con agar suave.

Sup. Izq. WS8

Sup. Der. VR1 (RSP0067::*aadA*)

Inf. VR1 pRK415_0067-inv.

Se buscó entonces la presencia de flagelos o flagelina por dos métodos: inmuno detección (Western blot) con anticuerpos policlonales anti-FliC (flagelina), y mediante la búsqueda de flagelos armados en el microscopio electrónico de transmisión.

Una alícuota de los cultivos de WS8 y de la mutante en RSP_0067 (VR1), fueron sometidas a un proceso de agitación vigorosa, el cual tiene como fin el

desprender y/o romper el filamento flagelar de la superficie celular. Las muestras obtenidas después de este procedimiento fueron centrifugadas y tanto el sobrenadante, como el precipitado fueron analizados por Western blot. En el sobrenadante y en el precipitado de ambos cultivos se detectó la presencia de flagelina (Figura 11A).

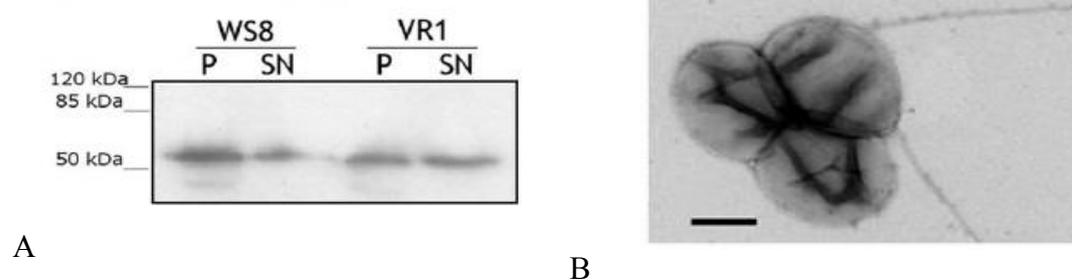


Figura 11. Análisis del fenotipo de la cepa VR1. **A.** Western blot anti-FliC, mostrando la presencia de flagelina tanto en el paquete celular como en el sobrenadante del cultivo de WS8 y VR1. **B.** micrografía electrónica de la cepa VR1, mostrando filamentos flagelares.

Asimismo, al observar muestras del cultivo de la cepa mutante VR1 al microscopio electrónico, se encontraron filamentos flagelares (Figura 11 B).

Estos dos resultados en conjunto indican que en ausencia de la proteína codificada por RSP_0067, las células son capaces de ensamblar el flagelo, pero son incapaces de hacerlo rotar, por lo tanto la cepa posee un fenotipo Mot-. Por esta razón se decidió renombrar a RSP_0067 como *motF*.

El gen *motF* se expresa a partir de su propio promotor en la clase III de la jerarquía flagelar.

La región intercistronica entre *flhB* y *motF* es de 53 pb. En esta zona se identificó una secuencia similar al promotor consenso del factor de transcripción sigma-54, el cual muestra como característica principal a los dinucleótidos GG y GC en las posiciones -24 y -12, respectivamente.

Con el objeto de determinar si esta secuencia representa un promotor funcional se procedió a clonar un fragmento de DNA que abarca la secuencia completa de *motF*, e incluye 259 pb río arriba a partir del sitio de inicio de la traducción. Este fragmento fue clonado en pRK415, en sentido opuesto al promotor *lac* presente en el vector, de tal forma que dicho promotor no tuviera una influencia positiva en la expresión del gen *motF*. Por otro lado, ha sido establecido que este plásmido no posee promotores adicionales cuya dirección de transcripción sea opuesta a la del promotor *lac*. El plásmido resultante, pRK_motFinv (Fig. 10 C), reestableció la capacidad de nado de la mutante VR1 (*motF::aadA*), lo que sugiere que *motF* se transcribe a partir de su propio promotor .

La presencia de una secuencia similar al consenso reconocido por el factor sigma-54, sugiere que el promotor de *motF* puede pertenecer a las clases II o III de la jerarquía flagelar^(Poggio 2005). Se procedió entonces a analizar la expresión del promotor de *motF* en diferentes fondos genéticos utilizando para ello un gen reportero. En caso de que el promotor de *motF* perteneciera a la clase II de la jerarquía flagelar, su expresión sería dependiente únicamente de FleQ; en caso de pertenecer a la clase III ésta sería dependiente de FleQ y FleT^(Poggio 2005).

Para establecer lo anterior, la región regulatoria de *motF* fue clonada río arriba del gen reportero '*uidA* el cual codifica para la enzima β -glucuronidasa^(Girard 2000). El plásmido resultante denominado pBB_0067prom, fue introducido a las cepas WS8, SP12 ($\Delta fleT1::aadA$) y SP13 ($\Delta fleQ1::Kan$) y la cantidad de enzima producida en cada una de estas cepas fue determinada (Tabla 1)

Tabla 1. Actividades específica de β -glucuronidasa*

Cepa	Actividad β -glucuronidasa
WS8-pBB_0067promF	333,914
SP12-pBB_0067promF	16,116
SP13-pBB_0067promF	5,492
SP7-pBB_0067promF	3,496

*nmoles de producto formado/min/mg proteína

Los resultados indican claramente que la expresión del promotor del gen *motF* requiere de la presencia de ambos activadores transcripcionales, esto es, de las proteínas FleQ y FleT; por lo tanto, *motFp* pertenece a la clase III de la jerarquía flagelar.

MotF es una proteína transmembranal con su segmento mayor presente en el periplasma.

El polipéptido codificado por MotF está formado por 239 aminoácidos. Un análisis de su secuencia primaria predice un segmento transmembranal (TM) entre los residuos 54 y 74. Con el fin de obtener evidencia experimental al respecto de la topología de esta proteína, se llevaron a cabo dos ensayos diferentes.

En el primero de ellos, se fusionó la proteína verde fluorescente (GFP) a los extremos amino (N-) o carboxilo (C-) terminal de MotF. Dado que ha sido reportado que la GFP sólo se pliega correctamente en el espacio citoplásmico^(Feilmeier 2000, Daley 2005), sólo la fusión que tuviera la GFP en el espacio periplásmico mostraría fluorescencia; por lo tanto, esta fusión revelaría el extremo de la proteína que se ubica en el espacio citoplásmico.

Ambas fusiones, GFP-MotF y MotF-GFP fueron expresadas a partir del promotor *plac*, presente en el plásmido pRK415, esto es con el propósito de expresar las fusiones independientemente del encendido de la cascada de regulación flagelar. Los plásmidos fueron introducidos a las cepas WS8 y VR1 (*motF::aadA*).

Se observó que la fusión GFP-MotF generó un foco de fluorescencia por célula, mientras que la fusión MotF-GFP no generó algún foco de fluorescencia detectable (Figura 12). Por lo tanto, los resultados anteriores sugieren que el segmento carboxilo terminal (C-) de MotF está localizado en el espacio periplásmico, mientras que el segmento amino (N) está en el citoplasma.

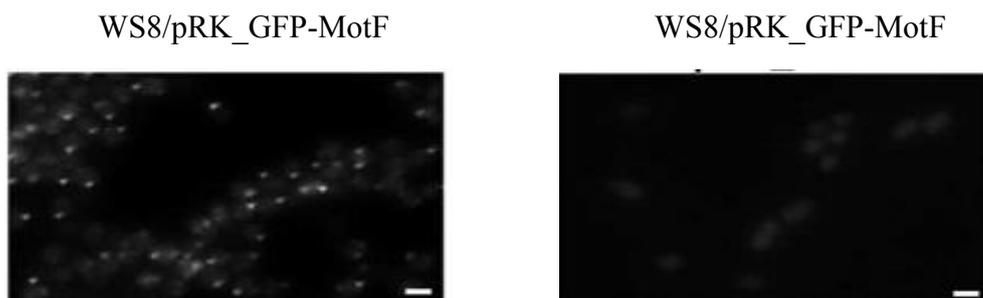


Figura 12. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de WS8 expresando las fusiones GFP-MotF y MotF-GFP, en las cepas WS8 y VR1. Longitud de la barra en las figuras: 2µm

Con el fin de establecer si la proteína de fusión era aún funcional, se evaluó la capacidad de nado de la cepa VR1 expresando ambas fusiones. Como se puede observar en la figura 13, la fusión que generó el foco de fluorescencia también complementó el fenotipo de nado de la cepa VR1; mientras que la fusión MotF-GFP, no restableció el nado. Por lo tanto, la proteína de fusión GFP-MotF además de ser un instrumento de rastreo para la localización de MotF, constituye una proteína funcional.

Para corroborar la topología de MotF, se llevó a cabo un ensayo de acceso de proteasas. Es importante mencionar que el anticuerpo anti-MotF fue generado utilizando únicamente el segmento carboxilo terminal de MotF, el cual se ubica después del cruce transmembranal, por ende los anticuerpos solo reconocen dicha parte de la proteína.

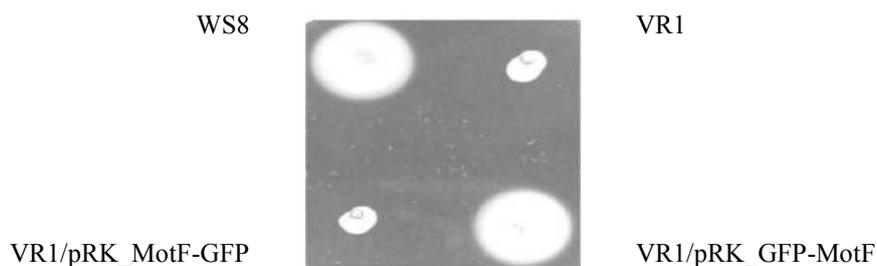


Figura 13. Cajas de nado de la cepa VR1 expresando las proteínas GFP-MotF y MotF-GFP.

Como se observa en la figura 14, la ausencia de la banda correspondiente a MotF cuando se somete a los esferoplastos al tratamiento con proteinasa K, confirma que el segmento largo de la proteína está expuesto en el espacio periplásmico, mientras que el extremo NH₂ terminal se encuentra en el espacio citoplásmico. Como

control se utilizó un anticuerpo que reconoce la proteína citoplasmática flagelar FliH. En este caso, la presencia de la proteínasa no afecta la estabilidad de la proteína.

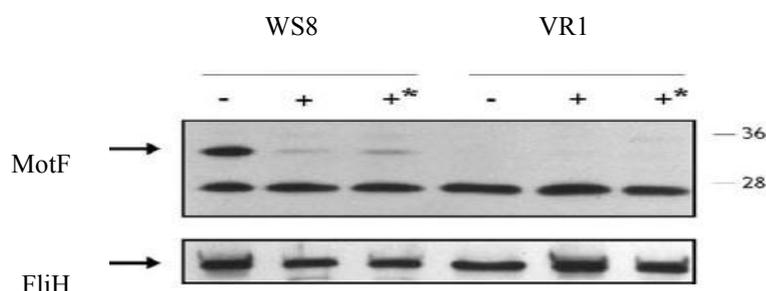


Figura 14. Ensayo de acceso de proteasas para MotF. (-) sin exposición proteínasa-k; (+) exposición a proteínasa-k por 10 minutos; (+*) exposición a proteínasa-k por 20 minutos. (Imagen obtenida por la Dra. Clelia Domenzain).

La localización de MotF depende de la presencia de un motor flagelar funcional.

Usando la fusión proteica GFP-MotF que se expresa independientemente del resto de los genes flagelares, se buscó algún fondo genético en el cual dicha fusión tuviera un cambio en la formación de focos de fluorescencia o ausencia de los mismos.

Al expresar GFP-MotF en ausencia de los activadores de la transcripción FleQ y FleT (mutantes SP12 y SP13), no se encontraron focos de fluorescencia, a pesar de que el Western blot reveló la presencia de la proteína de fusión en cantidades similares a la presente en WS8 y VR1; en estas últimas cepas la proteína de fusión sí generó focos de fluorescencia (Figura 15). Esto sugiere que la proteína GFP-MotF requiere de la presencia de alguna o algunas proteínas flagelares para ser localizada y generar el foco de fluorescencia.

Para averiguar cual podría ser la proteína encargada del agrupamiento y/o localización de MotF, se expresó la proteína de fusión GFP-MotF en varios fondos genéticos. Hay que tomar en cuenta que la ausencia de focos de fluorescencia en la ausencia de FleT indica que la proteína responsable de la localización debe ser una proteína expresada en la clase III o IV de la jerarquía flagelar.

Tomando en cuenta que la ausencia de MotF genera un fenotipo Mot-, probamos diversas cepas mutantes que tuvieran el mismo fenotipo (Mot-) para expresar la proteína de fusión GFP-MotF. Estas mutantes había sido previamente aisladas en el laboratorio y eran mutantes en los genes *fliL*, *motA*, *motB* y la cepa SF3, que tiene interrumpido el marco abierto de lectura RSP_6086. La proteína codificada por este marco abierto de lectura, está siendo estudiada y es el tema de investigación en el laboratorio, su ausencia genera también el fenotipo Mot- y es una proteína que se encuentra en el periplasma.

Al expresar GFP-MotF, en las mutantes FS3 (*fliL3::aadA*) y FS4 (*motB1::Kan*) se observaron dos o tres focos de fluorescencia formados por la proteína GFP-MotF (Figura 15). Sin embargo, la proteína de fusión GFP-MotF expresada en la cepa silvestre, WS8, en la cepa VR1, o en una mutante que carece de la proteína formadora del eje flagelar (SP18), presenta un simple foco de fluorescencia (Figura 15). Estos resultados sugieren que un defecto en la rotación del motor flagelar provocan la deslocalización de MotF.

Sorpresivamente, la expresión de GFP-MotF en la cepa mutante SF3 (RSP_6086) no generó focos de fluorescencia, lo que sugiere que en ausencia del producto codificado por RSP_6086, MotF no puede agruparse y generar fluorescencia.

Los diferentes patrones de localización observados en estas cepas no fueron el resultado de diferentes niveles de expresión o de estabilidad de la proteína, pues la cantidad de GFP-MotF es similar en estas cepas, como lo muestra la figura 15.

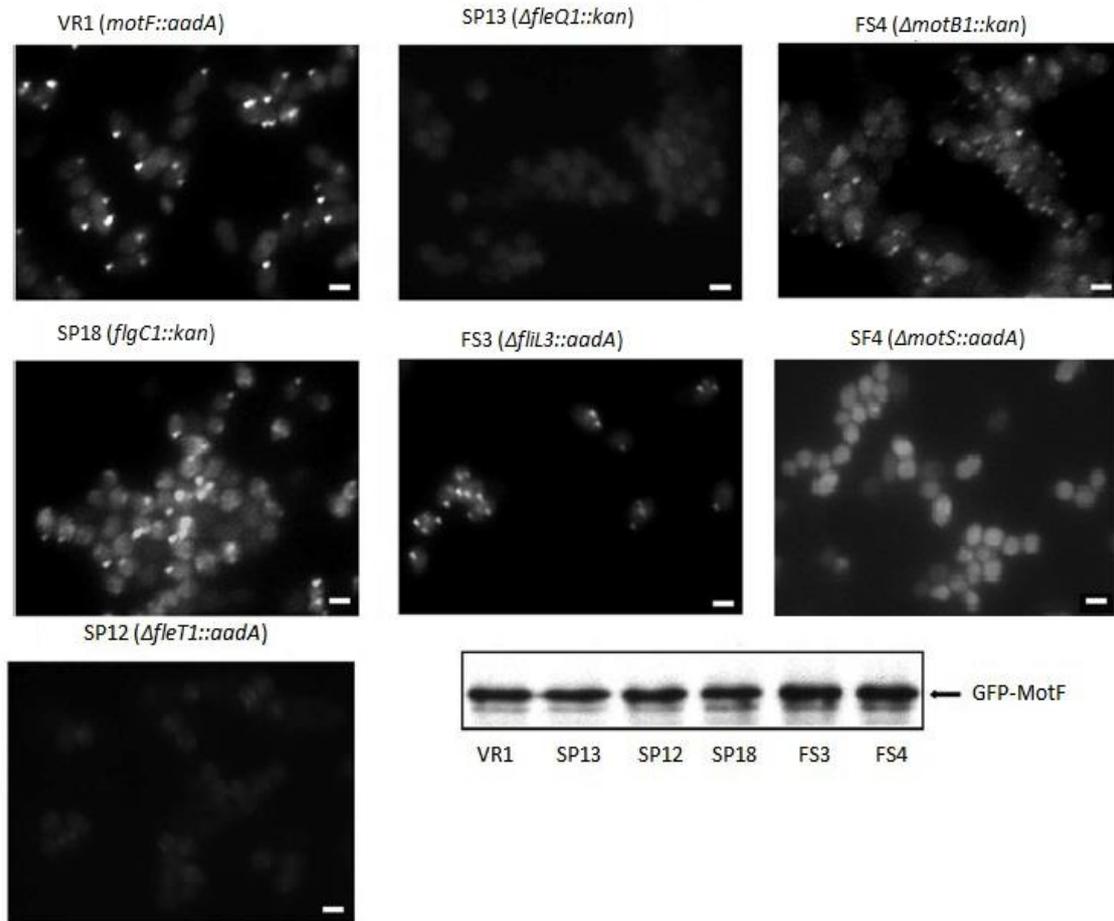
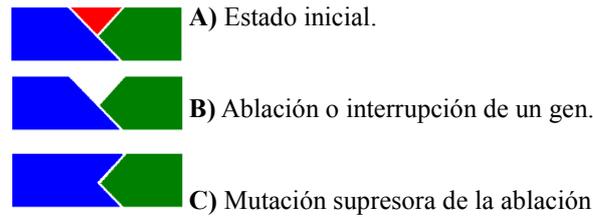


Figura 15. Expresión de GFP-MotF en distintos fondos genéticos, y verificación de la expresión de la proteína de fusión mediante Western blot. La longitud de la barra blanca equivale a 2 μ m.

Mutaciones puntuales en *motB* recuperaron el nado en ausencia de MotF .

El aislamiento de mutantes supresoras o pseudorevertantes, brinda la posibilidad de detectar que otros genes participan en el fenotipo que se está analizando. Por ejemplo, en la figura 16, el esquema muestra un sistema completo de tres elementos los cuales son capaces de interactuar entre si. Sin embargo, por alguna mutación se pierde uno de los componentes del sistema y éste queda incompleto y por tanto no es funcional; puede surgir entonces, una mutación que altera alguna de las proteínas restantes que podrían compensar la pérdida.

Figura 16. Esquema que ilustra el fenómeno de la supresión.



Anteriormente, en el laboratorio se habían aislado cepas supresoras extragénicas de la mutación $\Delta fliL3::aadA$ ^(Suaste-Olmos 2010). Las cepas pseudorevertantes del alelo $\Delta fliL$ fueron aisladas incubando cajas de nado durante una semana. Pasado este tiempo, se observó que del punto de inoculación emergieron poblaciones que habían recuperado la capacidad de nado sin perder la mutación en $fliL$ ^(Suaste-Olmos 2010).

Tomando en cuenta estos antecedentes, se prepararon cajas de nado y se inocularon con la cepa VR1($motF::aadA$). Las cajas se incubaron por varios días, obteniendo un par de halos de nado de los que se aislaron dos pseudorevertantes independientes.

Para determinar que mutación compensó la falta de MotF, se secuenciaron los genes relacionados con la rotación del motor, esto es, $motA$, $motB$, $fliL$, $fliM$ y $fliN$. Al comparar las secuencias resultantes con las secuencias silvestres previamente reportadas, se encontró una mutación puntual en $motB$ ^(Porter 2011). En ambas mutantes, la mutación provocó el cambio de la serina 62 por prolina (S62P).

Este aminoácido está localizado inmediatamente después del segmento transmembranal del MotB. Para confirmar que el cambio en MotB es suficiente para suplir la ausencia de $motF$, se procedió a introducir en la cepa doble mutante VR2 ($motF::aadA$ $motB1::Kan$), un plásmido que expresa el alelo $motB$ S62P. La cepa VR2, no recupera la capacidad de nado cuando el gen silvestre $motB$ es introducido en el plásmido pRK415. Sin embargo, al introducir el plásmido que expresa el alelo supresor de $motB$, la cepa recuperó el fenotipo de nado (Figura 17 A). Este resultado indica que MotB S62P es suficiente para suplir la ausencia de MotF

Como fue mencionado en los párrafos anteriores, en el laboratorio se habían aislado cepas supresoras a partir de la mutante FS3 ($\Delta fliL3::aadA$) de *R. sphaeroides*. La caracterización de las cepas supresoras reveló que uno solo de los distintos cambios que hubo en la región periplásmica de MotB, fue suficiente para restaurar el fenotipo de nado de la cepa FS3^(Suaste-Olmos 2010).

Resultó interesante encontrar que la mutación supresora de *motF* mapea en la misma región en que lo hacen los supresores de $\Delta fliL$. Lo que nos llevó a investigar si los alelos supresores de $\Delta fliL$ también puede compensar la ausencia de *motF*.

Para ello, la cepa VR2 ($\Delta motF::aadA \Delta motB1::Kan$) fue transformada con los plásmidos que expresan los diferentes alelos mutantes de *motB*, originalmente aislados como supresores de $\Delta fliL::aadA$. La figura 17 B muestra que los alelos mutantes de *motB* aislados como supresores de $\Delta fliL$, fueron capaces de restablecer el nado de la cepa VR2.

Este resultado sugiere que MotF podría controlar la rotación del motor flagelar afectando directa o indirectamente la conformación de MotB, al igual que lo hace FliL.

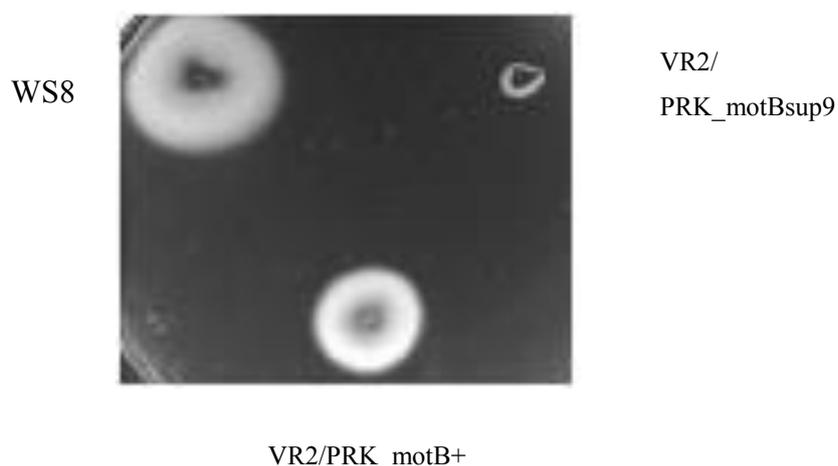
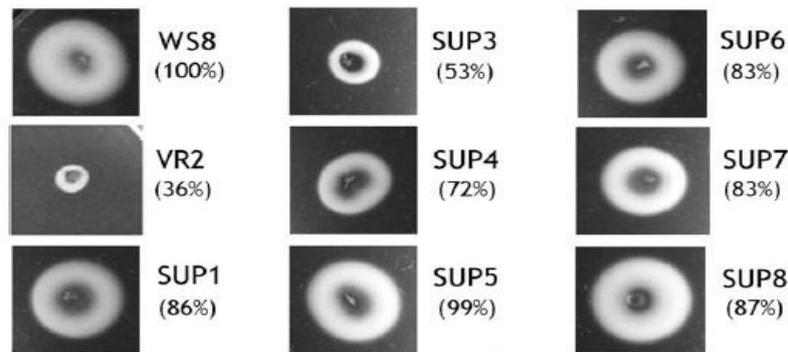


Figura 17. A) Caja de nado con la cepa silvestre (WS8) y la mutante VR2 (*motF::aadA motB::Kan*) expresando el plásmido que contiene el alelo supresor de *motB*, y *motB* silvestre.



B) Cajas de nado mostrando la complementación de la doble mutante VR2 (*motF::aadA motB::Kan*), con los diferentes alelos supresores de *fliL::aadA*.

Sin embargo, es notorio que no todas las mutaciones supresoras generaron el mismo efecto cuando fueron introducidas mediante conjugación en la cepa VR2.

Hay que tomar en cuenta que el tema de la generación de halos de nado es un asunto multifactorial, pues no solo depende de la funcionalidad del motor flagelar, sino de otros factores como el correcto ensamble del sistema quimiotáctico y/o la posible afectación de la velocidad del crecimiento de la cepa inoculada.

Entonces, consideramos que el fenotipo en la caja de nado también debe reflejar el funcionamiento del motor flagelar y por ende los alelos supresores deberían complementar a la cepa VR2 en función de cómo modifican la estructura del estator flagelar.

Así pudimos observar que la mutante MotB A56E (SUP3) mostró la menor capacidad para suprimir el fenotipo Mot-, mientras que MotB A67E (SUP1), MotB A67D (SUP5) y MotB A67G (SUP8) permitieron una mejor recuperación del nado. MotB F63L (SUP4), MotB F63L (SUP7) y MotB A67T (SUP6) tuvieron un nivel de nado intermedio. Es probable que el grado de complementación observado para cada una de diferentes versiones de MotB esté directamente relacionado con qué tanto se puede abrir el canal de protones de MotB en función de cada una de las sustituciones.

Al expresar en la cepa VR2, los alelos de motB que afectan el aminoácido 67, la capacidad de nado de la cepa se recuperó de forma notable. Este residuo podría ser muy importante para mantener la interacción hidrofóbica entre la membrana y la hélice anfipática de la compuerta de protones. Es posible suponer que el cambio de un residuo de alanina por un residuo cargado negativamente (como ocurre en SUP1 y en SUP5) o por un residuo polar (como ocurre en SUP6) o por un residuo pequeño y altamente móvil (como ocurre en SUP8) podrían estabilizar o favorecer la apertura del canal y por tanto provocar una mejor recuperación del fenotipo.

En contraste, la cepa con la mutación A56E (SUP3) prácticamente no pudo nadar desde el punto de inoculación y cuando se observó al microscopio, pocas células nadaban, usualmente éstas interrumpían frecuentemente su trayectoria y al parar rara vez recuperaban el nado. En este caso, el aminoácido A56, no está en el segmento identificado como tapón, sino que se ubica en el límite del cruce transmembranal, el cambio en la carga del residuo puede afectar la hélice que se originaría a partir de ese punto y de esa forma promover la apertura parcial del canal.

Importancia de las regiones localizadas a los lados del cruce transmembranal de la proteína MotF.

Cuando se ensambla el complejo MotA/B, la región periplásmica de MotB sufre cambios conformacionales importantes. En esta zona se encuentran al menos dos motivos relevantes para el funcionamiento del canal de protones, una es el tapón (plug), el cual está localizado exactamente después del cruce transmembranal y la otra es el sitio de unión a peptidoglicano.

Los cambios conformacionales que sufre MotB, podrían ser dependientes de la presencia de otras proteínas flagelares, como FliL y MotF, las cuales poseen un largo segmento periplásmico. En dado caso, es posible que la región adyacente al cruce transmembranal de MotF pudiera estar involucrada en favorecer los cambios conformacionales en MotB. Para analizar esto llevamos a cabo dos ablaciones en MotF.

En la primera se eliminaron los residuos 77 a 98 ($\Delta motF4$), en este caso fueron eliminados los aminoácidos periplásmicos adyacentes al segmento transmembranal; y en la otra construcción se eliminaron los aminoácidos 29 a 49 ($\Delta motF3$) que es la región previa al cruce transmembranal la cual coincide además con una zona predicha como de interacción proteína-proteína tipo hélice enrollada (coiled-coil).

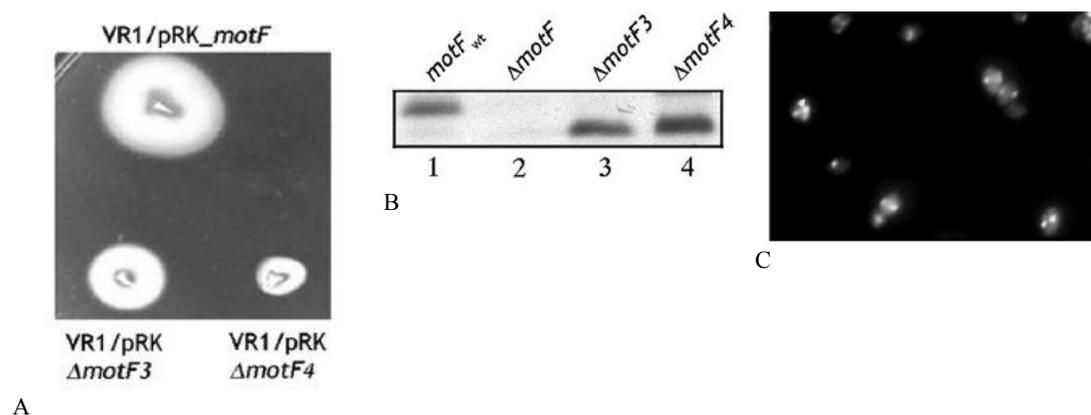


Figura 18. Efecto de la eliminación de las zonas aledañas al cruce transmembranal de MotF. **A.** Caja de nado de las cepas que expresan MotF Δ 77-98 y MotF Δ 29-49. **B.** Western blot de las cepas que expresan MotF Δ 77-98 y MotF Δ 29-49. **C.** Microscopía de fluorescencia de la ablación de la cepa que expresa la proteína de fusión GFP-MotF Δ 77-98.

Al expresar las proteínas MotF Δ 77-98 y MotF Δ 29-49 en la mutante VR1 encontramos que la proteína con la ablación previa al cruce transmembranal (MotF Δ 29-49) complementa parcialmente el fenotipo Mot⁻ de la cepa VR1. En contraste, la proteína mutante MotF Δ 77-98 no restituyó la capacidad de nado de la cepa VR1, lo que sugiere que esta región de la proteína es necesaria para la función de MotF (Figura 18 A). Es necesario mencionar que ambas proteínas son estables y se detectaron en cantidades similares con respecto a la proteína silvestre, de acuerdo al ensayo de inmunodetección mostrado en la Figura 18 B. Dado que MotF Δ 29-49 sí es capaz de promover el nado de la cepa VR1, se esperaría que MotF se encuentre asociada a la estructura flagelar. Sin embargo, MotF Δ 77-98 es incapaz de promover el nado de las células aunque la proteína sí es estable. Con base en estas observaciones, nos preguntamos si la proteína de fusión GFP-MotF Δ 77-98 sería o no, capaz de localizarse. Para evaluar esta cuestión, se construyó la fusión GFP-MotF Δ 77-98, la cual fue expresada en la mutante VR1, a partir del promotor *lac* presente en el

plásmido pRK415. La expresión de esta proteína de fusión generó dos o más focos de fluorescencia por célula (Figura 18 C), tal y como sucede cuando se expresa la fusión GFP-MotF en ausencia de FliL (FS3) y de MotB (FS4) (Figura 15).

De acuerdo a este resultado, podríamos suponer que la región periplásmica de MotF comprendida entre los aminoácidos 77 al 98, podría ser necesaria para la posible interacción de MotF con FliL o MotB, ya que la presencia de varios focos de fluorescencia fue también observada en ausencia de estas proteínas. Alternativamente, MotF Δ 77-98 podría aún interactuar con el resto de los componentes necesarios, y sin embargo, la conformación de MotF Δ 77-98 puede estar alterada e impedir la apertura del canal de protones (con el correspondiente cambio conformacional de MotB) con lo cual el defecto en el motor podría traducirse en la observación de varios puntos de fluorescencia.

Por otro lado, el hecho de que la proteína de fusión GFP-MotF Δ 77-98 genere varios focos de fluorescencia nos hace suponer que esta versión de la proteína retiene su capacidad de interactuar con el producto de RSP_6086, de lo contrario hubiera sido esperada la ausencia de puntos de fluorescencia.

Interacción de MotF con otras proteínas flagelares.

Originalmente se intentaron llevar a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación de la proteína para lo cual se sobre-expresó el segmento periplásmico de MotF en el vector de expresión pBAD-HisC. Se sobreexpresó la proteína y se purificó mediante una columna de níquel. Sin embargo, al llevar a cabo los ensayos de interacción de nuestro péptido con otros péptidos fusionados a la glutatión-S-transferasa (GST) encontramos que nuestra proteína por sí sola se unía a la resina de glutatión reducido. Fue por esta imposibilidad de discriminar entre la unión de MotF al glutatión de la resina, y la unión de MotF a otras proteínas, que decidimos descartar estos experimentos y llevar a cabo un ensayo de doble híbrido en levaduras, el cual reporta las interacciones proteína-proteína *in vivo*.

Para ello, se fusionó la región periplásmica de MotF al dominio de activación (AD) de la proteína GAL4 (MotFp-AD). También se fusionó el dominio AD de GAL4, con la región periplásmica de MotFp Δ 77-98. Los plásmidos que codifican para estas proteínas de fusión fueron introducidos a la cepa de levadura, AH109. Posteriormente, a las cepas transformadas con este primer plásmido, se les introdujo un segundo plásmido que expresaba el dominio de unión a DNA (BD) de GAL4, fusionado a las regiones periplásmicas de MotBp, o de FliLp. Estos plásmidos se denominaron BD-MotBp o BD-FliLp. Se probó la capacidad de crecimiento de las cepas resultantes en medios que carecen de histidina o de adenina. En caso de que las proteínas MotFp y/o MotFp Δ 77-98 interaccionasen con MotB y/o con FliL, los dominios BD y AD de GAL4 se acercarían lo suficiente para permitir la activación transcripcional de los genes HIS3 y ADE2, en consecuencia la cepa mostraría prototofia por estos compuestos. Los resultados de estos experimentos demostraron que MotF y MotF Δ 77-98 son incapaces de interactuar con MotB o con FliL (Figura 19).

Vale la pena mencionar que también se probó la interacción de MotF (AD-MotFp) con la fusión BD-MotB Δ plug, la cual carece de los residuos que conforman el tapón del canal de protones (aminoácidos 62 al 68). Como se puede apreciar en la figura 19, estas proteínas tampoco fueron capaces de interactuar.

Este mismo ensayo se realizó utilizando los plásmidos que expresan AD-MotF y AD-MotF Δ 77-98 pero en este experimento, éstos se co-transformaron con el plásmido que expresa la fusión del dominio de unión a DNA de GAL4 (BD) con la proteína codificada por RSP_6086 sin péptido señal (BD-6086).

Se observó que MotF y la proteína codificada por RSP_6086 no interactúan, dado que las levaduras permanecen como auxótrofas de histidina y adenina. Sin embargo, MotF Δ 77-98 si mostró interacción con la proteína codificada por RSP_6086, ya que las levaduras pudieron crecer en ausencia de histidina. El hecho de que estas cepas pudieron crecer en ausencia de histidina indica interacción media entre ambas proteínas (Figura 19).

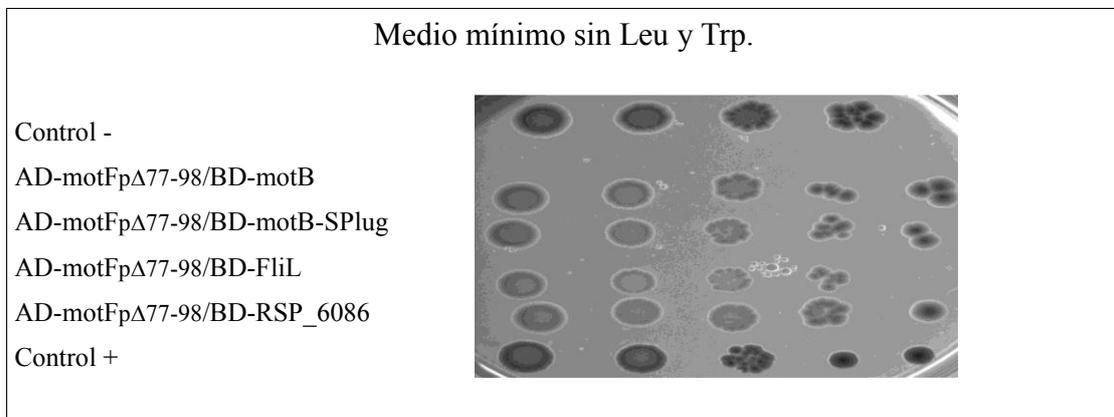
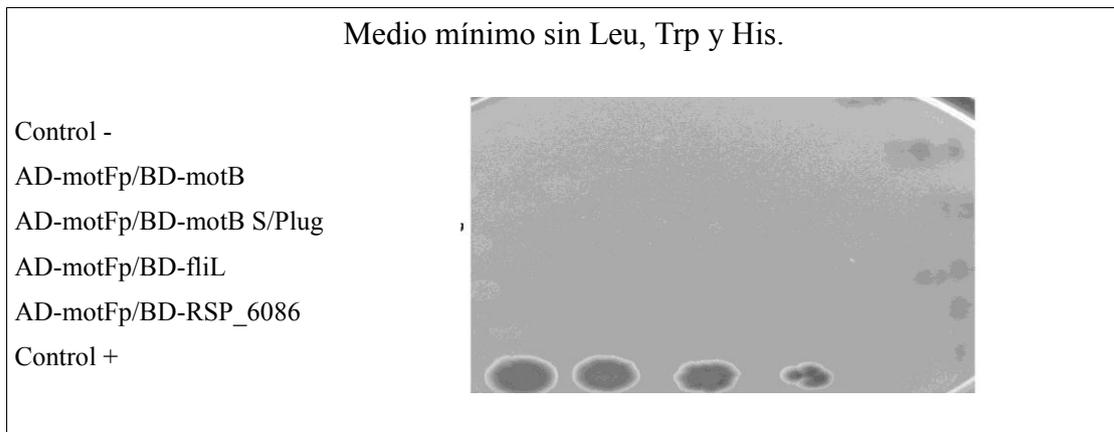
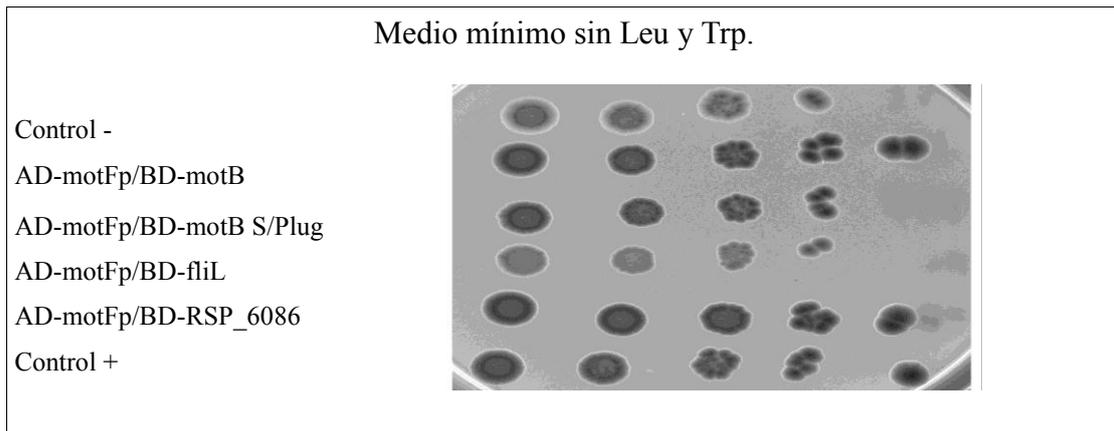


Figura 19. Ensayo de doble híbrido en levaduras. En primer y tercer lugar se muestran las cajas de medio SD sin los aminoácidos leucina y triptófano, en donde únicamente se selecciona la presencia de los plásmidos pGADT7 y pGBKT7. En segundo y cuarto sitio se observan las cajas de crecimiento con medio SD sin los aminoácidos HLT, cuando hay alguna interacción fuerte entre ambas proteínas, crecen las colonias. En primer y segundo lugar se muestra el crecimiento de las levaduras que expresan la fusión AD-MotFp. En tercer y cuarto lugar se muestra el crecimiento de las levaduras que expresan la fusión AD-MotFp Δ 77-98 (región periplásmica sin los aminoácidos contiguos al cruce transmembranal).

Medio mínimo sin Leu, Trp y His.

Control -

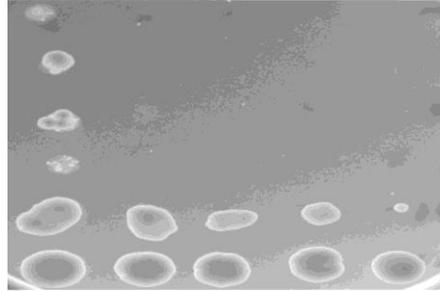
AD-motFp Δ 77-98/BD-motB

AD-motFp Δ 77-98/BD-motB-SPlug

AD-motFp Δ 77-98/BD-FliL

AD-motFp Δ 77-98/BD-RSP_6086

Control +



Discusión

Contexto genético y expresión de MotF y RSP_6092

Estudios comparativos de los componentes flagelares entre diversas especies bacterianas han hecho evidente que existen elementos adicionales a los ya descritos para *E. coli* y *S. enterica*. Ejemplos de esto son las proteínas MotX y MotY, que son parte del motor dependiente de sodio de *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*. También, la proteína MotC de *S. meliloti*, que funciona como embrague y controla la velocidad de la rotación flagelar ^(Platzer 1997).

En este trabajo, reportamos la existencia de una proteína transmembranal que es esencial para la rotación del flagelo 1 (Fla1) de *R. sphaeroides*. Dicha proteína se encuentra codificada por el gen *motF*, cuyo locus está dentro del contexto flagelar 1 y se encuentra en todas las especies secuenciadas de *R. sphaeroides*.

Fuera de *R. sphaeroides*, sólo hay similitud de MotF con alguna secuencia presente en la base de datos del metagenoma marino; por lo tanto, existe la posibilidad de que en alguna otra especie pudiera encontrarse el gen *motF* y participar en la misma función.

El gen *motF* aparentemente forma un operón con el marco abierto de lectura, RSP_6092. Sin embargo, la mutación por interrupción de RSP_6092 no tuvo efectos aparentes en el nado, sugiriendo que este gen es irrelevante para el nado de *R. sphaeroides* en condiciones de laboratorio.

La expresión de *motF* es dependiente de su propio promotor, el cual es reconocido por la RNA polimerasa asociada al factor sigma-54 y es dependiente de los activadores FleQ y FleT. El hecho de que la transcripción de *motF* dependa de FleQ y FleT indica que éste pertenece a la clase III de la jerarquía flagelar de *R. sphaeroides* ^(Girard 2000) en donde su expresión coincide con la expresión del resto de las proteínas del cuerpo basal y del estator ^(Girard 2000). Presumiblemente, MotF se

incorpora a la estructura flagelar al mismo tiempo en el cual se ensambla el cuerpo basal y los complejos del estator.

Homología de *motF* con genes de otros organismos

Durante todo el tiempo en que se desarrolló el presente trabajo se realizaron búsquedas mensuales de proteínas homólogas a MotF, esto mediante los algoritmos blast-p y psi-blast, usando la base de datos de proteínas no redundante (nr) y con los parámetros de búsqueda pre-establecidos al entrar a la página. Fueron consideradas como homólogas las proteínas cuyos valores de E menores a 0.1. El resultado de esta búsqueda nunca arrojó resultados positivos, a excepción de las proteínas homólogas provenientes de otras cepas de *Rhodobacter sphaeroides* como ATCC 17029, ATCC 17025 y KD131.

Sin embargo, cuando se realizó la búsqueda usando blastp, pero comparando con la base de datos de proteínas hipotéticas presentes en metagenomas, se obtuvieron dos posibles proteínas homólogas, con valores de E de .04 y .07. Derivado de esto, consideramos que es probable que existan proteínas homólogas en otros microorganismos. Es probable que estas proteínas homólogas de MotF podrían también servir para controlar la rotación del flagelo en las bacterias marinas de donde se obtuvo el metagenoma.

Es importante mencionar que *motF* se localiza entre un grupo de genes flagelares obtenidos por transferencia horizontal. En este sentido, es probable que el grupo de genes hubiese sido obtenido desde alguna γ -proteobacteria marina, la cual fue secuenciada en el metagenoma mencionado.

Topología de MotF

Usando las fusiones proteicas MotF-GFP y GFP-MotF, determinamos que MotF tiene su región más grande en el espacio periplásmico, la cual corresponde a los aminoácidos 75 a 239. El fenotipo observado para la mutante *motF* aunado a la

topología, nos llevó a preguntarnos si MotF podría interactuar con las regiones periplásmicas de MotB, FliL o con RSP_6086, la cual es una proteína periplásmica.

Mediante un ensayo de interacción proteína-proteína, detectamos que la versión de MotF que carece de los aminoácidos adyacentes a la región transmembranal (MotF Δ 77-98) es capaz de interactuar con RSP_6086, pero no así la proteína MotF silvestre.

Este resultado sugiere que la proteína completa y aislada de otros componentes flagelares, adquiere una conformación desfavorable para la formación del complejo MotF-RSP_6086. A partir de esta observación podríamos suponer que MotF requiere un cambio conformacional para poder asociarse a RSP_6086. Dicho cambio podría ser causado por su interacción con algún otro componente flagelar. Inicialmente consideramos que MotF podría interactuar con FliL y/o con MotB a través de sus regiones periplásmicas. El ensayo de doble híbrido en levadura no confirmó esta hipótesis. No obstante, queda la posibilidad de que la región de interacción pudiera encontrarse muy cercana a la zona límite de la fusión y de ahí que el dominio AD o BD podría haber obstruido dicha interacción. Alternativamente, MotF podría interactuar con sus blancos a través de su región transmembranal. En este sentido, en este trabajo fue identificada la secuencia GXXXG dentro del segmento transmembranal de MotF, dicha secuencia es parte del motivo conocido como cierre de glicinas, el cual ha sido propuesto como un motivo relevante para la interacción entre proteínas de membrana ^(Senes 2004) (Secuencia del gen y proteína en anexo 3).

Independientemente de que exista un paso previo en el cual MotF cambia de conformación, los resultados sugieren que MotF y RSP_6086 interactúan y dicha interacción no requiere de la región comprendida entre los aminoácidos 77-98. La asociación entre MotF y RSP_6086 podría favorecer la apertura del canal de protones, o podría estabilizar la asociación del rotor con el estator.

Localización de MotF y proteínas del motor flagelar.

En este trabajo se caracterizó el patrón de localización de la proteína de fusión GFP-MotF en diferentes fondos genéticos con la idea de encontrar algún cambio en la localización de MotF provocado por la ausencia de alguna o algunas proteínas. En el experimento no se encontró localización de MotF en las cepas que no expresan los genes de clases II y III, que son las cepas mutantes SP12 ($\Delta fleT1::Kan$) y SP13 ($\Delta fleQ1::Kan$). Lo cual indica que es necesaria la presencia de alguna o algunas proteínas codificadas por genes de la clase III flagelar.

Dado que MotF, MotB y FliL parecieran tener funciones y topología similares, y que RPS_6086 se ubica en el espacio periplásmico, investigamos si la localización de GFP-MotF es dependiente de alguna de estas tres proteínas. Al expresar GFP-MotF se generó un sólo foco de fluorescencia en la cepa silvestre y en la mutante SP18 ($flgC1::Kan$); pero en las mutantes carentes de las proteínas FliL y MotB se observaron múltiples focos de fluorescencia por célula, indicando que estas proteínas son necesarias para la correcta localización de MotF, pero no para su agrupación. Al expresar la fusión en la mutante en RSP_6086, no se observaron focos de fluorescencia, por lo cual esta proteína, expresada en la clase III de la jerarquía flagelar, es necesaria para agrupar a MotF.

Por lo tanto se puede considerar que MotF, por un lado se agrupa gracias a su asociación con RSP_6086; y por otro lado, MotF puede localizarse como un solo punto en la célula, cuando existe un motor flagelar completo y/o funcional.

Supresión de la mutación de MotF

En el laboratorio previamente se había determinado que la proteína FliL es esencial para la rotación flagelar en *R. sphaeroides* (Suaste-Olmos 2010). En ese trabajo, se aislaron varias cepas que tenían alguna mutación puntual en *motB* la cual permitía la rotación en ausencia de FliL (Suaste-Olmos 2010). Todas estas mutaciones se encontraron en la región periplásmica de MotB, comprendida entre los aminoácidos 56 al 67. Dicha

región en MotB de *E. coli* ha sido identificada como la compuerta para el canal de protones^(Hosking 2006, Suaste-Olmos 2010). Se ha propuesto que este segmento de la proteína mantiene cerrado el canal de protones de MotA/B hasta que MotB es incorporado en la estructura flagelar^(Suaste-Olmos 2010). Tomando en cuenta que en un trabajo anterior en el laboratorio se demostró que MotB y FliL no interactúan entre sí, se propuso que FliL puede participar indirectamente en el control de la apertura del canal^(Suaste-Olmos 2010).

En este trabajo fue aislado un alelo supresor de *motF*, el cual fue mapeado en la región correspondiente al aminoácido 62 de MotB. Asimismo demostramos que todos los alelos de *motB* que suprimen la mutación $\Delta fliL$, fueron capaces de suprimir el fenotipo Mot- provocado por la ausencia de *motF*. Por lo tanto, MotF, al igual que FliL, puede ser dispensable para la rotación del flagelo, siempre y cuando MotB lleve alguna de las mutaciones que nosotros hemos asociado a la presencia de un canal de protones abierto.

Por lo anterior, proponemos que tanto FliL como MotF participan en el proceso que activa el canal de protones formado por las proteínas MotAB.

CONCLUSIONES

1. MotF es indispensable para la rotación del flagelo de *R. sphaeroides*.
2. *motF* se expresa dentro de la clase III de la jerarquía flagelar y por ende, su expresión es dependiente de los activadores FleQ y FleT.
3. *motF* es expresado a partir de su propio promotor.
4. MotF es una proteína de membrana, en la cual el extremo NH₂ terminal se ubica en el citoplasma, la región comprendida entre los aminoácidos 54 al 74 corresponden al cruce transmembranal y el resto de la proteína se ubica en el espacio periplásmico.
5. La proteína de fusión GFP-MotF se localiza como un sólo punto de fluorescencia en la cepa silvestre.
6. FliL y MotB son esenciales para localizar a la proteína GFP-MotF.
7. La proteína codificada por RSP_6086 es necesaria para agrupar a la proteína GFP-MotF.
8. El producto de RSP_6086 interactúa con MotF Δ 77-98 pero no con MotF silvestre, sugiriendo que MotF podría tener al menos dos conformaciones.
9. Las versiones mutantes de MotB que presumiblemente mantienen abierto el canal de protones permiten la rotación del flagelo en ausencia de MotF .
10. MotF y FliL podrían participar en la apertura del canal de protones o en mantener la estabilidad del mismo. Asimismo, un estator funcional y/o un canal abierto, estabiliza la proteína MotF en la base del flagelo.

Material y Métodos.

Plásmidos, cepas bacterianas y condiciones de crecimiento: Las cepas bacterianas y plásmidos usados en este trabajo son enlistados en la Tabla 2. La cepa *R. sphaeroides* WS8 (Socket 1990) fue cultivada a 30°C en medio mínimo de Siström (Siström 1962) tanto en condiciones fototróficas como fotoheterotróficas. Las cepas de *E. coli* fueron crecidas bajo condiciones comúnmente reportadas (Ausubel 1987). Los antibióticos fueron usados a las siguientes concentraciones: kanamicina a 25 µg/ml, espectinomicina a 50µg/ml, y tetraciclina a 1 µg/ml para *R. sphaeroides*. Ampicilina a 100 µg/ml, kanamicina a 50 µg/ml, tetraciclina a 10 µg/ml, gentamicina a 30 µg/ml y espectinomicina a 50 µg/ml para los cultivos de *E. coli*. Los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* se crecieron en el medio de cultivo YPDA (extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%, y adenina al 0.003%) o en medio mínimo sintético definido (SD) de Clontech con los suplementos indicados.

Aislamiento de cepas mutantes. El gen *motF* fue amplificado por PCR usando como iniciador los oligonucleótidos RSP_0067F y RSP_0067R. Se obtuvo un producto de 808 pares de bases que fue clonado en el vector pTZ19R al cual le fue eliminado el sitio de restricción *SacI*, previamente fue digerido con las enzimas *XbaI* y *BamHI*. EL plásmido resultante se denominó pTZ_ *motF*).

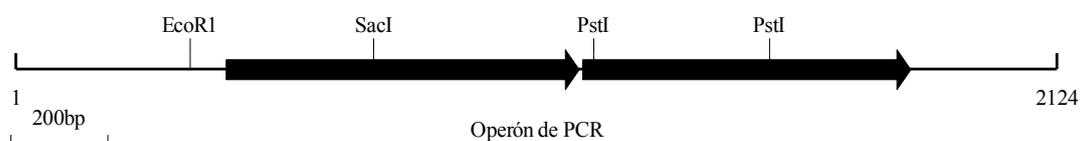


Figura 20. Marcos abiertos de lectura RSP_0067 y RSP_6092 mostrando los sitios de restricción usados para interrumpirlos.

El gen *aadA* que codifica para el aminoglicósido 3'-adeniltransferasa fue obtenido por PCR, el producto de esta amplificación elimina los extremos del cassette *aadA* que lleva terminadores transcripcionales^(Metcalf 1993). Este fragmento fue clonado dentro de *motF* usando el sitio único *SacI* presente en RSP_0067 (Figura 20). El fragmento de DNA que contenía la construcción *motF::aadA* fue subclonado en el vector suicida pJQ200mp18^(Quandt 1993) y conjugado a WS8 usando la cepa de *E. coli* S17-1^(Simon 1982). Las cepas transconjugantes resistentes a espectinomicina y sensibles a gentamicina fueron seleccionadas y el intercambio alélico fue confirmado por PCR. Adicionalmente la cepa VR2 (Δ *motF::aadA*, Δ *motB1::Kan*) fue obtenida mediante la introducción del alelo Δ *motB1::Kan*^(Suaste-Olmos 2010) en la cepa VR1.

Ensayos de movilidad. Se prepararon cajas de medio mínimo de SistroM con agar al 0.25%. Estas cajas fueron inoculadas con cinco microlitros de cultivo en fase estacionaria. Después de 30 horas de incubación a 30 °C se evaluó la capacidad de nado.

Plásmidos construidos para este trabajo. La cepa mutante VR1 fue complementada usando el plásmido pRK415_ *motF* o pRK415_ *motF*inv. Estos plásmidos fueron obtenidos mediante la clonación del producto de la amplificación por PCR usando los oligonucleótidos RSP_0067F y RSP_0067R en el vector pRK415 o 0067FwBam y 0067RvHind, respectivamente. Las ablaciones internas a *motF* fueron obtenidos por PCR inverso, usando el plásmido pTZ19R-*motF* como molde y los oligonucleótidos NoCC67FwdBglII y NoCCRvsBglII; o los oligos 67co 2-1 y 67co 2-2. Los plásmidos resultantes fueron digeridos con *XbaI* y *BamHI* y los fragmentos apropiados de DNA fueron subclonados en pRK415 para obtener los plásmidos pRK_ Δ *motF*3 and pRK_ Δ *motF*4. Para obtener pBB_0067prom, un producto de PCR de 455 pares de bases, generado con los oligonucleótidos RSP_0067 1prom y RSP_0067 2prom fue clonado en el vector pBBMCS53, el cual contiene el gen reportero *uidA*^(Suaste-Olmos 2010). Para las construcciones pRK_ *gfp-motF* los productos de la amplificación de *gfp* y *motF* obtenidos por reacciones de PCR usando los oligonucleótidos GFP-67(SD-GFP)FwdHindIII, and GFP-67rvs(-stop)XbaI, para *gfp*, mientras que se usaron los oligos 0067fwd(faseGFP-M)XbaI y 0067rvs (*EcoRI*), para *motF*, fueron clonados

simultáneamente en el vector pRK415 el cual fue previamente digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI*. Para obtener la construcción pRK_ *motF-gfp*, *motF* fue amplificado con los oligonucleótidos RSP_0067F y 0067GFPNcoI-Rv, el producto de esta amplificación fue clonado en el plásmido pEGFP de la marca comercial Clontech, el cual fue previamente digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *NcoI*. El fragmento que contiene la fusión *motF-gfp* se subclonó en pRK415 usando las enzimas *HindIII* y *EcoRI* para liberarle de pEGFP y abrir pRK415. Los plásmidos pGAD-*motF* y pGAD-*motF*- Δ 77-98 fueron construidos con los segmentos amplificados por PCR usando los oligos: DH67coilF, con RSP_0067-GSTRvs STOP y pG67FCOOH5 con RSP_0067-GSTRvs STOP, respectivamente. Se usó como DNA molde el plásmido pTZ-*motF*. Los fragmentos resultantes se digirieron con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SmaI*. Al mismo tiempo, el plásmido pGADT7 fue digerido con esas enzimas de restricción y defosforilado. Finalmente, los productos de amplificación y los plásmidos cortados y digeridos fueron ligados consiguiendo las construcciones indicadas.

Microscopia. Se prepararon portaobjetos cubiertos con una película de agarosa preparada en medio de Sistrom. Una vez preparada esta capa, se colocó una gota de 2 μ l de cultivo en crecimiento exponencial. Estas células sobre la película de agarosa fueron observadas en el microscopio de epifluorescencia. Las imágenes se tomaron con la ayuda de una cámara Hamamatsu Orca-ER acoplada a un microscopio Nikon E600.

Determinación de la actividad de β -glucuronidasa. La actividad enzimática de β -glucuronidasa se realizó utilizando extractos totales de los cultivos indicados. Dichos extractos fueron obtenidos mediante sonicación de las células en buffer de extracción y utilizando 4-metilumbeliferil-b-D-glucuronido como sustrato, de acuerdo al protocolo reportado ^(Jefferson 1986). La actividades son expresadas como nmoles de 4-metilumbeliferona formado por minuto por mg de proteína. Los resultados son la media de tres ensayos diferentes con una desviación estándar menor al 15%.

Ensayos de acceso a proteasas. Cultivos en crecimiento exponencial de *R. sphaeroides* fueron cosechadas por centrifugación a 12,000 x g por cinco minutos a 4 °C. Las pastillas de células fueron lavadas dos veces con solución 10mM de Tris-HCl pH 7 y resuspendidas en 500 μ l de Tris 10 mM /sacarosa 20%. En este punto del experimento, se tomó una muestra como control. Los esferoplastos fueron obtenidos por adición de EDTA y lisozima, a una concentración final de 50 mM y 0.5 mg/ml, respectivamente). Después de quince minutos de incubación a 37 °C, se dividió en dos partes la suspensión: y se añadió buffer Tris 10 mM pH 7 y en una de las muestras con 1 mg/ml de proteinasa K. Estas mezclas de reacción fueron incubadas a 37°C por 10 y 20 min. Para parar la reacción, se agregó el inhibidor de proteasas fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF; 2 milimolar) y las muestras fueron incubadas por 5 minutos antes de hervirlas y mezclarlas con buffer de carga Laemmli 1 X^(Laemli 1970). Las muestras fueron analizadas por Western blot, con anticuerpos policlonales anti His6X-MotFp.

Sobreexpresión y purificación de proteínas recombinantes. El segmento de DNA que codifica para la región periplásmica de MotF, (aminoácidos 75 a 239) fue obtenido por medio de PCR, usando los oligonucleótidos pBAD-67_{COOH}/PstI_Fwd y pBAD-67/rvs. El producto de reacción fue clonado en el plásmido pBAD/HisC el cual fue previamente digerido con las enzimas de restricción *PstI* y *EcoRI*, resultando el plásmido pBAD-His/MotF, el cual fue transformado en *E. coli* LMG174/pPIRL. La cepa transformada fue crecida durante toda la noche. Una muestra de este cultivo fue diluida en medio fresco en relación 1:100, y el cultivo se incubó a 37°C hasta llegar a una OD₆₀₀ de 0.5. Una vez alcanzada esta densidad, se agregó arabinosa a concentración de 2% y se incubó posteriormente por dos horas. Las células fueron cosechadas y resuspendidas en buffer de fosfatos (PBS) con 20% de glicerol, con un pH de 7.4 en una centésima del volumen del cultivo inicial. Se agregó lisozima, a una concentración final de 1 mg/ml. Esta mezcla de buffer células y lisozima fue incubada por 15 minutos en hielo.

La suspensión celular fue sonicada en frío y los restos celulares fueron eliminados por medio de centrifugación a 14,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue mezclado con resina de agarosa-níquel-acido nitriloacético (Ni²⁺) e incubado por 2 horas en

hielo. Después de este tiempo, la mezcla fue cargada en una columna de polipropileno y lavada con 50 volúmenes de buffer PBS y cinco volúmenes de PBS con imidazol 20 mM. Las proteínas fueron eluidas usando buffer PBS con imidazol 200 mM imidazol, glicerol al 20% y pH 7.4.

Anticuerpo Anti-MotF. Se obtuvieron anticuerpos anti-His_{6X}-MotFp mediante la inoculación de ratones hembras BALB/c, de acuerdo a protocolos previamente establecidos ^(Harlow 1988).

Oligonucleotidos. Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se muestran en el anexo 2.

Western Blot. Extractos totales celulares fueron separados por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa la cual fue posteriormente bloqueada por medio de incubación en una solución de leche descremada al 5% en buffer de fosfatos PBS. Una vez realizado esto, la membrana fue expuesta a los anticuerpos indicados ^(Keen 1988) y detectada por medio de un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina, y el reactivo CDP-Star (Perkin-Elmer Inc.)

Ensayo de doble híbrido. Los plásmidos que expresaban cada uno de los péptidos fusionados a los dominios de unión al DNA (BD) y de activación (AD) de GAL4 fueron transformados en la cepa de levadura AH109. Las combinaciones fueron las siguientes:

AD-motF BD-fliLp	AD-motF Δ 77-98 BD-fliL
AD-motF BD-motBp	AD-motF Δ 77-98 BD-motBp
AD-motF BD-motBs/plug	AD-motF Δ 77-98 BD-motBs/plug
AD-motF BD-RSP6086	AD-motF Δ 77-98 BD-RSP6086

Las dobles transformantes fueron seleccionadas como protótrofas de triptófano y leucina. Después de la selección inicial, las cepas fueron crecidas en un cultivo de tres ml por toda la noche, en el medio sintético (SD) el cual carecía de los aminoácidos leucina y triptófano, pero estaba suplementado con histidina y adenina. Se tomaron alícuotas de estos cultivos, las cuales fueron lavadas con medio SD sin los tres aminoácidos, (triptófano, leucina, histidina) y sin la base nitrogenada (adenina), entonces fueron llevados a una densidad óptica DO_{600} de 0.5 y de ahí se realizaron diluciones seriales 1:10 con el mismo medio SD.

Una vez realizadas las diluciones, se tomaron alícuotas de 10 μ l y se colocaron en las placas de selección con los aminoácidos indicados (HLT y AHLT). Una muestra también fue sembrada en las placas sin los aminoácidos leucina y triptófano. También se sembraron las placas con las células AH 109 transformadas con los plásmidos incluidos en el kit, que representan los controles negativos y positivos.

Sobreexpresión y purificación de las proteínas. La región codificante del dominio periplásmico de MotF (Residuos 78 a 239) fue obtenida por medio de PCR usando como DNA molde el plásmido pTZ19R-motF y usando los oligonucleótidos pBAD-0067/Fwd y pBAD-0067/Rvs. El producto de esta reacción fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI*. Se usó el plásmido pBAD-HisC digerido con las mismas enzimas de restricción y defosforilado, y se clonó el producto de PCR. El plásmid resultante se transformó en la cepa LMG174/pPIRL de *E. coli*. Esta cepa con el plásmido ya transformado se diluyó 1 a 100 en medio de cultivo fresco, e incubado a 37°C hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. Entonces se adicionó arabinosa al 2% y se incubó por dos horas. Los cultivos celulares fueron cosechados y resuspendidos en solución de fosfatos (PBS) con 20% de glicerol y pH 7.4. La mezcla fue lisada con lisozima a una concentración de 1 mg/ml, y se mezcló por 15 minutos en hielo.

La suspensión de celular se sonicó en hielo usando tres ciclos de 5 segundos de sonicación. El paquete proteico restante de la sonicación fue removido por tres ciclos de centrifugación (14,000 rpm, por cinco minutos cada ciclo) y el sobrenadante fue mezclado con perlas de níquel-ácido nitrilotiacético.-agarosa, y se incubaron por

dos horas en hielo, moviendo el tubo cada 10 minutos. La mezcla fue montada en una columna de polipropileno y lavada con 150 volúmenes de buffer PBS y 10 volúmenes de PBS imidazol a concentración 100mM. Finalmente la proteína se eluyó con PBS-imidazol a concentración 200mM, 20% de glicerol y pH de 7.4.

Búsqueda en BLAST. La secuencia resultante de la traducción del gen *motF* (orf RSP_0067) se introdujo a la página: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> y fueron , seleccionadas tanto la opción de algoritmo blastp como Position-Specific Iterated BLAST (PSI-BLAST). Los resultados de homólogos considerados fueron aquellos con un valor de E menor a 0.1.

Tabla 2. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo		
Cepa o plásmido	Características relevantes	Referencia o fuente
Cepa		
<i>Escherichia coli</i>		
S17-1	<i>recA endA thi hsdR</i> RP4-2-Tc::Mu::Tn7	Suaste-Olmos 2010
LMG194	Cepa de expresión de proteínas	Invitrogen
TOP10	Cepa de clonación	Invitrogen
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>		
WS8	Cepa silvestre, resistente espontánea a ácido nalidixico.	Ausubel 1987
SP7	<i>rpoN2Δ::Kan</i> derivada de WS8	Poggio 2002
SP12	<i>ΔfleT1::aadA</i> derivada de WS8	Girard 2000
SP13	<i>ΔfleQ1::Kan</i> derivada de WS8	Girard 2000
SP18	<i>ΔflgC1::Kan</i> derivada de WS8	Poggio 2007
FS3	<i>ΔfliL3::aadA</i> derivada de WS8	Suaste-Olmos 2010
FS4	<i>ΔmotB1::Kan</i> derivada de WS8	Suaste-Olmos 2010
VR1	<i>motF::aadA</i> derivada de WS8	Este trabajo
VR2	<i>ΔmotB1::Kan</i> derivada de VR1	Este trabajo
VR4	<i>motB_{sup9}</i> derivada de VR1	Este trabajo
Plásmidos		
pTZ19R	Vector de clonación, derivado de pUC resistencia a ampicilina	Pharmacia
pTZ19R SacI	Derivado de pTZ19R, sin sitio SacI	Colección del Laboratorio
pTZ19R _{motF}	<i>motF</i> clonado en pTZ19R SacI	Este trabajo
pBBMCS53	Vector que lleva el gen reportero <i>uidA</i>	Poggio 2005
pBB_0067prom <i>F</i>	pBBMCS53 con la región promotora de <i>moFp</i>	Trabajo presente
pRK415	Derivado de pRK404, plásmido de expresión en <i>R. sphaeroides</i>	Keen 1988
pJQ200mp18	Vector suicida mobilizable	Simon 1982

pRK415_motF	pRK415 expresando <i>motF</i> desde el promotor, <i>plac</i>	Este trabajo
pRK415_motFinv	pRK415, <i>motF</i> clonado en dirección opuesta al promotor <i>plac</i>	Este trabajo
pRK_Δ <i>motF3</i>	pRK415, que expresa <i>ΔmotF3</i> a partir del <i>plac</i>	Este trabajo
pRK_Δ <i>motF4</i>	pRK415 que expresa <i>ΔmotF4</i> a partir del <i>plac</i>	Este trabajo
pRK-gfp- <i>motF</i>	pRK415 que expresa GFP-MotF a partir de <i>plac</i>	Este trabajo
pRK_ <i>motF</i> -gfp	pRK415 que expresa MotF-GFP a partir del <i>plac</i>	Este trabajo
pBAD-His/ <i>motF</i>	pBAD/hisC que expresa His6X-MotFp	Este trabajo
pRK- <i>motB</i> ⁺	pRK415 que expresa <i>motB</i> ⁺ a partir del <i>plac</i>	Suaste-Olmos 2010
pRK_ <i>motB</i> _{sup9}	pRK415 que expresa <i>motB</i> _{sup9} a partir del <i>plac</i>	Este trabajo
pRK_ <i>motB</i> _{sup1}	pRK415 que expresa <i>motB</i> _{sup1} a partir del <i>plac</i>	Suaste-Olmos 2010
pRK_ <i>motB</i> _{sup3}	pRK415 que expresa <i>motB</i> _{sup3} a partir del <i>plac</i>	Suaste-Olmos 2010
pRK_ <i>motB</i> _{sup4}	pRK415 que expresa <i>motB</i> _{sup4} a partir del <i>plac</i>	Suaste-Olmos 2010
pRK_ <i>motB</i> _{sup5}	pRK415 que expresa <i>motB</i> _{sup5} a partir del <i>plac</i>	Suaste-Olmos 2010
pRK_ <i>motB</i> _{sup6}	pRK415 que expresa <i>motB</i> _{sup6} a partir del <i>plac</i>	Suaste-Olmos 2010
pRK_ <i>motB</i> _{sup7}	pRK415 que expresa <i>motB</i> _{sup7} a partir del <i>plac</i>	Suaste-Olmos 2010
pRK_ <i>motB</i> _{sup8}	pRK415 que expresa <i>motB</i> _{sup8} a partir del <i>plac</i>	Suaste-Olmos 2010
pGADT7	Plásmido que contiene la región activadora (AD) de GAL4 para el doble híbrido de levaduras .	Clontech protocol PT 3249-5
pGADT7- <i>motF</i>	pGADT7 que expresa la fusión AD-MotFp	Este trabajo
pGADT7- <i>motF</i> Δ77-98	pGADT7 que expresa la fusión AD-MotFpΔ77-98	Este trabajo
pGBKT7	Plásmido que contiene el dominio de unión al DNA (BD) de GAL4 para el doble híbrido de levaduras.	Clontech protocol #PT 3248-5
pGBMotB	Plásmido que expresa la fusión BD-MotBp	Suaste-Olmos 2010
pGBMotBS/Plug	Plásmido que expresa la fusión BD-MotBpΔplug	Colección del laboratorio
pGBFliL	Plásmido que expresa la fusión BD-FliL	Suaste-Olmos 2010
pGB6086	Plásmido que expresa la fusión BD-6086	Este trabajo

Aldridge PD, Karlinsky JE, Aldridge C, Birchall C, Thompson D, Yagasaki J, Hughes KT. 2006, The flagellar-specific transcription factor, sigma28, is the Type III secretion chaperone for the flagellar-specific anti-sigma28 factor FlgM. *Genes Dev.* 15;20(16):2315-26.

Armitage JP, Evans MCW. 1985. Control of the protonmotive force in *Rhodospseudomonas sphaeroides* in the light and dark and its effect on the initiation of flagellar rotation. *Biochim. Biophys. Acta* **806:42–55**.

Armitage, J. P., and R. M. Macnab. 1987. Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **169:514-8**.

Asai, Y., S. Kojima, H. Kato, N. Nishioka, I. Kawagishi, and M. Homma. 1997. Putative channel components for the fast-rotating sodium-driven flagellar motor of a marine bacterium. *J Bacteriol* **179:5104-10**.

Ausubel, F. M. a. B., R. and Kingston, R. E. and Moore, D. D. and Seidman, J. G. and Smith, J. A. and Struhl, K. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1. John Wiley and Sons, New York, NY.

Berg, H. C. 2003. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem* **72:19-54**.

Blair DF. 2003 Flagellar movement driven by proton translocation. *FEBS letters*. Volume **545: 86–95**.

Blair, D. F., and H. C. Berg. 1990. The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor. *Cell* **60:439-49**.

Blair, D. F., and H. C. Berg. 1991**. Mutations in the MotA protein of *Escherichia coli* reveal domains critical for proton conduction. *J Mol Biol* **221:1433-42**.

Braun, T. F., and D. F. Blair. 2001. Targeted disulfide cross-linking of the MotB protein of *Escherichia coli*: evidence for two H(+) channels in the stator Complex. *Biochemistry* **40:13051-9**.

Braun, T. F., L. Q. Al-Mawsawi, S. Kojima, and D. F. Blair. 2004. Arrangement of core membrane segments in the MotA/MotB proton-channel complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **43:35-45**.

Che, Y. S., S. Nakamura, S. Kojima, N. Kami-ike, K. Namba, and T. Minamino. 2008. Suppressor analysis of the MotB(D33E) mutation to probe bacterial flagellar motor dynamics coupled with proton translocation. *J Bacteriol* **190:6660-7**.

Chun, S. Y., and J. S. Parkinson. 1988. Bacterial motility: membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein. *Science* **239:276-8**.

Clontech protocol # PT 3249-5 version # PR8Z151 Catalog # k1612-1

Clontech protocol #PT 3248-5 version # PR8Y2643 Catalog # 630489

Daley, D. O., M. Rapp, E. Granseth, K. Melen, D. Drew, and G. von Heijne. 2005. Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome. *Science* **308:1321-3**.

Dean, G. E., R. M. Macnab, J. Stader, P. Matsumura, and C. Burks. 1984. Gene sequence and predicted amino acid sequence of the motA protein, a membrane-associated protein required for flagellar rotation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **159:991-9**.

Dibrov, P. A., V. A. Kostyko, R. L. Lazarova, V. P. Skulachev, and I. A. Smirnova. 1986. The sodium cycle. I. Na⁺-dependent motility and modes of membrane energization in the marine alkalotolerant vibrio *Alginolyticus*. *Biochim Biophys Acta* **850:449-57**.

Erhardt M, Hirano T, Su Y, Paul K, Wee DH, Mizuno S, Aizawa S, Hughes KT 2010. The role of the FliK molecular ruler in hook-length control *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **75(5):1272-84**.

Feilmeier, B. J., G. Iseminger, D. Schroeder, H. Webber, and G. J. Phillips. 2000. Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182:4068-76**.

Francis, N. R., G. E. Sosinsky, D. Thomas, and D. J. DeRosier. 1994. Isolation, characterization and structure

of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J Mol Biol* **235**:1261-70.

Francis, N. R., V. M. Irikura, S. Yamaguchi, D. J. DeRosier, and R. M. Macnab. 1992. Localization of the *Salmonella typhimurium* flagellar switch protein FliG to the cytoplasmic M-ring face of the basal body. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:6304-8.

Fraser GM, Hirano T, Ferris HU, Devgan LL, Kihara M, Macnab RM 2003 Substrate specificity of type III flagellar protein export in *Salmonella* is controlled by subdomain interactions in FlhB. *Mol Microbiol* **48**: 1043–1057.

Girard, L., S. Brom, A. Davalos, O. Lopez, M. Soberon, and D. Romero. 2000. Differential regulation of fixN-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel fixL-fixK cascade. *Mol Plant Microbe Interact* **13**:1283-92.

Harlow, E., and D. Lane. 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbor, New York.

Hosking, E. R., C. Vogt, E. P. Bakker, and M. D. Manson. 2006. The *Escherichia coli* MotAB proton channel unplugged. *J Mol Biol* **364**:921-37.

Hosking, E. R., C. Vogt, E. P. Bakker, and M. D. Manson. 2006. The *Escherichia coli* MotAB proton channel unplugged. *J Mol Biol* **364**:921-37.

Imae, Y., and T. Atsumi. 1989. Na⁺-driven bacterial flagellar motors. *J Bioenerg Biomembr* **21**:705-16.

Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D. 1986. β-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**:8447– 8451.

Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* **70**:191-7.

Kim, E. A., M. Price-Carter, W. C. Carlquist, and D. F. Blair. 2008. Membrane segment organization in the stator complex of the flagellar motor: implications for proton flow and proton-induced conformational change. *Biochemistry* **47**:11332-9.

Kojima S. 2004. The Bacterial Flagellar Motor: Structure and Function of a Complex Molecular Machine *International Review of Cytology V.* **233**: 93–134

Kojima, S., A. Shinohara, H. Terashima, T. Yakushi, M. Sakuma, M. Homma, K. Namba, and K. Imada. 2008. Insights into the stator assembly of the *Vibrio* flagellar motor from the crystal structure of MotY. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:7696-701.

Kojima, S., and D. F. Blair. 2001. Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor. *Biochemistry* **40**:13041-50.

Kojima, S., K. Imada, M. Sakuma, Y. Sudo, C. Kojima, T. Minamino, M. Homma, and K. Namba. 2009. Stator assembly and activation mechanism of the flagellar motor by the periplasmic region of MotB. *Mol Microbiol* **73**:710-8.

Konkel ME, Klena JD, Rivera-Amill V, Monteville MR, Biswas D, Raphael B, Mickelson J. 2004. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J Bacteriol* **186**(11):3296-303.

Kutsukake K, Minamino T, Yokoseki T. 1994. Isolation and characterization of FliK- independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 7625–7629.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.

Leake MC, et al. 2006. Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes. *Nature* **443**:355–358.

Li, N., S. Kojima, and M. Homma. 2011. Characterization of the periplasmic region of PomB, a Na⁺-driven

- flagellar stator protein in *Vibrio alginolyticus*. *J Bacteriol* **193**:3773-84.
- Li, N., S. Kojima, and M. Homma.** 2011. Sodium-driven motor of the polar flagellum in marine bacteria *Vibrio*. *Genes Cells* **16**:985-99.
- Lloyd, S. A., and D. F. Blair.** 1997. Charged residues of the rotor protein FliG essential for torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **266**:733-44.
- Lloyd, S. A., H. Tang, X. Wang, S. Billings, and D. F. Blair.** 1996. Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: evidence of a direct role for FliG but not for FliM or FliN. *J Bacteriol* **178**:223-31.
- Macnab RM.** 1996. Flagella and motility. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, ed. FC Neidhardt, R Curtiss III, JL Ingraham, ECC Lin, KB Low, et al., pp. **123–45**. Washington, DC: ASM Press
- Macnab R.M.** 2004 Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Molecular Cell Research Volume 1694, V. Issues 1-3*: **207–217**
- McCarter, L. L.** 1994. MotX, the channel component of the sodium-type flagellar motor. *J Bacteriol* **176**:5988-98.
- McCarter, L. L.** 1994*. MotY, a component of the sodium-type flagellar motor. *J Bacteriol* **176**:4219-25.
- Metcalf, W. W., and B. L. Wanner.** 1993. Construction of new beta-glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement. *Gene* **129**:17-25.
- Minamino T, Ferris HU, Moriya N, Kihara M, Namba K** 2006. Two parts of the T3S4 domain of the hook-length control protein FliK are essential for the substrate specificity switching of the flagellar type III export apparatus. *J Mol Biol* **362**: 1148–1158.
- Minamino T. and Robert M. Macnab.** 1999. Components of the *Salmonella* Flagellar Export Apparatus and Classification of Export Substrates. *J. Bacteriology* **181(5)**:1388-1394
- O'Neill, J., M. Xie, M. Hijnen, and A. Roujeinikova.** 2011. Role of the MotB linker in the assembly and activation of the bacterial flagellar motor. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**:1009-16.
- Okabe, M., T. Yakushi, M. Kojima, and M. Homma.** 2002. MotX and MotY, specific components of the sodium-driven flagellar motor, colocalize to the outer membrane in *Vibrio alginolyticus*. *Mol Microbiol* **46**:125-34.
- Paul, K., G. Gonzalez-Bonet, A. M. Bilwes, B. R. Crane, and D. Blair.** 2011. Architecture of the flagellar rotor. *EMBO J* **30**:2962-71.
- Platzer, J., W. Sterr, M. Hausmann, and R. Schmitt.** 1997. Three genes of a motility operon and their role in flagellar rotary speed variation in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **179**:6391-9.
- Poggio, S., Osorio, A., Dreyfus, G., and Camarena, L.** 2002. The four different sigma (54) factors of *Rhodobacter sphaeroides* are not functionally interchangeable. *Mol Microbiol* **46**: 75–85.
- Poggio, S., A. Osorio, G. Dreyfus, and L. Camarena.** 2005. The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins. *Mol Microbiol* **58**:969-83.
- Poggio, S., C. Abreu-Goodger, S. Fabela, A. Osorio, G. Dreyfus, P. Vinuesa, and L. Camarena.** 2007. A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **189**:3208-16.
- Porter, S. L., D. A. Wilkinson, E. D. Byles, G. H. Wadhams, S. Taylor, N. J. Saunders, and J. P. Armitage.** 2011. Genome sequence of *Rhodobacter sphaeroides* Strain WS8N. *J Bacteriol* **193**:4027-8.
- Quandt, J., and M. F. Hynes.** 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**:15-21.
- Reboul, C. F., D. A. Andrews, M. F. Nahar, A. M. Buckle, and A. Roujeinikova.** 2011. Crystallographic and molecular dynamics analysis of loop motions unmasking the peptidoglycan-binding site in stator protein MotB

of flagellar motor. PLoS One **6**:e18981.

Reid, S. W., M. C. Leake, J. H. Chandler, C. J. Lo, J. P. Armitage, and R. M. Berry. 2006. The maximum number of torque-generating units in the flagellar motor of *Escherichia coli* is at least 11. Proc Natl Acad Sci U S A **103**:8066-71.

Sanguk Kim , Tae-Joon Jeon, Amit Oberai, Duan Yang, Jacob J. Schmidt, and James U. Bowie Transmembrane glycine zippers: Physiological and pathological roles in membrane proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 October 4; **102**(40): 14278–14283.

Senes A, Gerstein M, Engelman DM. 2000. Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta- branched residues at neighboring positions. J Mol Biol. Feb 25;296:921-36.

Senes, A., D. E. Engel, and W. F. DeGrado. 2004. Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. Curr Opin Struct Biol **14**:465-79.

Shah DS, Armitage JP, Sockett RE. 1995*. *Rhodobacter sphaeroides* WS8 expresses a polypeptide that is similar to MotB of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **177**:2929 –2932.

Shah DS, Sockett RE. 1995. Analysis of the *motA* flagellar motor gene from *Rhodobacter sphaeroides*, a bacterium with a unidirectional, stop- start flagellum. Mol. Microbiol. **17**:961–969.

Simon, R., U. Priefer, and A. Puhler. 1982. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. Biotechnol **1**:784-791.

Sistrom, W. R. 1962. The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas spheroides*. J Gen Microbiol **28**:607-16.

Socketk, R. E., Foster, J.C.A., Armitage J. P. 1990. Molecular biology of the *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. FEMS Symp **53**:473-479.

Sommerlad, S. M., and D. R. Hendrixson. 2007. Analysis of the roles of FlgP and FlgQ in flagellar motility of *Campylobacter jejuni*. J Bacteriol **189**:179-86.

Sowa, Y., and R. M. Berry. 2008. Bacterial flagellar motor. Q Rev Biophys **41**:103-32.

Stolz, B., and H. C. Berg. 1991. Evidence for interactions between MotA and MotB, torque-generating elements of the flagellar motor of *Escherichia coli*. J Bacteriol **173**:7033-7.

Suaste-Olmos, F., C. Domenzain, J. C. Mireles-Rodriguez, S. Poggio, A. Osorio, G. Dreyfus, and L. Camarena. 2010. The flagellar protein FlhL is essential for swimming in *Rhodobacter sphaeroides*. J Bacteriol **192**:6230-9.

Terashima H, Koike M, Kojima S, Homma M. 2010. The flagellar basal body-associated protein FlgT is essential for a novel ring structure in the sodium-driven *Vibrio* motor. J Bacteriol **192**(21):5609-15.

Terashima, H., H. Fukuoka, T. Yakushi, S. Kojima, and M. Homma. 2006. The *Vibrio* motor proteins, MotX and MotY, are associated with the basal body of Na-driven flagella and required for stator formation. Mol Microbiol **62**:1170-80.

Terashima, H., S. Kojima, and M. Homma. 2008. Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. Int Rev Cell Mol Biol **270**:39-85.

Tokuda, H., M. Asano, Y. Shimamura, T. Unemoto, S. Sugiyama, and Y. Imae. 1988. Roles of the respiratory Na⁺ pump in bioenergetics of *Vibrio alginolyticus*. J Biochem **103**:650-5.

Yakushi, T., S. Maki, and M. Homma. 2004. Interaction of PomB with the third transmembrane segment of PomA in the Na⁺-driven polar flagellum of *Vibrio alginolyticus*. J Bacteriol **186**:5281-91.

Yamaguchi, S., S. Aizawa, M. Kihara, M. Isomura, C. J. Jones, and R. M. Macnab. 1986. Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol

168:1172-9.

Yorimitsu, T., and M. Homma. 2001. Na(+)-driven flagellar motor of *Vibrio*. *Biochim Biophys Acta* **1505:82-93**.

Yorimitsu, T., K. Sato, Y. Asai, I. Kawagishi, and M. Homma. 1999. Functional interaction between PomA and PomB, the Na(+)-driven flagellar motor components of *Vibrio alginolyticus*. *J Bacteriol* **181:5103-6**.

Zhao, R., C. D. Amsler, P. Matsumura, and S. Khan. 1996. FliG and FliM distribution in the *Salmonella typhimurium* cell and flagellar basal bodies. *J Bacteriol* **178:258-65**.

Zhao, R., N. Pathak, H. Jaffe, T. S. Reese, and S. Khan. 1996. FliN is a major structural protein of the C-ring in the *Salmonella typhimurium* flagellar basal body. *J Mol Biol* **261:195-208**.

Zhou, J., and D. F. Blair. 1997. Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for torque generation in the bacterial flagellar motor. *J Mol Biol* **273:428-39**.

Zhou, J., and D. F. Blair. 1997. Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for torque generation in the bacterial flagellar motor. *J Mol Biol* **273:428-39**.

Zhou, J., L. L. Sharp, H. L. Tang, S. A. Lloyd, S. Billings, T. F. Braun, and D. F. Blair. 1998. Function of protonatable residues in the flagellar motor of *Escherichia coli*: a critical role for Asp 32 of MotB. *J Bacteriol* **180:2729-35**.

Zhou, J., R. T. Fazio, and D. F. Blair. 1995. Membrane topology of the MotA protein of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **251:237-42**.

Zhou, J., S. A. Lloyd, and D. F. Blair. 1998. Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95:6436-41**.

Anexo 1

Oligonucleotidos usados en este estudio

Oligonucleotido	Secuencia	Uso
RSP_0067F	CCCAAGCTTCCTCCTTGCCC GCGCGCT C	Clonación de motF en pCR2.1 y pRK415
RSP_0067 Rvs	CGGGATCCTCGTGTCGGTCATGGGC	
NoCC67FwdBglII	GAAGATCTCGAAGCGGATGCA GGCCCTGT	Delección del segmento NH coiled-coil de MotF
NoCCRvsBglII	GAAGATCTGATCCTGCGCGGCA TCGTTG	
oligo del coiledcoil 2-1	GAAGATCTGCGACCGAGCGGAAATAG AC	Delección del segmento COOH coiled coil de MotF
oligo del coiledcoil 2-2	GAAGATCTGACCGAGCTCGGCGAGGC CA	
GFP-67(SD-GFP)FwdHindIII	CCCAAAGCTTGGAGGCGCCACCATGG TGAGCAAGG	Amplificar GFP y clonarlo en el extremo NH terminal de alguna proteína
GFP-67Rvs(-STOP)XbaI	GCTCTAGACTTGACAGCTCGTCCATG C	
0067fwd(faseGFP-M)XbaI	GCTCTAGAACGGAAGAGACCGACGAC CC	Clonación de MotF en la fusión GFP-MotF
oligorvs(conEcoRI)	CGGAATTCTCACGGATAACGGATCGGA T	
Fwd RSP_0067 con HindIII	AAGCTTCGATGTGACGGCGCCTTTGG C	Clonación de MotF en la fusión MotF-GFP
Sin STOP RSP_0067	CCATGGGATAACGGATCGGATTGTCCG CCG	
pBAD-67 COOH/PstI Fwd	GAATTCGGATAACGGATCGGATTGTCCG GC	Clonar al segmento MotF-COOH en pBAD His C plasmid
pBAD-67/rvs	CTGCAGCGCTCGGTCGCCGATCTGCG C	
DH67CoilF	GAATTCGCTCGGTCGCCATCTGCGCG A	Clonación de la región periplásmica de motF en el vector pGADT7
RSP_0067-GST Rvs STOP	CCCGGGTCACGGATAACGGATCGGAT TG	
pG67FCOOH5'	GAATTCACCGAGCTCGGCGAGGCCAT CG	Clonación de la región periplásmica de MotF sin la región inmediata al cruce transmembranal en pGADT7
RSP_0067-GST Rvs STOP	CCCGGGTCACGGATAACGGATCGGAT TG	

Anexo 2

Secuencias de gen y proteína

Secuencia del promotor y marco abierto de lectura de *motF* (RSP_0067) de *ws8*

c gat gtg acg gcg cct ttg gcg cag aac ttg cag gtt ccg cgc aac gac gga gag cag gcg atg
acg gaa gag acc gac gac ccc ctc agc gat ggc atc gcg cgc gcg ctt ggc gcc gcg agc gcg
gcc aac gat gcc gcg cag gat ctc gat ctg ctt cag gcc gag cat cgc gcc ttc atg gag cgg atg
atc cgc ggg cag aag cgg atg cag gcc ctg tgc ctc ggc gcg ctg gcc ggg gcc ggc gtg gcg
gtc ctt ctg ggc ggg ctc gtc tat ttc cgc tgc gtc gcc gat ctg cgc gac gcc tcc gcg att cag gcg
cag gcg ggc gag ctg atg gtc acg cgg ctg acc gag ctc ggc gag gcc atc ggc aag gtc gaa
ggg ctg gcc gac cgg atc gag gcg cag gag gcc acg ctc aag acg gcc atc gag gcg gtg ggc
gac cgg gtc gcc ggc gat ctc gag acc tat gcc gcc gat gcg ggc gcc atg ggg ccg cag ttc gcc
acc gcg atc cag agc cat gtg gac gag ggc ctg gcc gcc acg cgc gag gcg ctc gtc acg gca
ctc ggc gag gtg gat gtc tgc ctg cgt cgg gcc atc gag agc ggc gcg ggc gcg agc ccc gag
atc cgc gcg ctg atc ggc gag atc cgc gcc gag cgg gcg ccg gcg cgc aag ccc gcg gcg aag
gcg ccg agc cgc cct gcc aag gcc gcg ccc cgc ctt gct ccg aaa gcg gcc gac aat ccg atc cgt
tat ccg tga

En fondo azul, el marco abierto de lectura

En fondo amarillo, la zona del promotor

En verde, el sitio de restricción de las enzimas *SacI* y *SstI* usadas para interrumpir el gen mediante el cassette *aadA*

Secuencia de aminoácidos de MotF

MTEETDDPLSDGIARALGAASAANDAAQDLDL LQ
AEHRAFMERMIRGQKRMQALCLGALAGAGVAVL
LGGLVYFRS VADLRDASAIQAQAGELMVTRL TEL
GEAIGKVEGLADRIEAQEATLKTAIEAVGDRVAGD
LETYAADAGAMGPQFATAIQSHVDEGLAATREALV
TALGEVDVSLRRAIESGAGASPEIRALIGEIRAERA
PARKPAKAPSRPAKAAPRLAPKAADNPIRYP

En fondo amarillo, región transmembranal de MotF

En azul, los aminoácidos del posible cierre de glicinas GXXXG presentes en el cruce transmembranal.

En fondo verde, las regiones coiled-coil presentes antes y después del cruce transmembranal.