



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO SOBRE EL SISTEMA DE FLAGELOS LATERALES EN LA BACTERIA
MARINA *VIBRIO SHILONII*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:
Yael González Tinoco

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Georges Dreyfus
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Luis Servín
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Lorenzo Segovia
Instituto de Biotecnología, UNAM

MÉXICO, D. F. Junio, 2016.



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.

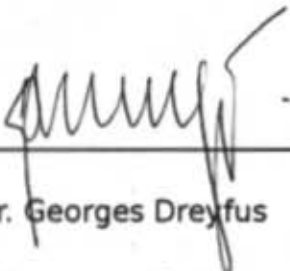
Formato: dg_1
VoBo Tutor,
revisión de tesis de doctorado

México, D.F. a 3 de Agosto del 2015.

A los miembros de Jurado de Examen

Por medio del presente manifiesto que he revisado el trabajo escrito del proyecto que lleva como título: "Estudio del sistema de flagelos laterales en la bacteria marina *Vibrio shilonii*." del(la) alumno(a) Yael González Tinoco y considero que tiene la calidad suficiente para ser presentado al jurado de examen.

Atentamente



Dr. Georges Dreyfus
Tutor Académico

PMDCB/934/2015...1a

Yael González Tinoco
Alumno (a) del Doctorado en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 17 de agosto del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Estudio del sistema de flagelos laterales en la bacteria marina *Vibrio shilonii***", dirigida por el Dr. Georges Dreyfus Cortés.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dra. Marietta Tuena Sangri
VOCAL	Dr. Dimitris Georgellis
VOCAL	Dr. Felipe Cruz García
VOCAL	Dr. Roberto Coria Ortega
SECRETARIO	Dra. Marina Gavilanes Ruiz

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de agosto de 2015
COORDINADORA DEL SUBCOMITÉ ACADÉMICO



DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO

C.c.p. Tutor
C.c.p. Archivo

BGP*Igg

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de doctorado se realizó bajo la dirección del Dr. Georges Dreyfus Cortés en el Departamento de Genética Molecular, laboratorio 222 edificio norte, del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Georges Dreyfus Cortés. Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. Luis Servín González. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dr. Lorenzo Segovia Forcella. Instituto de Biotecnología, UNAM.

Se reconoce la asesoría técnica del Dr. Francisco Javier de la Mora y la QFB. Teresa Ballado en los experimentos de aislamiento de complejos proteínicos, aislamiento de RNA total y ensayos de retrotranscripción "RT-PCR".

Se reconoce la asesoría del Dr. Fernando García y del Med. Cir. Rodolfo Paredes de la Unidad de Microscopía del IFC, UNAM en las técnicas de microscopía electrónica de transmisión.

Se reconoce el trabajo de la auxiliar de laboratorio Sra. Xochitl Castrejón en la limpieza del laboratorio y su equipo.

El proyecto fue parcialmente apoyado por los donativos 106081 de CONACYT e IN206811 de DGA-PA/PAPIIT (UNAM). Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT (número de becario: 203228) para la realización de la siguiente tesis.

El Jurado de Examen de Doctorado estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marietta Tuena Sangri
Vocal	Dr. Dimitris Georgellis
Vocal	Dr. Felipe Cruz García
Vocal	Dr. Roberto Coria Ortega
Secretario	Dra. Marina Gavilanes Ruiz

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química el haberme dado la oportunidad de realizar la empresa de mis estudios de doctorado.

Al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, que al ser mi segunda casa, me permitió conocer y aprender de muchas personas, compañeros y profesores; a mi tutor el Dr. Georges Dreyfus por prepararme para enfrentar el mundo fuera de los muros de la Universidad e impulsarme a buscar mi lugar dentro de la disciplina de la Biología, de una manera más activa. Asimismo al Dr. Luis Servín y al Dr. Lorenzo Segovia por su paciencia y consejo durante estos cuatro años.

A mi madre, la Licenciada María del Rosario González por su amor incondicional y todo su apoyo; su fe en mí jamás cesó en ningún momento. A mi tía María de los Milagros González, a mi tío Manuel González y a mis primas Frida y Nuria Guerra quienes estuvieron para mí en los momentos difíciles.

A mi novia Áurea Xaydé Esquivel por estar a mi lado todo el tiempo, así como a toda su familia que ahora es también la mía.

A la QFB. Teresa Ballado y a mi gran amigo el Dr. Javier de la Mora por toda la ayuda, consejos y lecciones de vida que me compartieron en estos años.

A todos los compañeros del laboratorio 222 del edificio norte, que fueron y vinieron durante mi estancia en el Instituto; de un modo u otro, recibí valiosas enseñanzas de cada uno. A mis amigos del laboratorio 226 del edificio norte, muchos se han ido pero otros nuevos siempre llegan.

A todos mis nuevos amigos del banco criogénico y del Hospital de Oncología del Centro Médico Siglo XXI, jamás podré terminar de agradecerles por su apoyo y por brindarme la oportunidad de trabajar con ustedes.

A mis maestros Juan Carlos Orozco, Camilo Esquivel y Roberto Martínez, quienes me enseñaron a esforzarme por ser una mejor persona y a tratar de superar mis limitaciones; con ellos entendí que la vida es una lucha constante en la que hay que atesorar los momentos de paz y enfrentar los momentos de pelea.

Siempre he pensado que somos el producto de la suma de nuestra historia más la historia de las personas que conocemos; a todos los anteriores mencionados aquí y a todos los demás que no, les agradezco por ayudarme, de uno u otro modo, a llegar hasta aquí. Muchas gracias.

“And now
The end is near
And so I face
The final curtain
My friend
I’ll say it clear
I’ll state my case
Of which I’m certain
I’ve lived
A life that’s full
I’ve travelled each
And every highway
And more
Much more than this
I did it my way”. My Way. Frank Sinatra.

“Stand up and fight!
Stand Up and See The Sky Turn Bright,
Fight for a better day
Get up! You’ve made it this far
No loser you are!
One more time! One more try!”. Stand Up And Fight. Turisas.

Resumen

El flagelo bacteriano es un orgánulo de locomoción ampliamente utilizado entre los organismos procariontes, constituye una ventaja adaptativa y es un factor muy importante tanto para la colonización de nichos como para la patogénesis. El flagelo es un heteromultímero formado por alrededor de 30 diferentes proteínas y está dividido en tres subestructuras: filamento, gancho y cuerpo basal.

El filamento es una estructura extracelular, tubular y hueca formada por monómeros de la proteína flagelina. El gancho la segunda estructura extracelular presenta, en la mayoría de los casos, una forma curva y su función es la de proporcionar una unión flexible entre el filamento y el cuerpo basal. El cuerpo basal, la última subestructura, tiene una localización intracelular y en *Escherichia coli* o en *Salmonella typhimurium* está formado por tres anillos asociados con las diferentes capas del cuerpo celular: el anillo L, insertado en la membrana externa, el anillo P embebido en la pared celular y el anillo MS inmerso en la membrana interna; juntos, los anillos rodean y proporcionan apoyo a un eje. El cuerpo basal recibe el torque del motor y lo transmite al gancho y luego al filamento.

Las bacterias marinas del género *Vibrio* se desplazan en medio líquido haciendo uso de la rotación de un flagelo polar único; en este apéndice, la generación del torque está acoplada a un flujo de iones sodio (Na^+). Asimismo, se sabe que cuando la densidad del medio aumenta y la rotación del flagelo polar se ve disminuida, algunas especies como *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* o *Vibrio shilonii*, son capaces de expresar, adicionalmente, un sistema de flagelos laterales con una disposición peritrica cuya rotación está acoplada a un flujo de protones (H^+).

V. shilonii es el modelo más estudiado de patogénesis en corales, pero poco se conoce sobre los sistemas de motilidad de esta bacteria. En un trabajo anterior, reportamos la presencia de flagelos laterales en *V. shilonii* cuya expresión es dependiente de la densidad del medio; de la misma manera, observamos que el diámetro de estas estructuras coincide con los 15 nm determinados para los flagelos laterales de otras especies del género *Vibrio*. En dicho estudio nos enfocamos en la caracterización del flagelo polar de esta bacteria; ahora, queremos continuar con la disección del sistema de flagelos laterales y para ello, hicimos uso del bloqueador de canales de sodio (Na^+) fenamil y analizamos su capacidad para inhibir la rotación del flagelo polar.

En la serie de experimentos descritos a continuación determinamos, mediante microscopía electrónica de transmisión y ensayos de retro transcripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), que la presencia del fenamil en el medio de cultivo líquido induce la expresión del sistema de flagelos laterales en *V. shilonii*; asimismo observamos que los flagelos laterales pueden detectarse sobre el cuerpo celular, después de 30 min de inducción con el bloqueador de canales de sodio. Finalmente apoyados en estas bases, aislamos y describimos por primera vez, la ultraestructura del complejo del gancho y el cuerpo basal de los flagelos laterales dentro del género *Vibrio*.

Índice

1. La motilidad bacteriana	1
2. El modelo experimental: <i>Vibrio shilonii</i>	4
3. Antecedentes del flagelo bacteriano	8
3.1. Estructura del flagelo polar en la familia <i>Vibrionaceae</i>	9
3.2. Ensamblaje y regulación de la biogénesis flagelar	14
3.3. Funcionamiento del motor flagelar	17
3.4. Motilidad en la interacción bacteria-hospedero	20
3.4.1. La motilidad dependiente del flagelo, es necesaria en las fases iniciales de la infección, pero no es requerida posteriormente una vez que la infección se ha establecido	20
3.4.2. La motilidad dependiente del flagelo, es necesaria para establecer y mantener la infección	21
3.5. Un sistema de motilidad alterno: los flagelos laterales	22
3.6. La cepa AK-1 de <i>V. shilonii</i> es resistente a la manipulación genética	25
4. Hipótesis	27
5. Objetivo general	27
6. Objetivos particulares	27
7. Materiales y métodos	27
7.1. Cepas y condiciones de crecimiento	27
7.2. Crecimiento y motilidad	28
7.3. Aislamiento de RNA total y perfiles de transcripción	28
7.3.1. Cosecha y lisis de las células	28
7.3.2. Extracción con fenol y primera precipitación	29
7.3.3. Extracción con cloroformo y segunda precipitación	29
7.3.4. Tratamiento con DNAsaI, extracciones fenol/cloroformo y tercera precipitación	29
7.3.5. Cuantificación	30
7.3.6. Ensayo de retro transcripción	30
7.4. Aislamiento de cuerpos basales	30
7.5. Microscopia electrónica	31

8. Resultados	32
8.1. Crecimiento, velocidad de nado y fracción mótil de la población de <i>V. shilonii</i> con dos concentraciones de NaCl	32
8.2. La presencia de fenamil induce la diferenciación de las células de <i>V. shilonii</i> AK-1 . . .	35
8.3. El transcrito de los genes <i>lafK</i> y <i>lafA</i> , se incrementa en presencia de fenamil	36
8.4. Ultraestructura del cuerpo basal en los flagelos laterales	38
8.5. Determinación del diámetro de los anillos H y L en los complejos aislados de gancho y cuerpo basal	40
8.6. Los flagelos laterales aparecen 30 min después de agregar el fenamil	41
9. Discusión	42
10. Conclusiones y perspectivas	45
A. Apéndice	47
A.1. Medios de cultivo	47
A.1.1. Medio de cultivo “Marine Broth”	47
A.1.2. Medio de cultivo TBSW	47
A.1.3. Solución de Sales 10x para medio TBSW	47
A.1.4. Amortiguador Tris para medio TBSW	47
A.2. Disposiciones para el aislamiento de cuerpos basales	48
A.2.1. Amortiguador de Sacarosa	48
A.2.2. Amortiguador TET	48
A.2.3. Manejo de la lisozima y el EDTA en la preparación de los esferoplastos	48
A.3. Disposiciones para el aislamiento de RNA total	48
A.3.1. Materiales.	48
A.3.2. Preparativos	49
A.3.3. Fenol saturado	49
A.3.4. Amortiguador de acetato.	49
A.3.5. Solución de lisis	50
A.3.6. Reactivos adicionales	50
A.3.7. Electroforesis del RNA	50
Bibliografía	51
Anexo	

1. La motilidad bacteriana

Para las bacterias, la motilidad representa una ventaja adaptativa que les permite avanzar hacia los ambientes nutritivos, escapar de los agentes potencialmente nocivos, colonizar nuevos nichos e invadir al hospedero. Al desplazarse en medio líquido o sobre las superficies bióticas o abióticas, los organismos procariontes inician cambios importantes en su fisiología que se traducen en las estrategias de motilidad descritas como sigue [revisado en 52, 49] (Figura 1.1):

El flagelo bacteriano —cuya fuerza motriz se genera a partir de un gradiente electroquímico tanto de protones (H^+) en *E. coli* o en *S. typhimurium* [81] como de iones sodio (Na^+) en *Vibrionaceas* o en *Bacillus* alcalófilos [165]— impulsa el desplazamiento individual de las células cuando éstas crecen de manera plantónica en el medio líquido [89] y también el movimiento en enjambre o “swarming” [48]

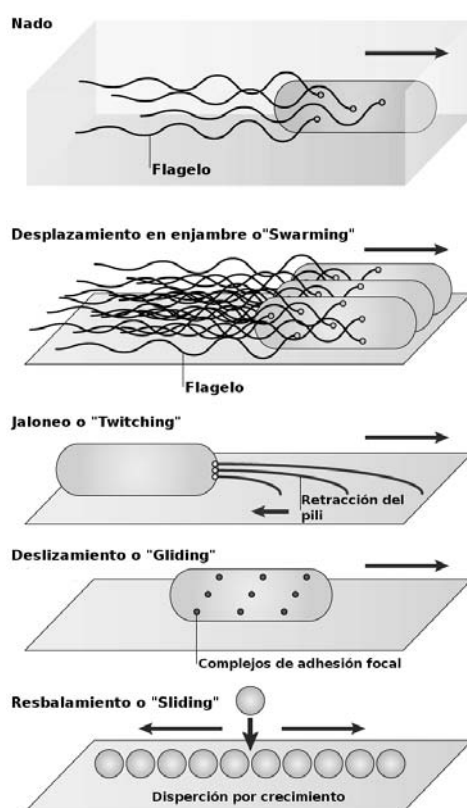


Figura 1.1: Diferentes estrategias de motilidad bacteriana. El flagelo puede propulsar tanto el nado en medio líquido como el desplazamiento grupal o “swarming” sobre medio sólido. El jaloneo o “twitching”, requiere de la extensión y retracción del pili tipo IV. El deslizamiento o “gliding”, es un movimiento desarrollado por la rotación de complejos de adhesión focal, los cuales están unidos a una estructura helicoidal citoplásmica que abarca todo el interior de la célula; la rotación es impulsada por la fuerza protón motriz. El resbalamiento o “sliding” se refiere al desplazamiento pasivo impulsado por el crecimiento de las células. Imagen tomada y modificada de la referencia [63].

cuando las bacterias crecen sobre las superficies [revisado en 63]. La rotación del filamento flagelar, que puede ser tanto unidireccional como bidireccional, está bajo el control de un sistema de quimiotaxis cuya función es la de sesgar el desplazamiento de las células hacia los atrayentes y lejos de los repelentes [21]. Más adelante en el texto, se tratará en detalle la estructura, la regulación de la biogénesis y el funcionamiento del flagelo bacteriano con especial enfoque hacia el grupo de las *Vibrionaceas*.

El jaloneo o “twitching” es un tipo de locomoción sobre superficies, impulsado por la extensión y retracción de un pili del tipo IV ubicado en el polo de la célula; en este movimiento, el extremo de pili actúa como un punto de sujeción a modo de gancho y al retraerlo, la bacteria se traslada sobre el sustrato [49]. El pili tipo IV es un organelo extracelular con un diámetro de 5 a 7 nm y una longitud de 1 a 4 μm ; se diferencia de otros pili por su localización polar y su papel en la motilidad bacteriana. El pili de desplazamiento tipo IV está formado por las siguientes proteínas (Figura 1.2): la pilina mayoritaria PilA en conjunto con las pilinas minoritarias PilE, PilV, PilW, PilX, FimV y FimU conforman el filamento, el cual está rematado por las adhesinas PilC1 y PilY1; el filamento se encuentra anclado a la membrana interna mediante el complejo que forma la proteína de membrana PilC (PilF en *Neisseria gonorrhoeae*). El canal formado por la secretina PilQ, permite el paso del filamento a través de la membrana externa. La incorporación de las pilinas al filamento naciente, comienza cuando la peptidasa de membrana, PilD, corta la secuencia líder en las pilinas y metila el residuo en el extremo amino resultante; las pilinas procesadas se insertan en la membrana interna. El principio de la locomoción dependiente del pili tipo IV, es la elongación del filamento mediante la polimerización de las pilinas por la proteína PilB y la retracción del filamento a través de la despolimerización del mismo filamento por acción de la proteína PilT. Tanto PilB como PilT tienen capacidad de unión a NTP, lo cual sugiere que la polimerización y despolimerización del filamento, son procesos dependientes de ATP. El desplazamiento mediante pili tipo IV se ha estudiado ampliamente en *Myxococcus xanthus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *N. gonorrhoeae*; este tipo de locomoción parece ser exclusivo de las bacterias Gram-negativas. Cepas mutantes en componentes del pili tipo IV demuestran que este apéndice, además de participar en la motilidad, interviene también en procesos como la conjugación, la captación de DNA exógeno (transformación natural) y en la infección por fagos [revisado en 156, 101].

El deslizamiento o “gliding” identifica a un desplazamiento, diferente del jaloneo y del impulsado por el flagelo, el cual se origina a partir de la rotación de una estructura filamentosa, helicoidal y citoplásmica, que recorre todo el interior de la célula, a modo de un asa cerrada; sobre esta estructura que funciona como una vía, se ubican puntos de adhesión focal que ejercen tracción sobre el surfactante secretado por la bacteria, entre la membrana externa y el sustrato (Figura 1.3). Aunque la composición de la vía helicoidal no es clara, se piensa que la proteína MreB, un homólogo bacteriano de la actina, podría participar en su biogénesis; esta idea se apoya en la evidencia de que la locomoción por deslizamiento es sensible al agente A22, un inhibidor de MreB. Cada uno de los puntos de adhesión focal, está formado

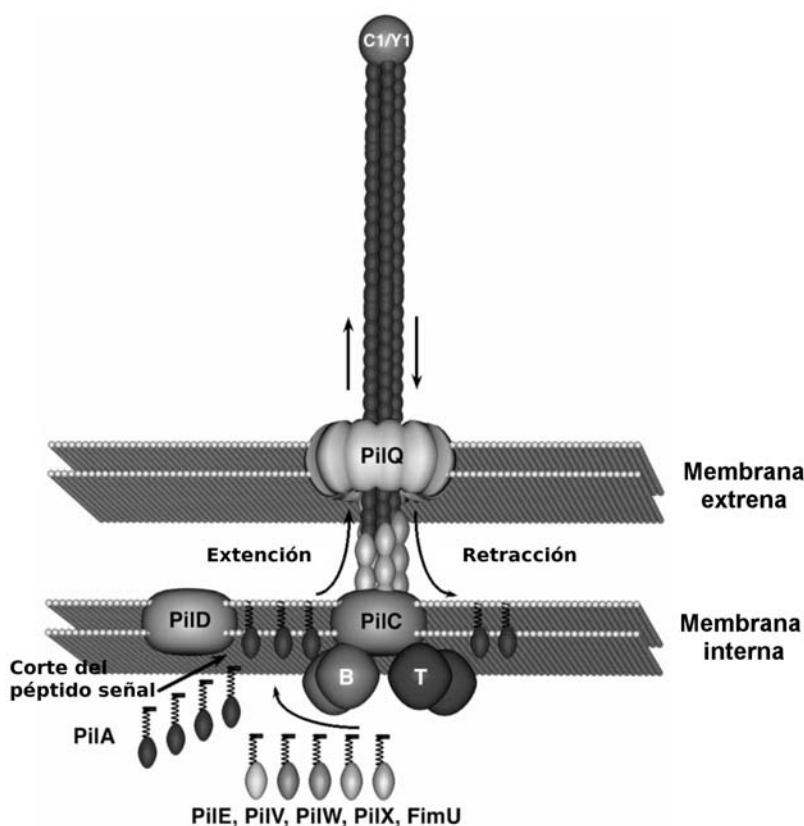


Figura 1.2: Estructura del pili de desplazamiento tipo IV empleado para el jaloneo o “twitching”. El desplazamiento por pili tipo IV ocurre de la siguiente manera: el filamento se elonga por acción de la proteína PilB, las adhesinas PliY1 y PilC1, ubicadas en el extremo del filamento, funcionan como un punto de sujeción y la bacteria se trasloca a sí misma cuando el filamento se despolimeriza por acción de la proteína PilT. Imagen tomada y modificada de la referencia [101].

por las siguientes proteínas: AglR, AglQ, AglS y AgmU. AglR está relacionada con la proteína MotA del estator flagelar mientras que AglQ y AglS son similares a la proteína MotB, también del estator flagelar; el complejo AglRQS se encuentra embebido en la membrana interna y se piensa que funciona como un motor impulsado por un gradiente de protones (H^+). Asociada con los complejos del motor, está la proteína AgmU, la cual parece ser el punto principal de tracción. Este tipo de motilidad se ha observado en bacterias como *M. xanthus*, *Flavobacterium johnsoniae* o *Mycoplasma mobile* [revisado en 122].

El resbalamiento o “sliding” se refiere a una forma de locomoción pasiva impulsada por la presión que ejercen las células entre sí durante el crecimiento sobre el sustrato. Esta forma de translocación se ha observado en *Serratia marcescens* [100], *V. cholerae*, *E. coli* [23] y en *Mycobacterium smegmatis* [130]. Aunque la presencia de un organelo en particular o algún tipo de diferenciación celular no son requerimientos necesarios para realizar este desplazamiento, la existencia de surfactantes como la serrawetina sí es un requisito fundamental.

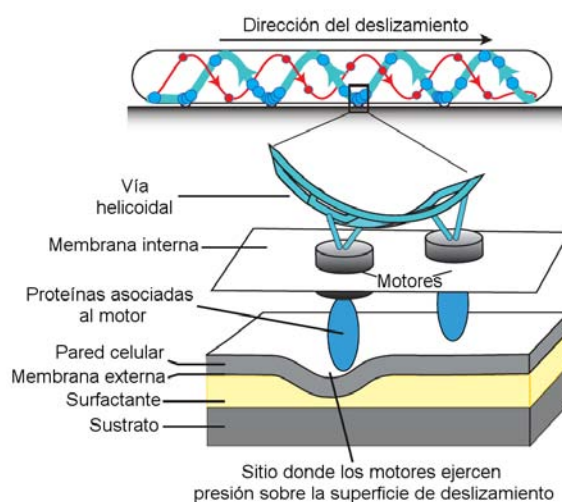


Figura 1.3: Mecanismo del deslizamiento o “gliding” en *M. xanthus*. Los complejos proteínicos que funcionan como motores están embebidos en la membrana interna e impulsan la rotación de la vía helicoidal mediante la fuerza protón motriz. Durante la rotación, las proteínas asociadas al motor, deforman la pared celular y la membrana externa ejerciendo presión sobre el surfactante impulsando a la célula en dirección de su eje mayor. Se ha observado que estos complejos que sirven como motores, se acumulan en la región ventral de la célula que está en contacto con la superficie [122].

2. El modelo experimental: *Vibrio shilonii*

La bacteria marina *V. shilonii* es actualmente el modelo más estudiado de patogénesis en corales [131], pero se conoce poco sobre la biología de este organismo. Aislada por primera vez en 1996 de corales blanqueados sobre la costa de Israel en el mar Mediterráneo, la cepa AK-1 fue descrita de manera morfológica y bioquímica. Sus células son bacilos ($2.4 \times 1.6 \mu\text{m}$) Gram-negativos, no formadores de esporas, móviles mediante un flagelo polar único que la célula utiliza para el nado en medio líquido y que está envuelto por una extensión de la membrana plasmática externa (Figura 2.1).

Forma colonias de color amarillo en medio selectivo para *Vibrionaceas* agar TCBS (sales biliares, tiosulfato y citrato) y es sensible al agente *Vibrio* estático O129 (2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina). Después de 12 h. de incubación a 30°C en medio “Marine Broth” 3.7% adicionado con 1.5% de agar, se obtienen colonias translúcidas de manera ligera, de color blanco pálido, con forma redonda definida y no luminiscentes. El crecimiento óptimo se logra con una concentración final de NaCl al 2%. Debido a estas y otras características, la cepa AK-1 fue clasificada dentro de la clase γ -proteobacteria, orden *Vibrionales*, familia *Vibrionaceae*, género *Vibrio*.

El perfil de ácidos grasos y la comparación de secuencias del DNA ribosomal de la subunidad 16S con otros miembros del género, señalaron a la cepa AK-1 como una especie nueva (Figura 2.2), a la cual le fue asignado el nombre de *Vibrio shiloi* [75] en reconocimiento al microbiólogo Moshe Shilo,

pionero de la ecología microbiana en Israel. Ese mismo año, se hizo una corrección en la cual el nombre fue cambiado a *Vibrio shilonii* [54]. De acuerdo con los resultados obtenidos al aplicar los postulados de Koch, se ha señalado a *V. shilonii* como el agente causal del blanqueamiento en los corales de la especie *Oculina patagonica* -phylum *Cnidaria*, clase *Anthosoa*, orden *Scleractinia*- (Figura 2.3).

Durante estas pruebas, la cepa AK-1 de *V. shilonii* fue aislada de las muestras provenientes de corales blanqueados, pero no fue hallada en aquellas de corales sanos (no blanqueados); se obtuvo en cultivo puro y se usó para infectar un grupo de corales sanos bajo condiciones controladas. A 26°C un inóculo de 120 células por mililitro causó pérdida total de la pigmentación al 60% del grupo experimental, mientras que no hubo efecto en aquellos grupos donde *V. shilonii* no fuera inoculado o donde se agregara un antibiótico junto con las células. Los cortes histológicos realizados en tejidos infectados, mostraron una reducción del 70 al 90% en la densidad poblacional de las micro algas endosimbiontes con respecto a los cortes hechos en tejidos sanos [76, 77]. Dicho de otro modo, el blanqueamiento de los corales ocurre debido a que la infección por *V. shilonii*, destruye la relación simbiótica entre el hospedero y sus dinoflagelados fotosintéticos, que en conjunto son llamados *Zooxanthellae*. De manera más detallada, la lisis de las micro algas (*zooxanthellae*) es el resultado de un proceso infectivo durante el cual se observan cinco diferentes pasos: i) La bacteria se adhiere a un receptor (generalmente un polisacárido) en la mucosa del epitelio coralino; este receptor contiene grupos β -galactopiranosidos. ii) Penetra en la epidermis del animal. iii) Pierde el flagelo polar y se diferencia en forma de coco hacia un estado viable no cultivable (del inglés

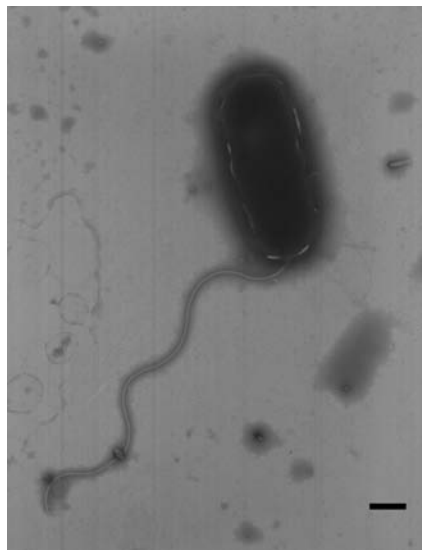


Figura 2.1: Micrografía electrónica de una célula completa de *V. shilonii* en medio líquido. Acetato de uranilo al 2% fue usado como material de contraste. Magnificación 12,000x a una aceleración de voltaje equivalente a 70 kV. Tomada en la Unidad de Microscopía Electrónica del IFC, UNAM. La barra de escala es equivalente a 500 nm.

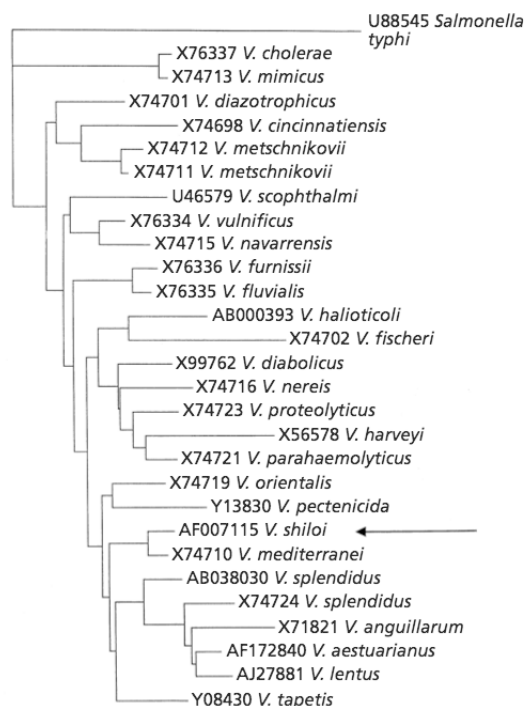


Figura 2.2: Árbol filogenético basado en las secuencias del DNA ribosomal de la subunidad 16S que muestra el parentesco entre 27 cepas de referencia del género *Vibrio* y la cepa AK-1 (señalada con una flecha). *Salmonella typhimurium* se usó como grupo externo. Imagen tomada y modificada de la referencia [75].

“Viable Non Culturable”). iv) Se replica de manera intracelular hasta alcanzar un número aproximado de 10^8 bacterias por cm^3 de tejido coralino. v) Produce y secreta al medio un péptido de doce residuos, rico en prolina, denominado toxina P capaz de inhibir la fotosíntesis y lisar a las micro algas. El resultado de estos sucesos se traduce en una pérdida de hasta el 63 % del abastecimiento de nutrientes para el coral, lo cual termina de manera irremediable en la muerte de la colonia [12, 11]. Evidencia recabada mediante observación anual señala que la infección es dependiente de la temperatura, ya que el efecto de blanqueo en el arrecife se agudiza durante la estación cálida (Figura 2.4).

Por lo tanto, el actual incremento en la temperatura global, podría causar un aumento progresivo en el blanqueamiento de las poblaciones coralinas, lo cual representa un daño irreversible a la constitución del arrecife, cuyas últimas consecuencias son de gran importancia ecológica y económica. Bajo condiciones controladas, usando corales dentro de acuarios a diferentes temperaturas, se observó que el blanqueamiento ocurre de un modo acelerado a 29°C , a 25°C es más lento y por debajo de los 20°C no hay blanqueamiento. Esto podría deberse a que ciertos factores de virulencia en la bacteria son activos sólo durante la estación cálida. Por otro lado, durante la estación fría, la presencia de *V. shilonii* se detectó en el gusano de fuego de la especie *Hermodice carunculata* (Figura. 2.5). Gusanos traídos directamen-



Figura 2.3: Efecto de blanqueamiento en los corales de la especie *Oculina patagonica* causado por *V. shilonii*. En la mitad izquierda de la foto, el coral mantiene su color debido a que las algas endosimbiontes se encuentran aun presentes dentro del tejido; en la mitad derecha, la infección por *V. shilonii* ha terminado por lisar a las algas y el tejido pierde su coloración. Imagen tomada y modificada de la referencia [131].

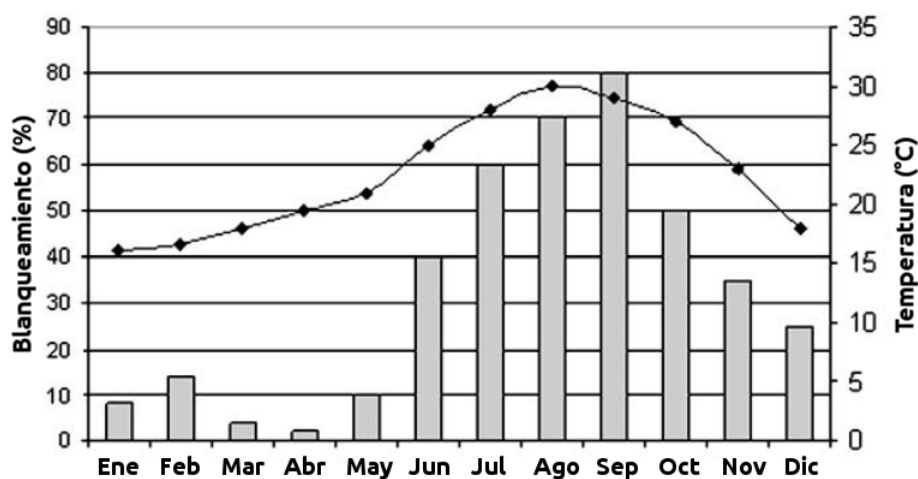


Figura 2.4: Patrón anual de blanqueo del coral *Oculina patagonica* en las costas mediterráneas de Israel desde 1995 hasta el 2003. En el gráfico se muestra el valor promedio mensual de la temperatura (◆) y el porcentaje de superficie blanqueada en los corales (barras). Imagen tomada y modificada de la referencia [131].



Figura 2.5: El gusano de fuego *Hermodice carunculata*, es el reservorio de invierno y posible vector de transmisión para *V. shilonii*. Imagen tomada de la referencia [131].

te del arrecife, pueden contener entre 0.6 y 2.9×10^8 células de *V. shilonii* por individuo. Cuando los gusanos infectados se ponen en contacto con los corales, estos últimos se blanquean en un lapso de 17 días; por otro lado, al colocar gusanos no infectados en presencia de corales sanos, el blanqueamiento no ocurre. Esta evidencia sugiere de manera importante que el gusano de fuego *H. carunculata* no sólo es el reservorio de invierno para *V. shilonii*, sino también un vector de transmisión [147, 131].

3. Antecedentes del flagelo bacteriano

El flagelo bacteriano es el organelo encargado de la motilidad de las células en su medio. La motilidad celular o nado, se basa en el movimiento rotatorio del filamento flagelar que funciona como una hélice. Especies del género *Vibrio* —bacterias Gram-negativas pertenecientes al grupo de las γ -proteobacterias— como *V. alginolyticus*, se desplazan a velocidades que van de 116 hasta 210 $\mu\text{m/s}$ en medio líquido; esto es equivalente a una tasa de rotación de 1,700 rps en 300 mM de NaCl a 35°C, mientras que *E. coli* alcanza una velocidad de 40 $\mu\text{m/s}$ la cual es equivalente a una tasa de rotación de 300 rps [96, 165].

Los flagelos bacterianos pueden tener arreglos distintos dependiendo del grupo de organismos en los que se observen (Figura. 3.1). En las bacterias del género *Vibrio*, existe un flagelo polar único recubierto por lo que parece ser una extensión de la membrana celular externa; este arreglo flagelar con un filamento único se denomina monotrico [107]. *Campylobacter jejuni* [160] y *Rhodospirillum rubrum* [83] son ejemplos de un arreglo flagelar llamado anfítrico en el cual se localizan desde uno hasta siete filamentos,

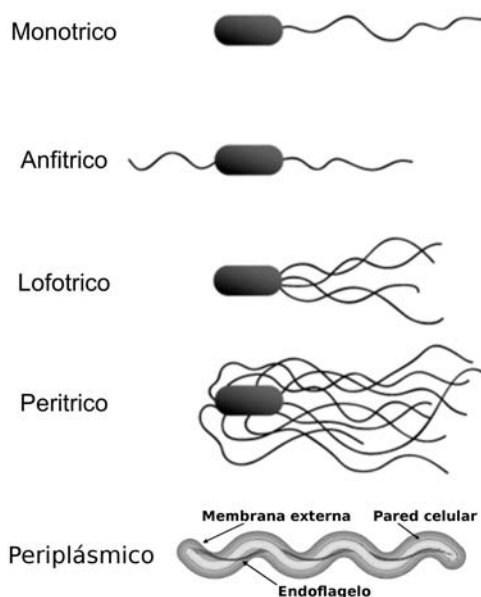


Figura 3.1: Patrones de distribución y ubicación del flagelo en las bacterias Gram-negativas. Arreglo monotrico, flagelo polar único como en las especies del género *Vibrio* [107]. Arreglo anfitrico, un filamento en cada polo del cuerpo celular como se observa en *C. jejuni* [160]. Arreglo lofotrico, varios filamentos polares como el caso de *V. fischeri* [5, 125]. Arreglo peritrico, múltiples flagelos alrededor del cuerpo celular, como los que se hallan en *E. coli* y *S. typhimurium* [48, 91]. Arreglo periplásmico, varios endoflagelos extendidos lo largo del cuerpo celular, ubicados entre la membrana externa y la pared celular [120].

respectivamente, en cada uno de los polos del cuerpo celular. Un caso particular dentro del género *Vibrio*, es el de *V. fischeri*, que presenta entre 2 y 8 flagelos polares en un arreglo llamado lofotrico, donde los múltiples filamentos se hallan concentrados en uno de los polos del cuerpo celular [5, 125]; otros ejemplos de especies bacterianas con flagelos en arreglo lofotrico, son *Pseudomonas putida* [51] y *Helicobacter pylori* [57]. Las bacterias entéricas, como *E. coli* y *S. typhimurium*, presentan múltiples flagelos desnudos distribuidos por toda la superficie celular en un arreglo llamado peritrico [48, 91]. Finalmente, las espiroquetas como *Treponema pallidum* (sífilis), *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme) o *Leptospira interrogans* (leptospirosis), poseen varios flagelos intracelulares periplásmicos que se extienden a lo largo del cuerpo celular, entre la membrana externa y la pared celular; estos organelos, les confieren a las espiroquetas su forma de espiral característica y especializada para el tráfico en medios de alta densidad [120].

3.1. Estructura del flagelo polar en la familia *Vibrionaceae*

Cada flagelo bacteriano es un heteromultímero integrado por más de 30 diferentes proteínas, el cual está dividido en tres subestructuras: el filamento, el gancho y el cuerpo basal [107, 25]. En la figura 3.2,

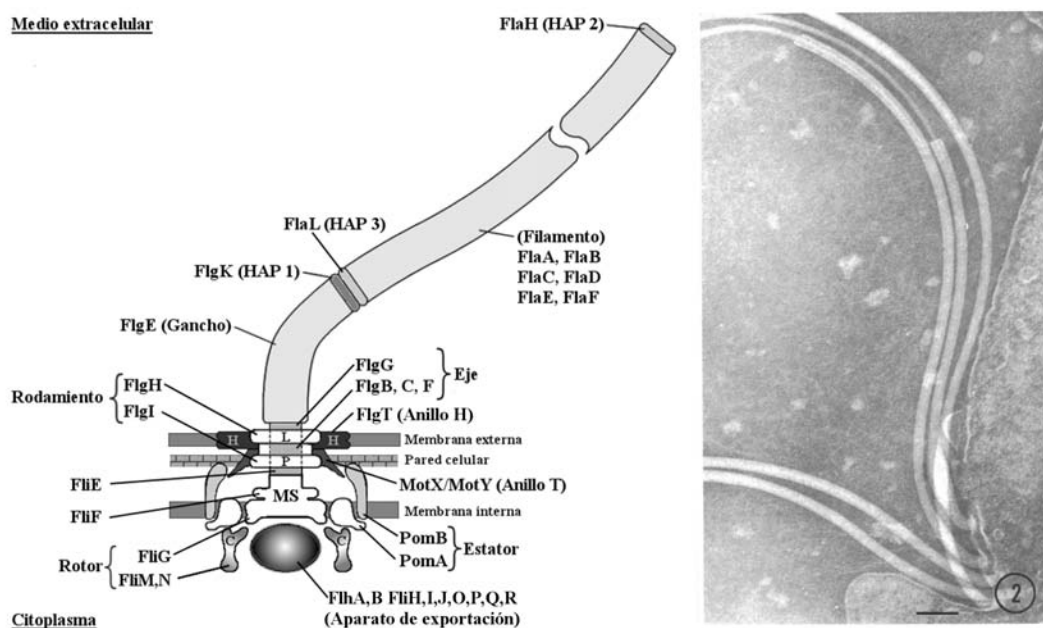


Figura 3.2: Localización de las tres subestructuras del flagelo polar, en las bacterias de la familia *Vibrionaceae*. En el panel de la izquierda, se muestra un esquema del flagelo polar completo. El filamento, constituido por las diferentes flagelinas (FlaA hasta FlaF), está unido al gancho mediante las proteínas accesorias FlgK (HAP 1) y FlgL (HAP 3); el extremo distal del filamento, está rematado por la proteína FlaH (HAP 2), la cual está involucrada en la polimerización de las flagelinas y en la elongación del flagelo. El gancho formado por la proteína FlgE, es el intermediario flexible entre el filamento y el cuerpo basal. La región intracelular del flagelo, el cuerpo basal, está formada por los anillos MS, L y P los cuales proporcionan soporte a un eje. En las *Vibrionaceae*, las proteínas accesorias del motor de iones sodio (Na^+), MotX y MotY forman el anillo T [149] mientras que FlgT y otras proteínas aún no descritas, forman el anillo H [150, 151]. Asociados al anillo MS, en la parte inferior del cuerpo basal, están el anillo C o “switch” flagelar y el aparato de exportación. La imagen del panel izquierdo fue modificada de la referencia [20]. El panel derecho muestra una micrografía de los flagelos en arreglo lofotrico de *V. fischeri* en los cuales se observa el núcleo de flagelina envuelto por un recubrimiento de membrana. La imagen del panel derecho fue tomada de la referencia [5].

se muestra un esquema general de la estructura del flagelo polar en *Vibrionaceae*. El filamento es una estructura extracelular de forma tubular, hueca, de entre 10 y 15 nm de diámetro por casi 4000 nm de largo y está construida a partir de monómeros de una proteína conocida como flagelina; cada filamento puede contener hasta 20,000 subunidades de flagelina [55]. En las especies del género *Vibrio*, el filamento polar es un heteropolímero constituido por 4 a 6 diferentes flagelinas [114, 85, 67]; el número de estas flagelinas varía de acuerdo con la especie y su masa molecular oscila entre los 44.5 y 45.5 kDa. Todas las flagelinas están presentes en el filamento de manera simultánea y algunas se hallan en mayor proporción que otras [106, 109]. En *V. shilonii* se encontraron, mediante secuenciación por espectroscopía de masas, péptidos correspondientes a tres flagelinas polares, FlaABC (acceso VSAK1_02999, VSAK1_02994 y VSAK1_02989) [42] y el genoma predice otros dos genes más de flagelina polar fuera del contexto genó-

Tabla 3.1: Genes que codifican para flagelinas presentes en los filamentos polares de algunas especies del género *Vibrio*. Tomada y modificada de la referencia [107].

Organismo	No. de genes que codifican para flagelina polar
<i>V. anguillarum</i>	5 (<i>FlaABCDF</i>)
<i>V. cholerae</i>	5 (<i>FlaABCDF</i>)
<i>V. fischeri</i>	6 (<i>FlaABCDEF</i>)
<i>V. parahaemolyticus</i>	6 (<i>FlaABCDEF</i>)
<i>V. shilonii</i>	5 (<i>FlaABCDF</i>)
<i>V. vulnificus</i>	6 (<i>FlaABCDEF</i>)

mico flagelar, *flaDF* (acceso VSAK108536 y VSAK108531 respectivamente); esto da un total de cinco flagelinas polares. Aunque la gran mayoría de estas flagelinas reiteradas se consideran como dispensables dentro de la biogénesis flagelar, dado que la eliminación de casi cualquier gen que codifica para una de estas proteínas no genera un fenotipo evidente sobre la estructura del flagelo o la motilidad [106], se conoce la existencia de flagelinas con cierta cualidad adicional. En *V. parahaemolyticus* se ha observado que la eliminación del gen *flaC*, que codifica para una flagelina polar, libera la restricción de la síntesis de los flagelos laterales al medio sólido [102]; de modo similar, interrupciones del homólogo de *flaC*, *flaA* en *V. cholerae* [70] y *V. anguillarum* [115], generan un fenotipo Fla⁻ (celulas carentes de filamento) o un flagelo polar trunco respectivamente. En la Tabla 3.1 se muestra el número de genes que codifican para flagelinas polares encontrados dentro del genoma de algunas especies del género *Vibrio*. El flagelo polar está envuelto por lo que se ha sido descrito como una extensión de la membrana externa [5, 36]; dicha característica incluye también a *Bdellovibrio bacteriovorus* y a *Helicobacter pylori* [139]. La cubierta membranal incrementa el grosor del filamento polar en un 50% llevándolo hasta un diámetro de 30 a 35 nm; aunque su función no es del todo clara, trabajos con *V. cholerae* [164] han postulado que la cubierta membranal, reduce el potencial antigénico de las flagelinas ocultándolas del sistema inmune del hospedero. El extremo distal del filamento está rematado por la proteína FlaH [107], también conocida como HAP 2 (por sus siglas en inglés “**H**ook **A**ssociated **P**rotein”), la cual está involucrada en la polimerización de las flagelinas; en *S. typhimurium* este remate está constituido por 5 subunidades de la proteína homóloga FliD [56].

El gancho como su nombre lo indica presenta una forma curva y su función es proporcionar una unión flexible entre el filamento y el cuerpo basal; el gancho está formado por 126 a 132 subunidades [56, 140] de la proteína FlgE. El gancho y el filamento se encuentran unidos, mediante las proteínas FlgK (HAP 1) y FlgL (HAP 3) [107]; se ha estimado un número de 11 subunidades para cada una de estas proteínas de unión que conforman la interfase [56].

El cuerpo basal en *E. coli* o *S. typhimurium*, está integrado por varios anillos que rodean y dan soporte

a un eje [92]. Los anillos se denominan de acuerdo a su asociación con las diferentes capas de la envoltura celular: el anillo MS recibe su nombre debido a que su región inferior se encuentra embebida en la membrana plasmática y la región que se encuentra mirando al periplasma es supramembranal; el anillo MS está constituido por la proteína FliF y actúa como base para el eje al cual está unido mediante la proteína adaptadora FliE [92]. El anillo P se encuentra en el periplasma, su nombre deriva de la asociación que tiene con la pared celular de peptidoglicano; está conformado por la proteína FlgI. El anillo L es el más distal de los componentes del cuerpo basal, se halla embebido en la membrana de lipopolisacáridos o membrana externa (característica del grupo de las bacterias Gram-negativas) y FlgH es la proteína que lo constituye. Se ha observado que la estequiometría de los anillos MS, L y P es de 26 subunidades cada uno [56, 140]. Los anillos rodean y dan soporte a un eje cuya porción proximal (la más cercana al anillo MS) está formada por las proteínas FlgB, FlgC y FlgF; cada una de estas proteínas presenta una estequiometría de 6 subunidades. La porción distal del eje (la más alejada del anillo MS) sobre la cual se monta el gancho, está compuesta por 26 subunidades de la proteína FlgG [56]. La masa molecular del cuerpo basal en *E. coli*, se ha estimado en 4400 kDa [140]. Dentro del género *Vibrio*, el cuerpo basal del flagelo polar cuenta con estructuras adicionales que no se hallan en el cuerpo basal descrito para *E. coli* o *S. typhimurium*, el anillo T y el anillo H. El anillo T, constituido por las proteínas MotX y MotY, con su forma de media luna se ubica bajo el anillo P en el espacio periplásmico [149]. MotX es una proteína de 28 kDa [104] involucrada en la localización del estator mediante la interacción con la proteína PomB [123] y esta no es estable en ausencia de MotY [74]; por otro lado MotY tiene una masa molecular de 33 kDa [105] y su estructura se ha dividido en dos dominios: una región C-terminal con capacidad de unión a peptidoglicano semejante a los dominios de proteínas como PomB o MotB [123] y una región N-terminal que interactúa tanto con MotX como con el cuerpo basal, probablemente a través de los anillos L y P [74]. Tomando en cuenta que en ausencia de las proteínas MotX o MotY, los complejos estatores pierden su localización polar y las células adquieren un fenotipo paralizado Mot⁻ (las células presentan un flagelo intacto pero incapaz de rotar), se piensa que el anillo T, está involucrado en el reclutamiento de los complejos estatores PomAB en torno al rotor y posiblemente también en el rodamiento del eje [39, 149]. El anillo H (del inglés “**H**olding ring”), formado por la proteína FlgT y otras proteínas aún no descritas, es un componente conspicuo del cuerpo basal situado en la porción distal del complejo en la base del gancho cuyo diámetro se aproxima a los 50 nm [150, 151, 42]. Por trabajos realizados en *V. cholerae*, se sabe que el anillo H está involucrado en la sujeción y estabilización del flagelo polar al cuerpo celular; en ausencia de FlgT, tanto el anillo H como el anillo T no se forman, el flagelo polar es incapaz de rotar y finalmente se desprende del cuerpo celular [97].

De manera general, el cuerpo basal recibe el torque del motor para transmitirlo al eje, al gancho y luego al filamento. El motor flagelar opera mediante un mecanismo rotatorio reversible y está dividido en dos secciones: el rotor y el estator. El rotor es una estructura en forma de campana llamada anillo C

(por mirar hacia el citoplasma) el cual está unido de manera no covalente a la parte inferior del anillo MS y conformado por las proteínas FliG, FliM y FliN [22, 37]. El anillo C es también conocido como el complejo del “switch” flagelar debido a que está asociado con el cambio de dirección en la rotación del filamento [159]; aunque la función de la proteína FliN no es del todo clara, se sabe que participa en la exportación de los componentes axiales del flagelo [92, 116]. El estator es el elemento fijo del motor y está formado por varios complejos de las proteínas transmembranales MotA y MotB (en *S. typhimurium*), que rodean al anillo C; cada uno de estos complejos estatores, está conformado por cuatro subunidades de MotA y dos subunidades de MotB [73]. La rotación se genera a partir de la interacción de MotA con FliG; el número estimado de complejos estatores por rotor, es de 10 unidades [65, 163]. Dentro del género *Vibrio*, el estator del flagelo polar está constituido por las proteínas homólogas PomA y PomB (por sus siglas en inglés “**P**olar flagellum **m**otility”) [165, 107, 7]. PomA tiene cuatro segmentos transmembranales y una asa citoplásmica mientras que PomB presenta sólo un cruce transmembranal en el extremo amino y un dominio de unión a peptidoglicano en el extremo carboxilo [7, 163]. Ambas proteínas interactúan entre sí para formar un complejo compuesto por cuatro subunidades de PomA y dos subunidades de PomB (PomA4/PomB2) que funciona como un canal para el ion sodio (Na⁺); es necesaria la presencia de ambas proteínas para que ocurra la translocación de iones desde el periplasma al citoplasma [134, 133, 163, 165, 167]. Se sugiere que este complejo es la unidad funcional del estator [161, 133, 65].

Ubicado dentro del anillo C y en el centro del anillo MS, se encuentra un sistema de secreción tipo III también conocido como aparato de exportación flagelar [59]. En bacterias patógenas de animales como *E. coli*, *S. typhimurium* o *Yersinia pestis* y en patógenas de plantas como *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora* o *Ralstonia solanacearum*, el inyector es el organelo encargado de translocar los factores de virulencia o efectores, desde las células bacterianas hacia las células del hospedero; en el inyector, la exportación de dichos efectores, depende de un sistema de secreción tipo III, cuyos componentes proteínicos son muy similares, a nivel de secuencia, a aquellos que conforman el aparato de exportación flagelar [27]. El aparato de exportación flagelar, tiene la función de translocar a los componentes axiales del flagelo (proteínas del eje, el gancho, las proteínas de unión HAP y las flagelinas del filamento) desde el citoplasma a través de la membrana interna, la pared celular y la membrana externa; el aparato de exportación flagelar está conformado por las proteínas transmembranales FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ y FliR así como por los componentes citosólicos FliH, FliI y FliJ [93]. Los componentes transmembranales forman la puerta de exportación dentro del anillo MS mediante la interacción de FlhA y FliF [66], mientras que los elementos citosólicos, son requeridos para guiar a los componentes axiales del flagelo o sustratos que serán translocados, hacia la puerta de exportación y para facilitar su entrada inicial en el poro de la misma. La actividad de ATPasa de FliI es necesaria para liberar a los sustratos dentro de la puerta de exportación flagelar, FliH es un regulador negativo para la ATPasa FliI y FliJ es una chaperona

general que previene la agregación prematura de los sustratos flagelares próximos a ser exportados [93]. El camino físico que siguen los sustratos al ser exportados, es un canal central e interno que se va formando a lo largo de todo el flagelo, mientras las subunidades de las diferentes subestructuras se incorporan al extremo distal del organelo en formación; se sabe que el diámetro de este canal central es de 2 nm [162].

El mecanismo de transporte se describe a continuación: el complejo FliH₂FliI-FliJ-sustrato se forma en el citoplasma (Figura. 3.3a) y se une a FliN en el anillo C mediante FliH, de modo tal que la concentración local de estos complejos aumenta en torno a la puerta de exportación (Figura. 3.3b). Enseguida la chaperona general FliJ se une a FliM, también en el anillo C, dejando libre al complejo FliH₂FliI-sustrato para que se una a la puerta de exportación; en esta unión específica con las proteínas FlhA y FlhB, FliI forma un hexámero y el extremo amino terminal del sustrato ingresa en la puerta de exportación. La energía de hidrólisis del ATP libera al oligómero FliH_xFliI₆ de la puerta de exportación y del sustrato dejándolo listo para el siguiente ciclo de transporte (Figura. 3.3c). Finalmente, el desplegamiento parcial y la exportación de los sustratos a través del canal central dependen de la fuerza protón motriz [116] (Figura. 3.3d).

3.2. Ensamblaje y regulación de la biogénesis flagelar

Debido a que el ensamblaje y funcionamiento del flagelo polar son costosos en términos energéticos, es necesario un control estricto de la biogénesis [110]. La biogénesis del flagelo polar tiene una organización jerárquica bajo la cual la expresión y la producción de proteínas estructurales y reguladoras, están gobernadas por puntos de control de un modo tal que el ensamblaje de un segmento no puede iniciar sino hasta que el segmento previo ha sido concluido [19, 92] (Figura. 3.4)

El flagelo polar de las *Vibrionaceas* requiere de dos factores de transcripción, la proteína RpoN (factor σ^{54}) para los genes tempranos [61, 68, 69] y la proteína FliA (factor σ^{28}) para los genes tardíos [108, 128, 68]. En *V. cholerae* la cascada de síntesis flagelar incluye 4 clases de genes y comienza con la transcripción del activador maestro Clase I *flrA*, cuyo producto se une al factor de transcripción σ^{54} para activar los genes de clase II. Aunque las señales que inician la transcripción del gen *flrA* aun no son del todo claras, se piensa que hay una relación entre el ciclo celular y la síntesis flagelar, esto debido a que el flagelo polar es constitutivo y está presente en todo momento durante la vida libre de la bacteria [128]. Los genes de la Clase II codifican para el anillo MS, el anillo C o “switch” flagelar, el aparato de exportación y los factores reguladores FlrB, FlrC y FliA (σ^{28}); estos elementos son los primeros en sintetizarse dentro de la jerarquía debido a que el flagelo se ensambla desde dentro hacia fuera de la célula. Cuando el ensamblaje del anillo MS, el anillo C y el aparato de exportación concluye, el sistema de dos componentes FlrB/FlrC se activa; la cinasa sensora de histidina FlrB transfiere un grupo fosfato a un residuo de aspartato conservado en el extremo amino terminal del regulador de respuesta FlrC el

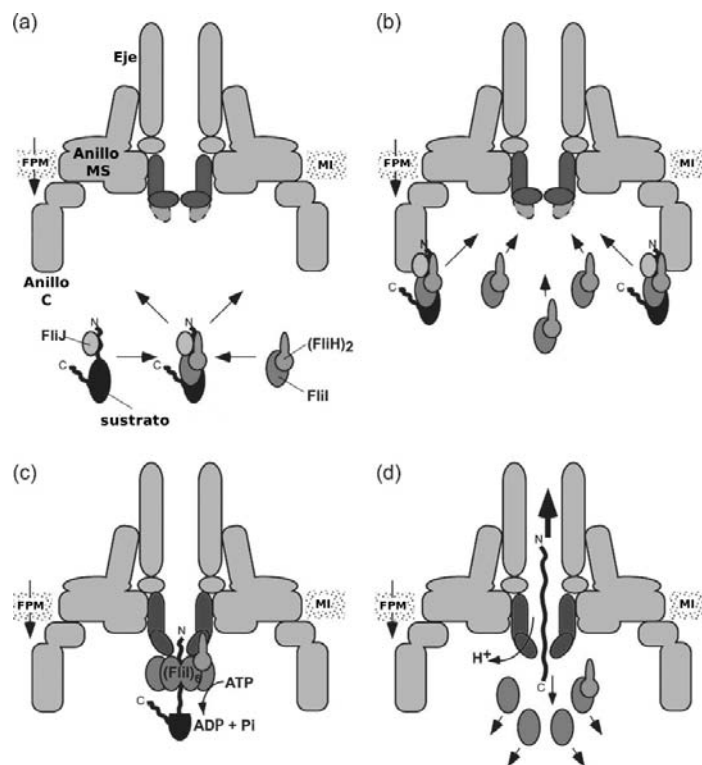


Figura 3.3: Mecanismo de exportación de las proteínas axiales del flagelo. (a) El heterotrímero $FliH_2FliI$ se une con el complejo $FliJ$ -sustrato en el citoplasma. (b) El complejo $FliH_2FliI$ - $FliJ$ -sustrato se une a $FliN$ mediante la interacción con $FliH$. (c) $FliJ$ interacciona con $FliM$ liberando al complejo $FliH_2FliI$ -sustrato, $FliI$ forma un hexamero y se une a la puerta de exportación para facilitar la entrada del extremo animo terminal del sustrato. (d) La hidrólisis de ATP desensambla a $FliH$ y $FliI$ de la puerta de exportación preparando la siguiente ronda de transporte; el polipéptido se despliega y se exporta por el canal mediante la fuerza protón motriz. Imagen tomada y modificada de la referencia [116].

cual a su vez inicia la transcripción σ^{54} -dependiente de los genes de clase III [29]. En el grupo de genes Clase III están los que codifican para el cuerpo basal, una flagelina mayoritaria o principal $FlaA$, el remate del filamento $FliD$ (HAP 2) y un componente del anillo T, $MotY$. La transcripción de los genes de Clase IV es dependiente de $FliA$ (factor σ^{28}); dentro de este grupo están los genes que codifican para las flagelinas adicionales ($FlaBCDE$), el regulador negativo $FlgM$ (factor anti- σ^{28}), la otra parte del anillo T, $MotX$, los componentes del complejo estator $PomA$ y $PomB$ así como para las proteínas encargadas de la quimiotaxis. Al mismo tiempo que se inicia la activación de los genes clase III por el sistema de dos componentes $FlrB/FlrC$, el factor $FliA$ -que es una proteína de Clase II- inicia la síntesis de proteínas pertenecientes a la Clase IV como se mencionó antes. Entre estas proteínas está el factor anti- σ^{28} o $FlgM$ cuya función es la de secuestrar al factor σ^{28} a modo de una asa de regulación negativa hasta que el cuerpo basal y el gancho estén terminados [28]. Una vez que el complejo del gancho y el cuerpo basal se completa, el aparato de exportación secreta a $FlgM$ al medio extracelular dejando a $FliA$ libre para

iniciar la transcripción de los genes de Clase IV [28, 128]. De manera general el esquema de la cascada de síntesis flagelar en *V. cholerae* es muy similar al de *V. parahaemolyticus*, pero tiene algunas variables.

V. parahaemolyticus presenta una cascada de tres clases: temprana, intermedia y tardía [108]. En la clase temprana se encuentran el regulador maestro FlaK (homólogo de FlrA en *V. cholerae*) y los factores reguladores FlaL y FlaM (homólogos de FlrB y FlrC respectivamente) [107]. En la clase intermedia se encuentran los genes que codifican para el anillo MS, el “switch” flagelar, el aparato de exportación, el gancho, el cuerpo basal, las proteínas de unión HAP 1 y HAP 3, la proteína MotY del anillo T, las proteínas para quimiotaxis CheZ, CheA, CheB y CheW además de las proteínas reguladoras FlhF, FlhG y FliA (σ^{28}). Por ultimo, la clase tardía, está integrada por los genes del estator PomA y PomB, la segunda proteína del anillo T MotX, algunas chaperonas como FlgN, seis diferentes flagelinas, las proteínas para quimiotaxis CheV y CheR y el factor anti- σ^{28} , FlgM. La clase temprana e intermedia son dependientes del factor σ^{54} mientras que la clase tardía es dependiente del factor σ^{28} [107, 108, 68]. Los elementos reguladores FlhF y FlhG están involucrados en el posicionamiento del flagelo polar y la determinación del número de filamentos respectivamente [78]. Debido a que el ensamblaje del filamento sigue un orden jerárquico, se debe reconocer que el aparato de exportación no es solo una puerta con un transporte activo dependiente de la fuerza protón motriz [117], sino que es capaz de discriminar qué elementos serán translocados de acuerdo con cada etapa en el ensamblaje del flagelo. Esta discriminación de sustratos comprende dos estados: el modo eje / gancho y el modo filamento. Se mencionó con anterioridad que los genes flagelares tardíos en *V. parahaemolyticus* o de clase IV en *V. cholerae* son activados por FliA, el factor σ^{28} el cual se encuentra secuestrado por FlgM, el factor anti- σ^{28} cuando el complejo del cuerpo

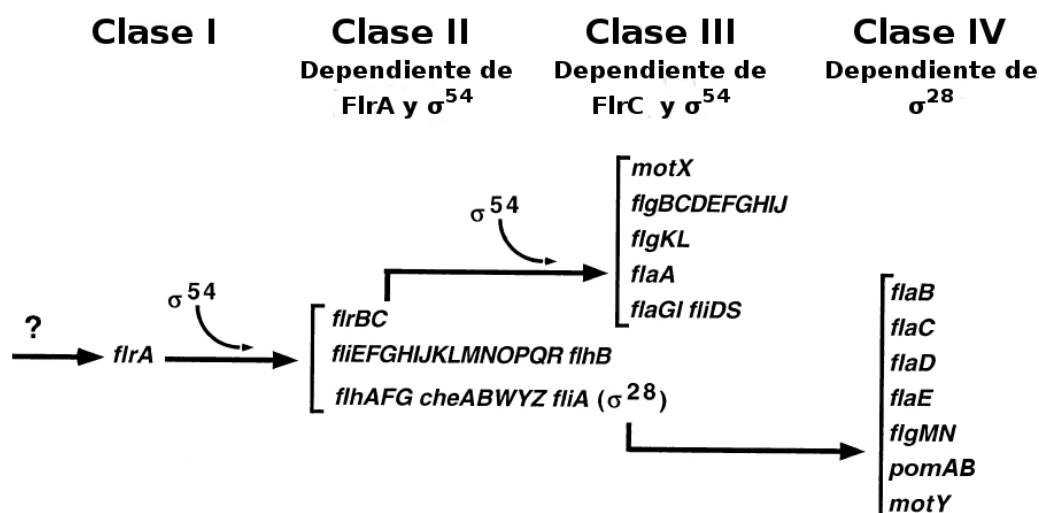


Figura 3.4: Ruta de biogénesis flagelar en *V. cholerae*. La imagen fue tomada y modificada de la referencia [128].

basal está en construcción; en este momento el aparato de exportación se encuentra en el modo eje / gancho. Una vez terminado el complejo del gancho y el cuerpo basal, la proteína de membrana FlhB del aparato de exportación sufre un corte autocatalítico en la región “linker” (entre la Asn269 y la Pro270); se sugiere que la proteína reguladora de la longitud del gancho FliK está involucrada en este corte [38]. Se piensa que el corte en la región “linker” de FlhB induce un cambio conformacional en la proteína que altera la especificidad del sustrato pasando del modo eje / gancho al modo filamento. En el momento en que el aparato de exportación entra en el modo filamento, FlgM se secreta del citoplasma al medio extracelular dejando libre a FliA para iniciar la transcripción de los genes tardíos o de clase IV [35].

3.3. Funcionamiento del motor flagelar

Se sabe que en *E. coli* y *S. typhimurium*, cada uno de los complejos MotA/MotB forma un canal que cruza la membrana interna de la célula; este canal, transloca protones (H^+) desde el espacio periplásmico hasta el citoplasma, en favor de un gradiente electro químico (fuerza protón motriz). El paso de los protones a través del canal formado por las proteínas MotA y MotB, está acoplado con la rotación del motor flagelar [19, 92, 127]. Cuando los protones pasan a través del canal MotA/MotB, se unen a un residuo específico de aspartato (Asp 32) en la proteína MotB e inducen un cambio conformacional en MotA el cual a su vez lleva a la proteína FliG en el rotor a un paso simple de rotación [72]). A continuación el residuo de aspartato libera al protón en el citoplasma, MotA regresa a su conformación original y FliG está listo para el siguiente ciclo [72, 92]. Dentro del asa citoplásmica de MotA y el extremo C-terminal de FliG hay residuos conservados e importantes para la rotación, estos interaccionan de manera electrostática entre si para generar el torque [165]. En FliG estos residuos son Lis264, Arg281, Asp288, Asp289 y Arg297 mientras que en MotA son Arg90 y Glu98 ; de manera general, la función de estos residuos parece ser redundante dado que la ausencia de uno en particular no es crítica para la función [72, 165, 171].

En las bacterias marinas como *V. cholerae*, *V. alginolyticus* o *V. parahaemolyticus* la fuerza motriz para generar el torque en el flagelo polar depende de un gradiente electroquímico de iones sodio (Na^+) cuyo paso a través de la membrana interna, es conducido por las proteínas del estátor PomA y PomB [7, 39, 133]. Se piensa que el principio para el funcionamiento del motor impulsado por sodio, es el mismo que en el motor impulsado por protón [165] (Figura. 3.5): los iones sodio en el periplasma se unen a un residuo específico de aspartato en PomB, el Asp 24 para ser translocados al citoplasma [39].

El paso de los iones sodio induce un cambio estructural en PomA que modifica su interacción con una de las proteínas del rotor, FliG. La interacción de los residuos cargados Lis284, Arg301, Asp308, Asp309 y Arg317 ubicados dentro del dominio carboxilo terminal de FliG [166] con los residuos Arg88 y Glu96 (residuos cargados equivalentes a los de MotA) más otros residuos adicionales: Lis89, Glu97 y Glu99 [168] en el asa citoplásmica de PomA, genera el torque del flagelo polar. La neutralización de

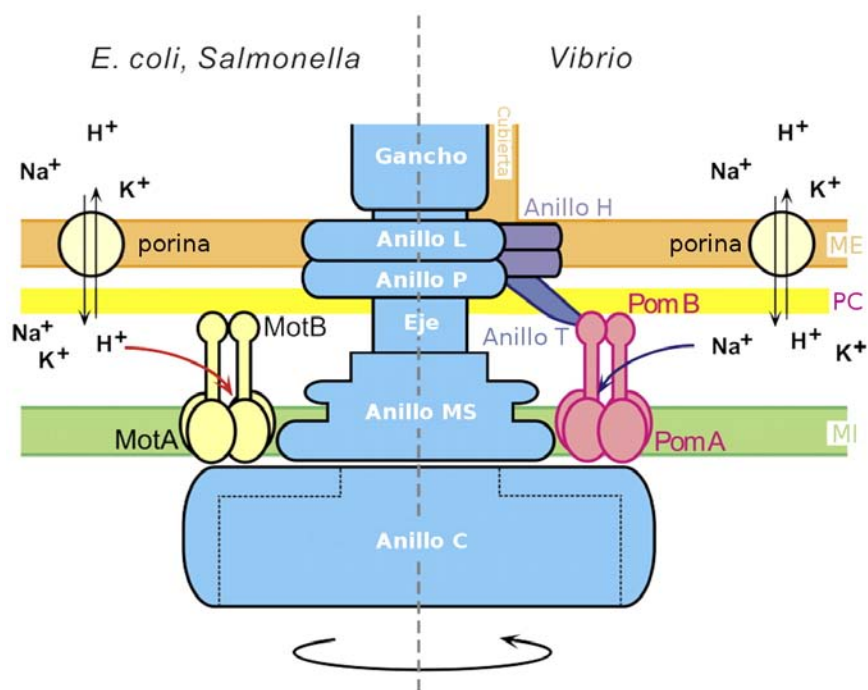


Figura 3.5: Mecanismo de rotación flagelar en las bacterias entéricas (*E. coli*) y en las bacterias marinas (*V. alginolyticus*). En *E. coli*, el complejo del estátor MotA/B conduce un flujo de protones (H^+) que se encuentra acoplado a la generación del torque en el complejo del rotor, el anillo C. En *V. alginolyticus*, el principio de la fuerza motriz es el mismo; un flujo de iones sodio (Na^+), conducido desde el periplasma hasta el citoplasma por el complejo del estátor PomA/B también está acoplado a la generación del torque en el complejo del anillo C. Asimismo, anillo T formado por las proteínas MotXY y el anillo H que incluye a la proteína FlgT, son necesarios para la rotación del filamento polar. En los miembros del género *Vibrio*, el flagelo polar está cubierto por una extensión de la membrana externa. Membrana externa (ME), Pared celular (PC) y Membrana interna (MI). Modificado de la referencia [161].

estos residuos en forma individual, no altera de manera significativa la función del estator, sin embargo la rotación flagelar se interrumpe cuando la carga de los cinco residuos se neutraliza de manera simultánea [168]. Los fármacos bloqueadores de canales de sodio como el amiloride y su derivado, el fenamil (Figura. 3.6) son capaces de prevenir la generación del torque en el filamento polar al interrumpir el flujo de iones inhibiendo así el desplazamiento de las células [8, 10, 121]; el amiloride tiene una constante de inhibición¹ (K_i) equivalente a 0.2 mM [146] mientras que para el fenamil la K_i es de 0.0015 mM [10].

La rotación reversible del motor flagelar dependiente del mecanismo de “switch” contenido en el anillo C, es el principio de la quimiotaxis [109]. En *E. coli*, la rotación flagelar en dirección opuesta a las manecillas del reloj (en inglés “counter-clockwise” o ccw) conduce a los filamentos a formar una

¹La constante de inhibición (K_i) es la concentración del inhibidor necesaria para reducir la velocidad máxima de una reacción, a la mitad de su valor no inhibido; esto en presencia de una cantidad baja de sustrato.

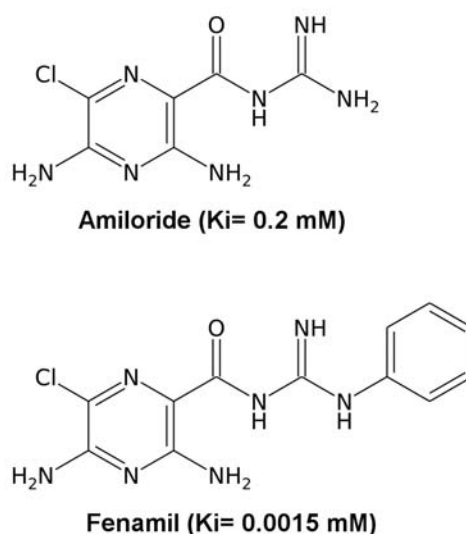


Figura 3.6: Estructura molecular de los bloqueadores de canales de sodio amiloride y fenamil. El fenamil deriva de la sustitución de uno de los átomos de hidrógeno por un grupo fenilo, en el amino terminal del grupo aminoiminometil del amiloride. Modificado de [121].

trenza que impulsa a las células hacia el frente; por otro lado, la rotación en dirección de las manecillas del reloj (en inglés “clockwise” o cw) deshace la trenza flagelar permitiendo así la reorientación de las células. El paso del modo de nado (rotación ccw) al paro y reorientación (rotación cw) depende de la interacción del regulador de respuesta quimiotáctico CheY en su estado fosforilado con la proteína del “switch” flagelar FliM. Cuando el medio es homogéneo y hay una concentración decreciente de ligando en los complejos de quimiorreceptores en el polo celular, se inicia la auto fosforilación de la cinasa sensora CheA, la cual transfiere su grupo fosfato al regulador de respuesta CheY. En su estado fosforilado, CheY-P se une primero al dominio amino terminal de FliM (FliM_N) y de manera sucesiva al dominio intermedio (FliM_M) desplazando -de manera competitiva- al dominio carboxilo terminal de FliG (FliG_C); este cambio de conformación en FliG altera de manera aun desconocida su interacción con MotA dando como resultado un cambio de sentido en la rotación flagelar, de nado a paro y reorientación. Bajo estas condiciones la frecuencia de paro y nado es semejante. Por otro lado, cuando existe en el medio un gradiente de sustancias favorables o nocivas, la concentración de ligando se incrementa en los complejos quimiorreceptores y la cinasa sensora CheA se desactiva; concomitantemente disminuye la concentración de CheY-P en el citoplasma, el dominio carboxilo terminal de FliG (FliG_C) regresa a su posición original con respecto a MotA y a su sitio de interacción con el dominio intermedio de FliM (FliM_M). En esta situación, la frecuencia de paro disminuye y los episodios de nado se vuelven más prolongados, lo que permite a las células dirigirse hacia los atrayentes o alejarse de los repelentes [32, 98].

3.4. Motilidad en la interacción bacteria-hospedero

La locomoción dependiente del flagelo, guiada por el sistema quimiotáctico, aleja a las bacterias de los ambientes nocivos para ellas y las dirige hacia los atrayentes; dichos atrayentes incluyen metabolitos, precursores u otros nutrientes disueltos en el medio, que las bacterias pueden interpretar como señales de proximidad hacia un hospedero potencial.

Debido a que el flagelo participa de manera importante en la interacción bacteria-hospedero, este organelo es considerado como un factor de virulencia o como un determinante de simbiosis. Se sabe que una cepa isogénica mutante, incapaz de moverse o que expresa sus sistemas de motilidad de manera incompleta, está restringida en cierto grado, para la colonización, la capacidad de causar enfermedad o para ambas; evidencia de lo anterior, es la recuperación exclusiva de bacterias motiles en modelos *in vivo*, después de una infección con células motiles o con una mezcla de células motiles y no motiles [revisado en 58, 126]. A continuación, se muestran algunos ejemplos de cómo es que el flagelo contribuye al proceso invasivo en diferentes maneras.

3.4.1. La motilidad dependiente del flagelo, es necesaria en las fases iniciales de la infección, pero no es requerida posteriormente una vez que la infección se ha establecido

Una cepa mutante en el gen *motY* de *V. anguillarum*, la cual presenta un fenotipo Mot⁻, exhibe una disminución de 750 veces en la capacidad de colonización al emplear un modelo experimental en trucha, con respecto de la cepa silvestre; esto se debe a que resulta imposible para las bacterias mutantes atravesar el tegumento del hospedero. Si esta barrera es superada, el flagelo ya no es necesario para continuar con la fase posterior de la infección; evidencia de ello es que, tanto la cepa mutante como la silvestre, tienen la misma capacidad de virulencia cuando estas se inyectan intraperitonealmente en el modelo *in vivo* [124].

Empleando *V. vulnificus* con un modelo murino, se ha observado que la cepa mutante para el gen *flgE*, con fenotipo Fla⁻, muestra una disminución significativa en su capacidad de adherencia a las células del epitelio intestinal y en la formación de biopelículas, con respecto de la cepa parental. Cuando estas cepas se inyectan dentro del peritoneo, la dosis media letal (DL₅₀) es de 5.0 x 10⁵ células para la cepa mutante y de 4.4 x 10⁴ células para la cepa silvestre [84].

Las mutantes de *V. fischeri* con fenotipo Fla⁻ y Mot⁻, obtenidas mediante transposición, son incapaces de colonizar los órganos de luz de su hospedero, el calamar *Euprymna scolopes* [43]. Aunque no existen experimentos de inoculación directa de las mutantes no motiles dentro de los órganos de luz, si se ha observado durante el curso de la infección, que más del 95 % de las bacterias silvestres recuperadas de los órganos de luz, después de un tiempo de colonización de 24 h, no presentan flagelos polares [132].

Una mutante aflagelada de *E. coli* del tipo EPEC (del inglés “enteropathogenic *Escherichia coli*”)

en el gen de la flagelina *fliC*, se adhiere a las células del epitelio intestinal en 6 h mientras que la cepa silvestre lo hace en 3 h; no obstante, tanto la cepa mutante como la silvestre, son capaces de reclutar filamentos de actina y formar una estructura de pedestal en las células del hospedero [40].

Durante la fase temprana de la infección por *Bordetella bronchiseptica*, la dispersión de las células bacterianas dentro del tracto respiratorio, es dependiente del flagelo. Luego, en la fase tardía, el sistema de dos componentes BvgAS se activa iniciando la expresión de factores requeridos para la colonización como adhesinas y toxinas, mientras que al mismo tiempo, reprime la expresión de los genes flagelares [88]. De estos ejemplos, se concluye que el flagelo es necesario para la dispersión de las bacterias y que participa en la adhesión de las células, pero que no es indispensable para las fases posteriores del proceso de infección.

3.4.2. La motilidad dependiente del flagelo, es necesaria para establecer y mantener la infección

Durante la colonización del tracto digestivo, la locomoción dependiente del flagelo, es necesaria para evitar la remoción debido a la peristalsis y al recambio intestinal.

En un modelo murino, la infección por *Campylobacter jejuni* resultó en la colonización de la porción cecal del intestino delgado; las bacteria recuperadas en la biopsia mostraron una motilidad activa dentro de la mucosa intestinal sin evidencia de unión a las células del epitelio [82]. Por otro lado, las cepas mutantes con fenotipo Fla⁻ y Fla⁺ Mot⁻, son incapaces de colonizar el tracto intestinal y mantener la infección, debido a que son eliminadas junto con el resto del contenido intestinal; después de la inoculación, las mutantes no motiles son removidas del tracto intestinal en un lapso de 2 días mientras que la cepa silvestre, puede permanecer dentro del hospedero por más de dos semanas [119].

La cepa silvestre de *Helicobacter pylori* es capaz de colonizar y persistir hasta 10 días después de la infección, en el estómago de un modelo experimental en lechón. Por otro lado, las mutantes sencillas no motiles para cualquiera de los genes de flagelina (*flaA* o *flaB*), persisten hasta por 4 días mientras que la doble mutante no persiste por más de 2 días [33].

Cuando la bacteria multiflagelada *Proteus mirabilis* entra en contacto con una superficie, esta se diferencia en un fenotipo hiper flagelado adecuado para el desplazamiento grupal o “swarming”. Mutantes motiles pero incapaces de pasar al fenotipo de “swarming”, son eliminadas del riñón y la vejiga mientras que la cepa silvestre persiste en el 21.7% de los ratones infectados. Asimismo, se sabe que estas mutaciones que alteran la locomoción o la hiper flagelación, previenen la expresión de otros factores de virulencia [6].

La mutante isogénica de *P. aeruginosa* para el gen de la flagelina, *fliC*, resulta incapaz de esparcirse de manera invasiva en un modelo de ratón neonato para neumonía y de causar la muerte a los individuos infectados; al mismo tiempo, en ese mismo ensayo, la cepa silvestre causó una mortalidad del 30% [34].

En *V. alginolyticus*, un patógeno considerado como letal para peces y agente causal de gastroenteritis en consumidores humanos, se ha detectado que la eliminación del gen *luxS*, involucrado en la comunicación interespecies por autoinductor del tipo 2 (AI-2), exhibe una virulencia disminuida en un modelo experimental en peces, debido a que dicha mutante es incapaz de ensamblar el flagelo polar [153].

3.5. Un sistema de motilidad alterno: los flagelos laterales

Algunas especies de *Vibrionaceas* como *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* o *V. shilonii*, cuentan con dos sistemas de locomoción conformados por diferentes tipos de apéndices [5, 42, 103, 107, 109]. El flagelo polar único, adecuado para el desplazamiento en medio líquido, presenta una expresión constitutiva, está recubierto por una extensión de la de membrana externa y depende de un potencial electroquímico de iones de sodio (Na^+) para su rotación [172]; por otro lado, los flagelos laterales que se distribuyen en un arreglo peritrico, son desnudos, dependen de un un potencial electroquímico de protones (H^+) [9] y sólo se expresan en medios de alta densidad o cuando la célula se encuentra sobre una superficie, para llevar a cabo un tipo de desplazamiento grupal tipo enjambre denominado “swarming” [102, 107, 137, 144, 155] (Figura. 3.7). Los flagelos laterales están constituidos por monómeros de la proteína LafA, la cual tiene una masa molecular de 30 kDa [106]. Los análisis por alineamientos tipo BLAST hechos con LafA de *V. parahaemolyticus*, contra las bases de datos de genomas ya secuenciados en varias especies del género *Vibrio*, mostraron que dicha proteína está presente en aquellas especies del género que poseen un sistema de flagelos laterales. En la Tabla 3.2 se muestran los patrones de distribución flagelar para algunas especies de *Vibrionaceas*. Otras bacterias que presentan un sistema

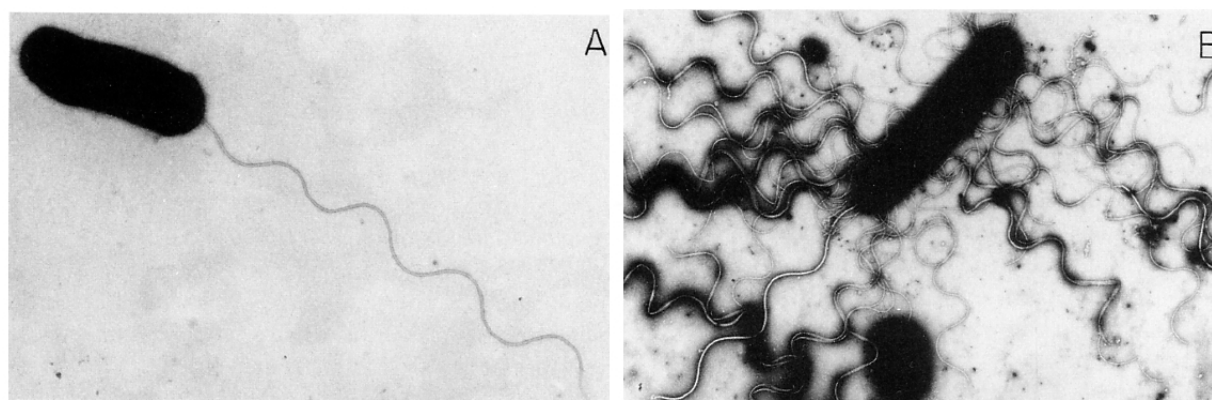


Figura 3.7: Algunas *Vibrionaceas* cuentan con dos sistemas de motilidad. Las células de *V. parahaemolyticus* cultivadas en medio líquido, presentan un flagelo monotrico único en posición polar (panel A); por otro lado, las células extraídas de medio sólido, muestran múltiples filamentos flagelares distribuidos de manera peritrica sobre la superficie celular. Las micrografías electrónicas se tomaron a una magnificación final de 11,000x. Figura tomada y modificada de la referencia [102].

de flagelos laterales adecuados para el desplazamiento en medio sólido [revisado en 113], incluyen a *Rhodospirillum centenum* [111], *Azospirillum brasilense* [46] o *Aeromonas hydrophila* [24].

Se ha sugerido, que la expresión de los flagelos laterales, se encuentra acoplada al decremento en la rotación del flagelo polar; en general, las condiciones que interfieren con la rotación del flagelo polar o que restringen el nado, promueven la activación del programa genético de los flagelos laterales. Experimentos realizados con *V. shilonii* [42] (Figura. 3.8) y *V. parahaemolyticus* [17] en cajas de nado adicionadas con diversas concentraciones de agar y varios agentes densificantes como el ficol o la polivinilpirrolidona, muestran que la expresión del sistema de flagelos laterales, es dependiente de la densidad del medio. Otras condiciones que promueven la activación de este sistema incluyen a los anticuerpos contra la superficie de las células [102], las mutaciones que afectan la capacidad de rotación del flagelo polar [22] y el bloqueador de canales de sodio (Na^+) fenamil [10, 41, 60].

En el trabajo realizado por Belas *et al.* en la bacteria *V. parahaemolyticus*, [17] se emplearon los genes reporteros luminiscentes (*lux*) para analizar la regulación de los genes involucrados en la biogénesis de los flagelos laterales (*laf*), esto durante el crecimiento en presencia de varios agentes densificantes. Las fusiones transcripcionales entre los genes reporteros *lux* y los genes *laf* se construyeron *in vivo* mediante el transposón mini-Mu *lux*, el cual inserta el operón *lux* dentro del genoma bacteriano. En las cepas resultantes del proceso de transposición, aquellas con la fusión *laf:lux*, la transcripción de los reporteros, carentes de promotor, está acoplada con la de los genes *laf*; el resultado es (el fenotipo de los genes *lux*) la luminiscencia, dependiente de los factores que activan la expresión de los flagelos laterales, como el crecimiento en medio sólido. Estas mismas fusiones transcripcionales con el operón *lux* se usaron

Tabla 3.2: Patrón de distribución flagelar en algunas especies del género *Vibrio*. Esta tabla se tomó de la referencia [107] y se complementó con información de las referencias [42, 109].

Organismo	Flagelo polar recubierto ¹	Flagelos laterales desnudos (peritricos) ²
<i>V. alginolyticus</i>	Monotrico	+
<i>V. anguillarum</i>	Monotrico	-
<i>V. cholerae</i>	Monotrico	-
<i>V. fischeri</i>	Lofotrico (2-8)	-
<i>V. harveyi</i>	Monotrico	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	Monotrico	+
<i>V. shilonii</i>	Monotrico	+
<i>V. vulnificus</i>	Monotrico	-

¹Observado mediante microscopía electrónica en cultivos de medio líquido.

²Observados mediante microscopía electrónica en cultivos de medio sólido. +, presencia de flagelos laterales; -, no se detectó la presencia de flagelos laterales.

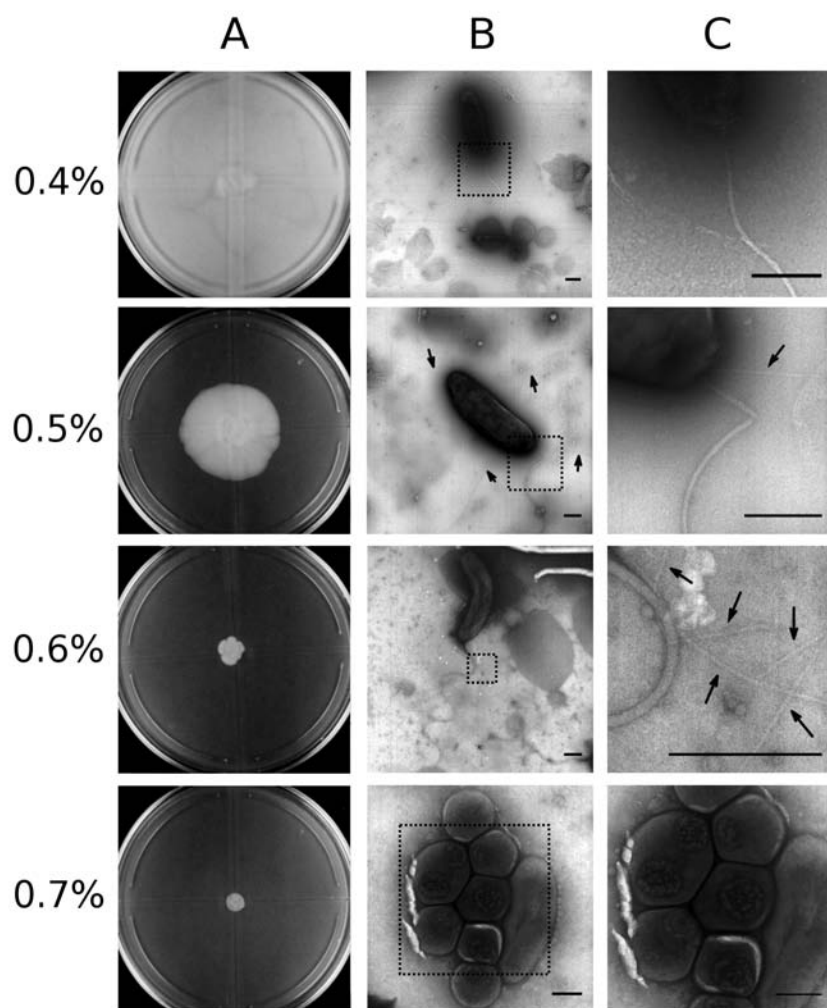


Figura 3.8: Motilidad de *V. shilonii* bajo diferentes condiciones de crecimiento. Columna A) Ensayos de motilidad en medio “Marine broth” al 3.7% adicionado con varias concentraciones de agar; todos los cultivos se incubaron a 30°C durante 36 h. Columna B) Micrografías de las muestras correspondientes a cada uno de los ensayos de motilidad. En agar al 0.4%, se observa que las células presentan sólo el flagelo polar único. Luego, en agar al 0.5% y 0.6% las células presentan múltiples flagelos laterales con un diámetro de 15 nm además del flagelo polar cuyo diámetro es de 30 nm; mientras mayor es la concentración de agar, mayor el número de filamentos laterales. Por último, en agar 0.7%, las células pierden todos sus apéndices flagelares y adquieren una forma de coco. Columna C) Ampliación de las áreas señaladas en la columna B. Las flechas negras señalan a los flagelos laterales. Todas las barras son equivalentes a 500 nm. Aceleración de voltaje equivalente a 70 kV. Figura tomada de la referencia [42].

para observar la regulación del sistema de flagelos laterales en presencia del bloqueador de canales de sodio (Na^+) amiloride y sus derivados, benzamil y fenamil. Estos ensayos hechos en *V. parahaemolyticus* [60], muestran que sólo el fenamil logra activar la expresión de los genes *laf* a lo largo de una curva de inducción; el punto máximo de inducción, que se observa a las 2 h de incubación en presencia de

fenamil, alcanza una luminiscencia 100 veces superior al cultivo control. Por otro lado, aunque está reportado, para *V. shilonii*, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* que el amiloride es capaz de inhibir el desplazamiento dependiente de flagelo polar en cajas de nado (agar 0.3 %) y en medio líquido [8, 42], también se ha observado que tanto este como su análogo, el benzamil, parecen inhibir la formación de los flagelos laterales [60]. La interrupción de los genes *laf* mediante la inserción del transposón mini-Mu *lux*, resulta en mutantes nulas con fenotipo *laf*⁻ incapaces de desplazarse en cajas de agar sólido y que no presentan flagelos laterales; la identidad de los genes *laf* interrumpidos mediante esta técnica, no está determinada.

En un trabajo anterior, reportamos la presencia de flagelos laterales en *V. shilonii* cuya expresión es dependiente de la concentración de agar en el medio de cultivo [42]; asimismo observamos que el diámetro de estas estructuras coincide con los 15 nm determinados para los flagelos laterales de otras especies del género *Vibrio* [5, 15]. Mientras que en aquella ocasión nos abocamos a la caracterización del flagelo polar en esta bacteria, para este nuevo trabajo decidimos continuar con la disección del sistema de flagelos laterales de *V. shilonii* usando al bloqueador de canales de sodio (Na⁺) fenamil como una herramienta de inducción.

3.6. La cepa AK-1 de *V. shilonii* es resistente a la manipulación genética

En nuestras manos, *V. shilonii*, demostró ser una bacteria inaccesible a la manipulación por técnicas de biología molecular; en este aspecto de su biología, los resultados obtenidos fueron opuestos a los reportados con anterioridad por Banin *et al.*, quienes aislaron una cepa mutante para la enzima superóxido dismutasa, a partir de una librería de mutantes generada mediante transposición [13]. Tomando en cuenta este antecedente, realizamos múltiples ensayos empleando las técnicas clásicas de transformación y manipulación genética en bacterias, así como las reportadas para el género *Vibrio* [138, 47, 142]. En nuestros ensayos incluimos la transformación química con CaCl₂ y choque térmico [26], la transformación natural en presencia de quitina [112, 99], la electroporación [62, 157], la conjugación [143, 79], la transposición [4] y la transducción por bacteriófago P1 [16]. En la Tabla 3.3 se muestran los plásmidos empleados en algunos de estos experimentos.

Pese a los múltiples intentos y controles realizados, empleando las técnicas de transformación ya mencionadas, a la fecha no hemos logrado modificar genéticamente a *V. shilonii*. Por lo tanto, este estudio y todos los ensayos que se presentan a continuación, se llevaron a cabo con la cepa silvestre AK-1 de esta bacteria marina.

Tabla 3.3: Plásmidos empleados como DNA exógeno en los experimentos de transformación con *V. shilonii*.

Plásmido	Características relevantes	Procedimiento	Referencia
pBSL181	R6K oriV, RP4 oriT, mini-Tn10 Cm ^r	Transposición.	[4]
pRK415	ColE1 oriV, RP4 oriT, Tc ^r	Conjugación, transformación química, transformación natural.	[64]
pRK415 _{flgG3}	ColE1 oriV, RP4 oriT, Tc ^r , Vsh <i>flgG3</i>	Conjugación.	Propio ¹
pSU21	p15A oriV, Cm ^r	Electroporación, transformación química, transformación natural.	[14]
pSU21 _{oriT}	p15A oriV, RP4 oriT Cm ^r	Conjugación.	Propio ²
pSU41	p15A oriV, Km ^r	Electroporación, transformación química, transformación natural.	[14]

¹El gen *flgG3* de *V. shilonii* se subclonó en el plásmido pRK415, con el objetivo de insertar el plásmido completo dentro del cromosoma a través de un evento de recombinación homóloga.

²En esta construcción, se insertó el origen de transferencia del plásmido pRK415 en el plásmido pSU21 para volver a este último, mobilizable mediante conjugación.

4. Hipótesis

La ultraestructura del cuerpo basal de los flagelos laterales de *V. shilonii*, es morfológicamente distinta a la ultraestructura del cuerpo basal del flagelo polar.

5. Objetivo general

Caracterización bioquímica y estructural del sistema de flagelos laterales de la bacteria marina *V. shilonii*.

6. Objetivos particulares

- Observar el efecto del bloqueador de canales de sodio, fenamil, sobre el crecimiento y la morfología de las células mediante microscopía óptica y electrónica de transmisión.
- Aislar el complejo del gancho y cuerpo basal de los flagelos laterales y describir, de manera morfológica, la ultraestructura de los complejos aislados mediante microscopía electrónica de transmisión.
- Determinar por ensayos de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (“RT-PCR”), la presencia de RNAs mensajeros de genes involucrados directamente en la biogénesis de flagelos laterales, en cultivos líquidos adicionados con fenamil.

7. Materiales y métodos

7.1. Cepas y condiciones de crecimiento

Todos los ensayos se realizaron en la cepa *V. shilonii* AK-1 del tipo silvestre (número de ATCC: BAA-91) [75]. Las células de AK-1 se cultivaron de manera rutinaria a 30°C, durante 48 h sobre cajas Petri con medio de cultivo “Marine Broth 2216²” marca Difco 37 g l⁻¹ adicionado con agar al 2%; estos cultivos sólidos se mantuvieron almacenados a 4°C por un lapso de 15 días mientras estuvieron en uso, antes de estriarse nuevamente en el mismo medio.

²Para revisar los detalles sobre la preparación del medio de cultivo “Marine Broth”, pasar a la sección A.1.1.

7.2. Crecimiento y motilidad

Células de AK-1 se cultivaron a 30°C en medio TBSW³ (triptona 1 %, MgSO₄ 35 mM, CaCl₂ 7 mM, KCl 7 mM, Tris/HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 342 mM) [125] durante 12 h en agitación suave. De estos cultivos saturados, 200 µl se diluyeron 1:100 en medio fresco TBSW adicionado con 342 mM (salinidad de 20 ppt) o con 120 mM (salinidad de 7 ppt) de NaCl. El crecimiento se analizó mediante la densidad óptica de los cultivos a una longitud de onda de 600 nm por intervalos de 30 min. La velocidad de nado se calculó a través del análisis de las trayectorias individuales de al menos 30 células por condición, capturadas en video usando el programa “CellTrack”. La fracción motil de la población se definió como el cociente del número de células en movimiento sobre el total de células en el campo multiplicado por 100; el conteo de al menos 100 células por condición se realizó analizando los videos en el programa “Image J” [135]. Los videos, con duración de 1 minuto, se obtuvieron observando a las células tomadas directamente del cultivo, bajo un microscopio óptico de campo oscuro de alta intensidad marca Olympus, modelo BH2 [90] al cual le fue adaptada una cámara de video digital marca Canon, modelo HV20; los videos se editaron en el programa de acceso libre, “Avidemux”. Cuando fue requerido, el bloqueador de canales de sodio (Na⁺) fenamil (en inglés “Phenamil”) (fenamil metano sulfonato marca Sigma-Aldrich, # P203-5MG), se adicionó al medio de cultivo en una concentración final de 50 µM; el fenamil, se disolvió en DMSO al 100 % y fue almacenado a -20°C.

7.3. Aislamiento de RNA total y perfiles de transcripción

El RNA total de *V. shilonii* se extrajo a partir de un cultivo líquido control libre de tratamiento y de un cultivo líquido experimental adicionado con 50 µM de fenamil; ambos cultivos se cosecharon después de alcanzar una densidad óptica de 0.2 a una longitud de onda de 600 nm. El aislamiento de RNA total⁴ se realizó como se describió con anterioridad [1].

7.3.1. Cosecha y lisis de las células

Un volumen de 100 ml de cada uno de los cultivo requeridos se dividió en alícuotas de 50 ml (tubos Falcon 50 ml) para cosechar las células por centrifugación a 10,000 rpm durante 3 min a 4°C, después de eliminar el sobrenadante, la pastilla se resuspendió con una pipeta Pasteur en 3 ml de la solución de lisis (acetato de sodio 20 mM [pH 5.5], EDTA 1mM y SDS 0.5 %); enseguida, cada tubo se incubó a 70°C durante 1 minuto hasta que la suspensión se clarificó indicando que la lisis era completa.

³Para revisar los detalles sobre la preparación del medio de cultivo TBSW, pasar a la sección A.1.2.

⁴Para mayores detalles sobre el aislamiento de RNA total, revisar la sección A.3.

7.3.2. Extracción con fenol y primera precipitación

Después de añadir un volumen de fenol saturado previamente calentado a 70°C, cada tubo se incubó durante 10 min a 65°C en agitación más o menos fuerte y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min a 4°C; sin mezclar las fases, cada tubo se incubó de nuevo a 70°C hasta que la suspensión se clarificó. El sobrenadante (fase acuosa) se pasó a un tubo nuevo con una pipeta de precisión y se agregó un volumen de fenol caliente; esta extracción con fenol se repitió tres veces más. El sobrenadante de la última extracción se colocó en un tubo Corex de vidrio de 30 ml y los ácidos nucleicos se precipitaron al agregar 1/10 del volumen original de acetato de sodio 3 M (pH 5.5) y 2½ volúmenes del original de etanol absoluto; la suspensión se incubó a -20°C durante 12 h. Luego de centrifugar la suspensión a 10,000 rpm durante 30 min a 4°C y eliminar el sobrenadante, la pastilla se secó al vacío, se resuspendió en 600 µl de agua y se hicieron alícuotas de 300 µl (tubos Eppendorf 1.5 ml); se tomaron muestras de este paso para resolverlas por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y verificar la integridad del RNA.

7.3.3. Extracción con cloroformo y segunda precipitación

Se agregó un volumen de cloroformo por tubo a los ácidos nucleicos en solución y la mezcla se agitó a mano; después de centrifugar las alícuotas a velocidad máxima en una microfuga durante 3 min, el sobrenadante (fase acuosa) se pasó a un tubo nuevo y se agregó un volumen de cloroformo. Las extracciones de cloroformo se repitieron tres veces más. El sobrenadante de la última extracción se pasó a un tubo nuevo y se precipitó agregando 1/10 del volumen original de acetato de sodio 3 M (pH 5.5) y 2.5 volúmenes del original de etanol absoluto; la suspensión se incubó a -20°C durante 12 h. Después de centrifugar la suspensión a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C y eliminar el sobrenadante, la pastilla se lavó sin resuspender al menos tres veces con 1 ml de etanol frío al 70 % para remover las sales; la pastilla se volvió a centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min a 4°C después de cada lavado.

7.3.4. Tratamiento con DNAsaI, extracciones fenol/cloroformo y tercera precipitación

Posteriormente la pastilla resultante del paso anterior, se secó al vacío, se resuspendió en 300 µl de agua y se trató con 1 µl de DNAsa I libre de RNAsas durante 1 hora a 37°C en agitación; la reacción se interrumpió con 5 mM final de EDTA. A continuación el RNA se extrajo cuatro veces para remover la DNAsa I: primero con un volumen de fenol, luego con un volumen de fenol y un volumen de cloroformo, enseguida con un volumen de cloroformo y finalmente una última vez más con cloroformo. Después se pasó el sobrenadante de la última extracción a un tubo nuevo de 1.5 ml y se precipitó agregando 1/10 del volumen original de acetato de sodio 3 M (pH 5.5) y 2 volúmenes del original de etanol absoluto; el RNA precipitado se incubó a -20°C durante 12 h antes de centrifugarlo a 10,000 rpm durante 10 min

a 4°C y eliminar el sobrenadante. La pastilla se lavó sin resuspender, al menos dos veces, con 1 ml de etanol al 70% frío para remover las sales y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min a 4°C después de cada lavado; la pastilla se secó al vacío. Finalmente esta se resuspendió en 300 µl de agua y se tomó una muestra para resolverla por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con el objetivo de verificar su integridad.

7.3.5. Cuantificación

Todas las purificaciones se almacenaron a -20°C y se cuantificó su densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm bajo la relación de $1.0 \text{ DO}_{260 \text{ nm}} = 40 \text{ µg/ml}$ de RNA; al mismo tiempo, se estimó la contaminación por proteínas mediante el cociente de las densidades ópticas a 260/280 nm; un valor de 2.0 a 2.2 sugiere un RNA relativamente libre de proteínas.

7.3.6. Ensayo de retro transcripción

Los ensayos de retro transcripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (“RT-PCR”) se hicieron con el sistema “Access RT-PCR System” de Promega (# de catálogo: A1250) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En cada reacción se cargaron 0.2 ng/µl de RNA total por cada condición de crecimiento y 10 pmol/µl de cada uno de los oligonucleótidos correspondientes (Tabla. 7.1).

Los parámetros de la reacción son los siguientes: 1) Síntesis de cDNA, un ciclo de 45°C por 45 min para transcripción reversa, 1 ciclo de 94°C por 2 min para inactivar por desnaturalización a la retro transcriptasa y desnaturalizar las cadenas de ácidos nucleicos (RNA, cDNA y oligonucleótidos); 2) Amplificación por “PCR”, 40 ciclos de 94°C por 30 min para desnaturalizar, 60°C durante 1 minuto para el alineamiento y 68°C por dos min para la extensión por ciclo; y por ultimo, un ciclo de 68°C por 7 min para la extensión final. Los productos de la reacción de retro transcripción se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

7.4. Aislamiento de cuerpos basales

Los cuerpos basales de AK-1 se aislaron usando una modificación del protocolo original descrito por Aizawa *et al.* [2, 3]. Un cultivo saturado de AK-1 crecido en medio TBSW adicionado con 342 mM de NaCl, se diluyó 1:100 en alícuotas de 100 ml del mismo medio adicionado con 120 mM de NaCl; 50 µM de fenamil se empleó cuando fue requerido. Las alícuotas se crecieron a 30°C en agitación moderada hasta una densidad óptica entre 0.2 y 0.25 a una longitud de onda de 600 nm y se cosecharon por centrifugación a 6,000 rpm (4,500 *xg*) durante 20 min a 4°C. Después de la centrifugación se eliminó el sobrenadante por decantación y la pastilla se resuspendió en 10 ml de amortiguador de sacarosa frío

Tabla 7.1: Secuencias de los oligonucleótidos empleados en los ensayos de retro transcripción (“RT-PCR”).

Gen	Secuencia de oligonucleótidos
Flagelina lateral <i>lafA</i>	FwLafA2. 5'-catgccatggagcggttgagcaacaggttac-3' RvLafA2. 5'-catgagatctcataccaggtagctggttag-3'
Activador maestro de los flagelos laterales <i>lafK</i>	LafK Fw BamHI. 5'-cgcggatccaaggatattctctacgttg-3' LafK Rv BamHI. 5'-cgcggattctcttcgcgaagatctttattag-3'
Subunidad β de la DNA girasa <i>gyrB</i>	GyrB Fw. 5'-tcacgtggcggtcaaattc-3' GyrB Rv. 5'-ctagtcacctttacgacgc-3'

(sacarosa 0.5 M y Tris 0.15 M). La suspensión se mantuvo en agitación con una barra magnética sobre hielo durante 15 min hasta que los agregados de células se eliminaron. Enseguida se añaden 100 μ l de la solución de lisozima (10 mg/ml) y 1 ml de la solución de EDTA (20 mM) para alcanzar una concentración final de 0.1 mg/ml y 2 mM respectivamente⁵; posteriormente se incuba la suspensión en hielo por 5 min. Luego de este tiempo, la suspensión se incuba a temperatura ambiente durante 35 min en agitación moderada y se agrega 1 ml de una solución de Tritón X-100 (10 % [v/v]) para llegar a una concentración final de 1 %. Una vez que la suspensión se torna clara, se revisa la viscosidad y se le agregan 200 μ l de una solución de MgSO₄ (100 mM) y 1 mg de DNAsa I liofilizada; la concentración final del MgSO₄ es de 1 mM. La suspensión se incuba a temperatura ambiente 5 min más hasta que la viscosidad disminuye y se añaden 200 μ l de una solución de EDTA (100 mM); la concentración final de EDTA es de 2 mM. A continuación, la suspensión clarificada se centrifuga a 6,000 rpm (4,500 *xg*) durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se vuelve a centrifugar a 25,000 rpm (75,300 *xg*) durante 35 min a 4°C. Posteriormente, la pastilla de esta segunda centrifugación se resuspende en 50 o 100 μ l del amortiguador TET frío (Tris/HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM y Tritón X-100 al 0.1 % [v/v]) dependiendo del tamaño de la pastilla.

7.5. Microscopia electrónica

Para observar células completas de *V. shilonii* AK-1, se tomaron alícuotas de 200 μ l directamente del cultivo, enseguida se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min y se decantó el medio de cultivo, las pastillas se resuspendieron en 1 ml de amortiguador Tris/HCl 10 mM pH 7.4 y se centrifugaron de nuevo; luego de decantar el sobrenadante, las pastillas se resuspendieron en el volumen sobrante. A continuación se depositaron 2 μ l de la suspensión de células sobre una rejilla de cobre, cubierta previamente con una película ionizada de carbón y se mezclaron con 10 μ l de una solución de ácido fosfotúngstico al 1 %

⁵Revisar la sección A.2.3 para ver los detalles sobre la preparación de los esferoplastos.

(pH 7.0); la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto y al final, con un papel filtro, se eliminó el volumen excedente de la rejilla y se dejó al aire durante 15 min antes de realizar la observación. Para observar la ultraestructura de los cuerpos basales aislados, se depositaron 2 μ l del aislado sobre la rejilla de cobre recubierta con carbón ionizado de manera previa y se mezclaron con 10 μ l de una solución de ácido fosfotúngstico al 2% (pH 7.0); enseguida la mezcla se incubó durante un minuto, el volumen excedente se retiró de la rejilla con papel filtro y se dejó secar al aire por al menos 15 min. Todas las observaciones se hicieron en un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL, (Japón) modelo JEM 1200EXIII. Las micrografías electrónicas de células completas y de cuerpos basales aislados se tomaron a una aceleración de voltaje equivalente a 80 kV y 100 kV, respectivamente. La película de carbón, colocada de manera previa sobre las rejillas de cobre, adquiere una carga estática y se hizo hidrofílica de manera temporal, al entrar en contacto con un plasma ionizado de argón en el vacío a 1.3 kV y 10 mA durante 10 s; este proceso se realizó dentro de una ionizadora marca JEOL, modelo JFC-1100 [44]. Las micrografías electrónicas obtenidas con estos métodos se analizaron y editaron, en su formato nativo (archivo.dm3), con el programa “Image J” [135].

8. Resultados

8.1. Crecimiento, velocidad de nado y fracción mótil de la población de *V. shilonii* con dos concentraciones de NaCl

Aislar los cuerpos basales de los flagelos laterales a partir de cajas con agar suave no es recomendable, en vista de que no es posible eliminar por completo los restos de agar de la preparación final, esto por un lado y por otro, encontrar a los cuerpos basales aislados de este modo en el campo bajo el microscopio electrónico de transmisión, resulta muy difícil debido a la presencia de una gran cantidad de material electro-denso. Para superar esta situación, es necesario lograr que las células inicien el programa genético de biogénesis de los flagelos laterales, sin depender del medio sólido. Tomando en cuenta que las condiciones que interfieren con la rotación del flagelo polar, promueven la expresión de los genes que codifican para los flagelos laterales (revisar la sección 3.5), emplearemos al bloqueador de canales de sodio (Na^+) fenamil, como una herramienta para inducir la expresión de los flagelos laterales en *V. shilonii* AK-1 en medio líquido. Escogimos al fenamil sobre sus otros análogos, el amiloride y el benzamil, debido a que este es el único de los tres bloqueadores de canales de sodio (Na^+), cuya presencia activa la expresión de los genes que codifican para los flagelos laterales en ensayos realizados con *V. parahaemolyticus* [60]; y a que, la constante de inhibición del fenamil ($K_i=0.0015$ mM) [10] es menor que la del amiloride ($K_i=0.2$ mM) [146].

Puesto que el flagelo polar funciona adicionalmente como un sensor, que percibe las fuerzas que actúan sobre su rotación y determina las condiciones que son adecuadas para la expresión de los genes que codifican para los flagelos laterales [102], resultaría ventajoso tener una población con un alto número de células en movimiento impulsadas por el flagelo polar.

Para determinar en qué condición de crecimiento había un mayor número de células en movimiento antes de aplicar el tratamiento con fenamil, primero seguimos el cambio en la densidad óptica de un cultivo con 342 mM de NaCl y otro con 120 mM de NaCl; las lecturas se realizaron cada 30 min a una longitud de onda de 600 nm (Figura. 8.1). A continuación, registramos en video el nado de las células en dos diferentes puntos de la curva, a una densidad óptica de 0.2 y de 0.5 para ambas concentraciones de NaCl; la velocidad de nado y la fracción mótil de la población se calcularon como se describió en los Materiales y métodos (sección 7.2).

En este experimento decidimos usar 120 mM y 342 mM de NaCl debido a lo siguiente: en ensayos realizados con anterioridad [42], observamos que *V. shilonii* no tiene una dependencia fuerte a una concentración alta de sodio, puesto que 120 mM de NaCl es una concentración que permite el desplazamiento de las células y sostiene su crecimiento como muestran las cajas de nado en agar suave al 0.3 % y el cambio en la densidad óptica de los cultivos líquidos, respectivamente. Por otro lado, 342 mM de NaCl es la concentración usual empleada para el crecimiento rutinario de la cepa AK-1 [75] y otras especies de *Vibrionaceas* [152].

Observamos que las células de *V. shilonii* muestran valores de velocidad de nado muy similares en las dos concentraciones de NaCl y en las dos densidades ópticas (0.2 y 0.5) (Tabla. 8.1); en estos ensayos, las

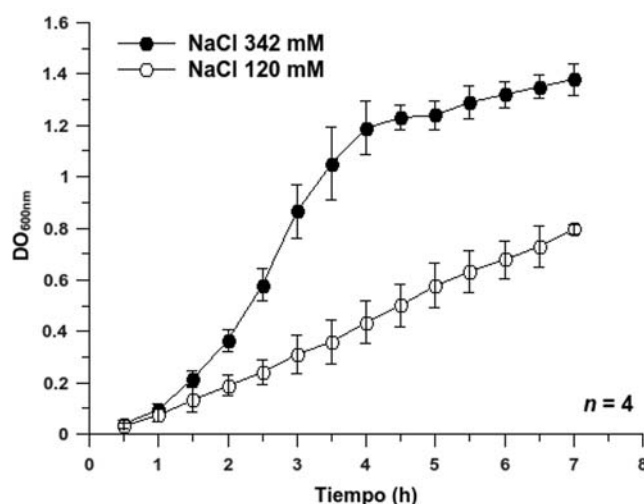


Figura 8.1: Curvas de crecimiento de *V. shilonii* AK-1 en dos diferentes concentraciones de NaCl. Los cultivos se hicieron como se describió en materiales y métodos (revisar la sección 7.2) y se incubaron a 30°C en presencia de 120 mM o 342 mM de NaCl, lo cual corresponde a un salinidad de 7 ppt y 20 ppt respectivamente.

células se desplazan entre 44.8 y 53.9 $\mu\text{m}/\text{seg}$. Los valores de velocidad de desplazamiento registrados para *V. shilonii*, fueron compatibles con los valores observados para *V. cholerae* [136], *V. alginolyticus* [169, 95, 170] y *V. anguillarum* [80]; en estos estudios, también se puede observar que la velocidad de nado se volvió independiente de la concentración de NaCl en el medio, cuando ésta es superior a 100 mM.

Tabla 8.1: Velocidad de nado de las células de *V.shilonii* AK-1. Los valores de velocidad se obtuvieron analizando las trayectorias, en video, de al menos 30 células por cada condición de crecimiento (120 mM y 342 mM de NaCl) y por cada punto de densidad óptica (0.2 y 0.5).

DO _{600nm}	Velocidad de nado ¹ ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	
	NaCl 120 mM	NaCl 342 mM
0.2	49.6 \pm 11.3	44.8 \pm 14.3
0.5	48.5 \pm 12.5	53.9 \pm 13.3

¹Para calcular los valores de velocidad de nado, solo se tomaron en cuenta las células que mostraron un desplazamiento superior a 10 μm . Estos valores representan la velocidad de nado promedio \pm desviación estándar dentro de cada muestra ($n=30$). El análisis de varianza (ANOVA), determinó que no existen diferencias significativas ($P<0.05$) en los valores promedio de velocidad de nado en las poblaciones observadas.

Por otra parte, en un cultivo con 120 mM de NaCl a una densidad óptica de 0.2, observamos que la población presentó una fracción mótil del 42%; a la misma densidad óptica, en un cultivo crecido en 342 mM de NaCl, la fracción mótil de la población, alcanza un 26%. A una densidad óptica de 0.5, la fracción mótil de la población tanto en 120 mM como en 342 mM de NaCl, que es muy similar, de 35% y 34% respectivamente (Tabla 8.2). Está documentado para algunas bacterias marinas que la fracción mótil de la población, puede variar con la cantidad de nutrientes presentes en el medio y con el tiempo de incubación [118].

Decidimos que los experimentos subsecuentes se realizaran en el medio de cultivo TBSW, a una concentración de NaCl de 120 mM y a una densidad óptica de 0.2, debido a las siguientes conclusiones: la velocidad de nado de las células de *V. shilonii* AK-1, parece ser independiente de las dos concentraciones de NaCl manejadas en esta serie de ensayos (120 mM y 342 mM), así como de la densidad óptica del cultivo (0.2 y 0.5), pero la fracción mótil de la población, presenta un aumento significativo en un cultivo con 120 mM de NaCl y que se ha incubado hasta una densidad óptica de 0.2.

Tabla 8.2: Fracción mótil en la población de *V. shilonii* AK-1. Los valores de la fracción mótil se obtuvieron mediante el conteo de las células en movimiento y el conteo de las células totales en el campo, a partir de observaciones capturadas en video; al final se cuantificaron 100 células por cada condición de crecimiento (120 mM y 342 mM de NaCl) y por cada punto de densidad óptica (0.2 y 0.5).

DO _{600 nm}	Fracción mótil ¹ (%)	
	NaCl 120 mM	NaCl 342 mM
0.2	42	26
0.5	35	34

¹Para calcular la fracción mótil, se consideró como células en movimiento, solo a aquellas que presentaron un desplazamiento superior a 10 μm . Estos valores, representan el porcentaje de células en movimiento dentro del total de células que fueron cuantificadas en el campo, por cada una de las muestras ($n=100$). El análisis para datos cualitativos χ^2 de Pearson, muestra que los valores de la fracción mótil para cada muestra, fueron significativamente distintos ($P<0.05$).

8.2. La presencia de fenamil induce la diferenciación de las células de *V. shilonii* AK-1

Para determinar el efecto del fenamil sobre el crecimiento y la morfología de las células de *V. shilonii*, seguimos el cambio poblacional y la motilidad mediante curvas de densidad óptica y observaciones al microscopio óptico de campo oscuro de alta intensidad; este análisis lo realizamos tomando muestras cada 30 min en paralelo, a cultivos libres del tratamiento (control) y a cultivos del mismo medio a los cuales se agregó fenamil, a una concentración final de 50 μM (experimental) [71]. Cabe mencionar que el nado de las células de *V. shilonii*, se interrumpe de manera instantánea, después de añadir 50 μM de fenamil al medio de cultivo con 120 mM de NaCl.

Iniciamos varios cultivos en paralelo de la cepa AK-1 y en los primeros 60 min de incubación ($\text{DO}_{600}=0.1$), agregamos el tratamiento y continuamos con la incubación y el muestreo. A lo largo del tiempo de incubación, observamos mediante el microscopio óptico, que el cultivo control muestra células con nado activo mientras que el cultivo al que se añadió fenamil, presentó células paralizadas de manera constante; con respecto a la curva de crecimiento, no detectamos diferencias evidentes entre el cultivo control, el cultivo experimental y un cultivo al que se agregó DMSO al 0.4% final, a modo de control tóxico (Figura. 8.2 A). El resultado de este ensayo, nos muestra que el fenamil y el DMSO, no afectan el crecimiento de *V. shilonii*.

Después de 60 min de incubación ($\text{DO}_{600}= 0.2$), tomamos muestras tanto del cultivo control como del cultivo experimental con el objetivo de observar la morfología de las células en las diferentes condi-

ciones usando el microscopio electrónico de transmisión. Decidimos realizar el análisis estructural por microscopía electrónica en este momento, debido a que este fue el punto de la curva de crecimiento donde observamos la mayor proporción de células con nado activo en el cultivo control. En nuestras imágenes de microscopía electrónica, pudimos observar que las células del cultivo control presentan un flagelo polar recubierto, con un diámetro de 30 nm. Por otro lado, en el cultivo experimental con fenamil, las células presentan, además del flagelo polar, múltiples flagelos laterales similares a los reportados para otras especies del género *Vibrio* [5, 15] (Figura. 8.2 B y C). Durante estas observaciones de células completas en el microscopio electrónico, revisamos los puntos de inserción de los filamentos flagelares tanto de origen polar como lateral, en busca de los cuerpos basales (Figura. 8.2 D). Detectamos varias estructuras compatibles con flagelos tanto laterales como polares, de las cuales fue posible obtener sus dimensiones. En el caso del filamento lateral, estas secciones en la base del filamento presentan un grosor de aproximadamente 23 nm, mientras que las de los flagelos polares, presentan un diámetro aproximado de 54 nm. Aunque se sabe que el fenamil activa la transcripción de los genes *laf* [60], los resultados de nuestros ensayos confirman que el tratamiento con este agente bloqueador de canales de sodio induce la diferenciación de las células de AK-1 de un fenotipo monotrico a un fenotipo peritrico.

8.3. El transcrito de los genes *lafK* y *lafA*, se incrementa en presencia de fenamil

Para verificar que la expresión de los flagelos laterales estaba asociada con el efecto del fenamil en el cultivo, realizamos un ensayo de transcriptasa reversa (“RT-PCR”), empleando como blancos a un gen temprano y a uno tardío de la cascada de biogénesis de los flagelos laterales. Diseñamos oligonucleótidos para amplificar parte de la secuencia codificante del gen correspondiente al regulador maestro de los flagelos laterales, *lafK* [41] (fragmento de 806 pares de bases) y del gen de la flagelina lateral, *lafA* (fragmento de 760 pares de bases). Ambos genes se localizaron en el genoma de *V. shilonii* (número de acceso NCBI NZ_ABCH00000000.1) mediante un análisis por alineamiento tipo “BLAST”, hecho contra los genes *lafK* y *lafA* de *V. parahaemolyticus*. Los genes *lafK* y *lafA* de *V. shilonii* están anotados como VSAK1_13130 y VSAK1_13080 respectivamente, dentro del grupo de genes que codifican para los componentes de los flagelos laterales; este locus fue definido con anterioridad como región flagelar 2 [42].

El resultado de estos experimentos muestra lo siguiente: los carriles marcados con la leyenda **Sólido**, corresponden a un control positivo de la presencia de ambos transcritos; estas reacciones se realizaron empleando RNA total, extraído de cultivos hechos en cajas Petri con agar suave al 0.6%, incubadas durante 72 h a 30°C (Figura. 8.3 A y B, carril: Sólido). El cultivo en agar suave es una condición en la cual sabemos, que los flagelos laterales se expresan [42] (revisar la Figura. 3.8 en la sección 3.5). Los carriles marcados con la leyenda **Líquido**, corresponden al cultivo en medio líquido libre de tratamientos; en este

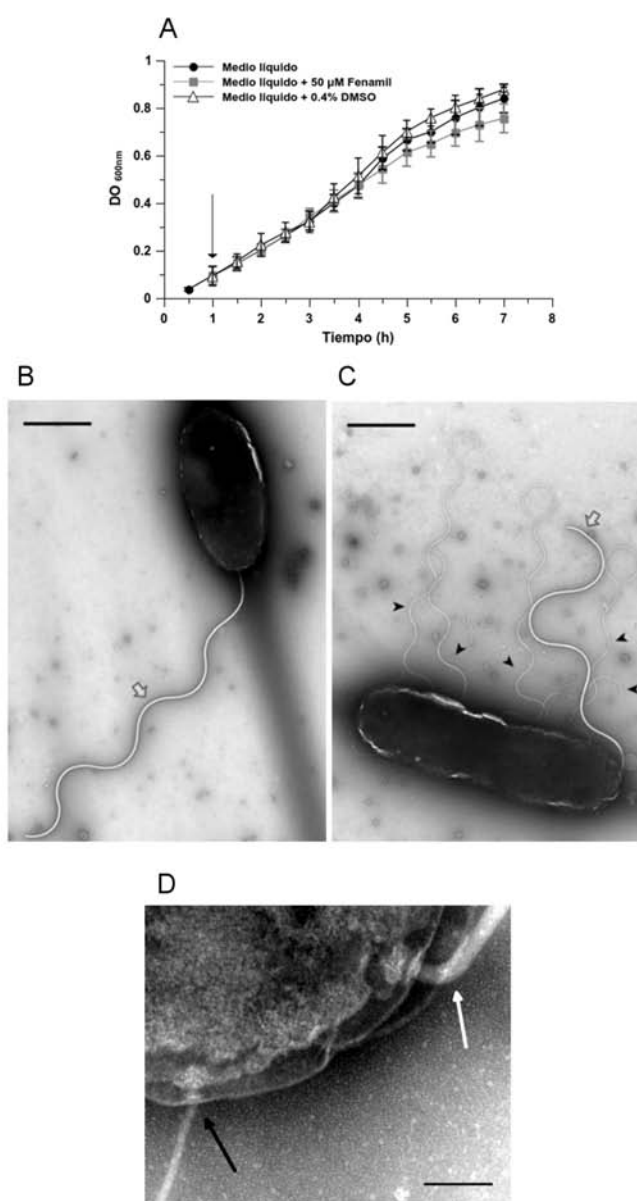


Figura 8.2: Diferenciación de las células de *V. shilonii* AK-1, inducida por el fenamil. En el panel A, observamos las curvas de crecimiento en medio TBSW a 30°C; el cultivo control sin tratamientos (círculos negros), el cultivo con DMSO al 0.4% final a modo de control tóxico (triángulos blancos) y el cultivo con fenamil 50 µM final disuelto en DMSO (cuadrados grises). La flecha en el panel A muestra el momento en que se agregan los tratamientos. En ausencia del tratamiento, el cultivo control muestra células motiles sólo con el flagelo polar (panel B); por otro lado, a la misma densidad óptica, en presencia de 50 µM de fenamil, las células paralizadas presentan el flagelo polar junto con múltiples flagelos laterales desnudos en arreglo peritrico (panel C). Las flechas grises en los paneles B y C señalan al flagelo polar mientras que las flechas negras en C apuntan a los flagelos laterales; las barras de escala son equivalentes a 1 µm. En el panel D, se muestra el acercamiento a una célula proveniente de un cultivo tratado con fenamil, donde podemos observar los puntos de inserción de los flagelos; la flecha negra señala a un flagelo lateral y la flecha blanca señala al flagelo polar. Estas son características que se observan en otras células del mismo cultivo (panel C); la barra de escala es equivalente a 100 nm.

caso observamos que el transcrito de *lafK* estaba ausente mientras que el transcrito de *lafA* presentaba una señal muy débil (Figura. 8.3 A y B, carril: Líquido). Finalmente, los carriles marcados con la leyenda **Líquido + fenamil**, corresponden al cultivo experimental al cual se agregó el tratamiento con fenamil; en estos carriles podemos detectar los transcritos de ambos genes, en cantidades superiores a las observadas en el cultivo de medio líquido (Figura. 8.3 A y B, carril: Líquido + fenamil). Un análisis por densitometría de las bandas correspondientes a los fragmentos de *lafA* (Figura.8.3 panel B, carriles Líquido y Líquido + fenamil), mostró un incremento de 4 veces en la cantidad de transcrito cuando se añadió fenamil al medio, en comparación con el cultivo líquido libre de tratamiento. Al mismo tiempo y a modo de control de carga del mRNA, realizamos un ensayo de retrotranscripción usando oligonucleótidos diseñados para amplificar parte de la secuencia codificante de un gen de expresión constitutiva, la subunidad β de la DNA girasa, *gyrB* (VSAK1_12632); como se esperaba, el transcrito de este gen estuvo presente en todas las condiciones de cultivo (Figura.8.3 C, carriles: Sólido, Líquido y Líquido + fenamil). Asimismo, para descartar la posibilidad de contaminación por DNA, repetimos los ensayos en ausencia de la enzima transcriptasa reversa y no detectamos transcrito en ninguna de las muestras.

Con esta serie de ensayos, concluimos que la presencia del fenamil en el medio de cultivo, induce la transcripción de los genes *lafK* y *lafA* de un modo similar, aunque en menor medida, a como sucede en el medio sólido. La biogénesis de los flagelos laterales sigue un orden jerárquico en el cual una estructura no puede formarse si la anterior no está presente [144]. Tomando en cuenta que el gen *lafK* es el primer gen del grupo de genes tempranos y que el gen *lafA* pertenece al grupo de los genes tardíos, podemos pensar que su transcripción señala el inicio y el término de la construcción de los flagelos laterales; por lo tanto, a través de nuestra evidencia, inferimos que el fenamil no sólo induce la transcripción de estos genes, sino también del resto de los genes *laf*.

8.4. Ultraestructura del cuerpo basal en los flagelos laterales

Tomando en cuenta los resultados anteriores, realizamos un aislamiento de cuerpos basales en AK-1 a partir de un cultivo control y un cultivo experimental adicionado con 50 μ M de fenamil. Después de inducir la biogénesis de los flagelos laterales durante 60 min en presencia de fenamil (DO_{600} entre 0.2 y 0.25), verificamos la motilidad en los cultivos, cosechamos las células por centrifugación y realizamos el aislamiento de flagelos intactos de acuerdo con los métodos documentados con anterioridad por Aizawa *et al.* [3, 2].

En las preparaciones hechas a partir del cultivo control, observamos la ultraestructura del cuerpo basal de origen polar como la habíamos descrito en un trabajo anterior [42]; se observa un anillo de 50 nm de diámetro ubicado en la porción distal del complejo en la base del gancho. Ahora sabemos, por otros trabajos realizados en *V. alginolyticus* [150, 151], que este componente se denomina anillo H (del

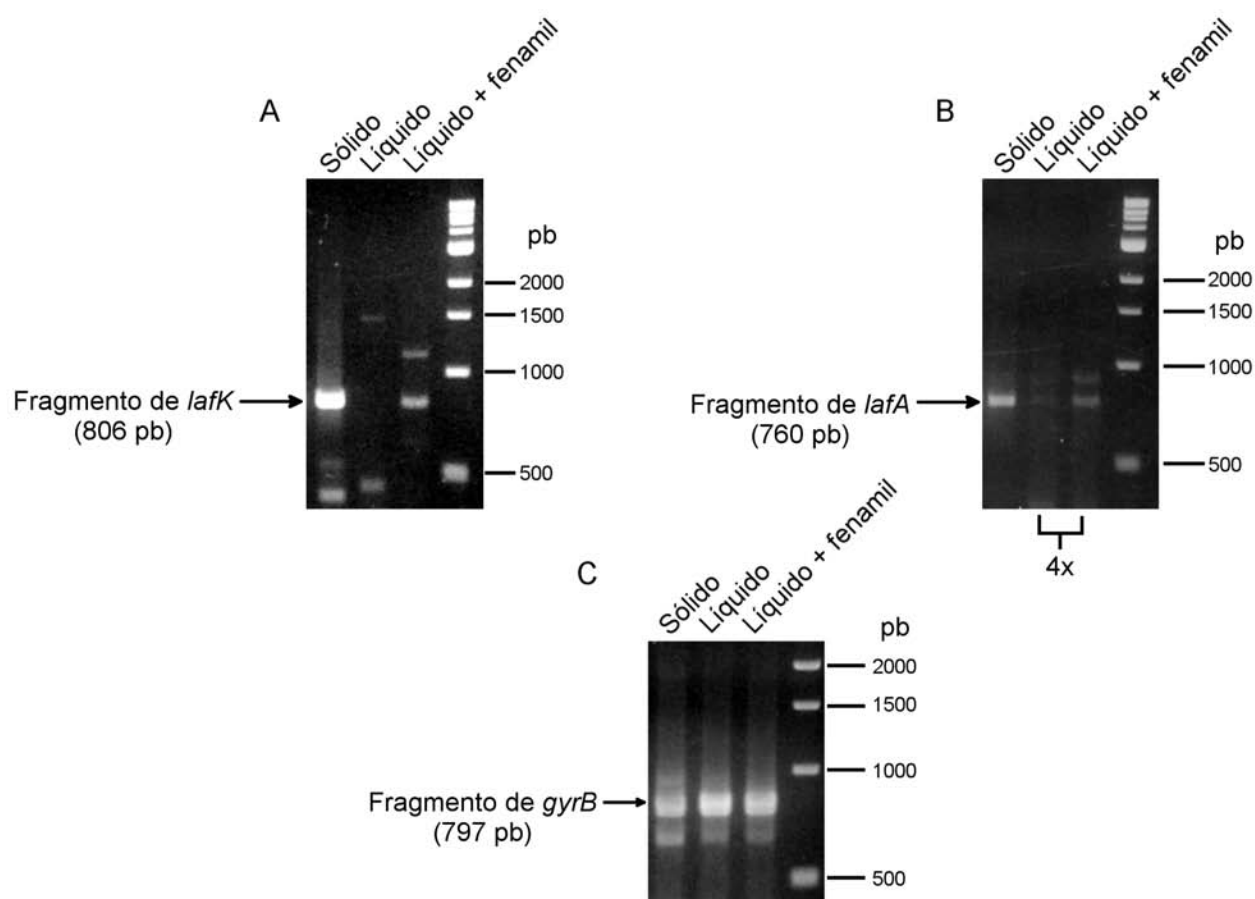


Figura 8.3: Nivel de transcripción de los genes *lafK* y *lafA* en tres condiciones. Estos ensayos de transcripción reversa (“RT-PCR”) se realizaron agregando 0.2 ng de RNA total de cada una de las condiciones de crecimiento y 10 pmol de los oligonucleótidos correspondientes para *lafK* (panel A) y *lafA* (panel B) por reacción. Carriles: Sólido) cultivo en agar suave al 0.6%, Líquido) cultivo líquido control libre de tratamientos y Líquido + fenamil) cultivo líquido experimental al cual se agregó fenamil a una concentración final de 50 μ M. Las flechas señalan las bandas cuyo peso corresponde a un producto de amplificación de 806 pares de bases para el gen *lafK* y de 760 pares de bases para el gen *lafA*. Un ensayo de retro transcripción usando al gen de expresión constitutiva, *gyrB*, fue hecho como control de carga del mRNA en todas las condiciones.

inglés “**H**olding ring”) y que está formado por la proteína FlgT y por otras proteínas aún no descritas. Por otra parte, en las preparaciones hechas a partir del cultivo experimental, observamos además de los cuerpos basales de origen polar, otro tipo de cuerpos basales con un anillo de aproximadamente 23 nm de diámetro, ubicado en la región distal del complejo, en la base de gancho; en estos cuerpos basales pequeños pudimos distinguir con claridad componentes que, debido a su posición dentro del complejo, se pueden designar como anillo MS, eje, anillo P y anillo L [92] (Figura. 8.4).

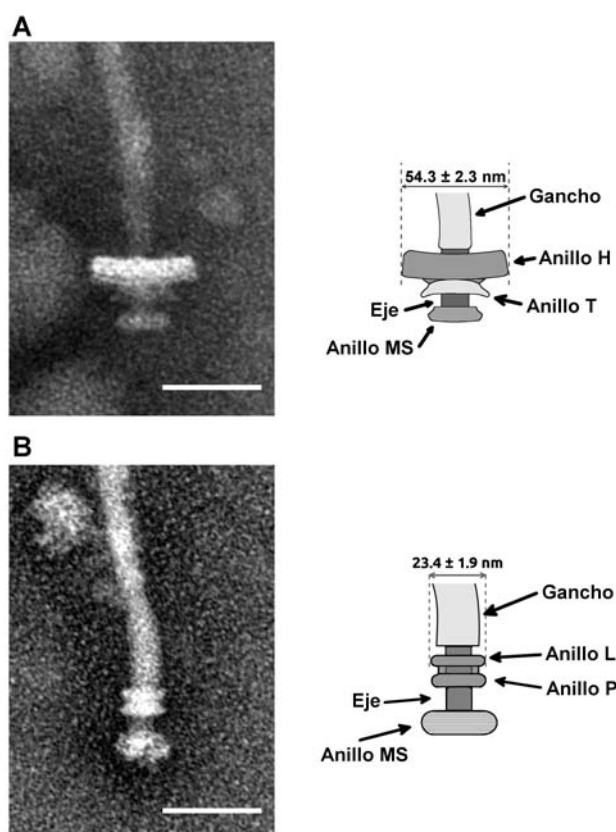


Figura 8.4: Aislamiento de cuerpos basales laterales intactos. En el panel A se muestra la micrografía correspondiente al cuerpo basal de un flagelo polar junto con el esquema de sus componentes; los cuerpos basales de flagelos polares que se obtuvieron de un cultivo control. El panel B muestra la micrografía que representa a los cuerpos basales recuperados de un cultivo adicionado con 50 μ M de fenamil; asimismo, con la micrografía se muestra un esquema donde se indican los componentes que se pueden distinguir por su posición dentro del complejo. Para su observación en el microscopio electrónico, los aislados se trataron como se describe en la sección 7.5 de Materiales y métodos. Las barras son equivalentes a 50 nm.

8.5. Determinación del diámetro de los anillos H y L en los complejos aislados de gancho y cuerpo basal

Durante estas observaciones, se llevó a cabo la determinación de los diámetros en los anillos H de los cuerpos basales de flagelos polares y de los anillos L de los cuerpos basales de flagelos laterales (Figura 8.5). En las preparaciones hechas a partir del cultivo control, se observó que el anillo H en los cuerpos basales polares tiene un diámetro de 54.3 ± 2.5 nm; por otro lado, en las preparaciones hechas a partir del cultivo experimental con fenamil, observamos que el anillo L en los cuerpos basales de flagelos laterales, presentó un diámetro de 23.4 ± 1.9 nm y el anillo H en los cuerpos basales de flagelo polares presentó un diámetro de 53.4 ± 3 nm. Cabe mencionar que encontramos cuerpos basales de flagelos polares en los

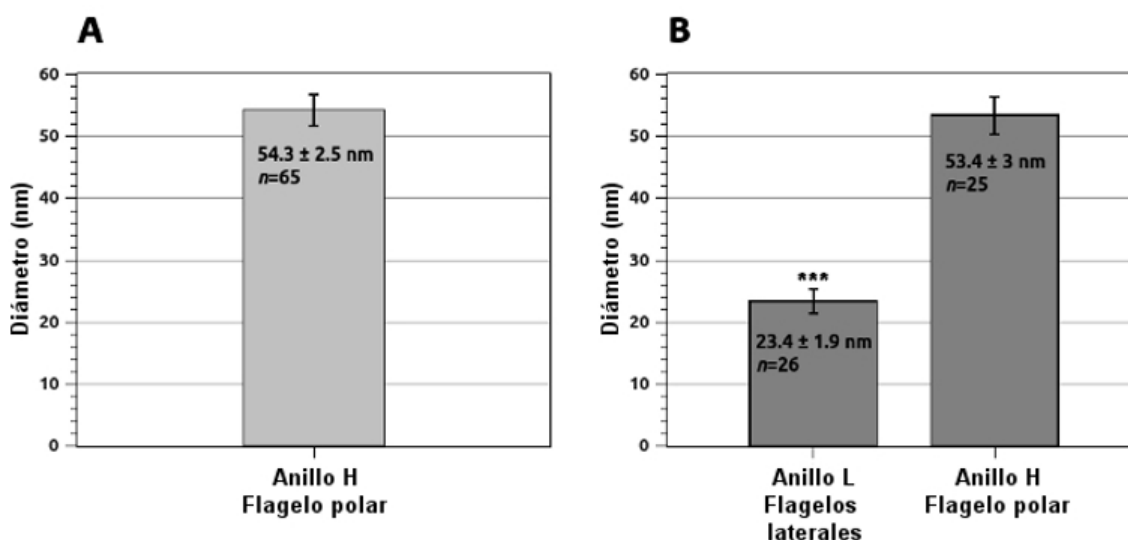


Figura 8.5: Dimensiones de los anillos H y L en los cuerpos basales aislados. Los datos para la determinación del diámetro (promedio \pm desviación estándar) de los anillos H y L, se obtuvieron analizando las imágenes de microscopía electrónica de los cuerpos basales aislados, con el programa “Image J” [135]. En el panel A, se muestra el diámetro del anillo H en los cuerpos basales de flagelos polares ($n=65$), aislados a partir de un cultivo control libre de tratamientos. En el panel B, se muestra el diámetro del anillo L en los cuerpos basales de los flagelos laterales ($n=26$) y el diámetro del anillo H en los cuerpos basales de flagelos polares ($n=25$); estos complejos proteínicos, se aislaron a partir de un cultivo experimental con fenamil a una concentración final de 50 μ M. El contraste de medias, hecho con la prueba t de Student, muestra que la diferencia entre el diámetro del anillo L y el diámetro del anillo H, es estadísticamente significativa ($P<0.05$).

aislados hechos a partir del cultivo experimental, probablemente porque la expresión de los genes que codifican para el flagelo polar, es constitutiva; el flagelo polar está presente en la célula tanto en medio líquido como en medio sólido. Estos resultados nos muestran que los flagelos laterales inducidos por la presencia del fenamil en el cultivo, tienen un cuerpo basal de dimensiones menores y una ultraestructura que es diferente a la reportada para el cuerpo basal del flagelo polar.

8.6. Los flagelos laterales aparecen 30 min después de agregar el fenamil

Todos los resultados de inducción de los flagelos laterales en medio líquido con fenamil que hemos presentado hasta ahora, se obtuvieron con el mismo esquema: adicionar el agente bloqueador de canales de sodio en la primera hora de incubación de la curva y cosechar las células después de 60 min de inducción, ya sea para observar la morfología celular, aislar cuerpos basales o extraer RNA total. Para determinar en qué momento aparecen los flagelos laterales después de agregar el fenamil, tomamos muestras a lo largo de la curva de crecimiento cada 30 min (Figura. 8.6A-E), después de añadir el tratamiento y revisamos la morfología de las células nuevamente en busca de flagelos laterales. En el momento de

añadir el tratamiento, el tiempo 0 min, observamos que las células presentan un único flagelo polar (Figura. 8.6A). A los 30 min, encontramos muy pocas células con flagelos laterales mientras que la mayoría presentan sólo flagelo polar (Figura. 8.6B). Después, a los 60 min, encontramos una mayor cantidad de células con fenotipo peritrico. Continuamos las observaciones hasta los 120 min después de agregar el tratamiento y de manera general observamos que mientras mayor es el tiempo de inducción, mayor es la cantidad de células con flagelos laterales; asimismo, notamos que el número de flagelos laterales por célula es muy variado, con facilidad podemos detectar entre dos y cinco filamentos laterales por bacteria. Estos resultados nos sugieren que 30 min es el momento aproximado de la transición; es cuando el fenotipo monotrico es predominante y solo algunas células se han diferenciado en el fenotipo peritrico, debido a los flagelos laterales (Figura. 8.6).

9. Discusión

Los resultados obtenidos con la cepa AK-1 de *V. shilonii* descritos en este trabajo, cubren tres aspectos importantes sobre la biología de los flagelos laterales dentro del género *Vibrio*: el primero es que nuestros ensayos sobre la morfología de las células tratadas con fenamil, a lo largo de varios intervalos de tiempo, complementan los ensayos de actividad transcripcional reportados por Kawagishi *et al.* [60]. En dicho estudio, la regulación de al menos uno de los genes *laf*, se sigue a lo largo del tiempo en una curva de emisión de luz gracias a la inserción de los genes reporteros *lux*; sin embargo, por la manera en que están construidas esas cepas mutantes, sólo se puede seguir la transcripción de un gen *laf* a la vez y las células carecen de flagelos laterales. A lo largo de nuestros experimentos de inducción en diferentes tiempos, observamos que la presencia de fenamil en el medio de cultivo, promueve y mantiene la biogénesis de los flagelos laterales durante todos los tiempos ensayados. El segundo, es que el retraso de 30 min que observamos entre la adición del estímulo (fenamil) y el cambio fenotípico en las células de *V. shilonii*, es consistente con el que se observa en los ensayos de inducción con agentes densificantes reportados por Belas *et al.* [17] para *V. parahaemolyticus*; esta característica apoya la idea del “swarming lag”. El “swarming lag” se refiere al periodo de retardo en la locomoción que precede al inicio del desplazamiento grupal en enjambre o “swarming” y el cual se presenta cuando las células recién pasan del medio líquido al medio sólido; se piensa que éste es un periodo de adaptación en el que ocurren los cambios fisiológicos necesarios para realizar el cambio del fenotipo de nado al fenotipo de enjambre. Para salir de “swarming lag”, *B. subtilis* debe cumplir con los siguientes requerimientos: alcanzar una densidad óptica alta para inducir la producción de agentes surfactantes y aumentar el número de flagelos sobre el cuerpo celular [63]. Finalmente, el tercer y más novedoso aspecto cubierto en este trabajo, es que este esquema de inducción con fenamil en medio líquido, nos permitió aislar y describir por primera vez, de una manera

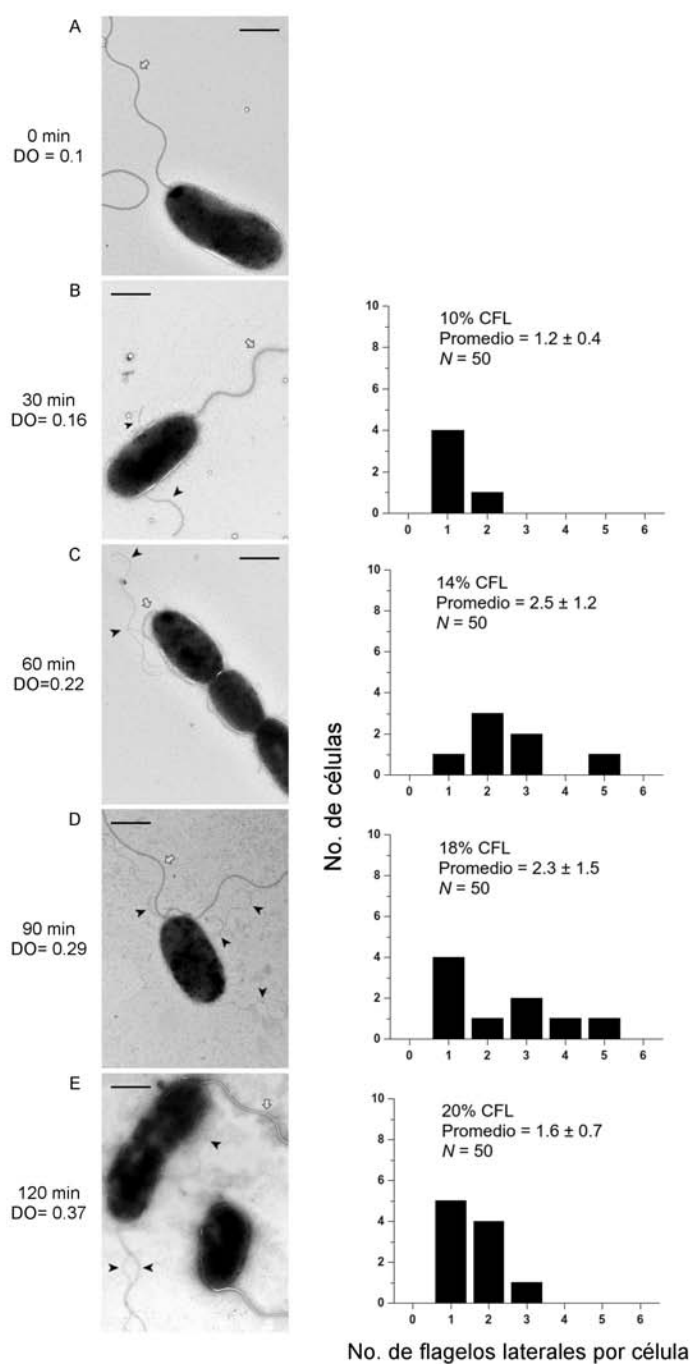


Figura 8.6: Diferenciación de AK-1 durante el tratamiento con fenamil. Seguimos la curva de crecimiento en presencia de 50 μM de fenamil, durante 120 min (panel A al E) tomando muestras cada 30 min para registrar la densidad óptica del cultivo y revisar la morfología de las células bajo el microscopio electrónico de transmisión; en cada punto del muestreo, observamos que las bacterias pierden su motilidad. Para su observación en el microscopio electrónico, las células colectadas se trataron como se describe en la sección 7.5 de Materiales y métodos. En cada panel, se muestra una micrografía representativa y un gráfico que incluye la fracción de células con flagelos laterales (CFL) y el promedio de flagelos laterales por célula. Las barras de escala son equivalentes a 1 μm , las flechas de color gris señalan los flagelos polares y las flechas de color negro señalan a los flagelos laterales.

sencilla, la ultraestructura del complejo del gancho y el cuerpo basal de los flagelos laterales dentro del género *Vibrio*; caracterizaciones de este tipo sólo se habían realizado hasta ahora para el flagelo polar.

Es interesante notar que la ultraestructura del cuerpo basal de los flagelos laterales de *V. shilonii* es muy semejante a aquella reportada con anterioridad para los flagelos peritricos de *E. coli* [31] o de *S. typhimurium* [3, 141]; en general, parecen presentar los mismos componentes: anillo L, P y MS (Figura 9.1). Nuestras mediciones indican que el anillo L en el cuerpo basal lateral de *V. shilonii*, tiene un diámetro de 23 nm mientras que el de *S. typhimurium* es de 27 nm [141].

Otras características que comparten los flagelos laterales de las *Vibrionaceas* y los flagelos peritricos de las *Enterobacterias* como *E. coli* o *S. typhimurium*, son las siguientes: ambos presentan un arreglo peritrico, son impulsados por un potencial electroquímico de protones (H^+), los filamentos flagelares son desnudos y están conformados por un solo tipo de flagelina [106, 94, 92], aunque con masas moleculares distintas. La flagelina que forma el filamento flagelar en *E. coli*, es el producto de gen *fliC*, tiene una masa molecular de 58 kDa [3, 53] mientras que en *V. shilonii* la flagelina de los filamentos laterales, codificada por el gen *lafA*, presenta una masa molecular de 29.9 kDa que se predice en el genoma; ambas proteínas presentan entre sí una identidad del 25% y una similitud del 40% de acuerdo con un análisis por alineamiento tipo BLAST. Estas cualidades pueden contribuir a conocer la historia evolutiva del flagelo bacteriano. Es probable que el flagelo, como medio de locomoción, fuera heredado mediante la transferencia vertical de un ancestro común γ -proteobacteria a las *Vibrionaceas* y a las *Enterobacterias* como *E. coli* o *S. typhimurium*; cuando estos linajes se separaron, cada uno portaba un sistema flagelar que probablemente hacía uso del potencial electroquímico de protones (H^+) [87]. En las *Vibrionaceas*, este sistema flagelar se adaptó para el desplazamiento en medio líquido y el uso del ion sodio (Na^+) para generar la fuerza motriz dando origen al flagelo polar. El análisis, por comparación de los operones flagelares en diferentes grupos bacterianos con sistemas flagelares duales, propone que los flagelos laterales en la familia *Vibrionaceae*, surgieron mediante la duplicación del locus del flagelo polar [86]; dado que no todas las especies del genero *Vibrio* tienen flagelos laterales, es posible que este evento de duplicación haya sucedido varias veces en la historia del clado, otra posibilidad es que los genes que codifican para los flagelos laterales se movilizaron entre algunas especies de *Vibrionaceas*, mediante la transferencia horizontal. La copia de genes que dio origen a los flagelos laterales pudo haber regresado, mediante cambios puntuales, al uso de los protones (H^+) para la generación de la fuerza motriz [148] y se adaptó para la locomoción sobre superficies y medios de alta densidad, mientras que los flagelos peritricos en las *Enterobacterias* fueron suficientes para impulsar a las células tanto en medio líquido como en medio semisólido [50].

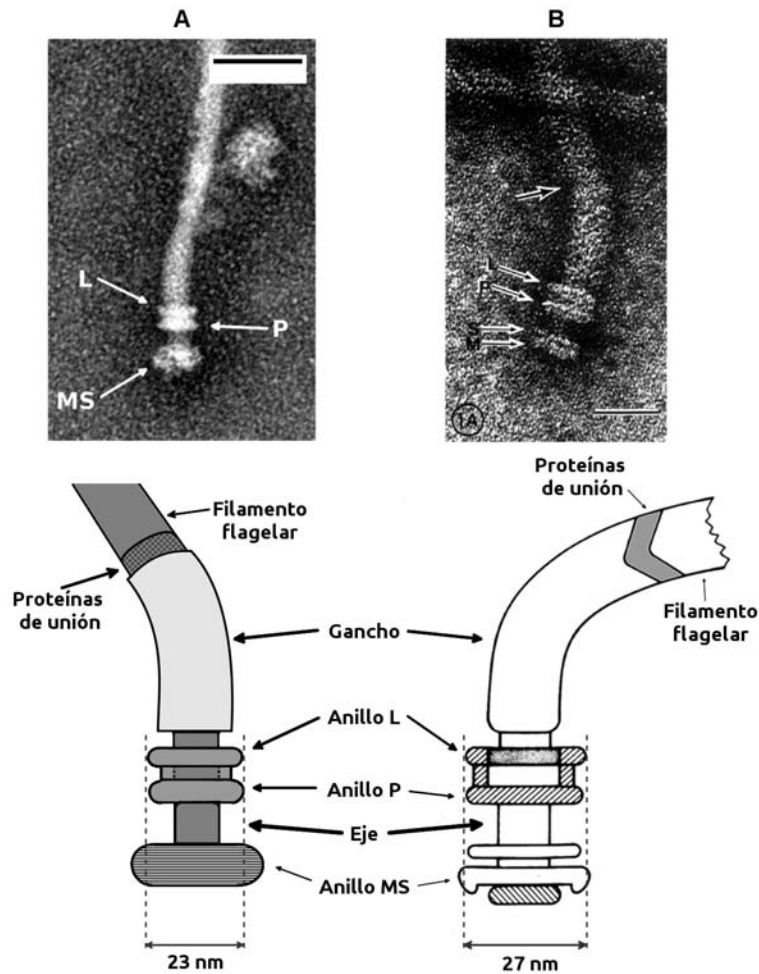


Figura 9.1: Ultraestructura de los cuerpos basales de *V. shilonii* y *E. coli*. Con fines comparativos, se muestra la micrografía de un cuerpo basal, correspondiente al sistema de flagelos laterales en *V. shilonii*, extraído a partir de un cultivo líquido tratado con fenamil (panel A) y la micrografía de un cuerpo basal perteneciente al sistema de flagelos peritricos de *E. coli* (panel B). En los esquemas correspondientes a cada una de las micrografías, se muestra que ambas estructuras son similares tanto en los componentes que las conforman, como en sus dimensiones. La barra en la imagen de microscopía electrónica del panel A es equivalente a 50 nm y la barra en la imagen de microscopía electrónica del panel B es equivalente a 30 nm. El panel B fue tomado y modificado de las referencias [3, 31].

10. Conclusiones y perspectivas

Mediante el uso de la microscopía óptica, la electrónica de transmisión y los ensayos de transcripción reversa, hemos confirmado en este trabajo que el tratamiento con el bloqueador de canales de sodio (Na^+), fenamil, suprime el nado en la cepa de *V. shilonii* AK-1, al inhibir la rotación del flagelo polar sin afectar el crecimiento de las células (Figura. 8.2 A), del mismo modo que como ocurre con *V. paraha-*

molyticus [60]. Asimismo observamos que inhibir la rotación del flagelo polar, con este agente provoca la diferenciación en las células del fenotipo monotrico, asociado con el nado en medio líquido, al fenotipo peritrico asociado al desplazamiento sobre superficies o a los medios de alta densidad (Figura. 8.2 BC). También observamos que la presencia del fenamil en el medio de cultivo, libera de la restricción al medio sólido, a la transcripción de los genes que participan en la biogénesis de los flagelos laterales; esto lo comprobamos al detectar aumentos en la cantidad del transcrito de los genes *lafK* y *lafA* cuando el agente en cuestión se agrega a los cultivos líquidos experimentales en contraste con los cultivos líquidos no tratados [41] (Figura. 8.3 AB). Confirmamos que los flagelos laterales aparecen sobre el cuerpo celular 30 min [17, 45] después de agregar el tratamiento con fenamil y persisten a lo largo de 120 min de incubación (Figura. 8.6); en estos ensayos también determinamos que el número de células con flagelos laterales en la población aumenta con el tiempo. Finalmente, la expresión de los flagelos laterales en medio líquido mediante el uso del fenamil permitió aislar el cuerpo basal de origen lateral y comparar su ultraestructura con la del cuerpo basal de origen polar [42]; los ensayos de aislamiento señalan que el cuerpo basal de los flagelos laterales en la cepa AK-1, es más sencillo en comparación con su contraparte polar. El cuerpo basal de los flagelos laterales no presenta el anillo T ni anillo H, ambos característicos de los motores impulsados por sodio (Na^+) en *Vibrionaceas*, y en general es mucho más parecido al motor impulsado por protones (H^+) descrito para *E. coli* [31] o para *S. typhimurium* [3, 141] (Figura. 9.1).

Con estas líneas queremos contribuir, en lo posible, a solucionar uno de los problemas más longevos en el área de la motilidad en *Vibrionaceas*: el mecanismo de transducción que conecta la disminución en la tasa de rotación del flagelo polar con la expresión de los flagelos laterales. Actualmente, se piensa que cuando la rotación del flagelo polar disminuye por el contacto con una superficie, las células pueden percibir el cambio en el flujo de los iones sodio a través del motor flagelar; para avanzar un poco más en esta pregunta, se pueden utilizar otros compuestos que alteren la motilidad como la familia de análogos de la quinazolina-2,4-diamino (Q24DAs) [129, 158] y determinar su capacidad para bloquear el flujo de iones sodio (Na^+). Alternativamente las células podrían detectar alteraciones sobre la torca de la rotación flagelar mediante una proteína transmembranal poco entendida, FliL [18, 30, 145]. Se sabe que una mayor fuerza de carga sobre el flagelo, aumenta el reclutamiento de complejos estatores sobre el rotor [154], tal vez FliL está involucrada en este proceso.

A. Apéndice

A.1. Medios de cultivo

A.1.1. Medio de cultivo “Marine Broth”

- Medio de cultivo “Marine Broth 2216” de la marca Difco 3.7 % (p/v).

Disolver calentando y con agitación en el volumen final de agua destilada requerido; hervir durante un minuto y esterilizar por autoclave. Almacenar a temperatura ambiente sobre la repisa.

A.1.2. Medio de cultivo TBSW

- Triptona 1 % (p/v).
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.86 % (p/v) (35 mM).
- NaCl 2 % (p/v) (342 mM), 0.7 % (p/v) (120 mM).
- Solución de sales 1x.
- Amortiguador Tris/HCl 20 mM.

Mezclar, aforar y esterilizar por autoclave. Almacenar a temperatura ambiente sobre la repisa.

A.1.3. Solución de Sales 10x para medio TBSW

- CaCl_2 70 mM.
- KCl 70 mM.

Mezclar y aforar. No se requiere esterilizar y se almacena a temperatura ambiente sobre la repisa.

A.1.4. Amortiguador Tris para medio TBSW

- Trisma base 1M.

Ajustar el pH a 7.5 con HCl y aforar. No se requiere esterilizar y se almacena a temperatura ambiente sobre la repisa.

A.2. Disposiciones para el aislamiento de cuerpos basales

A.2.1. Amortiguador de Sacarosa

- Sacarosa 0.5 M.
- Trisma base 0.15 M.

Mezclar, aforar y pasar por un filtro con poro de 0.22 μm . No es necesario ajustar el pH ni esterilizar por autoclave; almacenar a 4°C.

A.2.2. Amortiguador TET

- Trisma base 10 mM.
- EDTA 1 mM.
- Tritón X-100 0.1 % (v/v).

Mezclar, ajustar a pH 8.0 con HCl, aforar y pasar por un filtro con poro de 0.22 μm . No es necesario esterilizar; almacenar a 4°C.

A.2.3. Manejo de la lisozima y el EDTA en la preparación de los esferoplastos

Las soluciones de lisozima (10 mg/ml) y EDTA (20 mM) se agregan en la suspensión de células con una pipeta de precisión de la siguiente manera: se toma el volumen necesario de cada reactivo y la punta de la pipeta se coloca dentro de la suspensión de células mientras ésta se agita; enseguida, se rota el embolo de la pipeta —muy lentamente— para inyectar el reactivo. Este paso debe tardar entre 3 y 5 min para inyectar cada reactivo por completo. El objetivo de este paso es incrementar la concentración de lisozima y EDTA dentro de las células de a poco en una suspensión fría, de modo tal, que al hacer el cambio a temperatura ambiente, la membrana externa se fragilice debido al EDTA y la degradación de la pared celular se haga de una manera más eficiente.

A.3. Disposiciones para el aislamiento de RNA total

A.3.1. Materiales.

- Pipetas serológicas de 5 y 10 ml limpias.
- Pipetas Pasteur limpias.

- Tubos tipo Corex de 15 y 30 ml.
- Tubos tipo Falcon de polipropileno de 50 ml, paquete nuevo.
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml, paquete nuevo.
- Vasos de precipitado de vidrio de 250 ml.
- Puntas desechables de 1, 0.2 y 0.01 ml.
- Baño María a 70°C.
- Incubadora de agua con agitación a 65°C.
- Centrífuga Eppendorf refrigerada con camisas para tubos tipo Falcon de 50 ml.

A.3.2. Preparativos

Las pipetas serológicas, las Pasteur y los tubos Corex se envuelven en papel aluminio, se esterilizan mediante autoclave y finalmente se hornean durante un mínimo de 12 h a 150°C. Las puntas desechables y los tubos Eppendorf de 1.5 ml deben ser nuevos, manejados con guantes y esterilizados mediante autoclave; los tubos Eppendorf se esterilizan cerrados. **Durante todo el proceso de aislamiento, es necesario usar guantes.**

A.3.3. Fenol saturado

- Amortiguador de acetato.
- Fenol en fase líquida.

El fenol se calienta a 65°C hasta que se licua totalmente y se mezclan, un volumen del amortiguador de acetato con un volumen de fenol en fase líquida.

A.3.4. Amortiguador de acetato.

- Acetato de sodio 20 mM.
- EDTA 1 mM.

Mezclar, ajustar a pH 5.5 con ácido acético diluido, aforar, pasar por filtro poro de 0.22 μm y esterilizar por autoclave.

A.3.5. Solución de lisis

- Acetato de sodio 20 mM.
- EDTA 1 mM.
- SDS 0.5 % (p/v).

Mezclar, ajustar a pH 5.5 con ácido acético diluido, aforar, pasar por filtro poro de 0.22 μ m y esterilizar por autoclave. 100 ml.

A.3.6. Reactivos adicionales

- Agua destilada filtrada y esterilizada por autoclave, 100 ml.
- Solución de acetato de sodio 3 M. Ajustar a pH 5.5 con ácido acético al 100 %, filtrar y esterilizar por autoclave. 100 ml.
- Solución de EDTA 0.25 M pH 8.0 25 ml filtrada y esterilizada por autoclave.
- Alcohol etílico absoluto exclusivo para RNA. Almacenar a 4°C.
- Cloroformo exclusivo para RNA. Almacenar a 4°C.
- Solución de etanol al 70% hecha con agua filtrada y estéril. Almacenar a 4°C. 10 ml.
- Agarosa exclusiva para RNA.

A.3.7. Electroforesis del RNA

El RNA aislado, se resuelve mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %, la corrida se realiza en amortiguador E 1x previamente filtrado y esterilizado por autoclave. Antes de usar, la cámara de electroforesis, los vidrios, moldes y peines de los geles se remojan en etanol 70% durante un mínimo de 30 min a una hora. El gel se tiñe en una solución de bromuro de etidio disuelto en el mismo amortiguador E 1x empleado en la corrida de electroforesis. La solución de bromuro de etidio se prepara agregando 15 μ l de la solución concentrada por cada 100 ml del amortiguador E 1x; la solución concentrada de bromuro de etidio contiene 10 mg/ml. **Toda la cristalería y los contenedores que se usen en la preparación de los reactivos para la electroforesis del RNA se deben enjuagar o remojar en etanol 70 % antes de usarse.**

Bibliografía

- [1] Aiba, H., S. Adhya, and B. de Crombrughe: 1981, 'Evidence for two functional gal promoters in intact *Escherichia coli* cells'. *J Biol Chem* **256**(22), 11905–11910.
- [2] Aizawa, S. I.: 2014, *The Flagellar World*, Chapt. Apedix. Protocols for purification of flagella, p. 106. Academic Press. ISBN:9780124172340.
- [3] Aizawa, S. I., G. E. Dean, C. J. Jones, R. M. Macnab, and S. Yamaguchi: 1985, 'Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Salmonella typhimurium*'. *J Bacteriol* **161**(3), 836–849.
- [4] Alexeyev, M. F. and I. N. Shokolenko: 1995, 'Mini-Tn10 transposon derivatives for insertion mutagenesis and gene delivery into the chromosome of gram-negative bacteria'. *Gene* **160**(1), 59–62.
- [5] Allen, R. D. and P. Baumann: 1971, 'Structure and arrangement of flagella in species of the genus *Beneckea* and *Photobacterium fischeri*'. *J Bacteriol* **107**(1), 295–302.
- [6] Allison, C., L. Emödy, N. Coleman, and C. Hughes: 1994, 'The role of swarm cell differentiation and multicellular migration in the uropathogenicity of *Proteus mirabilis*'. *J Infect Dis* **169**(5), 1155–1158.
- [7] 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**(16), 5104–5110.
- [8] Atsumi, T., Y. Maekawa, H. Tokuda, and Y. Imae: 1992a, 'Amiloride at pH 7.0 inhibits the Na(+)-driven flagellar motors of *Vibrio alginolyticus* but allows cell growth'. *FEBS Lett* **314**(2), 114–6.
- [9] Atsumi, T., L. McCarter, and Y. Imae: 1992b, 'Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion-motive forces'. *Nature* **355**(6356), 182–4.
- [10] Atsumi, T., S. Sugiyama, E. J. J. Cragoe, and Y. Imae: 1990, 'Specific inhibition of the Na(+)-driven flagellar motors of alkalophilic *Bacillus* strains by the amiloride analog phenamil'. *J Bacteriol* **172**(3), 1634–9.
- [11] Banin, E., T. Israely, M. Fine, Y. Loya, and E. Rosenberg: 2001a, 'Role of endosymbiotic *zooxanthellae* and coral mucus in the adhesion of the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi* to its host'. *FEMS Microbiol Lett* **199**(1), 33–7.
- [12] Banin, E., S. K. Khare, F. Naider, and E. Rosenberg: 2001b, 'Proline-rich peptide from the coral pathogen *Vibrio shiloi* that inhibits photosynthesis of *Zooxanthellae*'. *Appl Environ Microbiol* **67**(4), 1536–41.
- [13] Banin, E., D. Vassilakos, E. Orr, R. J. Martinez, and E. Rosenberg: 2003, 'Superoxide dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*'. *Curr Microbiol* **46**(6), 418–22.
- [14] Bartolomé, B., Y. Jubete, E. Martínez, and F. de la Cruz: 1991, 'Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives'. *Gene* **102**(1), 75–78.
- [15] Belas, M. R. and R. R. Colwell: 1982, 'Scanning electron microscope observation of the swarming phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*'. *J Bacteriol* **150**(2), 956–9.
- [16] Belas, R., A. Mileham, M. Simon, and M. Silverman: 1984, 'Transposon mutagenesis of marine *Vibrio spp*'. *J Bacteriol* **158**(3), 890–6.

- [17] Belas, R., M. Simon, and M. Silverman: 1986, 'Regulation of lateral flagella gene transcription in *Vibrio parahaemolyticus*'. *J Bacteriol* **167**(1), 210–8.
- [18] Belas, R. and R. Suvanasuthi: 2005, 'The ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein'. *J Bacteriol* **187**(19), 6789–803.
- [19] Berg, H. C.: 2000, 'Motile behavior of bacteria'. *Physics Today* **53**(1), 24–30.
- [20] Berg, H. C.: 2003, 'The rotary motor of bacterial flagella'. *Annu Rev Biochem* **72**, 19–54.
- [21] Blair, D. F.: 1995, 'How bacteria sense and swim'. *Annu Rev Microbiol* **49**, 489–522.
- [22] Boles, B. R. and L. L. McCarter: 2000, 'Insertional inactivation of genes encoding components of the sodium-type flagellar motor and switch of *Vibrio parahaemolyticus*'. *J Bacteriol* **182**(4), 1035–45.
- [23] Brown, I. I. and C. C. Häse: 2001, 'Flagellum-independent surface migration of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*'. *J Bacteriol* **183**(12), 3784–3790.
- [24] Canals, R., M. Altarriba, S. Vilches, G. Horsburgh, J. G. Shaw, J. M. Tomás, and S. Merino: 2006, 'Analysis of the lateral flagellar gene system of *Aeromonas hydrophila* AH-3'. *J Bacteriol* **188**(3), 852–862.
- [25] Chen, S., M. Beeby, G. E. Murphy, J. R. Leadbetter, D. R. Hendrixson, A. Briegel, Z. Li, J. Shi, E. I. Tocheva, A. Müller, M. J. Dobro, and G. J. Jensen: 2011, 'Structural diversity of bacterial flagellar motors'. *EMBO J* **30**(14), 2972–2981.
- [26] Cohen, S. N., A. C. Chang, and L. Hsu: 1972, 'Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA'. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(8), 2110–2114.
- [27] Cornelis, G. R.: 2006, 'The type III secretion injectisome'. *Nat Rev Microbiol* **4**(11), 811–825.
- [28] Correa, N. E., J. R. Barker, and K. E. Klose: 2004, 'The *Vibrio cholerae* FlgM homologue is an anti-sigma²⁸ factor that is secreted through the sheathed polar flagellum'. *J Bacteriol* **186**(14), 4613–9.
- [29] Correa, N. E., C. M. Lauriano, R. McGee, and K. E. Klose: 2000, 'Phosphorylation of the flagellar regulatory protein FlrC is necessary for *Vibrio cholerae* motility and enhanced colonization'. *Mol Microbiol* **35**(4), 743–55.
- [30] Darnton, N. C. and H. C. Berg: 2008, 'Bacterial flagella are firmly anchored'. *J Bacteriol* **190**(24), 8223–4.
- [31] DePamphilis, M. L. and J. Adler: 1971, 'Attachment of flagellar basal bodies to the cell envelope: specific attachment to the outer, lipopolysaccharide membrane and the cytoplasmic membrane'. *J Bacteriol* **105**(1), 396–407.
- [32] Dyer, C. M., A. S. Vartanian, H. Zhou, and F. W. Dahlquist: 2009, 'A molecular mechanism of bacterial flagellar motor switching'. *J Mol Biol* **388**(1), 71–84.
- [33] Eaton, K. A., S. Suerbaum, C. Josenhans, and S. Krakowka: 1996, 'Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes'. *Infect Immun* **64**(7), 2445–2448.
- [34] Feldman, M., R. Bryan, S. Rajan, L. Scheffler, S. Brunnert, H. Tang, and A. Prince: 1998, 'Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection'. *Infect Immun* **66**(1), 43–51.

- [35] Ferris, H. U. and T. Minamino: 2006, 'Flipping the switch: bringing order to flagellar assembly'. *Trends Microbiol* **14**(12), 519–26.
- [36] Follett, E. A. and J. Gordon: 1963, 'An Electron Microscope Study Of *Vibrio* Flagella'. *J Gen Microbiol* **32**, 235–9.
- [37] 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**(4), 1261–70.
- [38] Fraser, G. M., T. Hirano, H. U. Ferris, L. L. Devgan, M. Kihara, and R. M. Macnab: 2003, 'Substrate specificity of type III flagellar protein export in *Salmonella* is controlled by subdomain interactions in FlhB'. *Mol Microbiol* **48**(4), 1043–57.
- [39] Fukuoka, H., T. Wada, S. Kojima, A. Ishijima, and M. Homma: 2009, 'Sodium-dependent dynamic assembly of membrane complexes in sodium-driven flagellar motors'. *Mol Microbiol* **71**(4), 825–35.
- [40] Girón, J. A., A. G. Torres, E. Freer, and J. B. Kaper: 2002, 'The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells'. *Mol Microbiol* **44**(2), 361–379.
- [41] Gode-Potratz, C. J., R. J. Kustusch, P. J. Breheny, D. S. Weiss, and L. L. McCarter: 2011, 'Surface sensing in *Vibrio parahaemolyticus* triggers a programme of gene expression that promotes colonization and virulence'. *Mol Microbiol* **79**(1), 240–263.
- [42] González, Y., D. Venegas, G. Mendoza-Hernandez, L. Camarena, and G. Dreyfus: 2010, 'Na⁺- and H⁺-dependent motility in the coral pathogen *Vibrio shilonii*'. *FEMS Microbiol. Lett.* **312**(2), 142–50.
- [43] Graf, J., P. V. Dunlap, and E. G. Ruby: 1994, 'Effect of transposon-induced motility mutations on colonization of the host light organ by *Vibrio fischeri*'. *J Bacteriol* **176**(22), 6986–6991.
- [44] Griffith, J. D.: 1974, 'Chapter 6. Electron Microscopic Visualization of DNA in Association with Cellular Components'. In: D. M. Prescott (ed.): *Methods in Cell Biology*, Vol. 7 of *Methods in Cell Biology*. Academic Press, pp. 129 – 146.
- [45] Guttenplan, S. B., S. Shaw, and D. B. Kearns: 2013, 'The cell biology of peritrichous flagella in *Bacillus subtilis*'. *Mol Microbiol* **87**(1), 211–229.
- [46] Hall, P. G. and N. R. Krieg: 1983, 'Swarming of *Azospirillum brasilense* on solid media'. *Can J Microbiol* **29**(11), 1592–1594.
- [47] Hamashima, H., M. Iwasaki, and T. Arai: 1995, 'A simple and rapid method for transformation of *Vibrio* species by electroporation'. In: J. Nickoloff (ed.): *Electroporation Protocols for Microorganisms*, Vol. 47 of *Methods in Molecular Biology*. Springer, Chapt. 14, pp. 155–160. ISBN: 9780896033108.
- [48] Harshey, R. M.: 1994, 'Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria'. *Mol Microbiol* **13**(3), 389–394.
- [49] Harshey, R. M.: 2003, 'Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal'. *Annu Rev Microbiol* **57**, 249–273.

- [50] Harshey, R. M. and T. Matsuyama: 1994, 'Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells'. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(18), 8631–8635.
- [51] Harwood, C. S., K. Fosnaugh, and M. Dispensa: 1989, 'Flagellation of *Pseudomonas putida* and analysis of its motile behavior'. *J Bacteriol* **171**(7), 4063–4066.
- [52] Henrichsen, J.: 1972, 'Bacterial surface translocation: a survey and a classification'. *Bacteriol Rev* **36**(4), 478–503.
- [53] Iino, T.: 1977, 'Genetics of structure and function of bacterial flagella'. *Annu Rev Genet* **11**, 161–182.
- [54] IJSEM: 2001, 'Notification that new names and new combinations have appeared in volume 51, part 4, of the IJSEM'. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**(5), 1621–3.
- [55] Jones, C. J. and R. M. Macnab: 1990, 'Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*: analysis with temperature-sensitive mutants'. *J Bacteriol* **172**(3), 1327–1339.
- [56] Jones, C. J., R. M. Macnab, H. Okino, and S. Aizawa: 1990, 'Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*'. *J Mol Biol* **212**(2), 377–387.
- [57] Josenhans, C., A. Labigne, and S. Suerbaum: 1995, 'Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species'. *J Bacteriol* **177**(11), 3010–3020.
- [58] Josenhans, C. and S. Suerbaum: 2002, 'The role of motility as a virulence factor in bacteria'. *Int J Med Microbiol* **291**(8), 605–614.
- [59] Katayama, E., T. Shiraishi, K. Oosawa, N. Baba, and S. Aizawa: 1996, 'Geometry of the flagellar motor in the cytoplasmic membrane of *Salmonella typhimurium* as determined by stereo-photogrammetry of quick-freeze deep-etch replica images'. *J Mol Biol* **255**(3), 458–475.
- [60] Kawagishi, I., M. Imagawa, Y. Imae, L. McCarter, and M. Homma: 1996, 'The sodium-driven polar flagellar motor of marine *Vibrio* as the mechanosensor that regulates lateral flagellar expression'. *Mol Microbiol* **20**(4), 693–699.
- [61] Kawagishi, I., M. Nakada, N. Nishioka, and M. Homma: 1997, 'Cloning of a *Vibrio alginolyticus rpoN* gene that is required for polar flagellar formation'. *J Bacteriol* **179**(21), 6851–6854.
- [62] Kawagishi, I., I. Okunishi, M. Homma, and Y. Imae: 1994, 'Removal of the periplasmic DNase before electroporation enhances efficiency of transformation in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*'. *Microbiology* **140**(9), 2355–2361.
- [63] Kearns, D. B.: 2010, 'A field guide to bacterial swarming motility'. *Nat Rev Microbiol* **8**(9), 634–644.
- [64] 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**(1), 191–197.
- [65] Khan, S., M. Dapice, and T. S. Reese: 1988, 'Effects of mot gene expression on the structure of the flagellar motor'. *J Mol Biol* **202**(3), 575–584.

- [66] Kihara, M., T. Minamino, S. Yamaguchi, and R. M. Macnab: 2001, 'Intergenic suppression between the flagellar MS ring protein FliF of Salmonella and FlhA, a membrane component of its export apparatus'. *J Bacteriol* **183**(5), 1655–1662.
- [67] Kim, S. Y., X. T. T. Thanh, K. Jeong, S. B. Kim, S. O. Pan, C. H. Jung, S. H. Hong, S. E. Lee, and J. H. Rhee: 2014, 'Contribution of six flagellin genes to the flagellum biogenesis of *Vibrio vulnificus* and in vivo invasion'. *Infect Immun* **82**(1), 29–42.
- [68] Kim, Y. K. and L. L. McCarter: 2000, 'Analysis of the polar flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*'. *J Bacteriol* **182**(13), 3693–3704.
- [69] Klose, K. E. and J. J. Mekalanos: 1998, 'Distinct roles of an alternative sigma factor during both free-swimming and colonizing phases of the *Vibrio cholerae* pathogenic cycle'. *Mol Microbiol* **28**(3), 501–520.
- [70] Klose, K. E., V. Novik, and J. J. Mekalanos: 1998, 'Identification of multiple sigma⁵⁴-dependent transcriptional activators in *Vibrio cholerae*'. *J Bacteriol* **180**(19), 5256–5259.
- [71] Kojima, S., T. Atsumi, K. Muramoto, S. Kudo, I. Kawagishi, and M. Homma: 1997, '*Vibrio alginolyticus* mutants resistant to phenamil, a specific inhibitor of the sodium-driven flagellar motor'. *J Mol Biol* **265**(3), 310–318.
- [72] Kojima, S. and D. F. Blair: 2001, 'Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor'. *Biochemistry* **40**(43), 13041–13050.
- [73] Kojima, S. and D. F. Blair: 2004, 'Solubilization and purification of the MotA/MotB complex of *Escherichia coli*'. *Biochemistry* **43**(1), 26–34.
- [74] 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**(22), 7696–7701.
- [75] Kushmaro, A., E. Banin, Y. Loya, E. Stackebrandt, and E. Rosenberg: 2001, '*Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*'. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**(Pt 4), 1383–1388.
- [76] Kushmaro, A., Y. Loya, M. Fine, and E. Rosenberg: 1996, 'Bacterial infection and coral bleaching'. *Nature* **380**(6573), 396–396.
- [77] Kushmaro, A., E. Rosenberg, M. Fine, and V. Loya: 1997, 'Bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1'. *Mar Ecol Prog Ser* **147**, 159–165.
- [78] Kusumoto, A., A. Shinohara, H. Terashima, S. Kojima, T. Yakushi, and M. Homma: 2008, 'Collaboration of FlhF and FlhG to regulate polar-flagella number and localization in *Vibrio alginolyticus*'. *Microbiology* **154**(Pt 5), 1390–1399.
- [79] Kwon, S. R., Y. J. Kang, D. J. Lee, E. H. Lee, Y. K. Nam, S. K. Kim, and K. H. Kim: 2009, 'Generation of *Vibrio anguillarum* ghost by coexpression of PhiX 174 lysis E gene and staphylococcal nuclease A gene'. *Mol Biotechnol* **42**(2), 154–159.

- [80] Larsen, M. H., N. Blackburn, J. L. Larsen, and J. E. Olsen: 2004, 'Influences of temperature, salinity and starvation on the motility and chemotactic response of *Vibrio anguillarum*'. *Microbiology* **150**(Pt 5), 1283–1290.
- [81] Larsen, S. H., J. Adler, J. J. Gargus, and R. W. Hogg: 1974, 'Chemomechanical coupling without ATP: the source of energy for motility and chemotaxis in bacteria'. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**(4), 1239–1243.
- [82] Lee, A., J. L. O'Rourke, P. J. Barrington, and T. J. Trust: 1986, 'Mucus colonization as a determinant of pathogenicity in intestinal infection by *Campylobacter jejuni*: a mouse cecal model'. *Infect Immun* **51**(2), 536–546.
- [83] Lee, A. G. and J. T. Fitzsimons: 1976, 'Motility in normal and filamentous forms of *Rhodospirillum rubrum*'. *J Gen Microbiol* **93**(2), 346–354.
- [84] Lee, J.-H., J. B. Rho, K.-J. Park, C. B. Kim, Y.-S. Han, S. H. Choi, K.-H. Lee, and S.-J. Park: 2004, 'Role of flagellum and motility in pathogenesis of *Vibrio vulnificus*'. *Infect Immun* **72**(8), 4905–4910.
- [85] Lee, S. E., S. Y. Kim, B. C. Jeong, Y. R. Kim, S. J. Bae, O. S. Ahn, J.-J. Lee, H.-C. Song, J. M. Kim, H. E. Choy, S. S. Chung, M.-N. Kweon, and J. H. Rhee: 2006, 'A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity'. *Infect Immun* **74**(1), 694–702.
- [86] Liu, R. and H. Ochman: 2007a, 'Origins of flagellar gene operons and secondary flagellar systems'. *J Bacteriol* **189**(19), 7098–7104.
- [87] Liu, R. and H. Ochman: 2007b, 'Stepwise formation of the bacterial flagellar system'. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(17), 7116–7121.
- [88] López-Boado, Y. S., L. M. Cobb, and R. Deora: 2005, '*Bordetella bronchiseptica* flagellin is a proinflammatory determinant for airway epithelial cells'. *Infect Immun* **73**(11), 7525–7534.
- [89] Macnab, R.: 1996, *Flagella and Motility*, Vol. 1, Chapt. D, pp. 123–145. ASM Press.
- [90] Macnab, R. M.: 1976, 'Examination of bacterial flagellation by dark-field microscopy'. *J Clin Microbiol* **4**(3), 258–265.
- [91] Macnab, R. M.: 1992, 'Genetics and biogenesis of bacterial flagella'. *Annu Rev Genet* **26**, 131–158.
- [92] Macnab, R. M.: 2003, 'How bacteria assemble flagella'. *Annu Rev Microbiol* **57**, 77–100.
- [93] Macnab, R. M.: 2004, 'Type III flagellar protein export and flagellar assembly'. *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3), 207–217.
- [94] Macnab, R. M. and J. S. Parkinson: 1991, 'Genetic analysis of the bacterial flagellum'. *Trends Genet* **7**(6), 196–200.
- [95] Magariyama, Y., S. Masuda, Y. Takano, T. Ohtani, and S. Kudo: 2001, 'Difference between forward and backward swimming speeds of the single polar-flagellated bacterium, *Vibrio alginolyticus*'. *FEMS Microbiol Lett* **205**(2), 343–347.
- [96] Magariyama, Y., S. Sugiyama, K. Muramoto, Y. Maekawa, I. Kawagishi, Y. Imae, and S. Kudo: 1994, 'Very fast flagellar rotation'. *Nature* **371**(6500), 752.

- [97] Martínez, R. M., B. A. Jude, T. J. Kirn, K. Skorupski, and R. K. Taylor: 2010, 'Role of FlgT in anchoring the flagellum of *Vibrio cholerae*'. *J Bacteriol* **192**(8), 2085–2092.
- [98] Martínez-del Campo, A., T. Ballado, L. Camarena, and G. Dreyfus: 2011, 'In *Rhodobacter sphaeroides*, chemotactic operon 1 regulates rotation of the flagellar system 2'. *J Bacteriol* **193**(23), 6781–6786.
- [99] Marvig, R. L. and M. Blokesch: 2010, 'Natural transformation of *Vibrio cholerae* as a tool—optimizing the procedure'. *BMC Microbiol* **10**, 155.
- [100] Matsuyama, T., A. Bhasin, and R. M. Harshey: 1995, 'Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low-agar medium'. *J Bacteriol* **177**(4), 987–991.
- [101] Mattick, J. S.: 2002, 'Type IV pili and twitching motility'. *Annu Rev Microbiol* **56**, 289–314.
- [102] McCarter, L., M. Hilmen, and M. Silverman: 1988, 'Flagellar dynamometer controls swarmer cell differentiation of *V. parahaemolyticus*'. *Cell* **54**(3), 345–351.
- [103] McCarter, L. and M. Silverman: 1990, 'Surface-induced swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*'. *Mol Microbiol* **4**(7), 1057–1062.
- [104] McCarter, L. L.: 1994a, 'MotX, the channel component of the sodium-type flagellar motor'. *J Bacteriol* **176**(19), 5988–5998.
- [105] McCarter, L. L.: 1994b, 'MotY, a component of the sodium-type flagellar motor'. *J Bacteriol* **176**(14), 4219–4225.
- [106] McCarter, L. L.: 1995, 'Genetic and molecular characterization of the polar flagellum of *Vibrio parahaemolyticus*'. *J Bacteriol* **177**(6), 1595–1609.
- [107] McCarter, L. L.: 2001, 'Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*'. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**(3), 445–62.
- [108] McCarter, L. L.: 2004, 'Dual flagellar systems enable motility under different circumstances'. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**(1-2), 18–29.
- [109] McCarter, L. L.: 2006a, 'Motility and Chemotaxis'. In: *The Biology of Vibrios*. ASM, Press, pp. 115–132.
- [110] McCarter, L. L.: 2006b, 'Regulation of flagella'. *Curr Opin Microbiol* **9**(2), 180–186.
- [111] McClain, J., D. R. Rollo, B. G. Rushing, and C. E. Bauer: 2002, '*Rhodospirillum centenum* utilizes separate motor and switch components to control lateral and polar flagellum rotation'. *J Bacteriol* **184**(9), 2429–2438.
- [112] Meibom, K. L., M. Blokesch, N. A. Dolganov, C.-Y. Wu, and G. K. Schoolnik: 2005, 'Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*'. *Science* **310**(5755), 1824–1827.
- [113] Merino, S., J. G. Shaw, and J. M. Tomás: 2006, 'Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system.'. *FEMS Microbiol Lett* **263**(2), 127–135.
- [114] Millikan, D. S. and E. G. Ruby: 2004, '*Vibrio fischeri* flagellin A is essential for normal motility and for symbiotic competence during initial squid light organ colonization'. *J Bacteriol* **186**(13), 4315–4325.

- [115] Milton, D. L., R. O'Toole, P. Horstedt, and H. Wolf-Watz: 1996, 'Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*'. *J Bacteriol* **178**(5), 1310–1319.
- [116] Minamino, T., K. Imada, and K. Namba: 2008, 'Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly'. *Mol Biosyst* **4**(11), 1105–1115.
- [117] Minamino, T. and K. Namba: 2008, 'Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export'. *Nature* **451**(7177), 485–488.
- [118] Mitchell, J. G., L. Pearson, A. Bonazinga, S. Dillon, H. Khouri, and R. Paxinos: 1995, 'Long lag times and high velocities in the motility of natural assemblages of marine bacteria.'. *Appl Environ Microbiol* **61**(3), 877–882.
- [119] Morooka, T., A. Umeda, and K. Amako: 1985, 'Motility as an intestinal colonization factor for *Campylobacter jejuni*'. *J Gen Microbiol* **131**(8), 1973–1980.
- [120] Motaleb, M. A., L. Corum, J. L. Bono, A. F. Elias, P. Rosa, D. S. Samuels, and N. W. Charon: 2000, '*Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions'. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(20), 10899–10904.
- [121] Muramoto, K., Y. Magariyama, M. Homma, I. Kawagishi, S. Sugiyama, Y. Imae, and S. Kudo: 1996, 'Rotational fluctuation of the sodium-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus* induced by binding of inhibitors'. *J Mol Biol* **259**(4), 687–695.
- [122] Nan, B., M. J. McBride, J. Chen, D. R. Zusman, and G. Oster: 2014, 'Bacteria that glide with helical tracks'. *Curr Biol* **24**(4), R169–R173.
- [123] Okabe, M., T. Yakushi, and M. Homma: 2005, 'Interactions of MotX with MotY and with the PomA/PomB sodium ion channel complex of the *Vibrio alginolyticus* polar flagellum'. *J Biol Chem* **280**(27), 25659–25664.
- [124] Ormonde, P., P. Hörstedt, R. O'Toole, and D. L. Milton: 2000, 'Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*'. *J Bacteriol* **182**(8), 2326–2328.
- [125] O'Shea, T. M., C. R. Deloney-Marino, S. Shibata, S.-I. Aizawa, A. J. Wolfe, and K. L. Visick: 2005, 'Magnesium promotes flagellation of *Vibrio fischeri*'. *J Bacteriol* **187**(6), 2058–2065.
- [126] Ottemann, K. M. and J. F. Miller: 1997, 'Roles for motility in bacterial-host interactions'. *Mol Microbiol* **24**(6), 1109–1117.
- [127] Pallen, M. J., C. W. Penn, and R. R. Chaudhuri: 2005, 'Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era'. *Trends Microbiol* **13**(4), 143–149.
- [128] Prouty, M. G., N. E. Correa, and K. E. Klose: 2001, 'The novel sigma⁵⁴- and sigma²⁸-dependent flagellar gene transcription hierarchy of *Vibrio cholerae*'. *Mol Microbiol* **39**(6), 1595–1609.
- [129] Rasmussen, L., E. L. White, A. Pathak, J. C. Ayala, H. Wang, J.-H. Wu, J. A. Benitez, and A. J. Silva: 2011, 'A high-throughput screening assay for inhibitors of bacterial motility identifies a novel inhibitor of the Na⁺-driven flagellar motor and virulence gene expression in *Vibrio cholerae*'. *Antimicrob Agents Chemother* **55**(9), 4134–4143.

- [130] Recht, J., A. Martínez, S. Torello, and R. Kolter: 2000, 'Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*'. *J Bacteriol* **182**(15), 4348–4351.
- [131] Rosenberg, E. and L. Falkovitz: 2004, 'The *Vibrio shiloi/Oculina patagonica* model system of coral bleaching'. *Annu Rev Microbiol* **58**, 143–159.
- [132] Ruby, E. G. and L. M. Asato: 1993, 'Growth and flagellation of *Vibrio fischeri* during initiation of the sepiolid squid light organ symbiosis'. *Arch Microbiol* **159**(2), 160–167.
- [133] Sato, K. and M. Homma: 2000a, 'Functional reconstitution of the Na(+)-driven polar flagellar motor component of *Vibrio alginolyticus*'. *J Biol Chem* **275**(8), 5718–5722.
- [134] Sato, K. and M. Homma: 2000b, 'Multimeric structure of PomA, a component of the Na+-driven polar flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*'. *J Biol Chem* **275**(26), 20223–20228.
- [135] Schneider, C. A., W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri: 2012, 'NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis'. *Nat Methods* **9**(7), 671–675.
- [136] Sen, A., R. K. Nandi, and A. N. Ghosh: 2005, 'Ion-swimming speed variation of *Vibrio cholerae* cells'. *J Biosci* **30**(4), 465–467.
- [137] Shinoda, S. and K. Okamoto: 1977, 'Formation and function of *Vibrio parahaemolyticus* lateral flagella'. *J Bacteriol* **129**(3), 1266–1271.
- [138] Silverman, M., R. Showalter, and L. McCarter: 1991, 'Genetic analysis in *Vibrio*'. *Methods Enzymol* **204**, 515–536.
- [139] Sjoblad, R. D., C. W. Emala, and R. N. Doetsch: 1983, 'Invited review: bacterial flagellar sheaths: structures in search of a function'. *Cell Motil* **3**(1), 93–103.
- [140] Sosinsky, G. E., N. R. Francis, D. J. DeRosier, J. S. Wall, M. N. Simon, and J. Hainfeld: 1992a, 'Mass determination and estimation of subunit stoichiometry of the bacterial hook-basal body flagellar complex of *Salmonella typhimurium* by scanning transmission electron microscopy'. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11), 4801–4805.
- [141] Sosinsky, G. E., N. R. Francis, M. J. Stallmeyer, and D. J. DeRosier: 1992b, 'Substructure of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*'. *J Mol Biol* **223**(1), 171–184.
- [142] Stabb, E. V. and E. G. Ruby: 2002, 'RP4-based plasmids for conjugation between *Escherichia coli* and members of the *Vibrionaceae*'. *Methods Enzymol* **358**, 413–426.
- [143] Starks, A. M., K. L. Bourdage, P. C. Thiaville, and P. A. Gulig: 2006, 'Use of a marker plasmid to examine differential rates of growth and death between clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in experimentally infected mice'. *Mol Microbiol* **61**(2), 310–323.
- [144] Stewart, B. J. and L. L. McCarter: 2003, 'Lateral flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*'. *J Bacteriol* **185**(15), 4508–4518.
- [145] Suaste-Olmos, F., C. Domenzain, J. C. Mireles-Rodríguez, S. Poggio, A. Osorio, G. Dreyfus, and L. Camarena: 2010, 'The flagellar protein FliL is essential for swimming in *Rhodobacter sphaeroides*'. *J Bacteriol* **192**(23), 6230–6239.

- [146] Sugiyama, S., E. J. Cragoe, and Y. Imae: 1988, 'Amiloride, a specific inhibitor for the Na⁺-driven flagellar motors of alkalophilic *Bacillus*'. *J Biol Chem* **263**(17), 8215–8219.
- [147] Sussman, M., Y. Loya, M. Fine, and E. Rosenberg: 2003, 'The marine fireworm *Hermodice carunculata* is a winter reservoir and spring-summer vector for the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi*'. *Environ Microbiol* **5**(4), 250–255.
- [148] Terahara, N., T. A. Krulwich, and M. Ito: 2008, 'Mutations alter the sodium versus proton use of a *Bacillus clausii* flagellar motor and confer dual ion use on *Bacillus subtilis* motors'. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(38), 14359–14364.
- [149] 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**(4), 1170–1180.
- [150] Terashima, H., M. Koike, S. Kojima, and M. Homma: 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), 5609–5615.
- [151] Terashima, H., N. Li, M. Sakuma, M. Koike, S. Kojima, M. Homma, and K. Imada: 2013, 'Insight into the assembly mechanism in the supramolecular rings of the sodium-driven *Vibrio* flagellar motor from the structure of FlgT'. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(15), 6133–6138.
- [152] Thompson, F. L., T. Iida, and J. Swings: 2004, 'Biodiversity of *Vibrios*'. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**(3), 403–431.
- [153] Tian, Y., Q. Wang, Q. Liu, Y. Ma, X. Cao, L. Guan, and Y. Zhang: 2008, 'Involvement of LuxS in the regulation of motility and flagella biogenesis in *Vibrio alginolyticus*'. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**(4), 1063–1071.
- [154] Tipping, M. J., N. J. Delalez, R. Lim, R. M. Berry, and J. P. Armitage: 2013, 'Load-dependent assembly of the bacterial flagellar motor'. *MBio* **4**(4).
- [155] Ulitzur, S. and M. Kessel: 1973, 'Giant flagellar bundles of *Vibrio alginolyticus* (NCMB 1803)'. *Arch Mikrobiol* **94**(4), 331–339.
- [156] Wall, D. and D. Kaiser: 1999, 'Type IV pili and cell motility'. *Mol Microbiol* **32**(1), 1–10.
- [157] Wang, H. and M. W. Griffiths: 2009, 'Mg²⁺-free buffer elevates transformation efficiency of *Vibrio parahaemolyticus* by electroporation'. *Lett Appl Microbiol* **48**(3), 349–354.
- [158] Wang, H., L. Zhang, A. J. Silva, and J. A. Benitez: 2013, 'A quinazoline-2,4-diamino analog suppresses *Vibrio cholerae* flagellar motility by interacting with motor protein PomB and induces envelope stress'. *Anti-microb Agents Chemother* **57**(8), 3950–3959.
- [159] 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**(3), 1172–1179.

- [160] Yamamoto, T., T. Takano, W. Higuchi, W.-C. Hung, I. Reva, S. Yabe, Y. Iwao, and O. Khokhlova: 2013, 'Unique features of the motility and structures in the flagellate polar region of *Campylobacter jejuni* and other species: an electron microscopic study'. *Microbiol Immunol* **57**(2), 83–90.
- [161] Yonekura, K., S. Maki-Yonekura, and M. Homma: 2011, 'Structure of the flagellar motor protein complex PomAB: implications for the torque-generating conformation'. *J Bacteriol* **193**(15), 3863–3870.
- [162] Yonekura, K., S. Maki-Yonekura, and K. Namba: 2003, 'Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy'. *Nature* **424**(6949), 643–650.
- [163] Yonekura, K., T. Yakushi, T. Atsumi, S. Maki-Yonekura, M. Homma, and K. Namba: 2006, 'Electron cryo-microscopic visualization of PomA/B stator units of the sodium-driven flagellar motor in liposomes'. *J Mol Biol* **357**(1), 73–81.
- [164] Yoon, S. S. and J. J. Mekalanos: 2008, 'Decreased potency of the *Vibrio cholerae* sheathed flagellum to trigger host innate immunity'. *Infect Immun* **76**(3), 1282–1288.
- [165] Yorimitsu, T. and M. Homma: 2001, 'Na(+)-driven flagellar motor of *Vibrio*'. *Biochim Biophys Acta* **1505**(1), 82–93.
- [166] Yorimitsu, T., A. Mimaki, T. Yakushi, and M. Homma: 2003, 'The conserved charged residues of the C-terminal region of FliG, a rotor component of the Na⁺-driven flagellar motor'. *J Mol Biol* **334**(3), 567–583.
- [167] 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**(16), 5103–5106.
- [168] Yorimitsu, T., Y. Sowa, A. Ishijima, T. Yakushi, and M. Homma: 2002, 'The systematic substitutions around the conserved charged residues of the cytoplasmic loop of Na⁺-driven flagellar motor component PomA'. *J Mol Biol* **320**(2), 403–413.
- [169] Yoshida, S., S. Sugiyama, Y. Hojo, H. Tokuda, and Y. Imae: 1990, 'Intracellular Na⁺ kinetically interferes with the rotation of the Na(+)-driven flagellar motors of *Vibrio alginolyticus*'. *J Biol Chem* **265**(33), 20346–20350.
- [170] Youle, M., F. Rohwer, A. Stacy, M. Whiteley, B. C. Steel, N. J. Delalez, A. L. Nord, R. M. Berry, J. P. Armitage, S. Kamoun, and others: 2012, 'The microbial olympics'. *Nature Reviews Microbiology* **10**(8), 583–588.
- [171] 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**(11), 6436–6441.
- [172] Zhu, S., S. Kojima, and M. Homma: 2013, 'Structure, gene regulation and environmental response of flagella in *Vibrio*'. *Front Microbiol* **4**, 410.

Induction of the lateral flagellar system of *Vibrio shilonii* is an early event after inhibition of the sodium ion flux in the polar flagellum

Yael González, Laura Camarena, and Georges Dreyfus

Abstract: In this study, we show the induction of lateral flagella by the action of the sodium channel blocker phenamil, in the marine bacterium *Vibrio shilonii*, a coral pathogen that causes bleaching. We analyzed the growth and morphology of cells treated with phenamil. A time course analysis showed that after 30 min of exposure to the sodium channel blocker, lateral flagella were present and could be detected by electron microscopy. Detection of the mRNA of the master regulator (*lafK*) and lateral flagellin (*lafA*) by RT-PCR confirmed the expression of lateral flagellar genes. We show the simultaneous isolation of polar and, for the first time, lateral flagellar hook-basal bodies. This allowed us to compare the dimensions and morphological characteristics of the 2 structures.

Key words: *Vibrio shilonii*, bacterial motility, sodium-driven flagella, proton-driven lateral flagella.

Résumé : Dans la présente étude, nous relatons l'induction de flagelles latéraux par l'action du phénamil, qui bloque les canaux sodiques, chez la bactérie marine *Vibrio shilonii*, un pathogène de coraux qui cause leur blanchissement. Nous avons analysé la croissance et la morphologie de cellules traitées au phénamil. Une analyse du décours temporel a révélé que des flagelles latéraux étaient apparus 30 minutes après l'exposition au bloqueur de canaux sodiques, tel qu'on a pu détecter par microscopie électronique. La détection de l'ARNm du régulateur principal (*lafK*) et de la flagelline latérale (*lafA*) par RT-PCR a confirmé l'expression de gènes de flagelles latéraux. Nous faisons état de l'isolation simultanée de corps basaux flagellaires polaires et (pour la première fois) latéraux munis du crochet. Ceci nous a permis de comparer les dimensions et les caractéristiques morphologiques des 2 structures. [Traduit par la Rédaction]

Mots-clés : *Vibrio shilonii*, motilité bactérienne, flagelles activés par le sodium, flagelles latéraux activés par les protons.

Introduction

Motility is a widespread characteristic among *Bacteria* and *Archaea* that provides a clear advantage for survival. This trait has been widely studied, showing that microorganisms have developed a multiplicity of motility systems that allow movement in liquid, viscous media, or over surfaces. Many microorganisms use flagella for locomotion. These are highly complex and efficient structures that also play important roles in other processes, such as biofilm formation and virulence in pathogenic species (Kirov 2003).

The basic structure of the bacterial flagellum consists of a helical filament connected to the cell via a rod and hook that transmit the torque generated by the rotating motor. This organelle spans the inner membrane, the cell wall, and the outer membrane (reviewed in Berg 2003). Its basic structure has been characterized and variations in its architecture have started to be noticed as microscopic techniques have continued to develop (Chen et al. 2011; Zhao et al. 2014).

Many bacteria modulate gene expression to cope with changes in the environment, such as nutrients, temperature, and cell density. Lifestyle alterations, such as growth in biofilms or on surfaces, also result in quite dramatic gene expression and morphological adaptations, such as cell elongation and the display of peritrichous flagella (Lee and Fitzsimons 1976; Hall and Krieg 1983; McClain et al. 2002; Canals et al. 2006). A thorough analysis of the global response to surface sensing in *Vibrio parahaemolyticus* shows that it

not only induces swarming motility but also invokes new capacities that prepare the bacterial cells for encounters with a potential host (Gode-Potratz et al. 2011). Certain marine *Vibrio* species found mainly in coastal areas possess 2 types of flagella: a single polar-sheathed flagellum (Fla) and numerous lateral flagella (Laf) (Allen and Baumann 1971; McCarter and Silverman 1990; McCarter 2001, 2004; González et al. 2010). Among these, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio shilonii*, and *V. parahaemolyticus* show a constitutive polar flagellum and inducible lateral flagella. In contrast, other members of the genus, like *Vibrio cholerae*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio fischeri*, and *Vibrio vulnificus*, do not possess a lateral flagellar system (McCarter 2001). The visualization of polar and lateral flagella of *V. parahaemolyticus* was recently reported (Aizawa 2014). The polar flagellum is sheathed by what appears to be an extension of the outer membrane and is used for swimming in liquid media, whereas the lateral multiple unsheathed flagella are suitable for displacement over surfaces or viscous environments. Both of these motility organelles rotate by means of their respective motors that are embedded in the cytoplasmic membrane (McCarter et al. 1988; McCarter and Wright 1993). It should be noted that the 2 types of flagella utilize different coupling ions for rotation: sodium for the polar flagellum and protons for lateral flagella (Chernyak et al. 1983; Atsumi et al. 1992a, 1992b; Kawagishi et al. 1995; González et al. 2010).

Received 27 August 2014. Revision received 26 November 2014. Accepted 26 November 2014.

Y. González and G. Dreyfus. Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Ap. Postal 70-243, Cd. Universitaria, México DF 04510, Mexico.

L. Camarena. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, Mexico.

Corresponding author: Georges Dreyfus (e-mail: gdreyfus@ifc.unam.mx).

As mentioned above, the lateral flagellar system is induced either by increased viscosity or by contact with a surface (Ulitzur and Kessel 1973; Shinoda and Okamoto 1977). It has been proposed that this is in direct response to inhibition of rotation of the sodium-driven polar flagellum motor. In *V. parahaemolyticus* the polar flagellum works as a sensor of the surrounding medium by detecting conditions where rotation of the swimming structure is not optimal or simply impeded (for a review see Belas 2014). These conditions are of various kinds, such as growth on surfaces or in high viscosity media, mutations of the polar genes, and treatment by sodium channel blocking compounds such as phenamil or amiloride, which poison the energy source that drives rotation (Belas et al. 1986; McCarter et al. 1988; Kawagishi et al. 1996; Boles and McCarter 2000). We have previously shown for the marine bacterium *V. shilonii* that increasing the viscosity of the medium in soft-agar plates induces cells to differentiate to a swarmer cell phenotype (González et al. 2010). Previous work carried out by Belas' group in *V. parahaemolyticus* showed the induction of the genes encoding the lateral flagella in response to growth in viscous media, and the transcriptional level of these genes was evaluated using the *lux* system as a reporter (Belas et al. 1984, 1986). This approach was also used to determine the activation of the genes controlling lateral flagella in response to sodium channel blockers that stop polar flagellum rotation in *V. parahaemolyticus* (Kawagishi et al. 1996).

Through our work *V. shilonii* has proven to be recalcitrant to genetic manipulation. Therefore, we have limited our studies to the wild-type strain AK-1. In this work we induced the lateral flagella system of *V. shilonii* by treatment with phenamil and determined the presence of the lateral filaments at different time points after the arrest in rotation of the sodium-dependent polar flagellum. In addition, we purified for the first time the lateral flagellar structures of phenamil-treated cells and compared the hook-basal body ultrastructure of the constitutive polar flagellum with the H⁺-driven lateral flagella.

Materials and methods

Strain and growth conditions

This work was carried out with a wild-type strain of *Vibrio shilonii* ATCC BAA-91 (AK-1) (Kushmaro et al. 2001). Typically, *V. shilonii* cells were plated on Petri dishes containing 1.5% agar dissolved in 3.7% Marine Broth 2216 (MB) (Difco); this is a complex medium and the final concentration of NaCl is 1.9% (327 mmol/L), which is equivalent to 19 ppt. Plates were incubated for 12 h at 30 °C, stored at 4 °C, and cells were regrown regularly. For motility assays the cells were grown as indicated below.

Growth conditions for motility assays

Vibrio shilonii was grown overnight for 12 h with orbital shaking at 30 °C in a growth medium consisting of 1% tryptone, 35 mmol/L MgSO₄, 7 mmol/L CaCl₂, 7 mmol/L KCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, also known as tryptone-based sea water (TBSW) (O'Shea et al. 2005), to which 342 mmol/L NaCl was added (equivalent to 20 ppt). Overnight cultures reached an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of ca. 1.0. Cultures were diluted 100-fold in fresh TBSW medium with 120 mmol/L NaCl (equivalent to 7 ppt) and grown at 30 °C with orbital shaking until an OD₆₀₀ of 0.1 was reached. An aliquot of the culture was challenged with phenamil and incubation proceeded for an additional hour; commonly after this time, the cultures reached an OD₆₀₀ of 0.25. At this point, the cultures were used for the various assays described in this work. Growth was determined by measuring the OD₆₀₀, and motility by direct observation in a high intensity dark field microscope; both parameters were monitored every 30 min.

Inhibition of motility with phenamil

Liquid cultures, obtained as described above, were supplemented, when indicated, with a final concentration of 50 μmol/L of phenamil methanesulfonate (Sigma P203-5MG); a 12.4 mmol/L

stock solution of phenamil dissolved in DMSO was stored at -20 °C.

Isolation of the flagellar hook-basal-body complex

Hook-basal-body complexes (HBBs) from the lateral and polar flagella of *V. shilonii* were isolated following the protocol previously described for isolation of the HBBs of *Salmonella enterica* (Aizawa et al. 1985; Aizawa 2014). Briefly, overnight cultures were grown in TBSW and subcultured at a 100-fold dilution in 100 mL of fresh TBSW medium with 120 mmol/L NaCl. Cultures were grown with orbital shaking to an OD₆₀₀ of 0.1. At this point, phenamil (50 μmol/L) was added and growth continued for 1 h until the culture reached an OD₆₀₀ of 0.25. Cells were collected by centrifugation at 4500g for 20 min at 4 °C. The pellet was resuspended in cold sucrose buffer (0.5 mol/L sucrose, 0.15 mol/L Tris) and stirred gently for 15 min at 4 °C. Cells were converted to spheroplasts by the addition of lysozyme and EDTA (pH 8.0) at a final concentration of 0.1 mg/mL and 2 mmol/L, respectively. Lysis of spheroplasts was achieved by adding Triton X-100 from a 20% stock solution to a final concentration of 1% (v/v) and then incubating at room temperature with gentle agitation for 25 min. Once the suspension was clear, the following reagents were added: MgSO₄ (1 mmol/L), 1 mg of DNase I powder, and EDTA (2 mmol/L). The clear suspension was centrifuged for 10 min at 4500g at 4 °C. The supernatant was centrifuged for 30 min at 75 300g at 4 °C. The supernatant was discarded and the pellet was carefully resuspended in 50–100 μL of cold TET buffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 0.1% Triton X-100).

Electron microscopy

Two hundred microlitres of wild-type *V. shilonii* cells that were actively swimming were withdrawn directly from the liquid cultures and centrifuged at 4500g for 5 min at 4 °C. The pellet was recovered and resuspended in 1 mL of Tris-HCl buffer (pH 7.4) and immediately centrifuged again. This buffer is used to avoid the presence of salt crystals that are electron-dense. The cells were resuspended in the leftover volume from which 2 μL was deposited on a carbon-coated copper grid, and 10 μL of a 1% phosphotungstic acid (PTA) solution was added. After 1 min at room temperature the drop was carefully removed with filter paper. The same procedure was used to prepare the grids for isolated HBBs except that negative staining was achieved with 2% PTA. Observations were made using a JEM-1200EXII electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan). Micrographs were taken with an 11 megapixel Gatan digital camera at an accelerating voltage of 80 and 100 kV for whole cells and HBBs, respectively. Electron micrographs were analyzed and edited using Image J software (Schneider et al. 2012). PTA instead of uranyl acetate was used in this study because of the acidic nature of a uranyl acetate solution (pH 4.0). Generally, filament HBB structures are sensitive to acidic pH (Aizawa 2014), and it was our interest to preserve the components of the lateral and polar structures as much as possible.

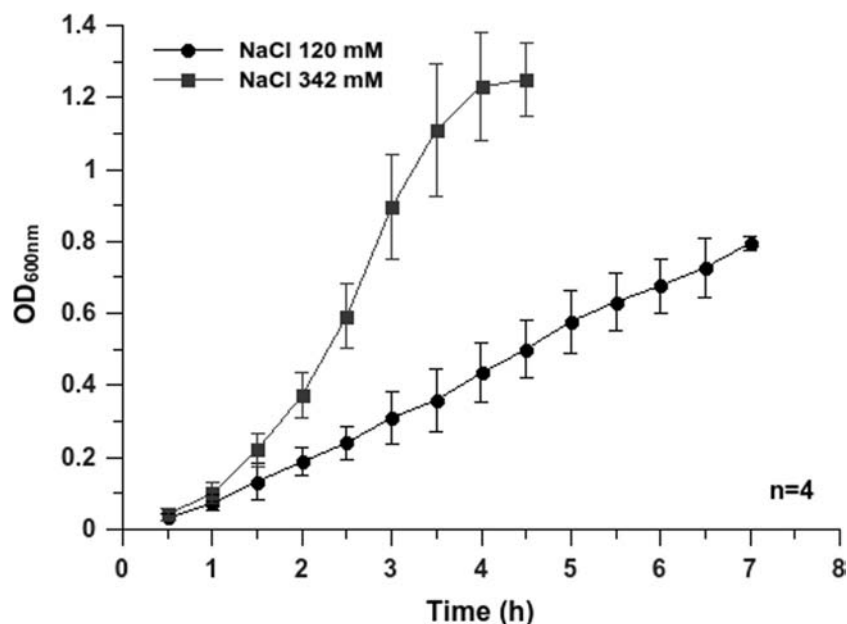
Videos

Videos were recorded using a Canon HV20 digital camera coupled to a high intensity dark-field setup in a Olympus BH2 microscope and were edited with Avidemux free access software.

Isolation of RNA and RT-PCR

Total RNA was obtained from *V. shilonii* grown in TBSW (120 mmol/L NaCl) in the presence or absence of phenamil. For this purpose an overnight culture was diluted 1/100 in fresh medium and incubated at 30 °C until it reached an OD₆₀₀ of 0.1. At this point the culture was divided in 2 parts either in the presence or absence of phenamil. After 1 h of incubation the cultures reached an OD₆₀₀ of 0.25. At this point the cells were collected and RNA was purified. RNA was also isolated from cells grown in 0.6% soft-agar plates. For this, soft-agar plates containing TBSW with 342 mmol/L

Fig. 1. Growth curves of *Vibrio shilonii* grown with 2 different concentrations of NaCl. Liquid cultures were started and followed as described in Materials and methods. Two NaCl concentrations were used at 30 °C: 120 and 342 mmol/L corresponding to salinities of 7 and 20 ppt, respectively.



NaCl were inoculated with 5.0 μ L of an overnight culture; after 48 h of incubation at 30 °C, the cells were scraped and suspended in 5 mL of TBSW containing 120 mmol/L NaCl. Immediately after, the cells were collected and RNA purified.

Total RNA was isolated from the resulting pellets as described previously (Aiba et al. 1981). RT-PCR was performed using an Access RT-PCR System (Promega A1250) according to the instructions provided by the supplier. The samples containing 0.2 ng of RNA were mixed with 10 pmol of each oligonucleotide (see supplementary Table 1³) and with the enzymes and dNTPs provided by the manufacturer. The PCR reaction consisted of 40 cycles. Three independent experiments were carried out.

Results

In this work we analyzed the activation of the lateral flagellar system by phenamil. The flagellar HBBs of phenamil-treated cells were purified and the ultrastructure of the lateral basal body was characterized.

It has been reported that phenamil reduces or stops the rotation of the polar flagellum in several species of *Vibrio* (Kawagishi et al. 1996; Kojima et al. 1997, 1999). To test if this also holds for *V. shilonii*, we added 50 μ mol/L phenamil to *V. shilonii* cells. We observed that motility was severely reduced immediately after phenamil was added into a culture containing 120 mmol/L NaCl (see supplementary movie³). Given that this low concentration of sodium could cause the lysis of certain species of marine bacteria, we tested the ability of *V. shilonii* to withstand and grow in this condition. Therefore, we carried out growth curves in TBSW containing 2 concentrations of NaCl, 342 and 120 mmol/L. As can be observed in Fig. 1, *V. shilonii* is able to grow albeit slowly in TBSW containing 120 mmol/L NaCl, suggesting that this species does not have a strong dependency on a high sodium concentration. In addition, we determined that in this growth medium at an OD₆₀₀ of 0.25, *V. shilonii* cells show a swimming speed of 47.1 ± 2.5 μ m/s, which is close to the values that were previously determined for other species of *Vibrio* (Magariyama et al. 2001; Youle et al. 2012).

Therefore, incubation in TBSW with 120 mmol/L NaCl does not affect swimming or cell integrity (given that no lysis of the culture was noticed).

Cell growth and the flagellar structure of *V. shilonii* cells cultured in TBSW with 120 mmol/L NaCl were analyzed in the presence or absence of phenamil, or DMSO where phenamil is dissolved. Figure 2A shows that phenamil or DMSO did not affect growth of *V. shilonii* significantly. Flagella were observed in phenamil-treated cells following the procedure indicated in Materials and methods. Figure 2B shows a representative image of an untreated *V. shilonii* cell with its constitutive polar sheathed flagellum. It should be mentioned that cells grown in the presence of DMSO looked identical to the cell shown in Fig. 2B (data not shown). Electron microscopy showed that cells grown in the presence of 50 μ mol/L phenamil appeared sometimes elongated and showed, in addition to the polar flagellum, various thin peritrichous filaments that are indicated by black arrowheads in Fig. 2C.

To gain further insight on the characteristics of these thinner filaments, we analyzed at a higher magnification the insertion points of flagella in the cell membrane of phenamil-treated cells. A representative image of the flagellar insertion points is shown in Fig. 2D. Two structurally distinct basal bodies can be observed: one that connects with what appears to be a sheathed polar filament and a smaller basal structure that connects with a thin filament that is suggestive of a lateral flagellum. This image reveals that the basal body of the lateral flagellum shows a smaller diameter of the L and P rings compared with the polar basal body, which in addition contains the H and T rings.

To support the idea that phenamil promotes the expression of the lateral flagella, we explored in 3 different growth conditions the presence of RNA transcripts of 2 genes involved in the biogenesis of the lateral flagellum. The 2 genes that we chose were the master regulator *lafK* and the gene that encodes for lateral flagellin *lafA*. Both genes were identified in the draft genome sequence of *V. shilonii* AK1 (NCBI access number NZ_ABCH0000000.1) using

³Supplementary data are available with the article through the journal Web site at <http://nrcresearchpress.com/doi/suppl/10.1139/cjm-2014-0579>.

Fig. 2. Growth and morphology of phenamil-treated *Vibrio shilonii* cells. (A) Liquid cultures were followed at 600 nm in the absence or presence of phenamil as described in Materials and methods. A control with DMSO was included. The arrow indicates the time when treatments were added. (B and C) Electron micrographs of cells harvested after 60 min ($OD_{600} = 0.25$) of growth in the absence (panel B) or presence (panel C) of phenamil (bar = 1 μm). White arrows indicate polar flagella and black arrows indicate lateral flagella. (D) Electron micrograph of a magnification of the insertion points of the polar and lateral flagella of cells harvested and grown in the presence of phenamil as indicated above (bar = 100 nm).

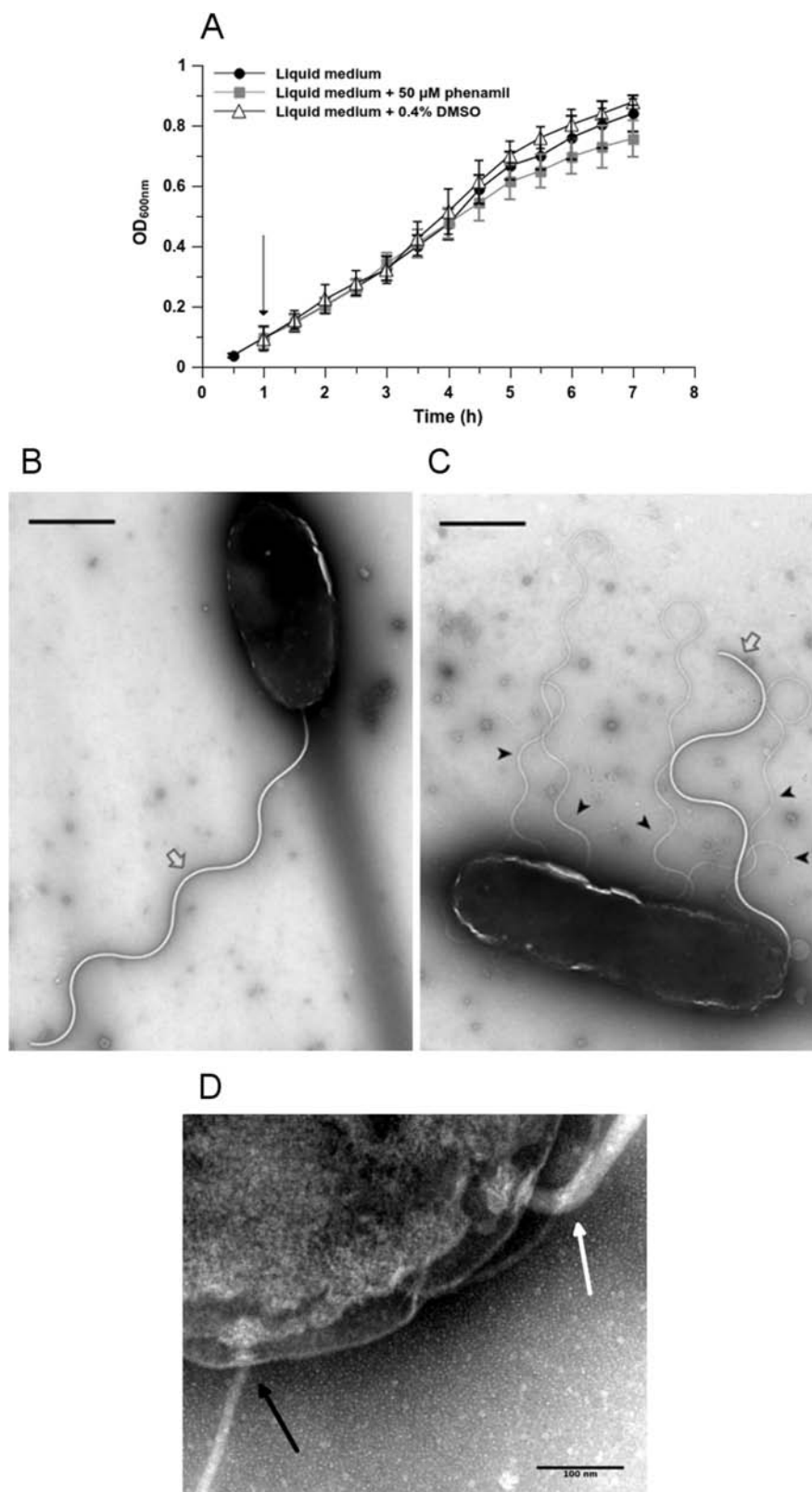
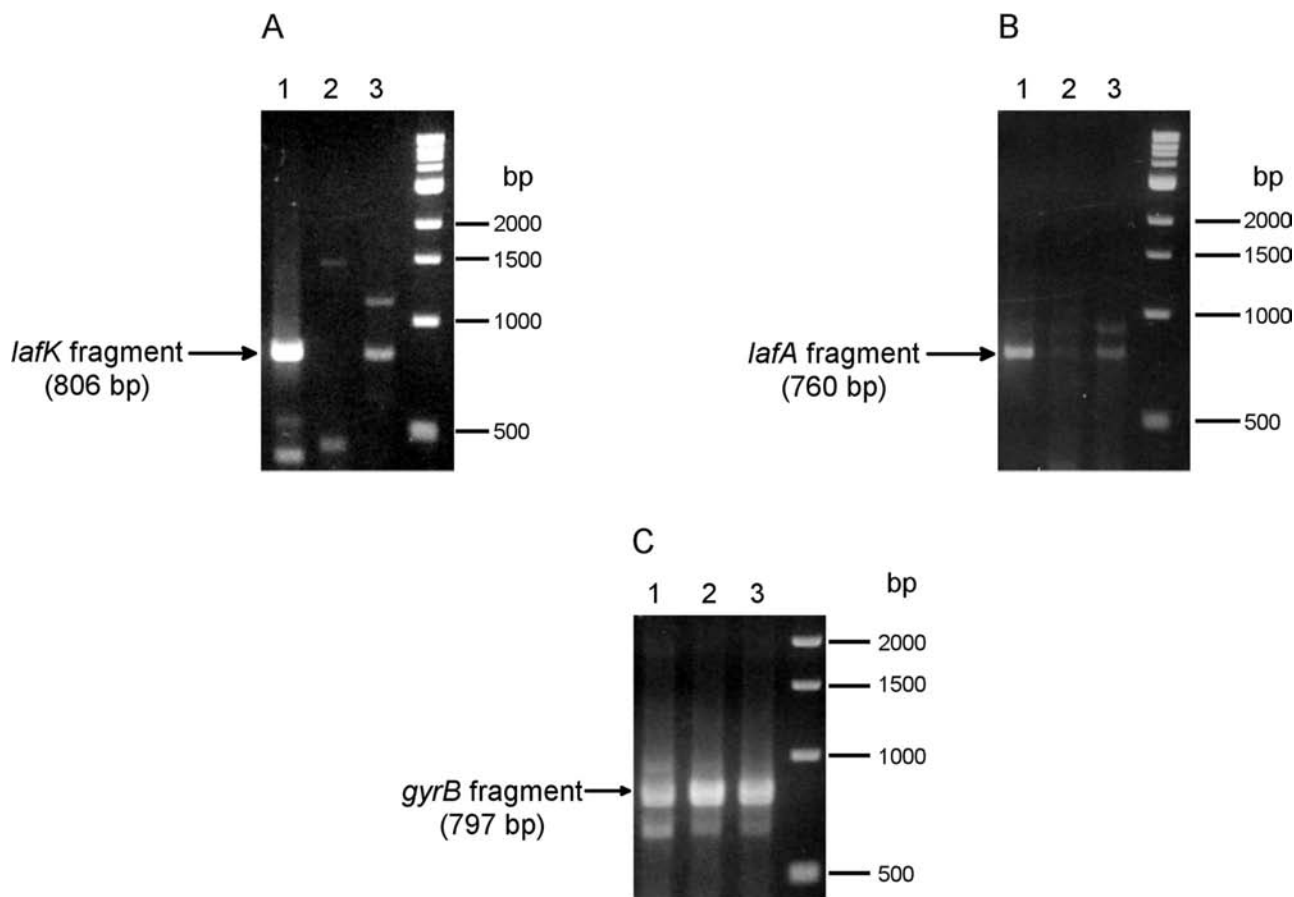


Fig. 3. RT-PCR analysis of the expression of *lafK* and *lafA*. The effect of the growth medium on *lafK* (A) and *lafA* (B) transcription is shown. RT-PCR amplification products from *Vibrio shilonii* grown in solid medium (0.6% soft agar) (lane 1), in liquid medium (lane 2), and in liquid medium in the presence of phenamil (lane 3). (C) The effect of the conditions described above on the expression of the β subunit of the DNA gyrase from *V. shilonii*. RNA was prepared as indicated in Materials and methods.



the sequences of the *lafK* and *lafA* from *V. parahaemolyticus* as a query in a BLAST search. The best hits for these sequences are annotated as VSAK1_13130 and VSAK1_13080, which correspond to *lafK* and *lafA*, respectively, and are located within a cluster of genes that seem to encode for components of the lateral flagella previously named as region 2 (González et al. 2010). Specific oligonucleotides for these genes were included in a RT-PCR reaction, as indicated in Materials and methods. The results indicate that the transcripts that correspond to the master regulator *lafK* and the lateral flagellin gene *lafA* are present when *V. shilonii* cells were grown on semisolid agar medium, given that under these conditions, cells are forced to swarm using lateral flagella (Figs. 3A and 3B lane 1). When cells were grown in liquid medium the *lafK* transcript was not detected and the *lafA* transcript was barely detected, possibly indicating a very low constitutive production of *lafA*. When *V. shilonii* was grown in the presence of phenamil, the mRNA transcripts of *lafK* and *lafA* were detected (Figs. 3A and 3B lanes 2 and 3, respectively). Densitometric analysis of the bands showed that there was 4 times more *lafA* transcript in liquid medium in the presence of phenamil than in its absence. As a control we carried out a RT-PCR reaction using specific oligonucleotides for the β subunit of DNA gyrase (VSAK1_12632) that is expressed constitutively; as expected, the transcript was present in the 3 experimental conditions (Fig. 3C). In the absence of reverse transcriptase (RT) none of the samples showed a detectable product (data not shown).

The time dependence of the appearance of lateral filaments in *V. shilonii* cells grown in the presence of phenamil was determined

by taking samples at various culture times. Figure 4A shows an image of *V. shilonii* at the moment of the addition of the Na^+ -channel blocker phenamil. A sample taken 30 min after phenamil treatment shows that the bacterial cells start to display lateral filaments (Fig. 4B). It can also be observed that the number of lateral filaments increases progressively with time (Fig. 4C–4E).

We carried out the isolation and characterization of HBBs from control and phenamil-treated *V. shilonii* cells. The isolation procedure was carried out as described in Materials and methods. Electron micrographs of the isolated HBB complexes were analyzed and processed with ImageJ to determine the dimensions of the structures that were obtained from polar or lateral flagella. The left panels in Figs. 5A and 5B show representative images of the structures isolated from cells grown in the presence of phenamil, given that, as shown in Fig. 4D, cells simultaneously display polar and lateral flagella. As we have previously shown in the absence of phenamil, only polar flagella were isolated (González et al. 2010). Several images ($n = 27$) of each kind were analyzed to obtain a graphic representation of the HBB structures of the polar and lateral flagella. The resulting structures are shown in the right panels of Figs. 5A and 5B; these structures allowed us to determine the overall shape of the HBBs as well as the diameter (54.3 ± 2.3 nm) of the H ring of the Na^+ -dependent polar flagellum and the diameter (23.4 ± 1.9 nm) of the L ring of the lateral flagellum. It should be noted that in our previous study (González et al. 2010), the annular structure located below the hook was labeled as L-P ring, given its similarity with previously reported structures. However, a few months later it was shown that a new protein

Fig. 4. Time-course differentiation of *Vibrio shilonii* cells grown in liquid in the presence of phenamil. Cells were treated at time 0 with phenamil (50 $\mu\text{mol/L}$). At each indicated time interval, motility was determined and a sample of each condition was treated as described in Materials and methods to make observations with the electron microscope (bars = 1 μm). The number of lateral flagella per cell (LFC) was quantified and is shown in the graphs to the right. For each time point, 50 cells were observed.

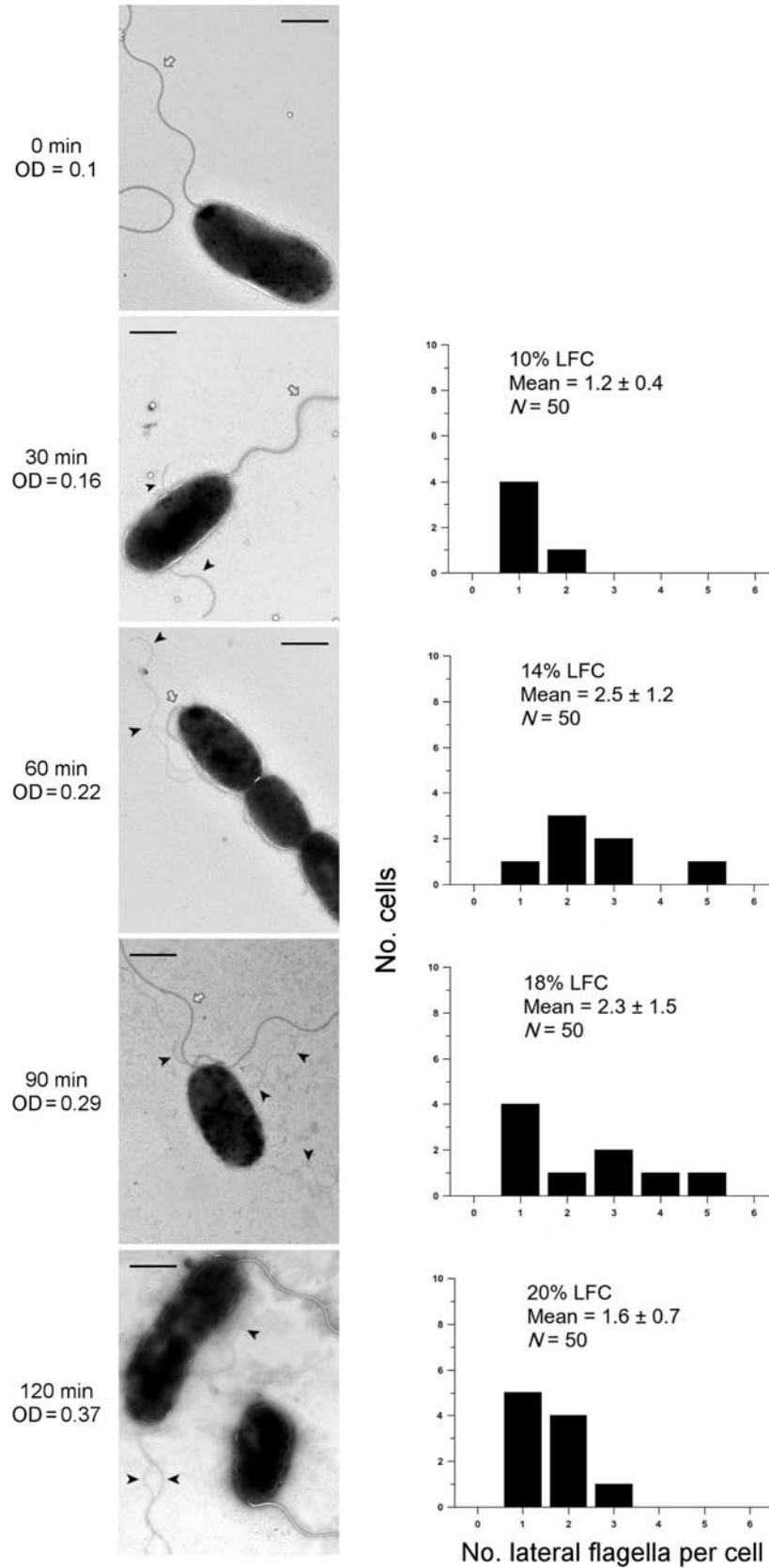
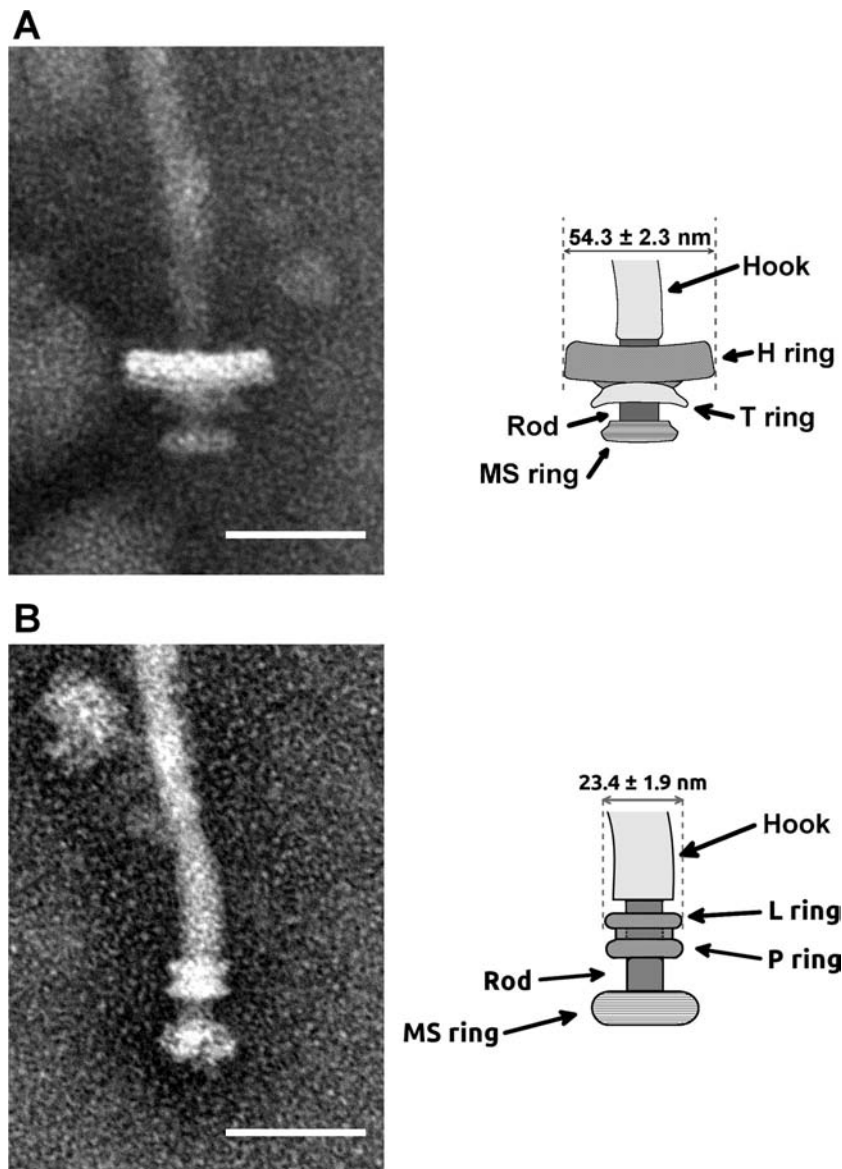


Fig. 5. Simultaneous isolation of polar (A) and lateral (B) hook–basal-bodies of cells grown in the presence of phenamil. Panels on the left are electron micrographs of representative images of polar and lateral HBBs. The panels to the right are schematic representations of the observed structures. These structures were isolated and prepared for electron microscopy as described in Materials and methods (bars = 50 nm).



named FlgT forms a supramolecular ring that covers the L-P ring in *V. alginolyticus* (Terashima et al. 2010). This protein is conserved in many *Vibrio* species, including *V. shilonii*. The structure obtained for the polar flagellum is similar to the one reported previously by us (González et al. 2010).

Discussion

Vibrio shilonii is a monoflagellated marine bacterium that thrives in coral reefs where it can reside in the marine worm *Hermodice carunculata* (Sussman et al. 2003) and also invade the coral *Oculina patagonica* causing bleaching (Kushmaro et al. 1997). Its lifestyle depends mainly on motility, hence, the importance of understanding how these systems respond to changes in the environment. In this study we analyzed the effects of phenamil on the expression of lateral flagella. We showed that this compound impedes the rotation of the polar flagellum by blocking the flux of Na^+ ions that energize the motor (see supplementary movie¹).

We have previously shown that *V. shilonii* cells synthesize lateral flagella in response to increased concentrations of agar in a

swarm plate. When swarming plates contained 0.6% agar, the cells became elongated and lateral flagella were readily distinguishable. In that report we also showed the structure, dimensions, and composition of the polar flagellum (González et al. 2010). Here we describe for the first time the isolation and characterization of lateral HBBs. After analyzing several isolated structures we were able to compare polar and lateral HBBs and conclude that the HBB from lateral flagella of *V. shilonii* has a different motor structure characterized by its smaller dimensions than that from the polar flagellum, which reflects a different structural composition (see Fig. 5). Furthermore, the *V. shilonii* lateral HBB resembles the HBB structures that have been described in Gram-negative bacteria that use a proton (H^+) gradient as the main energy source for rotation of the flagellar motor (DePamphilis and Adler 1971; Aizawa et al. 1985; Sosinsky et al. 1992). Given that it has been shown that the rotation of the lateral flagellum in several species of *Vibrio* is H^+ dependent (Atsumi et al. 1992b; Kawagishi et al. 1995), a structure lacking the H and T rings characteristic of the Na^+ -dependent motors (Terashima et al. 2006, 2010; Koike et al.

2010) could have been anticipated. In accordance with the presence of lateral flagella, the mRNA transcripts corresponding to *lafK* and *lafA* were clearly detectable under 2 experimental conditions: (i) when cells were grown on semisolid agar and were forced to swarm, and (ii) when cells were grown in liquid medium in the presence of phenamil. The presence of these 2 reporter genes of lateral flagella gene activity supports the notion that blockage of the Na⁺-dependent polar flagellum induces the lateral flagellar system in *V. shilonii*. It should be noted that after blocking polar flagellar rotation, the detection of lateral filaments appeared after 30 min, indicating that the lateral flagellar genes are induced very rapidly under this condition. As mentioned before, in *V. parahaemolyticus* the induction of the genes encoding lateral flagella in response to growth in dense media was detected in the first 30 min, which was the shortest time tested (Belas et al. 1986). Nevertheless, there is a possibility that gene activation occurs at shorter times to concur with the presence of the lateral filaments that we detected at this time point.

In contrast with this type of regulation, it was recently shown that the lateral flagellar genes of *Aeromonas hydrophila* AH3 could be controlled at post-transcriptional level, since these genes are strongly transcribed in liquid medium but in this condition no lateral flagella are formed (Wilhelms et al. 2013). The possibility remains that *lafA* of *V. shilonii* could be post-transcriptionally regulated given that we detected a low level of *lafA* transcript during growth in liquid medium.

In this work we also analyzed the growth condition that allowed the simultaneous expression of the constitutive polar flagellum and the lateral flagella system. The presence of the 2 motility systems allowed us to isolate and analyze the polar and lateral flagellar structures simultaneously and for the first time to observe the ultrastructure of the lateral HBB.

Acknowledgements

Y.G. was supported by a fellowship from CONACyT (203228). This work is part of Y.G. requirements to obtain a Ph.D. degree at the Graduate Program in Biochemical Sciences in UNAM. We thank Teresa Ballado, Javier de la Mora, and Aurora Osorio for their technical assistance; Diego González-Halphen for critically reading the manuscript; and Fernando García from the Microscopy Unit at IFC-UNAM. This work was partially supported by grants IN206811 and IN204614 from DGAPA-UNAM.

References

- Aiba, H., Adhya, S., and de Crombrugge, B. 1981. Evidence for two functional gal promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* **256**(22): 11905–11910. PMID:6271763.
- Aizawa, S.I. 2014. Protocols for purification of flagella. *In* The flagellar world. Academic Press. p. 106.
- Aizawa, S.I., Dean, G.E., Jones, C.J., Macnab, R.M., and Yamaguchi, S. 1985. Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **161**(3): 836–849. PMID:2982790.
- Allen, R.D., and Baumann, P. 1971. Structure and arrangement of flagella in species of the genus *Beneckea* and *Photobacterium fischeri*. *J. Bacteriol.* **107**(1): 295–302. PMID:4105030.
- Atsumi, T., Maekawa, Y., Tokuda, H., and Imae, Y. 1992a. Amiloride at pH 7.0 inhibits the Na(+)-driven flagellar motors of *Vibrio alginolyticus* but allows cell growth. *FEBS Lett.* **314**(2): 114–116. doi:10.1016/0014-5793(92)80954-F. PMID:1459240.
- Atsumi, T., McCarter, L., and Imae, Y. 1992b. Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion-motive forces. *Nature*, **355**(6356): 182–184. doi:10.1038/355182a0. PMID:1309599.
- Belas, R. 2014. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends Microbiol.* **22**(9): 517–527. doi:10.1016/j.tim.2014.05.002. PMID:24894628.
- Belas, R., Mileham, A., Simon, M., and Silverman, M. 1984. Transposon mutagenesis of marine *Vibrio* spp. *J. Bacteriol.* **158**(3): 890–896. PMID:6327645.
- Belas, R., Simon, M., and Silverman, M. 1986. Regulation of lateral flagella gene transcription in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **167**(1): 210–218. PMID:3013835.
- Berg, H.C. 2003. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu. Rev. Biochem.* **72**: 19–54. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161737. PMID:12500982.
- Boles, B.R., and McCarter, L.L. 2000. Insertional inactivation of genes encoding components of the sodium-type flagellar motor and switch of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **182**(4): 1035–1045. doi:10.1128/JB.182.4.1035-1045.2000. PMID:10648530.
- Canals, R., Altarriba, M., Vilches, S., Horsburgh, G., Shaw, J.G., Tomás, J.M., et al. 2006. Analysis of the Lateral Flagellar Gene System of *Aeromonas hydrophila* AH-3. *J. Bacteriol.* **188**(3): 852–862. doi:10.1128/JB.188.3.852-862.2006. PMID:16428388.
- Chen, S., Beeby, M., Murphy, G.E., Leadbetter, J.R., Hendrixson, D.R., Briegel, A., et al. 2011. Structural diversity of bacterial flagellar motors. *EMBO J.* **30**(14): 2972–2981. doi:10.1038/emboj.2011.186. PMID:21673657.
- Chernyak, B.V., Dibrov, P.A., Glagolev, A.N., Sherman, M.Y., and Skulachev, V.P. 1983. A novel type of energetics in a marine alkali-tolerant bacterium: Δμ_{Na}-driven motility and sodium cycle. *FEBS Lett.* **164**(1): 38–42. doi:10.1016/0014-5793(83)80014-3.
- DePamphilis, M.L., and Adler, J. 1971. Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **105**(1): 384–395. PMID:4993325.
- Gode-Potratz, C.J., Kustusch, R.J., Breheny, P.J., Weiss, D.S., and McCarter, L.L. 2011. Surface sensing in *Vibrio parahaemolyticus* triggers a programme of gene expression that promotes colonization and virulence. *Mol. Microbiol.* **79**(1): 240–263. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07445.x. PMID:21166906.
- González, Y., Venegas, D., Mendoza-Hernandez, G., Camarena, L., and Dreyfus, G. 2010. Na⁺ and H⁺-dependent motility in the coral pathogen *Vibrio shilonii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **312**(2): 142–150. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02110.x. PMID:20979349.
- Hall, P.G., and Krieg, N.R. 1983. Swarming of *Azospirillum brasilense* on solid media. *Can. J. Microbiol.* **29**(11): 1592–1594. doi:10.1139/m83-243.
- Kawagishi, I., Maekawa, Y., Atsumi, T., Homma, M., and Imae, Y. 1995. Isolation of the polar and lateral flagellum-defective mutants in *Vibrio alginolyticus* and identification of their flagellar driving energy sources. *J. Bacteriol.* **177**(17): 5158–5160. PMID:7665498.
- Kawagishi, I., Imagawa, M., Imae, Y., McCarter, L., and Homma, M. 1996. The sodium-driven polar flagellar motor of marine *Vibrio* as the mechanosensor that regulates lateral flagellar expression. *Mol. Microbiol.* **20**(4): 693–699. doi:10.1111/j.1365-2958.1996.tb02509.x. PMID:8793868.
- Kirov, S.M. 2003. Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **224**(2): 151–159. doi:10.1016/S0378-1097(03)00445-2. PMID:12892877.
- Koike, M., Terashima, H., Kojima, S., and Homma, M. 2010. Isolation of basal bodies with C-ring components from the Na⁺-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* **192**(1): 375–378. doi:10.1128/JB.01121-09. PMID:19880601.
- Kojima, S., Atsumi, T., Muramoto, K., Kudo, S., Kawagishi, I., and Homma, M. 1997. *Vibrio alginolyticus* mutants resistant to phenamil, a specific inhibitor of the sodium-driven flagellar motor. *J. Mol. Biol.* **265**(3): 310–318. doi:10.1006/jmbi.1996.0732. PMID:9018045.
- Kojima, S., Yamamoto, K., Kawagishi, I., and Homma, M. 1999. The polar flagellar motor of *Vibrio cholerae* is driven by an Na⁺ motive force. *J. Bacteriol.* **181**(6): 1927–1930. PMID:10074090.
- Kushmaro, A., Rosenberg, E., Fine, M., and Loya, Y. 1997. Bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **147**(1): 159–165. doi:10.3354/meps147159.
- Kushmaro, A., Banin, E., Loya, Y., Stackebrandt, E., and Rosenberg, E. 2001. *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**(4): 1383–1388. doi:10.1099/00207713-51-4-1383. PMID:11491336.
- Lee, A.G., and Fitzsimons, J.T.R. 1976. Motility in normal and filamentous forms of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Gen. Microbiol.* **93**(2): 346–354. doi:10.1099/00221287-93-2-346. PMID:819618.
- Magariyama, Y., Masuda, S., Takano, Y., Ohtani, T., and Kudo, S. 2001. Difference between forward and backward swimming speeds of the single polar-flagellated bacterium, *Vibrio alginolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**(2): 343–347. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10970.x. PMID:11750825.
- McCarter, L.L. 2001. Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**(3): 445–462. doi:10.1128/MMBR.65.3.445-462.2001. PMID:11528005.
- McCarter, L.L. 2004. Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**(1–2): 18–29. doi:10.1159/000077866. PMID:15170400.
- McCarter, L., and Silverman, M. 1990. Surface-induced warmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol. Microbiol.* **4**(7): 1057–1062. doi:10.1111/j.1365-2958.1990.tb00678.x. PMID:2233248.
- McCarter, L.L., and Wright, M.E. 1993. Identification of genes encoding components of the swarmer cell flagellar motor and propeller and a sigma factor controlling differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **175**(11): 3361–3371. PMID:8501040.
- McCarter, L., Hilmen, M., and Silverman, M. 1988. Flagellar dynamometer controls swarmer cell differentiation of *V. parahaemolyticus*. *Cell*, **54**(3): 345–351. doi:10.1016/0092-8674(88)90197-3. PMID:3396074.
- McClain, J., Rollo, D.R., Rushing, B.G., and Bauer, C.E. 2002. *Rhodospirillum centenum* utilizes separate motor and switch components to control lateral and polar flagellum rotation. *J. Bacteriol.* **184**(9): 2429–2438. doi:10.1128/JB.184.9.2429-2438.2002. PMID:11948156.
- O'Shea, T.M., DeLoney-Marino, C.R., Shibata, S., Aizawa, S.-I., Wolfe, A.J., and

- Visick, K.L. 2005. Magnesium promotes flagellation of *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* **187**(6): 2058–2065. doi:10.1128/JB.187.6.2058-2065.2005. PMID:15743954.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, **9**(7): 671–675. doi:10.1038/nmeth.2089. PMID:22930834.
- Shinoda, S., and Okamoto, K. 1977. Formation and function of *Vibrio parahaemolyticus* lateral flagella. *J. Bacteriol.* **129**(3): 1266–1271. PMID:845115.
- Sosinsky, G.E., Francis, N.R., Stallmeyer, M.J.B., and DeRosier, D.J. 1992. Substructure of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **223**(1): 171–184. doi:10.1016/0022-2836(92)90724-X. PMID:1370543.
- Sussman, M., Loya, Y., Fine, M., and Rosenberg, E. 2003. The marine fireworm *Hermodice carunculata* is a winter reservoir and spring-summer vector for the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Environ. Microbiol.* **5**(4): 250–255. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00424.x. PMID:12662172.
- Terashima, H., Fukuoka, H., Yakushi, T., Kojima, S., and Homma, M. 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**(4): 1170–1180. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05435.x. PMID:17038120.
- Terashima, H., Koike, M., Kojima, S., and 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): 5609–5615. doi:10.1128/JB.00720-10. PMID:20729351.
- Ullitzur, S., and Kessel, M. 1973. Giant flagellar bundles of *Vibrio alginolyticus* (NCMB 1803). *Arch. Mikrobiol.* **94**(4): 331–339. doi:10.1007/BF00769028. PMID:4131532.
- Wilhelms, M., Gonzalez, V., Tomás, J.M., and Merino, S. 2013. *Aeromonas hydrophila* lateral flagellar gene transcriptional hierarchy. *J. Bacteriol.* **195**(7): 1436–1445. doi:10.1128/JB.01994-12. PMID:23335410.
- Youle, M., Rohwer, F., Stacy, A., Whiteley, M., Steel, B.C., Delalez, N.J., et al. 2012. The microbial olympics. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**(8): 583–588. doi:10.1038/nrmicro2837. PMID:22796885.
- Zhao, X., Norris, S.J., and Liu, J. 2014. Molecular architecture of bacterial flagellar motor in cells. *Biochemistry*, **53**(27): 4323–4333. doi:10.1021/bi500059y. PMID:24697492.

Supplementary Table 1. RT-PCR Primers.

Description of Primers

Tag number	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')	Product (bp)
VSAK1_13130	cgcggatccaaggatattctctacgttg	cgcggattctcttcgcaagatctttattag	806
VSAK1_13080	catgcatggagcgtttgagcaacaggttac	catgagatctcataccaggtagctggttag	760
VSAK1_12632	tcatcgtggcgggtcaaattc	ctagtgcacctttacgacgc	797
